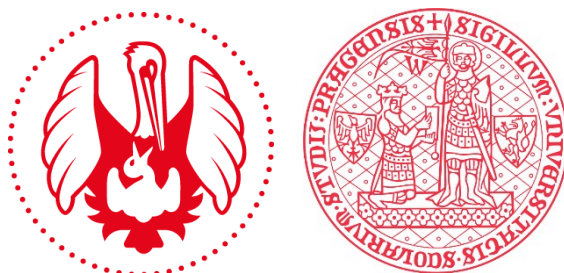


Univerzita Karlova

2. lékařská fakulta

Doktorský studijní program: Preventivní medicína a epidemiologie



MUDr. Andrea Zichová

Pozdní následky protinádorové léčby pro nádory dětského věku

Late effects of oncological treatment for childhood cancers

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20.4.2023

Andrea Zichová

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří se zasloužili o vznik této disertační práce, o můj výzkum a absolvování mého doktorského studia.

Největší díky patří mému školiteli panu profesoru MUDr. Tomáši Eckschlagerovi, CSc. za odborné vedení, cenné připomínky, pomoc s korekturou textu a především za neskonalou trpělivost a pochopení při nelehkém skloubení mých rodinných i studijních povinností.

Velké díky patří také paní doktorce Jarmile Kruseové, Ph. D. za spolupráci při výzkumu pozdních následků u osob po předchozí onkologické terapii.

Dále bych ráda poděkovala kolegyním z laboratoře solidních nádorů Kliniky dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol za pomoc s laboratorní částí mé práce, zejména pak Mgr. Marii Belhajové za odborný dohled a pomoc s vyhodnocením dat a Mgr. Natálii Podhorské a Mgr. Ing. Barbare Feriančikové za kultivaci buněk.

Velké poděkování si také zaslouží Aleš Lukš za jeho nikdy nekončící práci na databázi pacientů léčených u nás na Klinice dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol z které jsem čerpala většinu dat použitých v této disertační práci.

Poděkování dále náleží panu inženýru Petru Hoškovi, Ph.D. z Biomedicínského centra Lékařské fakulty v Plzni za statistické zhodnocení dat týkajících se angiomyolipomů ledvin.

Na závěr bych ještě ráda poděkovala mému manželu Ondřeji Zichovi bez jehož podpory bych studium nikdy nezvládla a hlavně mým dcerám Terezce a Zuzance za jejich trpělivost s „pracující“ maminkou.

Pozdní následky protinádorové léčby pro nádory dětského věku

Abstrakt

Cílem disertační práce bylo zmapovat aktuální poznatky týkající se pozdních následků se zaměřením na sekundární nádory a jejich rizikové faktory, zhodnotit jejich výskyt na Klinice dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol a zaměřit se na relativně časté, dosud v literatuře nepublikované, sporadické angiomyolipomy ledvin. Z celkového počtu 4059 přeživších léčených mezi lety 1975 až 2018 pro solidní nádor na Klinice dětské hematologie a onkologie 2.LF a FN Motol byl u 170 (4,2 %) diagnostikován alespoň jeden sekundární maligní nádor, 21 (0,5 % ze všech přeživších) z nich mělo nádorovou multiplicitu a u 34 (0,8 % ze všech přeživších) z nich se objevil sekundární maligní nádor a jeden nebo více sekundárních benigních nádorů. Mortalita mezi přeživšími se sekundárním maligním nádorem činila 38,2 % (65 pacientů; 1,6 % ze všech přeživších). Nejčastější byly karcinomy štítné žlázy (37; 19,2 %), nádory centrální nervové soustavy (25; 13 %) a sarkomy měkkých tkání (23; 11,9 %). U 119 přeživších (2,9 %) byl diagnostikován jeden či více sekundárních benigních nádorů (a zároveň žádný maligní). Z 1098 přeživších, kteří podstoupili mezi lety 2014 - 2019 ultrazvukové vyšetření ledvin v rámci dlouhodobého sledování po předchozí onkologické terapii, byl u 48 (4,4 %) přítomen sporadický angiomyolipom ledviny a 20 z nich mělo prokázány i další sekundární nádor. Medián věku při diagnóze byl 27,9 let, medián času od primární diagnózy po rozvoj angiomyolipomu byl 22,6 let. U 21 (44 %) přeživších byla potvrzena mnohočetná nebo bilaterální léze a vznik angiomyolipomu koreloval s radioterapií retroperitonea. V experimentální části jsme sledovali míru exprese genu CDKN2A po kultivaci buněk s doxorubicinem, rozdíl oproti kontrole nebyl statisticky významný.

Klíčová slova: pozdní následky, sekundární nádory, rizikové faktory, buněčná senescence, sporadické angiomyolipomy ledvin, gen CDKN2A

Late effects of oncological treatment for childhood cancers

Abstract

The study aimed to describe the occurrence of subsequent neoplasms and their risk factors at the Department of Pediatric Haematology and Oncology, Motol University Hospital, Prague. Moreover, we focused on sporadic renal angiomyolipomas as the most frequent benign subsequent neoplasms. Out of 4,059 survivors treated between 1975 - 2018 for a solid tumor on Department of Pediatric Haematology and Oncology, 170 (4.2 % of all survivors) had at least one subsequent malignant neoplasm, 21 of them (0.5 of all survivors) developed more subsequent malignant neoplasms, and 34 (0.8 of all survivors) developed one subsequent malignant neoplasm and at least one subsequent benign neoplasm. Mortality among patients with subsequent malignant neoplasm was 38 %, i.e. 1.6 % of all survivors. The most common subsequent malignant neoplasms was thyroid carcinoma (37; 19.2 %), central nervous system tumors (25; 13 %), and soft tissue sarcomas (23; 11.9 %). 119 (2.9 %) survivors developed only subsequent benign neoplasm. Out of 1,098 survivors who underwent ultrasound examination between 2014 - 2019, 48 (4.4 %) had sporadic renal angiomyolipoma; moreover, 20 of them also had another subsequent neoplasm. The median age at diagnosis was 27.9 years, and the median time between the first cancer diagnosis and renal angiomyolipoma diagnosis was 22.6 years. In 21 patients (44 %), there were multiple or bilateral lesions, and there was a correlation between development of sporadic renal angiomyolipoma and radiotherapy of retroperitoneum. There was no significant difference in CDKN2A expression between cells treated by doxorubicin and non-treated cells *in vitro*.

Key words: late effects, subsequent neoplasms, risk factors, cellular senescence, sporadic renal angiomyolipomas, CDKN2A gene

Seznam použitých zkratek

ALL = akutní lymfoblastická leukémie

ARF = p14 = *alternative reading frame* (protein kódovaný genem CDKN2A)

BCC = basocelulární karcinom

CAYACS = Childhood, adolescent, young adult cancer survivors

CCSS = Childhood Cancer Survivor Study

CDKN2A = inhibitor cyklindependentní kinázy 2A (gen)

CHT = chemoterapie

CNS = centrální nervová soustava

Ct = treshold cycle = „hraniční“ cyklus u metody PCR v reálném čase

CT = počítačová tomografie = *computed tomography*

DCOG LATER = The Dutch Childhood Cancer Oncology Group-Long-Term Effects After Childhood Cancer

DNA = deoxyribonukleová kyselina

FAB klasifikace = *French American British classification* = klasifikace leukémií

HDF = *human dermal fibroblasts* = lidské kožní fibroblasty

HL = Hodgkinův lymfom

¹³¹I – MIBG = metajodobenzylguanidin s radiojódem = *metaiodobenzylguanidin*

KDHO = Klinika dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Motol

mTOR = *mechanistic/mammalian target of rapamycin* signální dráha

MRI = magnetická rezonance = *magnetic resonance imaging*

NF1 = neurofibromatóza typu 1

NMSC = nemelanomový maligní kožní nádor = *nonmelanoma skin cancer*

p16 = p16^{INK4a} = INK4A = inhibitor cyklindependentní kinázy 2A (protein kódovaný genem CDKN2A)

p21 = inhibitor cyklindependentní kinázy 1

p53 = protein kódovaný genem TP53

PCR = polymerázová řetězová reakce = *polymerase chain reaction*

POT1 = protein, který se váže na telomery a chrání je

Rb1 gen = retinoblastomový gen

RNA = ribonukleová kyselina

RT = radioterapie

SAML = sporadický angiomyolipom ledviny

SBN = sekundární benigní nádor = *subsequent benign neoplasm*

SMN = sekundární maligní nádor = *subsequent malignant neoplasm*

SN = sekundární nádor = *subsequent neoplasm = secondary neoplasm*

STS = sarkom měkkých tkání = *soft tissue sarcoma*

TSC = komplex tuberózní sklerózy

TSC1 = gen kódující proteiny hamartin a tuberin (postižený u tuberózní sklerózy)

TSC2 = gen kódující proteiny hamartin a tuberin (postižený u tuberózní sklerózy)

TPP1 = protein, který se váže na telomery a chrání je

USA = Spojené státy americké = *United States of America*

UZ = ultrazvuk

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Seznam použitých zkratek.....	6
1. Úvod.....	9
1.1 Nádory dětského věku.....	10
1.2 Pozdní následky po onkologické léčbě v dětství.....	13
1.3 Buněčná senescence.....	18
1.3.1 Buněčná senescence, nádorová onemocnění a předčasné stárnutí.....	21
1.3.2 Biologický věk a jeho měření.....	24
1.4 Sekundární nádory.....	25
1.4.1 Rizikové faktory sekundárních nádorů.....	27
1.4.2 Angiomyolipomy ledvin.....	31
2. Hypotézy a cíle práce.....	33
3. Pacienti a metody.....	34
3.1 Výskyt sekundárních nádorů u pacientů léčených v dětství na KDHO.....	34
3.1.1 Pacienti.....	34
3.1.2 Statistické metody.....	35
3.2 Angiomyolipomy ledvin.....	36
3.2.1 Pacienti.....	36
3.2.2 Statistické metody.....	38
3.3 Vliv cytostatik na buněčnou senescenci <i>in vitro</i>	39
3.3.1 Metody.....	39
3.3.2 Statistické metody.....	40
4. Výsledky.....	41
4.1 Výskyt sekundárních nádorů u pacientů léčených v dětství na KDHO.....	41
4.2 Angiomyolipomy ledvin.....	47
4.3 Vliv cytostatik na buněčnou senescenci <i>in vitro</i>	55
5. Diskuse.....	57
6. Závěr.....	63
7.1 Souhrn.....	65
7.2 Summary.....	66
8. Literatura.....	67

1. Úvod

Trendem současné medicíny už není jen samotné vyléčení pacienta, ale velký důraz je kladen i na kvalitu života vyléčených. Nejinak je tomu i v dětské onkologii. Díky pokrokům v diagnostice i léčebných metodách jsme v dnešní době schopni vyléčit přes 80 % dětských onkologických pacientů (Howlader N. et al., 2019). Více než dvě třetiny přeživších se však doživotně potýkají s řadou pozdních následků a téměř polovina z nich je závažná nebo dokonce život ohrožující (Armstrong G. T. et al., 2014; Geenen M. M. et al., 2007; Hudson M. M. et al., 2013). Je tedy zřejmé, že pozdní následky nejenže snižují kvalitu života vyléčených z dětského nádoru, ale také představují závažný medicínský a socioekonomický problém. Zásadním úkolem výzkumu v této oblasti je proto snaha o co nejlepší popsání rizikových faktorů rozvoje pozdních následků. Podle těchto rizikových faktorů se snažíme o optimalizaci dlouhodobého sledování přeživších a tam, kde to povaha nádoru umožňuje, i o úpravu léčebných protokolů s cílem minimalizace rizika.

1.1 Nádory dětského věku

Nádorová onemocnění v dětském věku jsou relativně vzácná, v České republice mají incidenci okolo 20 případů na 100 000 dětí ročně, což odpovídá přibližně 400 případům za rok (Krejčí D. et al., 2018). Dětské nádory se v řadě ohledů liší od dospělých a navíc i dětský organismus má svá specifika, proto je nezbytně nutné, aby byla jejich léčba svěřena do rukou odborníků v oblasti dětské hematologie a onkologie.

Histologické typy nádorů, a především jejich zastoupení, se v dětském věku značně liší od nádorů v dospělé populaci. Přibližně jednu třetinu všech dětských nádorů tvoří leukémie (nejčastěji akutní lymfoblastická leukémie (ALL)), zbylé dvě třetiny tvoří solidní nádory. Typické pro dětské pacienty jsou nádory vyrůstající z nezralých nediferencovaných tkání (tzv. embryonální typy nádorů), mezi které patří neuroblastom, meduloblastom, retinoblastom, nefroblastom a hepatoblastom. Výskyt nádorů v dětství má dvě maxima, jedno u malých dětí ve věku 0 až 5 let a druhé v období puberty a dospívání. Pro kojence a malé děti je nejčastějším nádorem ALL (cca 25 %), nádory centrální nervové soustavy (CNS) (22 %) a již zmíněné nádory z nediferencovaných tkání (zejména neuroblastom (8 %) a nefroblastom (7 %)). V období dospívání převažují maligní lymfomy (25 %), germinální nádory (13 %) a nádory CNS (10 %), časté jsou dále sarkomy měkkých tkání (STS) či sarkomy kostí. V tomto věku se již také objevují karcinomy typické pro dospělé pacienty (Lebl J. et al., 2014; Adam Z. et al., 2010).

Kromě odlišných histologických typů se dětské nádory odlišují svým biologickým chováním, zejména pak agresivním a velmi rychlým růstem a časnou tvorbou metastáz (Koutecký J., 2002; Lebl J. et al., 2014; Adam Z. et al., 2010). Čas potřebný ke zdvojnásobení počtu nádorových buněk, tzv. doubling time, se u dětských nádorů pohybuje v řádu dní, někdy dokonce pouze hodin. Proto je pro vyléčení pacienta klíčová časná diagnóza a co nejrychleji zahájená adekvátní léčba. Na druhou stranu vysoká proliferační aktivita dětských malignit zpravidla vede k jejich vyšší citlivosti k radioterapii (RT) a/nebo chemoterapii (CHT).

U dětských pacientů je nutné zohlednit nezralost tkání a orgánů a také probíhající růst což nás limituje v možnostech použití některých léčebných metod či jejich radikalitě. Příkladem může být kontraindikace ozařování mozku u dětí mladších 3 let anebo nutnost omezení radikalit některých chirurgických výkonů. Naopak benefitem je prakticky absence řady komorbidit komplikujících terapii u dospělých, rychlejší hojení ran a větší tolerance agresivní chemoterapie (a tím i možnost zcela vyléčit pokročilá onemocnění s přítomností metastáz) (Koutecký J., 2002).

Příčina většiny dětských malignit zůstává neobjasněná. Oproti dospělým je zde menší podíl vlivu prostředí (zejména u kojenců a malých dětí lze těžko hovořit o „nezdravém životním stylu“), naopak množství geneticky podmíněných nádorů vzniklých v rámci některého z hereditárních nádorových predispozičních syndromů je vyšší než v dospělé populaci (Adam Z. et al., 2010). U dospělých tvoří geneticky podmíněné nádory cca 5 – 10 %, u dětí se jejich výskyt odhaduje na cca 20 %, ale mnoho genetických syndromů či predispozic zůstává i v současné době neobjasněných. Mezi nejčastější genetické syndromy predisponující ke vzniku nádoru patří Li Fraumeni syndrom, neurofibromatóza typu I (NF1) a II, patogenní změna v Rb1 genu, familiární adenomatózní polypóza, Gardnerův syndrom, Lynchův syndrom, Beckwith-Wiedemannův syndrom anebo tuberosní skleróza (TSC) (Kruseová et al., 2021; Strahm B., Malkin D., 2006; Hisada M. et al., 1998). U dětí s prokázaným genetickým syndromem je nutné pravidelné sledování umožňující včasný záchyt nádoru a případně sekundárního nádoru (SN).

Příznaků nádorových onemocnění dětí je celá řada a většina z nich je nespecifická a vyskytuje se daleko častěji u jiných, méně závažných onemocnění. Přesto je nutné na možnost nádorového onemocnění myslet a v případě nejasných a neustupujících obtíží neprodleně odeslat dítě do specializovaného centra ke včasné diagnóze. Nespecifické příznaky nádorů u dětí a mladistvých zahrnují neprospívání, únavu, malátnost, hmotnostní úbytek, nechutenství, nevysvětlitelné subfebrilie nebo febrilie, bledost, změny chování, povahy a nálad, poruchy spánku a změny pohybového stereotypu (Kepák T. et al., 2005). Specifické příznaky závisí na druhu a lokalizaci nádoru.

Relativní vzácnost zhoubných onemocnění v dětském věku současně s nutností vysoce specializované a komplexní péče vedla k nutnosti centralizace. Momentálně se v České republice nachází šest center pro léčbu akutních leukémií jakožto nejčastějšího dětského zhoubného onemocnění (v Olomouci, Plzni, Hradci Králové, Ostravě, Českých Budějovicích a Ústí nad Labem) a dvě centra, kde se léčí dětské pacienty se všemi typy malignit (v Praze a v Brně). Součástí týmu podílejícího se na komplexní péči jsou nejen lékaři a sestry, ale i patolog zkušený v diagnóze maligních onemocnění dětského věku, pracovníci molekulárněbiologických a cytogenetických laboratoří, zkušený radiologové, chirurgové, fyzioterapeuti, psychologové, sociální pracovníci a další. Klíčovou roli hraje také rodina pacienta (Pacientům a rodinám, 2021).

Základními léčebnými modalitami v dětské onkologii jsou CHT, RT a operace. Od druhé poloviny minulého století, kdy se postupně vyčlenil samostatný obor dětské onkologie, byla vypracována řada léčebných protokolů pro konkrétní diagnózy jakožto přesný návod, jak

postupovat při diagnostice a terapii. U každého dětského pacienta je individuálně zhodnoceno riziko dalšího růstu nádoru, diseminace i předpoklad úspěšného vyléčení (např. s ohledem na histologii nádoru, klinické stádium, věk pacienta, prognostické znaky včetně imunofenotypu a molekulárněgenetických změn) a podle toho je v rámci protokolu zařazen do režimu odpovídající léčby. I nadále probíhají rozsáhlé klinické studie na optimalizaci léčby, které jsou vzhledem k malému počtu dětských onkologických pacientů v Evropě téměř vždy multicentrické a mezinárodní. Jejich cílem není jen zlepšit šanci na vyléčení dítěte (momentálně se v České republice uzdraví okolo 80 % všech dětských onkologických pacientů), ale též omezit na minimum vznik pozdních následků, které negativně ovlivňují kvalitu života vyléčených z dětského nádoru (Lebl J. et al., 2014, Pacientům a rodinám, 2021).

1.2 Pozdní následky po onkologické léčbě v dětství

Pozdní následky po onkologické léčbě v dětství, zkráceně „pozdní následky“ (anglicky *late effects*), jsou jakékoliv zdravotní, psychické i sociální problémy vzniklé v souvislosti s předchozím nádorem dětského věku a jeho léčbou. Některé z nich se objevují bezprostředně po léčbě, jiné až s odstupem několika let či dokonce dekád po ukončení protinádorové terapie. Vznikají v důsledku protinádorové kurativní léčby, která je mnohdy velmi agresivní. Díky ní jsme sice v současné době schopni zajistit dlouhodobé přežití u cca 80 % dětských onkologických pacientů, nicméně některé pozdní následky jsou natolik závažné, že je zcela namístě snaha o optimalizaci léčebných postupů s cílem uzdravit pacienta s co možná nejmenšími pozdními následky (Howlader N. et al., 2019).

Zhodnotit skutečnou prevalenci pozdních následků je úkol ne zcela jednoduchý. Prevalence se v první řadě odvíjí od věku osob zahrnutých do studie a zejména pak od času uplynulého od konce léčby (tzv. *follow-up time*). Čím delší doba uplynula od léčby, tím více pozdních následků pozorujeme, jelikož některé pozdní následky se projeví až s odstupem mnoha let od léčby. Doposud nebylo u většiny pozdních následků prokázáno, že by jejich rozvoj zaznamenal v určitém věku plato či dokonce pokles, naopak s věkem pozdních následků přibývá (Bhakta N. et al., 2017; Friedman D. L. et al., 2010). Prevalence dále záleží na použité metodologii, v úvahu připadají populační studie využívající registry onkologicky nemocných, rozsáhlé kohortové studie využívající dotazníků (zodpoví sami přeživší) nebo studie hodnotící následky v rámci lékařské prohlídky (ať již jednorázové nebo v rámci dlouhodobého sledování). V neposlední řadě také záleží na době, kdy byli přeživší zahrnuti do studie léčení – zjednodušeně řečeno lze říct, že dříve se používaly intenzivnější a agresivnější protokoly i u méně rizikových pacientů, což vedlo ke vzniku většího množství pozdních následků. U novějších protokolů se používá větší stratifikace podle rizika a někdy i podle odpovědi na iniciální léčbu. U méně rizikových pacientů se tedy volí léčba méně intenzivní s menšími vedlejšími účinky a tím i s menším rizikem vzniku pozdních následků (samozřejmě u diagnóz kde je to možné, přičemž vždy pro nás zůstává na prvním místě vyléčení pacienta, tzv. *risk-adapted approach*) (Turcotte L. M. et al., 2017).

Studie u dospělých osob léčených v dětství pro nádor prokázaly zvýšenou morbiditu v souvislosti s pozdními následky. U 60 – 90 % přeživších byl diagnostikován alespoň jeden chronický následek, 20 – 30 % čelilo v dospělosti závažné nebo život ohrožující komplikaci

(Armstrong G. T. et al., 2014; Geenen M. M. et al., 2007; Hudson M. M. et al., 2013). Dále byla ve velkých populačních studiích prokázána častější nutnost lékařské péče než u kontrol srovnatelného stáří a pohlaví (léčba pozdních následků i jejich komplikací a také pravidelné kontroly v rámci dlouhodobého sledování) (Lorenzi M. F. et al., 2011; Rebholz C. E. et al., 2011; Kurt B. A. et al., 2012; Sørensen G. V. et al., 2019; Norsker F. N. et al., 2018). Například v USA je jeden z 1000 mladých dospělých ve věku 20 let vyléčený z nádoru v dětství (Oeffinger K. C., Hudson M. M., 2004). Je tedy nepochybné, že pozdní následky představují závažný medicínský, sociální a ekonomický problém.

Výsledky z CAYACS (Childhood, adolescent, young adult cancer survivors) programu, Britská Kolumbie, Kanada, popisují největší riziko u přeživších po leukémiích a lymfomech, nádorech CNS, sarkomech kostí, STS a nádorech ledvin. Zvýšená morbidita byla popsána pro všechny typy primární léčby i jejich kombinaci, nejvyšší nárůst byl pozorován u přeživších po kombinaci všech tří základních léčebných modalit (RT, CHT a operaci) (relativní riziko 7,1 oproti srovnatelným osobám, které neprodělaly nádorové onemocnění) (Lorenzi M. F. et al., 2011).

CCSS (Childhood Cancer Survivor Study), Spojené státy americké (USA), popisuje počet hospitalizací u přeživších 1,6 krát vyšší než u běžné americké populace. Zvýšená potřeba hospitalizace byla zaznamenána nezávisle na pohlaví, době dlouhodobého sledování a primární diagnóze. Ženské pohlaví, jiné chronické onemocnění a/nebo SN byly asociovány s vyšším počtem hospitalizací (vyjma v souvislosti s těhotenstvím a porodem). Kumulativní incidence závažné, hendikepující, život ohrožující nebo fatální události byla významně větší mezi přeživšími než jejich sourozenci (53,6 % vs. 19,8 %) (Armstrong G. T. et al., 2014; Kurt B. A. et al., 2012).

Nizozemská studie zahrnující 1362 přeživších prokázala minimálně jeden pozdní následek u 75 % z nich, téměř 25 % mělo dokonce pět a více pozdních následků. U 40 % ze všech přeživších byl diagnostikován alespoň jeden závažný, hendikepující anebo život ohrožující následek. Závažné pozdní následky byly pozorovány u 55 % přeživších po předchozí léčbě při níž byla použita pouze RT, u 15 % po samotné CHT a u 25 % pouze po operaci. Nejpostiženější byli přeživší po kostních tumorech a nejméně pozdních následků měli přeživší po leukémii a nefroblastomu (Geenen M. M. et al., 2007).

Mezi nejčastější pozdní následky patří postižení endokrinního a reprodukčního systému (Dixon S. B. et al., 2018). Dalšími pozdními následky bývá postižení srdce, plic,

neurokognitivních funkcí, úzkosti, deprese, bolesti, neuropatie, epilepsie, dyslipidémie, postižení jater, skeletu, ledvin, hematopoetického systému, očí, infekční komplikace a SN. Nejčastější pozdní následky vzniklé v souvislosti s předchozí RT viz Tabulka 1 a v souvislosti s CHT viz Tabulka 2 (Robison L. L., Hudson M. M., 2014; Hudson M. M. et al., 2013; Meijer A. J. M., 2021).

Pozdní následky nejenže zhoršují kvalitu života vyléčených z dětského nádoru, ale mohou být i příčinou jejich časného úmrtí. Nejzávažnější jsou v tomto ohledu SN, kardiotoxicita a pneumotoxicita (Tukenova M. et al., 2011; Armstrong G. T. et al., 2016; Bagnasco F. et al., 2019; Nicholson H. S. et al., 1994; Hawkins M. M. et al., 1990).

Vznik pozdních následků u konkrétního jedince je značně individuální, neboť je ovlivněn velkým množstvím rizikových faktorů (Dixon S. B. et al., 2018). Kromě použité léčby hrají roli histologie, lokalizace a biologické vlastnosti primárního nádoru. Dále rozhoduje věk, pohlaví, růst a vývoj přeživšího a psychologické faktory. Zásadní může být i genetická predispozice či geneticky daná citlivost jedince na nežádoucí vlivy protinádorové terapie. Rozhodující je samotná protinádorová terapie, její intenzita, použití různých léčebných modalit, podpůrná terapie a také komplikace, které se v průběhu léčby vyskytly. Určitou roli hrají komorbidity přítomné před, v průběhu nebo po primární léčbě a také nežádoucí vlivy nezdravého životního stylu (kouření, alkohol, drogy, nevhodná strava, nedostatek pohybové aktivity aj.). Na včasnou diagnózu a úspěšnou léčbu/kompenzaci pozdních následků má vliv přístup pacienta ke zdravotní péči (pravidelné sledování) a jeho compliance. Řada rizikových faktorů je již delší dobu známá a jednoznačně prokázána, dále se však přichází na nové rizikové faktory, které nám pomáhají léčit či předcházet pozdním následkům po onkologické léčbě v dětství. Zásadní roli má znalost jednotlivých rizikových faktorů při managementu správného dlouhodobého sledování po onkologické terapii.

Tabulka 1. Nejčastější pozdní následky vzniklé v souvislosti s předchozí radioterapií

(upraveno z Survivors of Childhood/Adolescent Cancer: Life-long Risks and Responsibilities, Robison L. L., Hudson M. M., 2014)

RT	pozdní následky
kardiovaskulární systém	kardiomyopatie postižení a. carotis nebo a. subclavia, postižení koronárních cév arytmie a převodní poruchy chlopenní vady perikardiální fibróza/perikarditida hypertenze
centrální nervový systém	neurokognitivní deficit včetně sníženého inteligenčního kvocientu, poruchy učení, exekutivních funkcí a pozornosti, snížené psychomotorické tempo, postižení paměti a vizuomotorické koordinace cerebrovaskulární postižení včetně cévní mozkové příhody a okluzivní cerebrální vaskulopatie spasticita, ataxie, dysartrie, dysfágie, parézy, plegie sekundární epilepsie únavový syndrom, bolesti hlavy
endokrinní systém	poškození hypofýzy – pubertas praecox, opožděná puberta, deficit růstového hormonu, selhání adrenokortikální dráhy, deficit folikulostimulační hormon, luteinizační hormon a tyreotropní hormon nadváha, obezita, metabolický syndrom hypotyreóza, hypertyreóza, noduly ve štítné žláze diabetes mellitus
gastrointestinální systém	píštěle a striktury chronická enterokolitida bolesti břicha
reprodukční systém (ženy)	insuficience a. uterina a s tím související predispozice ke spontánní abortům, předčasným porodům, intrauterinní růstové retardaci, narození dětí s nízkou porodní hmotností, vyšší novorozenecká úmrtnost ovariální dysfunkce s opožděnou pubertou, sekundární amenoreou nebo předčasnou menopauzou infertilita
reprodukční systém (muži)	dysfunkce Leydigových buněk s opožděnou pubertou androgenní insuficience poruchy spermioqramu (oligospermie, azospermie), infertilita
játra a žlučové cesty	jaterní fibróza, cirhóza, steatóza, fokální nodulární hyperplázie cholecystolitiásis
muskuloskeletální systém	hypoplázie, fibróza svalů poradiační deformity skeletu, skolióza, vertebralgický syndrom
plíce	plicní fibróza, intersticiální pneumonie restriktivní porucha funkce plic obstruktivní porucha funkce plic
močový trakt	fibróza močového měchýře poruchy močení vezikouretrální reflux, hydronefróza renální insuficience hypertenze
zrak	poradiační katarakta, syndrom suchého oka
sekundární nádory	karcinom štítné žlázy, nádory CNS, sarkomy měkkých tkání, karcinom prsu, akutní myeloidní leukémie, myelodysplastický syndrom, bazocelulární karcinom, meningeomy, angiomyolipomy ledvin, ...
imunitní systém	imunodeficience, časté infekty
hematopoetický systém	anémie, leukopenie, trombocytopenie, trombózy (hluboká žilní trombóza, embolie)

Tabulka 2. Nejčastější pozdní následky vzniklé v souvislosti s předchozí chemoterapií

(upraveno z Survivors of Childhood/Adolescent Cancer: Life-long Risks and Responsibilities, Robison L. L., Hudson M. M., 2014)

skupina cytostatik	cytostatika	pozdní následky
alkylační činidla	busulfan, karboplatina, karmustin, chlorambucil, cisplatina, cyklofosfamid, ifosfamid, lomustin, mechlorethamin, melphalan, procarbazin, thiotepa, dacarbazin, temozolomid	sekundární myelodysplastický syndrom, sekundární akutní leukémie gonadální selhání, infertilita plicní fibróza (při expozici busulfanu, karmustinu nebo lomustinu) abnormality močového traktu (při expozici cyklofosfamidu a ifosfamidu) renální insuficience (při expozici karboplatině/cisplatině a ifosfamidu) ototoxicita (při expozici cisplatině a velmi vysokým dávkám karboplatiny) dyslipidémie (při expozici cisplatině)
antracykliny	daunorubicin, doxorubicin, epirubicin, idarubicin	dysfunkce levé komory srdeční kardiomyopatie arytmie
kortikosteroidy	dexametazon, prednison	snížená kostní denzita, osteoporóza osteonekróza katarakta
vinca alkaloidy	vinkristin, vinblastin	periferní neuropatie
antimetaboly	metotrexát	neurokognitivní postižení leukoencefalopatie jaterní selhání renální insuficience snížená kostní denzita, osteoporóza
epipodofylotoxiny	etoposid, teniposid	akutní myeloidní leukémie

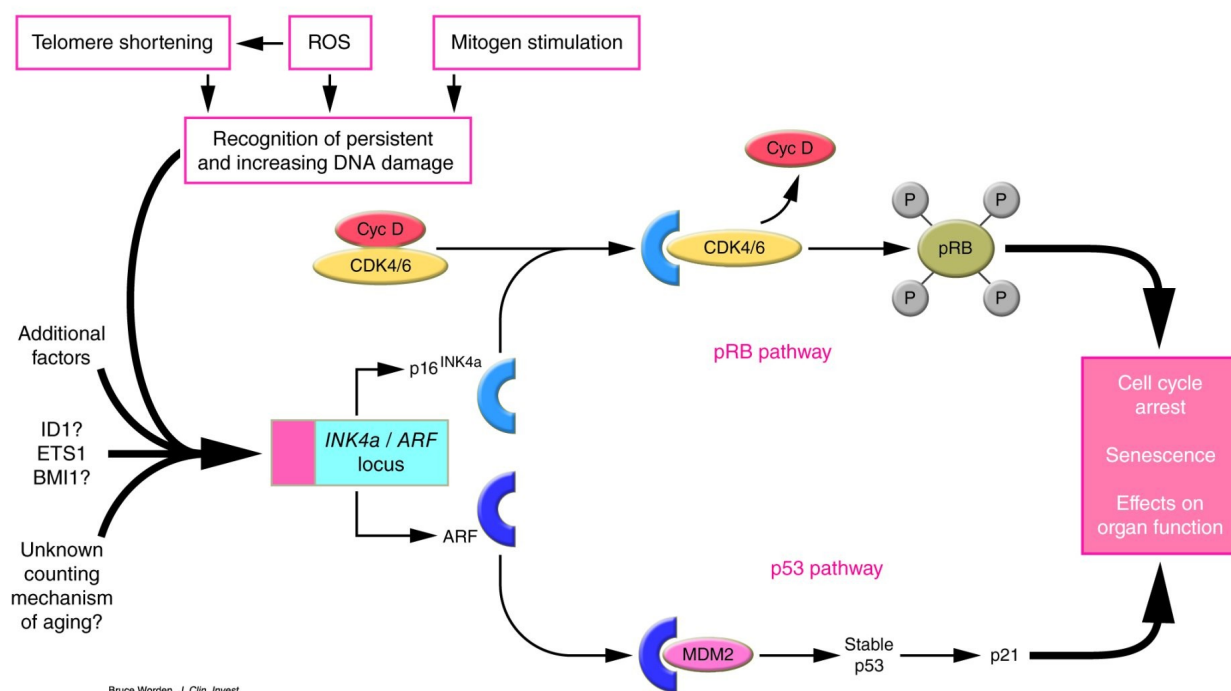
1.3 Buněčná senescence

Společným mechanismem vzniku řady pozdních následků je předčasné biologické stárnutí tkání, orgánů i celého organismu způsobené urychlenou buněčnou senescencí s kumulací senescentních buněk a nedostatkem plně funkčních buněk zajišťujících správné funkce orgánů v plném rozsahu. Buněčná senescence je definována jako proces trvalé zástavy buněčného cyklu a navození specifických fenotypových změn. Dochází k zástavě buněčného dělení, nepokračuje tedy buněčný cyklus, ani nedochází k apoptóze, ale buňka přechází do G0 fáze. V této fázi může buňka setrvávat po dlouhou dobu a je přitom metabolicky aktivní (produkuje celou řadu cytokinů a jiných látek čímž ovlivňuje své okolí), pouze se dále nedělí. Jelikož takto buňka reaguje na různé stresové podněty, zejména pak na poškození DNA nebo onkogenní/mitogenní změny, lze celý proces chápat jako obrannou reakci organismu zabráňující dalšímu zmnožení poškozených buněk. Tímto způsobem nás chrání proti vzniku maligních nádorů, hraje důležitou roli v procesu stárnutí tkání a organismu, při obnově tkání i v průběhu embryogeneze (López-Otín C. et al., 2013; Kuilman T. et al., 2010).

Existují dvě cesty vedoucí k buněčné senescenci. První z nich je tzv. replikativní senescence. Byla poprvé popsána v roce 1961 L. Hayflickem (Hayflick L., Moorhead P. S., 1961; Hayflick L., 1965). Ten popsal fakt, že se buňky pěstované v kultuře rozdělí přibližně padesátkrát a poté stárnou a přestávají se dělit a děje se tak i přes optimální podmínky k růstu a k buněčnému dělení. Později bylo objeveno, že k tomu dochází v důsledku zkracování telomer (Blackburn E. H., Szostak J. W., 1984). Telomery jsou koncové části chromozómů a chrání je před poškozením či fúzí s ostatními chromozómy a hrají důležitou roli při replikaci DNA. U lidí jsou tvořeny mnohonásobným opakováním (repeticí) krátkých hexanukleotidových sekvencí 5'-TTAGGG-3'. Při replikaci DNA syntetizuje enzym DNA polymeráza nové dceřiné vlákno podle původního mateřského vlákna na základě komplementarity bází. DNA polymeráza je schopna nukleotidy pouze připojovat, ne však sama syntézu nového vlákna začít. K tomu je nezbytný tzv. primer, krátká oligonukleotidová RNA, ke které pak připojuje další nukleotidy. Když je syntéza nového vlákna hotová dojde k degradaci primeru, čímž by na konci vlákna zůstala mezera a při každém buněčném dělení by tak došlo ke zkrácení chromozómů. Tento tzv. „*end-replication problem*“ se povedlo objasnit právě v důsledku popsání struktury telomer a objevu enzymu telomerázy (Blackburn E. H., Szostak J. W., 1984; Greider, C. W., Blackburn, E. H., 1985; Greider, C. W., Blackburn, E. H., 1987; Greider, C. W., Blackburn, E. H., 1989). Pokud totiž dochází ke zkracování chromozómů v repetitivních sekvencích telomer, jsou chráněny kódující

sekvence DNA a buňka tedy „neztrácí“ svůj genetický materiál. Některé buňky dokonce dokáží své telomery prodlužovat a kompenzují tím tak následné zkrácení při replikaci. K tomu jim slouží telomeráza. Telomeráza je enzym schopný syntetizovat telomery a jedná se o ribonukleoprotein s RNA-dependentní DNA-polymerázovou aktivitou. Kromě proteinů zajišťujících jeho enzymatickou funkci v sobě totiž nese i krátkou hexanukleotidovou molekulu RNA sloužící jako templát pro syntézu koncové části DNA, telomer. Aktivita telomerázy je v různých buňkách různá, největší je v embryonálních kmenových buňkách a dále je přítomna v mužských zárodečných buňkách a v aktivovaných lymfocytech. V menší míře je detekovatelná u rychle se dělících buněk jako jsou kmenové buňky hematopoetického systému, bazální buňky epidermis anebo buňky intestinálních krypt. Naopak v diferencovaných lidských buňkách telomeráza chybí, a buňky proto mohou podstoupit jen omezený počet buněčných dělení (Holt S. E. et al., 1997; Prowse K. R., Greider C. W., 1995). Vysoká aktivita telomerázy bývá přítomná i u celé řady nádorů (Kim N. W. et al., 1994; Stewart S. A., Weinberg R. A., 2006). V některých nádorových buňkách můžeme však pozorovat prodlužování telomer pomocí alternativního mechanismu, bez přítomnosti enzymu telomerázy (Dunham M. A. et al., 2000). Pokud jsou telomery zkráceny na určitou kritickou délku, buňka buď hyne (apoptóza) nebo vstupuje do senescence (Yu G. L. et al., 1990; Lundblad V., Szostak J. W., 1989; Deng Y. et al., 2008).

Kromě replikativní senescence existuje ještě tzv. urychlená buněčná senescence (*premature/accelerated cellular senescence*), při které dochází k navození senescence nezávisle na délce telomer. Buňka takto reaguje na různé stresové faktory jako je např. oxidativní stres, mitogenní stimulace nebo poškození DNA (Kuilman T. et al., 2010). Rozdíl mezi replikativní a urychlenou senescencí je pouze ve vyvolávajícím podnětu, na který buňka zareaguje, její reakce je pak v obou případech stejná a klíčovou roli přitom hrají p16 a ARF, dva odlišné produkty CDKN2A genu (Campisi J., 1997; Kuilman T. et al., 2010; Alcorta D. A. et al., 1996). Schématické znázornění dvou signálních drah vedoucích k navození senescence můžeme vidět na Obrázku 1 (Satyanarayana A., Rudolph K. L., 2004). V jedné z drah hraje klíčovou roli p16 a Rb1 (tzv. *Rb1 pathway*) a v druhé ARF a protein p53 (tzv. *p53 pathway*).



Obrázek 1: Schématické znázornění dvou signálních drah vedoucích k senescenci. (Satyanarayana, A., Rudolph, K. L., 2004)
 (ROS = *reactive oxygen species* = volné kyslíkové radikály; IN4a/ARF locus = lokus na 9. chromozómu kódující protein p16 a ARF; p16 = p16^{INK4a} = inhibitor cyklin dependentní kinázy 2A; ARF = p14 = *alternative reading frame*; Cyc D = cyklin D; CDK4/6 = cyklin dependentní kináza 4/6; P = fosfát; pRB = protein kódovaný Rb1 genem; p53 = protein kódovaný genem TP53; p21 = inhibitor cyklin dependentní kinázy 1; MDM2 = *mouse double minute 2 homolog* = enzym polyubiquitinylující protein p53)

1.3.1 Buněčná senescence, nádorová onemocnění a předčasné stárnutí

Buněčná senescence hraje klíčovou roli v procesech tumorigeneze a stárnutí. Jelikož buňka podstoupí senescenci v reakci na různé stresové podněty, zejména pak na poškození DNA nebo onkogenní stimulaci, lze celý proces chápat jako obrannou reakci organismu zabráňující zmnožení poškozené buňky, čímž jí chrání před maligním zvratem (Kuilman T. et al., 2010). Když je buňka zbavena své schopnosti podstoupit senescenci nebo apoptózu, bude se dělit stále dále a pokud je poškozen její genom, nesou i její dceřiné buňky toto poškození. Tuto teorii podporuje fakt, že u celé řady nádorových onemocnění můžeme najít změny p53, CDKN2A, případně Rb1 genu, což jsou klíčové faktory v dráhách navozujících senescenci (Nobori T. et al., 1994; Kamb A. et al., 1994; Kandoth C. et al., 2013; Knudsen E. S. et al., 2020). Změny v CDKN2A genu (a tím vznik mutantního p16) jsou přítomny např. u maligních melanomů, nádorů CNS, spinocelulárních karcinomů hlavy a krku, zhoubných nádorů prsu, nádorů pankreatu nebo ALL (Bahau M. et al., 1998). Navzdory faktu, že p16 funguje jako tumor supresorový protein, existují i důkazy prokazující jeho zvýšenou expresi u řady nádorů (Witkiewitz A. K., 2011). Zvýšená exprese proteinu p16 v nádorových buňkách je v tomto případě spojena se ztrátou funkce Rb1 proteinu, který tak není schopen navodit senescenci.

Přeživší po léčbě nádorového onemocnění v dětství se doživotně potýkají s řadou pozdních následků (Armstrong G. T. et al., 2014; Oeffinger K. C. et al., 2006). Tyto následky se do určité míry podobají onemocněním vyskytujícím se se zvýšenou četností ve stáří. Nabízí se tedy otázka, zda u osob po předchozí léčbě nádorového onemocnění dochází k urychlenému stárnutí a s tím spojenému časnějšímu výskytu patologických stavů souvisejících se stářím. Ness et al. zjistili, že výskyt slabosti (ztráta svalové hmoty tzv. sarkopenie, vyčerpanost, nízká aktivita, snížené tempo a slabost měřitelná dynamometrem) byl u skupiny přeživších o průměrném věku necelých 34 let (rozsah 18 – 60 let) stejný jako u zdravých osob starších 65 let a předpokládají tedy, že přeživší mohou mít urychlené stárnutí (Ness K. K. et al., 2013). Bezprostředně po CHT stoupá exprese p16 a ARF v T-lymfocytech, tento vzestup je závislý na intenzitě použité CHT a na její hematologické toxicitě a trvá minimálně 12 měsíců (Sanoff H. K. et al., 2014). Sanoff et al. dále prokázali, že CHT indukuje expresi markerů buněčného stárnutí v lymfocytech odpovídající nárůstu o cca 10 – 15 roků chronologického věku zdravých osob (Sanoff H. K. et al., 2014). Je to dáno toxicitou CHT, která poškozuje nejen nádorové buňky, ale i buňky zdravé. Organismus pak jako obrannou reakci u poškozených buněk navodí senescenci, kdy množství

senescentních buněk lze hodnotit pomocí exprese p16. Řada studií prokázala, že některá onemocnění se u přeživších po předchozí onkologické léčbě projeví v daleko mladším věku než u běžné populace (Konończuk K. et al., 2021; Wang S. et al., 2021). Například ve věku 20 let měli přeživší stejné riziko rozvoje chronických onemocnění jako jejich sourozenci ve věku 50 let (Armenian S. H. et al., 2019). Riziko rozvoje chronických onemocnění vyskytujících se zejména ve stáří (např. kardiovaskulárního onemocnění nebo endokrinopatie) je u těchto osob třikrát vyšší než u kontrolní skupiny tvořené jejich sourozenci (Armenian S. H. et al., 2019; Armstrong G. T. et al., 2014). V naší studii zabývající se výskytem SAML jsme prokázali výskyt SAML u přeživších po léčbě nádorového onemocnění v dětství desetkrát vyšší než v běžné populaci a navíc byly diagnostikovány u mladších osob (medián 27,9 let u přeživších vs. 50 – 60 let v běžné populaci) (Kruseová J. et al., 2021). Stelwagen et al. prokázali „akcelerované vaskulární stárnutí“ (zvýšenou tuhost cév, zvýšený čas ischemie a zotavení v chladovém testu a albuminurii) u dlouhodobě vyléčených z germinálních nádorů varlat (Stelwagen J. et al., 2020). Zhu et al. zase zjistili častý časný výskyt potíží spojených se stárnutím (neschopnost běžných denních aktivit a neschopnost vyjít schody) u vyléčených z karcinomu prsu (Zhu et al., 2020). Dalším příkladem je studie dlouhodobě vyléčených po ALL, která ukázala, že pozdní mortalita byla třikrát větší než u kontrolní skupiny (Dixon S. B. et al., 2020). V jiné studii, také u přeživších po léčbě ALL, Marcoux et al. zkoumali míru senescence v kožních buňkách v závislosti na předchozí léčbě radioterapií (Marcoux S. et al., 2013). Expres p16 v buňkách z kožní biopsie z hlavy několik let po kraniospinálním ozáření byla 5,8 krát vyšší než v biopsii z oblasti hýždí. Ve své studii Bøhns et al. zjistili, že jeden ze čtyř dlouhodobě přeživších po nádoru v období adolescence nebo časně dospělosti trpí chronickou únavou a v multicentrické studii z Velké Británie Spathis et al. zjistili chronickou únavu dokonce u 85 % přeživších po maligním nádoru v adolescenci nebo časně dospělosti (Bøhns S. K. H. et al., 2019; Spathis A. et al., 2017).

Výše uvedené poznatky z literatury jasně ukazují vztah mezi předchozí onkologickou léčbou a nástupem předčasného biologického stárnutí a s ním spojených zdravotních komplikací. U každé osoby dochází v průběhu života k poškození buněk, ať už vlivem vnějších či vnitřních podmínek, s čímž se organismus vyrovnává mimo jiné pomocí buněčné senescence. Nedochází tak k dalšímu dělení poškozených buněk a jejich malignímu zvratu. Bohužel má ale tento velmi prospěšný mechanismus i svou stinnou stránku. S přibývajícím věkem převažuje vznik senescentních buněk nad jejich clearance (eliminací) a dochází tedy k jejich kumulaci. Kromě toho bývají ve vyšším věku omezené nebo zcela vyčerpané regenerační schopnosti tkáně a senescentní buňky nemohou být nahrazeny plnohodnotnými buňkami zajišťujícími správnou

funkci dané tkáně. Tím dochází k poruše funkcí tkání a orgánů a k rozvoji onemocnění spojených se stárnutím. Ve svém důsledku to vede k porušení funkce celého organismu tj. ke stárnutí, proto je buněčná senescence chápána jako *pro-aging* proces (López-Otín C. et al., 2013; Baker D. J. et al., 2016; Tuttle C. S. L. et al., 2019). U přeživších po předchozí terapii nádorového onemocnění je tento proces v důsledku agresivní onkologické léčby s využitím CHT a RT urychlen (větší poškození vede ke vzniku většího množství senescentních buněk což způsobuje rychlejší ztrátu funkcí jednotlivých tkání a orgánů tj. stárnutí) (Wood W. A. et al., 2016).

Kromě CDKN2A genu a jeho produktů ovlivňuje CHT senescenci i prostřednictvím telomer. *In vitro* i *in vivo* zkracuje délku telomer, *in vitro* snižuje telomerázovou aktivitu, snižuje expresi telomerázové reverzní transkriptázy a na telomery se vážících proteinů TPP1 a POT1 (Li P. et al., 2012; Lu Y. et al., 2013). Zkrácené a nefunkční telomery vedou ke genomové nestabilitě a tím ke zvýšenému riziku vzniku nádorů. Ovlivnění telomerázové reverzní transkriptázy a délky telomer by mohlo být jedním z mechanismů zvýšeného rizika vzniku SN, brali bychom tedy vznik SN jako následek předchozí onkologické terapie. Na druhou stranu musíme zvážit možnost, že daný pacient má zvýšenou náchylnost ke vzniku nádorů nebo zvýšenou instabilitu genomu, a proto u něj vznikl primární nádor a posléze i sekundární (jak je to bezpochyby u pacientů s prokázaným genetickým syndromem, ale mohlo by být i u dalších, dosud neznámých mutací). Vztah mezi zkrácením délky telomer a vznikem SN byl prokázán u karcinomu štítné žlázy. U karcinomu prsu a sarkomů nebyl vztah, nejspíše z důvodu malého počtu osob zařazených do studie, statisticky významný (Gramatges M. M. et al., 2014). Dále byl prokázán vztah mezi zvýšenou mortalitou a zkrácením telomer u vyléčených z karcinomu prsu (Duggan C. et al., 2014).

1.3.2 Biologický věk a jeho měření

Společným mechanismem rozvoje pozdních následků u vyléčených z nádorového onemocnění v dětství je urychlené stárnutí a s ním spojený předčasný nástup patologií spojených se stárnutím. U těchto osob tedy pozorujeme vyšší biologický věk, který se výrazně liší od věku chronologického (Wang S. et al., 2021). Abychom lépe porozuměli mechanismu, jakým je biologický věk ovlivněn, mohli předvídat rizikové faktory předčasného stárnutí a v budoucnu snad mohli i terapeuticky zasáhnout, je nutné biologický věk změřit. Bohužel však dosud není znám jediný zcela spolehlivý marker, který by plně odpovídal biologickému věku a je proto nutné k jeho měření přistupovat komplexně a zhodnotit více různých markerů najednou.

Jednou z možností je stanovení biologického věku na základě tzv. *aging clocks* (hodiny ukazující stárnutí). Jedná se o soubor znaků, které mohou předpovědět biologický věk. V současné době existují dva typy těchto hodin – epigenetické a proteomické. Epigenetické hodiny jsou založeny na úrovni metylace tzv. CpG ostrůvků DNA a patří k nim *Horvath's clock*, *Hannum's clock*, *Levine's clock* a další (Hannum G. et al., 2013; Horvath S. C. 2013; Levine M. E. et al., 2015). Johnson et al. a Tanaka et al. zase definovali hodiny založené na biomarkerech souvisejících se stárnutím, které cirkulují v krvi a jsou měřené pomocí proteomických metod (Johnson A. A. et al., 2020; Tanaka T. et al., 2018).

Další možností je zhodnocení míry buněčné senescence. K tomu můžeme využít stanovení aktivity β -galactosidázy (*senescence associated β -galactosidase*), průkaz zvýšené exprese p16, p53 a p21, průkaz vzniku tzv. *senescence – associated heterochromatin foci* nebo třeba zjištění zvýšených hladin některých cytokinů jako je interleukin 6 a interleukin 8, které jsou produkovány senescentními buňkami v rámci tzv. *senescence – associated secretory phenotype* (se senescencí asociovaný sekreční fenotyp) (Hooten N. N. et Evans M. K., 2018). Protein p16 je považován za užitečný biomarker stárnutí, je zvýšeně exprimován ve všech senescentních buňkách a jeho vzestup dobře koreluje s chronologickým věkem (Krishnamurthy J. et al., 2004; Tuttle C. S. L. et al., 2019). Nejjednodušší se zdá stanovení míry jeho exprese z krve, konkrétně z T lymfocytů, kde je jeho exprese nejvyšší (Liu Y. et al., 2009).

1.4 Sekundární nádory

Relativně častým a velmi závažným pozdním následkem, který v mnoha případech vede ke smrti pacienta, jsou sekundární nádory (*subsequent neoplasm* nebo *secondary neoplasm*, SN). SN je definován jako histologicky odlišný nádor, který se objevil minimálně dva měsíce od ukončení léčby pro primární nádor. Může být maligní (*subsequent malignant neoplasm*, SMN) nebo benigní (*subsequent benign neoplasm*, SBN). V některých studiích ještě rozlišují třetí skupinu – kožní nemelanomové zhoubné nádory (*nonmelanoma skin cancer*, NMSC). Do této skupiny jsou řazeny basocelulární (BCC) a spinocelulární karcinomy kůže, tedy karcinomy, které metastazují pouze zřídka a mají velmi dobrou prognózu (Meadows A. T. et al., 1985; Meadows A. T., 2009; Neglia J. P. et al., 2001).

Velkým problémem u pacientů se SMN jsou omezené léčebné možnosti v důsledku dosažení kumulativních dávek některých cytostatik při léčbě prvního nádoru, nemožnosti ozařovat již ozařované oblasti a také poškození orgánů a tkání předchozí léčbou. SMN jsou relativně časté, incidence u přeživších po dětském nádoru se pohybuje mezi 3 – 10 % (Turcotte L. M. et al., 2017; Friedman D. L. et al., 2010; Teepen J. C. et al. 2017). Z těchto důvodů jsou SMN druhou hlavní příčinou úmrtí v této skupině (první je relaps primárního onemocnění) (Armstrong G. T. et al. 2009; Garwicz S. et al., 2011; Fidler M. M. et al., 2016).

I incidenci SBN předpokládáme relativně častou, ale jelikož v naprosté většině případů neohrožují život pacienta, nebývá jim v rámci studií zabývajících se SN věnována větší pozornost. Pokud je nám známo, tak jediné dva dosud publikované články zahrnující také různé benigní SN (nejen meningeomy – ty jakožto jediný SBN bývají zmiňovány v řadě článků) jsou jeden vycházející z americké CCSS a druhý náš (Turcotte M. L. et al., 2015; Zichova et al., 2020). Na SBN jsme se zaměřili ze dvou zásadních důvodů. Zaprvé výskyt SBN může být provázen různými komplikacemi, vyžaduje opakované lékařské prohlídky a nesmíme opomenout jeho značně negativní psychologický dopad na osobu, která se předtím potýkala s maligním onemocněním. Zadruhé nám SBN mohou posloužit jako markery rizika vzniku SMN, jelikož v řadě případů předchází SBN právě výskytu SMN. Otázkou zůstává, do jaké míry je to dáno předchozím poškozením tkání při agresivní onkologické terapii a do jaké míry genetickou predispozicí pacienta k rozvoji nádorů. Určitý vliv samozřejmě má i větší záchyt benigních nádorů při častějších prohlídkách v rámci pravidelného sledování přeživších.

Studie zabývající se problematikou vícečetných SN prokázala výskyt pouze jednoho SN u 6,94 % všech přeživších a dvou a více SN u 2,69 % všech přeživších, jednalo se tedy přibližně o třetinu pacientů s alespoň jedním prokázaným SN (Armstrong G. T. et al. 2011). Kumulativní incidence druhého SN byla 46,9 % 20 let po diagnóze prvního SN. Výskyt dalšího maligního SN byl dokonce vyšší u přeživších, kteří měli NMSC jako první SN než u přeživších s prvním maligním SN (druhý SMN se později vyvinul u 20,3 % přeživších po NMSC a pouze u 10,7 % přeživších po SMN), nicméně musíme vzít v úvahu výrazně vyšší mortalitu při maligním SN než u NMSC, u nichž je mortalita prakticky nulová (zjednodušeně řečeno je možné, že se někteří pacienti s prvním maligním SN „nedožili“ svého druhého maligního SN). Obdobné výsledky ukazuje i jiná studie zaměřená na pacienty s častým výskytem BCC (Cho H. G. et al., 2018). U přeživších po více než šesti BCC prokázali 3,2 – 3,5krát vyšší riziko dalšího maligního nádoru než u zdravé populace. U 20 % z nich prokázali patogenní změny genů zajišťujících opravu DNA, což naznačuje, že by mohl vyšší výskyt BCC sloužit jako marker genetické predispozice k maligním nádorům (tj. i jako marker vzniku SMN). Souvislost NMSC a rozvoje maligního nádoru popisují i další studie (Friedman G. D., Tekawa I. S., 2000; Chen J. et al. 2008).

Nejčastějšími SMN jsou karcinomy štítné žlázy, nádory CNS, STS, karcinomy prsu a leukémie, ale jako SMN byly popsány prakticky všechny maligní nádory (Meadows A. T. et al., 2009; Friedman D. L. et al., 2010; Teepen C. S. et al., 2017). Objevují se i po více než deseti letech od ukončení primární terapie a s délkou sledování jich stále přibývá. Z SBN jsou nejčastější angiomyolipomy ledvin, meningeomy, adenomy štítné žlázy a adenomy/fibroadenomy prsu (Zichová A. et al., 2020; Morgenstern P. F. et al., 2016; Kutsenko A. et al., 2014).

1.4.1 Rizikové faktory sekundárních nádorů

Hlavní rizikový faktor většiny SN je RT (Kamran S. C. et al., 2016; Oeffinger K. C. et al., 2013; Inskip P. D. et al., 2016). Zásadní roli hraje RT při rozvoji karcinomu štítné žlázy a karcinomu prsu, tyto SN následují nejčastěji po předchozí léčbě Hodgkinova lymfomu (HL) jejíž součástí je často ozařování krku a mediastina (Bhatia S. et al., 2003; Dores G. M. et al., 2010; Moskowitz Ch. S. et al., 2015; Kenney L. B. et al., 2004; Bhatti P. et al., 2010; O'Brien M. M. et al., 2010). Proto už v dnešní době u pacientů s HL, kteří dobře odpověděli na iniciální léčbu, ozařování nepoužíváme (protokol EuroNet-PHL-C2 = *European Network of Paediatric Hodgkin Lymphoma Second International Inter-Group Study for Classical Hodgkin Lymphoma in Children and Adolescents*). Kromě RT pro HL zvyšuje riziko karcinomu prsu a karcinomu štítné žlázy také ozáření kraniospinální osy pro nádor centrální nervové soustavy a celotělové ozáření v rámci přípravného režimu před transplantací hematopoetických buněk, u těchto pacientů se však s ohledem na prognózu nádorů radioterapii vyhnout nelze. U karcinomu štítné žlázy nesmíme opomenout ani staging a léčbu neuroblastomu a neuroendokrinních nádorů pomocí ¹³¹I-MIBG (metajodobenzylguanidinu s radioaktivně značeným jódem). U karcinomu prsu zase pozorujeme zvýšené riziko po RT plic pro metastázy nefroblastomu a dalších nádorů, která je však indikovaná pouze v ojedinělých případech (Armstrong G. T. et al., 2009; Stokkevåg C. H. et al., 2014; Baker K. S. et al., 2019; van Santen H. M. et al., 2012; Clement S. C. et al., 2013; Zichova et al., 2020).

Další velmi častou skupinou SN, u které je RT považována za hlavní rizikový faktor, jsou nádory CNS (Bowers D. C. et al., 2013; Taylor A. J. et al., 2010; Little M. P. et al., 1998; Neglia J. P. et al., 2006; Saha A. et al., 2014). Ty vznikají ve velké většině případů právě po předchozí RT nádorů CNS, která se u těchto nádorů často používá (tj. jak primární, tak SN je nádor CNS, avšak histologicky odlišný). Kromě maligních nádorů CNS vede předchozí ozařování krania (zejména při použití vyšších dávek záření) ke vzniku meningeomů (Bowers D. C. et al., 2017; Morgenstern P. F. et al., 2016; Kutsenko A. et al., 2014; Meignin V. et al., 1998). Meningeomy jsou většinou benigní, maligní, tzv. anaplastické meningeomy, tvoří pouze asi 2 % ze všech diagnostikovaných meningeomů (Maggio I. et al., 2021). Přesto ale mohou, s ohledem na svou lokalizaci a mnohdy značné rozměry, vést k vážným zdravotním komplikacím a někdy až ke smrti (Bowers D. C. et al., 2017).

U pacientů léčených v dobách, kdy byly při RT používány vyšší dávky záření, je popsáno vyšší riziko vzniku SN než u pacientů léčených novějšími, lépe cílenými metodami s použitím nižších dávek záření podle moderních protokolů (Turcotte L. M. et al., 2017). Nicméně i v dnešní době zůstává u přeživších výrazně vyšší riziko rozvoje nádoru než u běžné populace, proto je stále namístě zlepšovat léčebné metody s cílem uzdravit pacienta s co možná nejmenšími pozdními následky.

Druhým významným rizikovým faktorem podporujícím vznik SN je CHT (Turcotte L. M. et al., 2019). Dánská DCOG LATER Study (The Dutch Childhood Cancer Oncology Group Long-Term Effects After Childhood Cancer) popisuje zvýšené riziko vzniku všech SN po předchozí léčbě doxorubicinem (Teepen J. C. et al., 2017). Toto riziko je závislé na použité dávce doxorubicinu a zvýšené je zejména riziko vzniku následného karcinomu prsu. U přeživších po CHT (bez předchozí RT hrudníku) bylo popsáno čtyřikrát vyšší riziko vzniku karcinomu prsu než u osob bez CHT, hlavní roli zde hrály alkylační látky a antracykliny použité při léčbě primárního nádoru (Henderson T. O. et al., 2016; Ehrhardt M. J. et al., 2019). Další časté SN, u kterých je rizikovým faktorem CHT, jsou sarkomy, riziko představuje expozice alkylačním látkám a antracyklinům a roste se zvyšující se dávkou cytostatik (Teepen J. C. et al., 2017; Henderson T. O. et al., 2012; Bright C. J. et al., 2018; Fidler M. M. et al. 2018). Konkrétním příkladem může být vznik sarkomu močového měchýře (sarkom měkké tkáně, *soft tissue sarcoma*, STS) po předchozí terapii cyklofosfamidem. Většinou bývá ještě zároveň přítomen genetický syndrom (nejčastěji patogenní změna v Rb1 genu, případně Li Fraumeni syndrom), ale byly popsány i případy bez prokázaného genetického syndromu (Tanguay C. et al., 2003). Henderson et al. popsali zvýšené riziko STS nebo sarkomů kostí v souvislosti s RT, primární diagnózou sarkomu, vícečetnými SN a léčbou vysokými dávkami antracyklinů a alkylačních cytostatik (Henderson T. O. et al., 2012). Zvýšené riziko vzniku STS nebo nádorů kostí mají zejména přeživší po předchozí léčbě familiárního retinoblastomu v důsledku změny Rb1 genu (více než 50 % přeživších se STS jakožto SN má prokázaný genetický syndrom), dále také po předchozím STS, Ewingově sarkomu a osteosarkomu (Wong J. R. et al., 2014; MacCarthy A. et al., 2013).

Mnoho studií zaměřených na přeživší po léčbě dětského nádoru potvrdilo vyšší incidenci SN u žen než u mužů (Armstrong G. T. et al., 2009; Perkins S. M. et al., 2013; Meadows A. T. et al., 2009; Neglia J. P. et al., 2001; Turcotte L. M. et al., 2017). Jedním z vysvětlení může být relativně vysoká incidence karcinomu prsu jakožto jednoho z nejčastějších SN u žen, nikoliv

však u mužů (Kenney L. B. et al., 2004). Druhým může být vyšší citlivost na CHT u žen než u mužů a s tím spojená vyšší toxicita vedoucí ve svém důsledku i k výraznějšímu vyjádření pozdních následků (Huang R. S. et al., 2007; Van Den Berg H. et al., 2015; Chemaitilly W., Sklar C. A., 2019).

Samostatnou, poněkud odlišnou skupinu SMN, tvoří sekundární myelodysplastický syndrom a sekundární leukémie, zejména akutní myeloblastická leukémie. Sekundární leukémie byly popsány po předchozí léčbě HL, leukémie, STS, tumorů CNS, non-Hodgkinského lymfomu, neuroblastomu a nefroblastomu. V kohortě téměř 70000 přeživších minimálně pět let po léčbě bylo popsáno čtyřikrát vyšší riziko rozvoje leukémie než v běžné populaci (Allodji R. S. et al., 2019). K jejich vzniku dochází většinou méně než 10 let po léčbě primárního nádoru a vyšší riziko je spojeno s předchozí léčbou alkylačními činidly a inhibitory topoizomerázy II (Nottage K. et al., 2011). Pacienti s ALL léčení vyššími dávkami etoposidu (kumulativní dávka 4 – 5g/m²) měli zvýšené riziko rozvoje sekundární akutní myeloidní leukémie. Naopak pacienti s germinálním nádorem léčení nižšími dávkami etoposidu (kumulativní dávka 1,5 – 2g/m²) měli toto riziko zvýšené méně (Smith M. A. et al., 1994). Sekundární leukémie po předchozí léčbě inhibitory topoizomerázy II vzniká nejčastěji s odstupem 1 – 3 let od primárního nádoru bez předchozího rozvoje myelodysplastického syndromu, dle FAB klasifikace (*French American British classification*) se většinou jedná o M4 nebo M5 a její prognóza bývá mimořádně špatná. Naopak sekundární leukémie po předchozí léčbě alkylačními činidly se rozvíjí většinou po 5 – 7 letech, předchází jí myelodysplastický syndrom, podle FAB klasifikace jde nejčastěji o typ M1 nebo M2 a její prognóza je poněkud lepší než u sekundární leukémie po inhibitech topoizomerázy II, přesto však horší než u de novo vzniklých leukémií (Ezoe S., 2012; Heuser M., 2016).

V současnosti je známo kolem 300 genetických syndromů, které jsou způsobeny změnami určitého genu (zejména tumor supresorových genů) a vedou k větší náchylnosti ke vzniku nádorů u daného jedince (Van Cott Ch., 2020). Přibližně 40 z nich hraje roli při vzniku nádoru v dětství (Ngeow J. et Eng Ch., 2016; Brodeur G. M. et al., 2017; Perrino M. et al., 2019). Pokud je u přeživšího prokázán genetický syndrom, je nutné jeho pečlivé, pravidelné a dlouhodobé sledování s častějšími kontrolami než u ostatních přeživších, neboť je u něj výrazně vyšší riziko vzniku SN. Mezi nejčastější genetické syndromy v dětské onkologii patří NF1 vedoucí ke vzniku velkého množství neurofibromů a také gliomu optického nervu, popřípadě schwannomu vestibulárního nervu, Li Fraumeni syndrom vedoucí k rozvoji různých nádorů

(STS, osteosarkomu, nádorů CNS, karcinomu prsu, leukémií), patogenní změna Rb1 genu vedoucí kromě retinoblastomu ke vzniku osteosarkomu a STS, TSC vedoucí k častému vzniku angiomyolipomů ledvin a jater, benigních nádorů srdce, maligních nádorů varlat nebo jater, sarkomů, karcinomu prsu a maligního melanomu, Beckwith-Wiedemannův syndrom vedoucí k rozvoji nefroblastomu, hepatoblastomu, karcinomu nadledvin a rhabdomyosarkomu, syndromy vedoucí k častému vzniku endokrinních nádorů (*multiple endocrine neoplasia*), familiární adenomatozní polypóza v dětském věku provázená v dětství zvýšeným výskytem hepatoblastomu a meduloblastomu a další (Strahm B., Malkin D., 2006; Hisada M. et al., 1998; Krutílková V., Eckschlager T., 2009). Kromě těchto syndromů s jasně popsányými změnami v jednom genu, které se dědí autosomálně recesivně, autosomálně dominantně nebo X-vázaně (výskyt v rámci rodiny, tzv. familiární) a dají se relativně snadno vyšetřit, existuje ještě celá řada genů či změn, které přímo „nezpůsobují“ nádorové onemocnění, ale mají vliv na riziko vzniku nádoru. Jedná se o různé změny v genech zajišťující opravu DNA a jejich existenci naznačuje zejména fakt, že i u sporadických nádorů (tj. nepodmíněných v rámci genetického syndromu) je riziko pro příbuzné pacienta s nádorovým onemocněním zvýšené, i když ne tak výrazně, jako v rodinách s prokázaným genetickým syndromem (Vodička P. et al., 2004; Fijneman R. J. A., 2005; Wu P. E., Shen Ch. Y., 2011). Ačkoliv je vliv různých genetických změn (polymorfizmů, mutací nebo chromozomálních aberací) na vznik SN jednoznačně prokázaný a rozhodně nezanedbatelný, otázkou stále zůstává, u kterých přeživších a v jakém rozsahu provádět genetická vyšetření. Limitujícími faktory jsou v tomto případě zejména omezené kapacity zdravotního systému a ekonomická zátěž (Wang Z. et al., 2018; Turnbull C. et al., 2018; Kuhlen M. et al., 2019).

1.4.2 Angiomyolipomy ledvin

Jedním z nejčastějších SBN jsou angiomyolipomy ledvin. Angiomyolipomy ledvin jsou benigní nádory ledvin, postihují jednu nebo obě ledviny a v některých případech mohou být i v rámci jedné ledviny mnohočetné léze. Histologicky jsou složeny z hladké svaloviny, tukové tkáně a cév, zastoupení jednotlivých složek může být různé (Lee K. H. et al., 2019; Hussain T. et al., 2020; Swärd J. et al., 2020). Z klinického hlediska rozlišujeme dva základní typy angiomyolipomů ledvin – SAML a angiomyolipomy v rámci TSC.

Incidence SAML v běžné populaci se odhaduje na 0,1 – 0,44 % (Flum A. S. et al., 2016; Fittschen A. et al., 2014). Jedná se tedy o vzácné nádory, které bývají většinou diagnostikovány jako náhodný nález u starších osob (zpravidla mezi 50 – 60 rokem věku) při ultrazvuku (UZ) či CT břicha z jiné indikace. Jen relativně vzácně způsobují klinické obtíže jako jsou bolesti, nevolnost, hypotenze nebo hypertenze, horečka a anémie. Nicméně v případě velkých SAML může docházet ke krvácení projevujícím se hematurií a vzácně až k selhání ledvin.

Pro SAML je typická jedna unilaterální léze a častější výskyt u žen než u mužů (Lee K. H. et al., 2019; Hussain T. et al., 2020; Swärd J. et al., 2020). Vyšší incidence SAML u žen naznačuje, že by v patogenezi tohoto onemocnění mohly hrát roli pohlavní hormony. Boorjian et al. zkoumali expresi hormonálních receptorů u 110 pacientů, kteří podstoupili resekci pro angiomyolipom ledviny – exprese estrogenových receptorů β byla zjištěna ve všech vyšetřovaných vzorcích, ve většině vzorků byla dále zjištěna exprese androgenních receptorů (cca 80 %), estrogenové receptory α a progesteronové receptory byly exprimovány přibližně u jedné třetiny vyšetřovaných SAML (Boorjian S. A. et al., 2008).

Naproti tomu angiomyolipomy asociované s TSC bývají mnohočetné a často postihují obě ledviny (Fernández-Pello S., 2020; Hussain T. et al., 2020; Swärd J. et al., 2020). Častěji se objeví u mladších osob a není zde patrná ani ženská ani mužská predominance.

TSC je genetický syndrom způsobený změnou tumor supresorového genu TSC1 (cca 1/5 případů) nebo TSC2 (cca 4/5 případů) (Sadowski K. et al., 2016; Jacks S. K. et Witman P. M., 2015). Delece, přestavba či inaktivace v jednom z těchto genů vede k tvorbě abnormálního proteinu hamartinu a/nebo tuberinu, což znemožňuje jejich funkci inhibitoru mTOR signální dráhy (*mechanistic target of rapamycin*, dříve *mammalian target of rapamycin*) a má za následek poruchu regulace buněčného růstu a inhibici apoptózy (MacKeigan J. P. et Krueger D. A., 2015).

V důsledku toho dochází k nadměrné buněčné proliferaci a k tvorbě četných hamartomů v různých lokalizacích jako je kůže, CNS, srdce, plíce nebo ledviny (Randle S. C., 2017; Portocarrero L. K. L. et al., 2018). Klinický obraz je proto značně variabilní a odvíjí se od lokalizace a rozsahu postižení. Postižení ledvin se manifestuje vznikem mnohočetných angiomyolipomů, často bilaterálně a jeho závažnou komplikací je krvácení a selhání ledvin (Bhatt J. R. et al., 2016). Ačkoliv bývají většinou asymptomatické, jsou, spolu s CNS postižením, díky své četnosti a případné závažnosti poškození, zodpovědné za morbiditu a mortalitu pacientů s TSC. Angiomyolipomy bývají přítomny u 55 – 90 % pacientů s TSC (Swärd J. et al., 2020; Flum A. S. et al., 2016). Nachází se u nich bialelická inaktivace v TSC1 nebo TSC2 genu, přičemž stejná bialelická inaktivace TSC1 nebo TSC2 byla prokázána i u sporadických angiomyolipomů, což naznačuje možnou patogenezi těchto nádorů (Calio A. et al., 2021; Giannikou K. et al., 2016; Henske E. P. et al., 1995).

Kromě ojedinělých kazuistik neexistují data o incidenci angiomyolipomů u přeživších po předchozí onkologické léčbě (Neofytou K. et al., 2015; Stone N. N. et al., 1993). Během dlouhodobého sledování přeživších po dětském nádoru na Klinice dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol (KDHO) jsme v rámci pravidelných UZ kontrol diagnostikovali relativně velké množství SAML, tj. angiomyolipomů bez přítomnosti TSC (Zichová A. et al., 2020). Vzhledem k tomu, že k potvrzení této diagnózy i dalšímu sledování jsou nutná opakovaná vyšetření, která zatěžují pacienta, jeho rodinu i celý zdravotní systém, rozhodli jsme se pro detailnější studium výskytu SAML u přeživších a o jejich korelaci s předchozí onkologickou léčbou a s výskytem dalších SN (Kruseová J. et al., 2021).

2. Hypotézy a cíle práce

Hlavním cílem práce je zmapovat výskyt SN u přeživších, kteří byli v dětství léčeni na Klinice dětské hematologie a onkologie 2. lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Motol (KDHO) a zhodnotit jejich rizikové faktory. Z dosavadních poznatků z literatury předpokládáme jako rizikové faktory například RT, některá cytostatika, pohlaví, genetické faktory, nezdravý životní styl (kouření, alkohol, drogy, nedostatek pohybu) a další (Kruseová J. et al., 2023; Dixon S. B. et al., 2018).

Druhým cílem je zaměřit se na výskyt SBN, které na rozdíl od SMN jsou studovány minimálně. Naše dosavadní pozorování ukazují relativně častý výskyt SAML mezi přeživšími. Výskyt a rizikové faktory SAML (tj. angiomyolipomů ledvin bez přítomnosti TSC) nebyl dosud v literatuře publikován (až na ojedinělé kazuistiky) a není jasná jejich souvislost s předchozí onkologickou terapií. Význam SBN je za prvé ve snížení kvality života přeživších, za druhé některé literární údaje i naše dosavadní pozorování naznačují, že by mohly být faktorem signalizujícím vyšší riziko vzniku SMN (Cho H. G. et al., 2018; Turcotte M. L. et al., 2015).

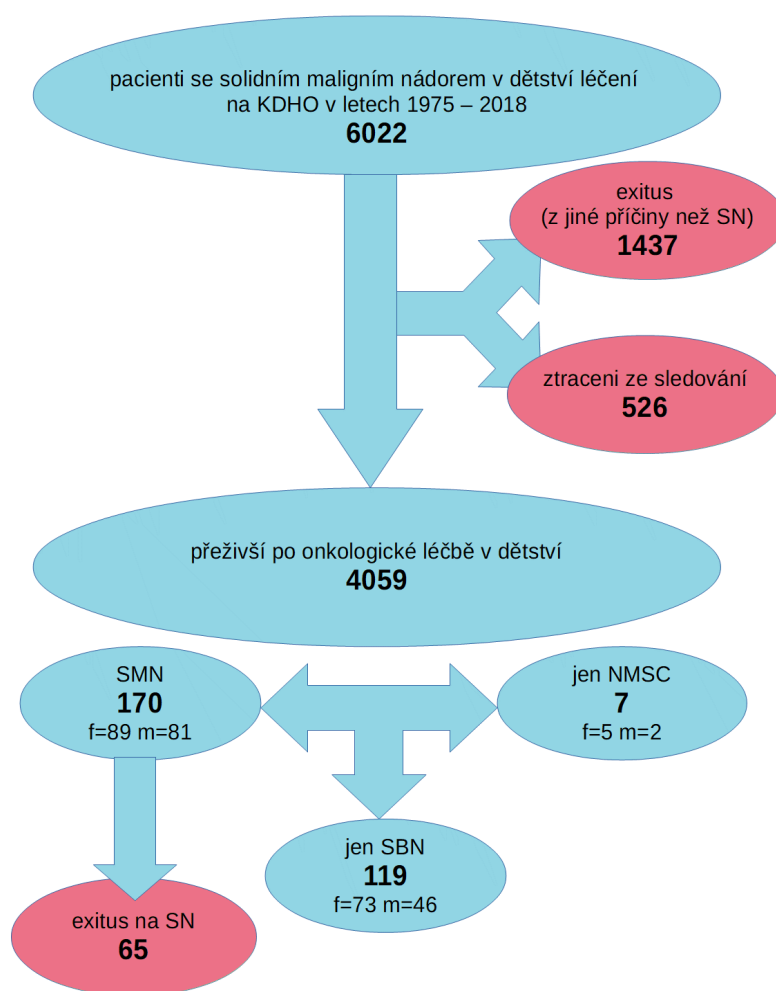
Třetím cílem je zhodnotit vliv cytostatik na buněčnou senescenci *in vitro* prostřednictvím stanovení exprese genu CDKN2A. Na základě poznatků z literatury předpokládáme, že vyšší dávky doxorubicinu povedou k časnějšímu navození senescence a tím ke zvýšené expresi genu CDKN2A (Sanoff H. K. et al., 2014; Krishnamurthy J. et al., 2004; Tuttle C. S. L. et al., 2019).

3. Pacienti a metody

3.1 Výskyt sekundárních nádorů u pacientů léčených v dětství na KDHO

3.1.1 Pacienti

Do studie jsme zahrnuli všechny pacienty léčené pro histologicky potvrzený solidní maligní nádor (tj. maligní nádor včetně lymfomů, mimo leukémie) na KDHO mezi lety 1975 až 2018. Zdrojem dat pro nás byla databáze kliniky, případně nemocniční informační systém, ze kterého jsme chybějící data do databáze doplnili. Celkem se jednalo o 4059 přeživších (Obrázek 2. Charakteristika studované kohorty).



Obrázek 2. Charakteristika studované kohorty

KDHO = Klinika dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN v Motole, SN = sekundární nádor, SMN = sekundární maligní nádor, SBN = sekundární benigní nádor, NMSC = nemelanomové kožní nádory, f = ženy, m = muži

SN je definován jako jakýkoliv histologicky odlišný nádor vzniklý minimálně dva měsíce od konce léčby pro primární nádor, bez ohledu na jeho lokalizaci. Všechny SN byly histologicky potvrzené nádory (v případě sekundární leukémie byla diagnóza potvrzena pomocí cytologie, průtokové cytometrie a molekulárně genetických metod). Jedinou výjimku tvořily v některých případech meningeomy (diagnóza na základě vyšetření magnetickou rezonancí) a angiomyolipomy ledvin. Diagnóza angiomyolipomu ledvin byla stanovena na základě UZ vyšetření, v případě nejasnosti bylo indikováno CT vyšetření anebo vyšetření pomocí magnetické rezonance. Mezi NMSC jsme zařadili spinocelulární a basocelulární karcinom. Meningeomy jsme v rámci naší studie počítali mezi SBN.

SN byly diagnostikovány u pacientů v průběhu pravidelného dlouhodobého sledování po ukončené onkologické léčbě, v případě pacientů ztracených z dlouhodobého sledování jsme se aktivně snažili kontaktovat je nebo jejich rodiče, případně jejich praktického lékaře. Poslední SN v naší studii byl diagnostikován na konci roku 2019. Pravidelné sledování probíhá na naší klinice dle doporučení pro konkrétní typ diagnózy a dle časového odstupu od léčby pro primární nádor. Pro většinu diagnóz je četnost prohlídek v průběhu prvního roku po léčbě každé dva měsíce, v druhém roce každé tři měsíce a v třetím roce každé čtyři měsíce. V průběhu čtvrtého a pátého roku jsou přeživší zváni na kontrolu vždy po půl roce, do 10 let od léčby jednou ročně a dále pak každé 2 – 3 roky. Přeživší po transplantaci krevtvočných buněk, s potvrzeným genetickým syndromem a někteří pacienti s pozitivní onkologickou rodinnou anamnézou jsou zváni na kontroly častěji.

KDHO byla až do roku 1998 jediným centrem pro léčbu dětských pacientů se solidním maligním nádorem v celé České republice a i nyní zajišťuje léčbu pro 2/3 české populace, proto lze výsledky našeho výzkumu do jisté míry vztáhnout na celou českou populaci.

3.1.2 Statistické metody

Pro porovnání kvalitativních charakteristik jsme použili χ^2 test pro 2×2 kontingenční tabulky, P hodnota nižší než 0,05 byla považována za statisticky významnou. Analýzy byly provedeny pomocí statistického programu SPSS (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

3.2 Angiomyolipomy ledvin

3.2.1 Pacienti

Zhodnotili jsme kohortu 1098 přeživších, kteří podstoupili v letech 2014 až 2019 UZ vyšetření břicha v rámci dlouhodobého sledování po předchozí onkologické terapii. Všichni přeživší byli v dětství (věk <19 let) léčeni pro solidní nádor na KDHO a žádný z nich neměl v době primární diagnózy přítomný angiomyolipom ledviny. Charakteristiku studované kohorty shrnuje Tabulka 3.

110 přeživších (cca 10 %) mělo prokázaný genetický syndrom, konkrétně 28 z nich delecii Rb1 genu, 18 NF1, 7 familiární adenomatózní polypózu, 6 Li Fraumeniho syndrom, 5 Beckwith-Wiedemannův syndrom, 5 mnohočetnou endokrinní neoplázií typu 1 a další. U žádného z pacientů nebyla potvrzena TSC (pro TSC jsou angiomyolipomy typické a mají odlišné chování než SAML). U 132 přeživších (12 %) byl kromě SAML diagnostikován i jiný sekundární nádor, 70 z nich mělo alespoň jedním SMN, zbylých 62 mělo kromě SAML ještě další SBN (avšak žádný SMN).

UZ vyšetření bylo součástí pravidelného dlouhodobého sledování přeživších po onkologické terapii. Prvních pět let po léčbě bývají přeživší sledováni především s cílem odhalit případný relaps nádoru (sledování dle příslušného protokolu podle primární diagnózy a případných rizikových faktorů). Následné dlouhodobější sledování v době, kdy je riziko relapsu malé, je zaměřené převážně na včasnou diagnostiku SN a jiných pozdních následků (sledování na KDHO je součástí Motol Late Effect Studies). Vzhled SAML na UZ je jasně definovaný, proto není v naprosté většině případů k potvrzení diagnózy nutná biopsie. Jedná se o výrazně hyperechogenní masu vzhledem k normálnímu renálnímu parenchymu s akustickým stínem, bez kalcifikací (Lee K. H. et al., 2019; Hussain T. et al., 2020; Swärd J. et al., 2020). UZ nálezy byly potvrzeny dvěma zkušenými radiology a byl zhodnocen jejich počet, velikost a případná progresse o více než 3 mm v nejdelším rozměru. Retrospektivně jsme zhodnotili opakovaná UZ vyšetření a podle nich určili, kdy se u daného pacienta SAML objevil poprvé.

Tabulka 3. Charakteristika studované kohorty

primární diagnóza	N	věk dg primárního nádoru (medián roky, IQR)		čas sledování (medián roky, IQR)		Ž/M	GS ^a (%)	SMN ^b (%)	SBN ^c (%)
celkem	1098	4,3	(1,4–11,4)	8,5	(5,1–14,2)	525/573	110 (10)	70 (6,4)	62 (5,6)
nádory kostí	73	10,9	(7,1–13,5)	6,4	(11,0–4,4)	32/41	3 (4,1)	2 (2,7)	7 (10)
CNS nádory	61	5,2	(2,9–9,2)	12,7	(8,9–17,1)	31/30	22 (36)	6 (10)	3 (4,9)
Germinální nádory	63	8,5	(1,1–15,3)	16,1	(9,4–23,6)	30/33	4 (6,4)	2 (3,2)	2 (3,2)
Hodgkinův lymfom	153	14,4	(10,1–16,5)	8,3	(5,4–18,6)	74/79	7 (4,6)	25 (16)	17 (11)
nefroblastom	144	3,1	(1,5–4,4)	12,3	(7,2–16,4)	85/59	12 (8,3)	5 (3,4)	7 (4,9)
neuroblastom	172	1,2	(0,3–2,6)	10,6	(7,1–14,9)	87/85	8 (4,6)	9 (5,2)	6 (3,5)
non-Hodgkinův lymfom	116	8,3	(5,0–12,8)	8,2	(5,4–12,8)	37/79	0	9 (7,8)	9 (7,8)
retinoblastom	64	0,9	(0,6–2,0)	9,3	(5,2–14,4)	31/33	28 (44)	1 (1,6)	0
sarkomy měkkých tkání	119	5,8	(2,0–1,9)	7,8	(4,5–12,6)	59/60	11 (9,3)	7 (5,9)	8 (6,7)
ostatní maligní nádory ^d	133	2,0	(0,9–8,8)	7,4	(3,7–13,2)	59/74	15 (11,4)	4 (3,0)	3 (2,3)

N = počet přeživších, IQR = mezikvartilové rozpětí, Ž = ženy, M = muži, GS = genetický syndrom, SMN = sekundární maligní nádor, SBN = sekundární benigní nádor

^a Procento přeživších s genetickým syndromem (GS)

^b Procento přeživších s maligním sekundárním nádorem (SMN)

^c Procento přeživších s benigním sekundárním nádorem (SBN)

^d Diagnózy: 55 histiocytóza, 32 hepatoblastom, 25 různé karcinomy, 9 melanom, 12 ostatní solidní nádory ≤ 3 od každého typu

3.2.2 Statistické metody

Výskyt SAML (jednoduchá prevalence s ohledem na jednotlivé rizikové faktory) byl vyhodnocen pomocí analýzy přežití, tj. Kaplan – Meierova odhadu podílu pacientů bez SAML a Cox proporcionálního modelu rizik pro odhad poměrů rizik. Uvedeny jsou také frekvence výskytu SAML v našem souboru. K hodnocení středního času vývoje SAML, byly použity dvě metody. Zaprvé analýza přežití založená na lineární interpolaci Kaplan – Meierovy křivky uvádějící odhadovanou dobu, kdy se u poloviny z celkové populace vyvine SAML a zadruhé jednoduchý medián pozorovaných dob, který uvádí střední časový interval těch, u kterých se skutečně vyvinul SAML. Statistické hodnocení provedl Ing. Petr Hošek Ph.D. z Biomedicínského centra, Lékařské fakulty v Plzni. Výpočty byly provedeny pomocí softwaru STATISTICA (StatSoft, Inc.2013, Version 12, www.statsoft.com). Kaplan – Meierovy křivky byly použity k vyloučení bias podmíněného délkou sledování, jelikož pacienti se SAML byli UZ sledováni déle a častěji než většina pacientů s normálním nálezem na ledvinách.

3.3 Vliv cytostatik na buněčnou senescenci *in vitro*

3.3.1 Metody

Jako buněčný model jsme zvolili lidské kožní fibroblasty (HDF). Fibroblasty *in vitro* použil ve svém výzkumu v šedesátých letech 20. století L. Hayflick a popsal na nich omezenou schopnost buněk dělit se, tj. buněčnou senescenci (Hayflick L., Moorhead P. S., 1961; Hayflick L., 1965). Jsou používány v řadě studií a představují ideální model pro studium buněčné senescence nenádorových buněk a jejího ovlivnění cytostatiky (Jones G. E., Wise C. J., 1997; Kisiel M. A., Klar A. S., 2019).

Buňky byly nasazené v počtu 4×10^5 na misku o velikosti 22,1 cm² a po 24 h byl přidán doxorubicin o konečných koncentracích 0,04μM; 0,1μM; 0,2μM a 0,5μM. Po 24 hodinách byly buňky sklizené a zamražené při teplotě – 196 °C. Pro koncentraci doxorubicinu 0,1μM byl proveden ještě jeden experiment, kde byly buňky léčené doxorubicinem 24 hodin stejně jako v předchozím případě, následně však byly promyté a ještě 72 hodin kultivované bez doxorubicinu.

K izolaci RNA byl použit PureLink RNA Mini Kit od firmy Thermo Fisher Scientific podle protokolu od výrobce. Kvantita a kvalita izolované RNA byla ověřena na spektrofotometru NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific).

Následně byla provedena reverzní transkripce pomocí gb Revers Transcription Kit od firmy Generi Biotech a jako templát pro syntézu komplementární DNA bylo použito 500 ng RNA. Reverzní transkripce probíhala v thermocycleru (Thermo Fisher Scientific) po dobu 60 minut při teplotě 42 °C.

Dalším krokem byla amplifikace zvoleného úseku DNA metodou kvantitativní PCR (jinak také PCR v reálném čase neboli *real-time PCR*). V našem případě se jednalo o amplifikaci genu CDKN2A, který je lokalizován na chromozómu 9 (p21.3) a jeho produkt p16 je klíčový pro buněčnou senescenci a míra jeho exprese dobře koreluje s chronologickým věkem (Krishnamurthy J. et al., 2004; Tuttle C. S. L. et al., 2019; Liu Y. et al., 2009). K provedení *real-time PCR* jsme použili gb Easy PCR Master Mix a primery a próby genu hCDKN2A_Q1 a kontrolního genu POLR2A, vše od firmy Generi Biotech. Kontrolní gen POLR2A jsme zvolili jako interní standard, jelikož je jeho exprese v lidských kožních fibroblastech konstantní a není závislá na věku a použité chemoterapii (Díaz-Piña G. et al., 2015). Kvantifikace genové exprese byla provedena v triplicátech na přístroji QuantStudio 3 Real-Time PCR System od firmy

Thermo Fisher Scientific. Teplotní profil byl 95 °C 3 minuty, následně 50 cyklů 95 °C na 10 vteřin a 60 °C na 20 vteřin.

3.3.2 Statistické metody

Relativní rozdíly v genové expresi byly vyjádřeny jako násobek změny a byly získány metodou $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Významnost rozdílů genové exprese byla zhodnocena prostřednictvím programu REST verze 384 www.rest.gene-quantification.info (Pffafel M. W. et al., 2002).

4. Výsledky

4.1 Výskyt sekundárních nádorů u pacientů léčených v dětství na KDHO

Z celkového počtu 4059 přeživších léčených mezi lety 1975 až 2018 pro solidní nádor na KDHO byl u 170 (4,2 %) diagnostikován alespoň jeden SMN, 21 (0,5 % ze všech přeživších) z nich mělo nádorovou multiplicitu (dva a více SMN) a u 34 (0,8 % ze všech přeživších) z nich se objevil SMN a jeden nebo více SBN. Celkem bylo tedy diagnostikováno 193 SMN a 47 SBN. Mortalita mezi přeživšími se SMN činila 38,2 % (65 pacientů), jednalo se tak o 1,6 % ze všech přeživších. Nejčastějšími primárními diagnózami byly HL (50 pacientů; 29,4 % z pacientů se SMN), nádory CNS (28; 16,5 %) a non-Hodgkinův lymfom (17; 10 %) (Tabulka 4. Primární diagnózy). Nejčastější SMN byly karcinomy štítné žlázy (37; 19,2 %), nádory CNS (25; 13 %) a STS (23; 11,9 %) (Graf 1. Sekundární maligní nádory).

U 119 přeživších (2,9 %) byl diagnostikován jeden či více SBN (a zároveň žádný SMN), celkem 146 SBN. Nejčastějšími primárními diagnózami byly nádory CNS (25; 21 % z pacientů se SBN), HL (23; 19,3 %), neuroblastom (14; 11,8 %) a nefroblastom (12; 10,1 %) (Tabulka 4. Primární diagnózy). Nejčastějšími SBN byly angiomyolipomy ledvin (41; 28,1 % což činí 1 % ze všech přeživších), meningeomy (19; 13 %) a adenomy štítné žlázy (15; 10,3 %) (Graf 2. Sekundární benigní nádory). Záchyt SAML byl ovlivněn četností provedených UZ kontrol, mezi přeživšími s UZ břicha (tj. u těch, kde skutečně mohl být zachycen asymptomatický angiomyolipom ledviny) byl SAML diagnostikován u 4,4 % přeživších. Obdobně byla ovlivněn i počet diagnostikovaných meningeomů, jelikož ne každý pacient podstoupil CT nebo magnetickou rezonanci mozku.

Genetický syndrom byl prokázán u 25 pacientů se SMN (14,7 % pacientů se SMN) a u 16 pacientů pouze s SBN (13,4 % pacientů se SBN). Nejčastějšími genetickými syndromy byla NF1 (8 pacientů s SMN a 4 se SBN), Li Fraumeniho syndrom (8 a 2) a patogenní změna Rb1 genu (3 a 2). Dále se vyskytly syndrom mnohočetné endokrinní neoplázie typu 2b, familiální adenomatózní polypóza, Gorlinův syndrom, Peutz-Jaghersův syndrom, syndrom Rubinstein-Taybi, změna NSB1 genu a Beckwith-Wiedmannův syndrom. Skutečná prevalence genetických syndromů u onkologických pacientů však může být odlišná, neboť zdaleka ne všichni pacienti jsou indikováni ke genetickému vyšetření a v řadě případů pacienti nebo jejich zákonní zástupci genetické vyšetření odmítnou. V současnosti je na KDHO zahájen program vyšetření

celoexomové sekvenace u všech pacientů s maligním nádorem s cílem odhalit zárodečné genetické patogenní varianty.

Tabulka 4. Primární diagnózy všech přeživších a přeživších se SN + základní charakteristiky

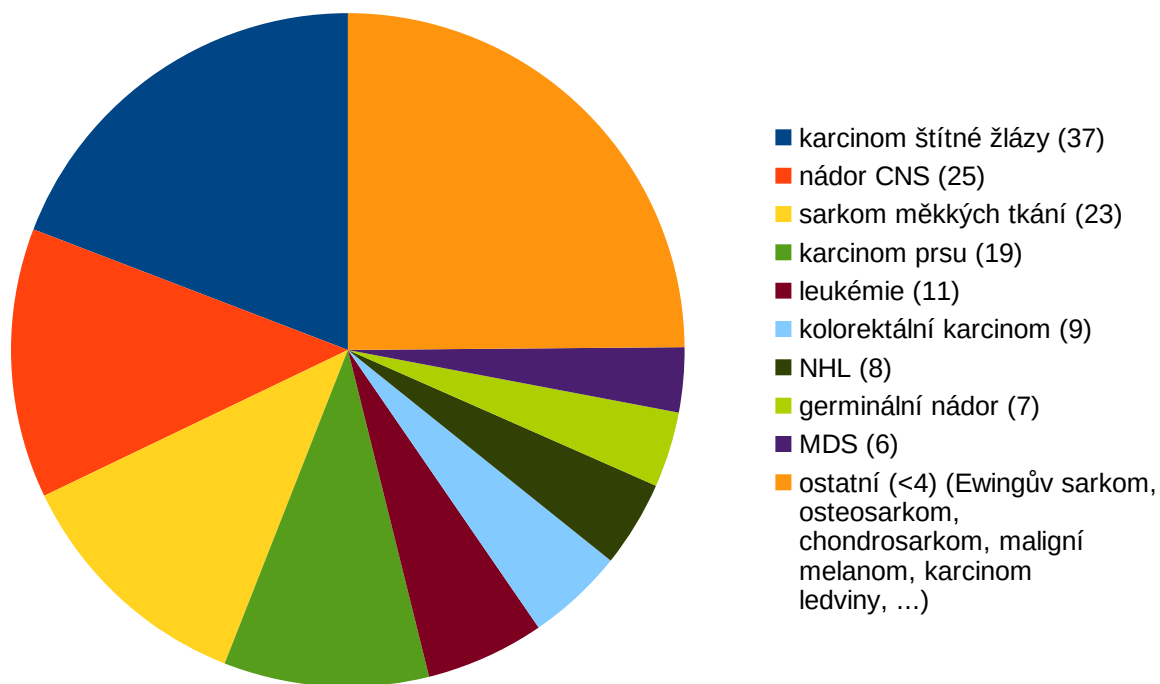
diagnóza	všichni přeživší		přeživší s maligním SN		přeživší pouze s benigním SN		přeživší pouze s NMSC	
	N	%	N	%	N	%	N	%
CELKEM	4059	100	170	4,2	119	2,9	7	0,2
Hodgkinův lymfom	534	13,2	50	9,4	23	4,3	3	0,6
nádor CNS	847	20,9	28	3,3	25	3,0	2	0,2
NHL	382	9,4	17	4,5	9	2,4	0	0
sarkom měkkých tkání	332	8,2	15	4,5	6	1,8	0	0
neuroblastom	345	8,5	11	3,2	14	4,1	0	0
retinoblastom	167	4,1	11	6,6	5	3,0	0	0
Ewingův sarkom	162	4,0	9	5,6	5	3,1	0	0
nefroblastom	378	9,3	8	2,1	12	3,2	2	0,5
osteosarkom	110	2,7	7	6,4	5	4,5	0	0
germinální nádor	351	8,6	5	1,4	4	1,1	0	0
ostatní	451	11,1	9	2,0	11	2,4	0	0

čas od konce terapie pro primární nádor do dg SN	/	/	12 r 6 m +- 9 r 11 m	14 r 11 m +- 9 r 4 m	25 r 3 m +- 3 r 11 m
--	---	---	----------------------	----------------------	----------------------

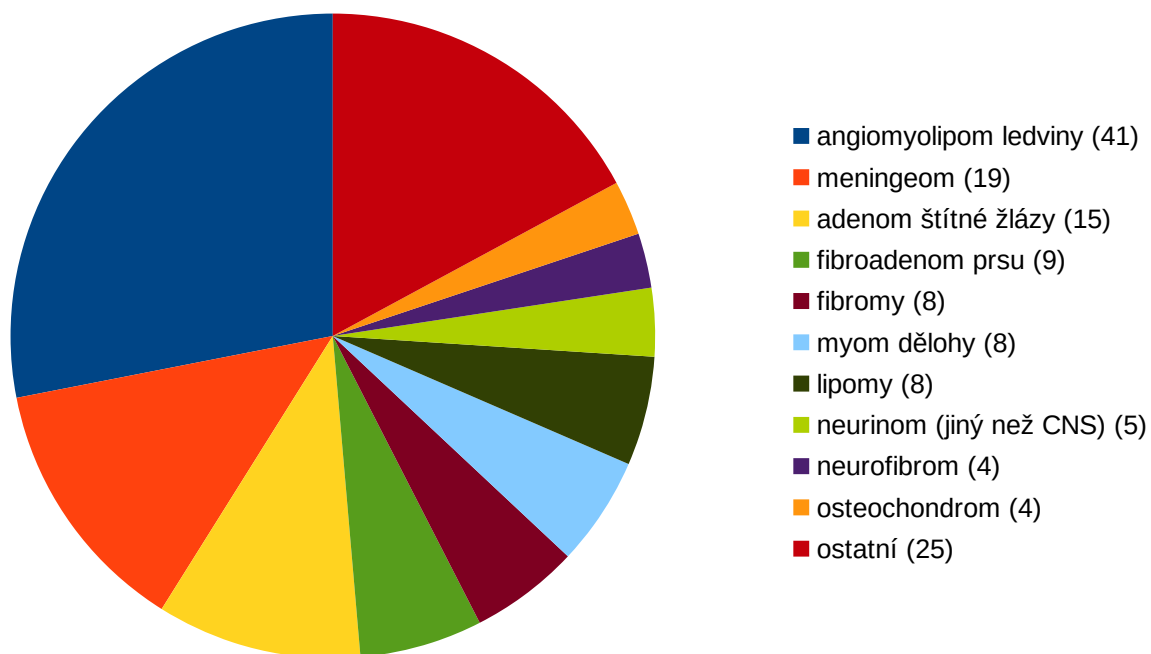
ženy	2040	50,3	89	52,3	73	61,3	5	71,4
muži	2019	49,7	81	47,7	46	38,7	2	28,6

1975-1985	315	7,7	3	/	0	/	0	/
1986-1995	868	21,4	19	/	2	/	0	/
1996-2005	1196	29,5	41	/	17	/	0	/
2006-2018	1680	41,4	107	/	100	/	7	/

procenta u přeživších se SN jsou počítány ze všech přeživších dané dg (např. 50 přeživších se SMN po HL ze 534 všech přeživších po HL = 9,4%)



Graf 1: Sekundární maligní nádory (celkem 193)



Graf 2: Sekundární benigní nádory (celkem 146)

Nejčastějším SMN byl karcinom štítné žlázy, v počtu 37 případů tvořil téměř 1/5 všech SMN. Z histologického hlediska bylo 29 (78,4 %) případů papilární karcinom, 7 (18,9 %) folikulární karcinom a jeden případ (2,7 %) anaplastický karcinom. Naše výsledky potvrzují dobře známý vztah mezi RT a následným poškozením štítné žlázy se vznikem adenomů i adenokarcinomů, 32 (86,5 %) karcinomů vzniklo po předchozí RT v oblasti štítné žlázy. Dvacet pět případů bylo diagnostikováno po předchozí RT horního lymfatického systému pro lymfom (20 HL a 5 non-Hodgkinův lymfom), 2 případy po RT hrudníku pro Ewingův sarkom, 2 případy po celotělovém ozáření při přípravném režimu pro transplantaci krvetvorných buněk a jeden po RT krčních lymfatických uzlin pro metastázy neuroblastomu. Jeden případ mohl mít jako rizikový faktor ozařování kraniospinální osy pro nádor CNS, jelikož i v těchto případech je štítná žláza zasažená určitou dávkou záření, i když menší než samotná mícha. V jednom případě připisujeme vinu za vznik karcinomu štítné žlázy systémové RT s použitím ¹³¹I-MIBG. V 5 případech (13,5 %) jsme neidentifikovali žádný zjevný rizikový faktor (nebyla použita RT nebo byla ozařována lokalita zcela bez možnosti zasažení štítné žlázy RT ani nebyl přítomen genetický syndrom).

Druhým nejčastějším SMN byly nádory CNS (25; 14,8 %) (kromě meningeomů). Naprostá většina z nich (22; 88 %) byla diagnostikována po předchozí RT, v 64 % (16 případů) po RT pro primární nádor CNS. U dvou případů byl prokázán genetický syndrom (NF1 a Li Fraumeni syndrom). U jednoho případu není jasně patrný rizikový faktor, jelikož primárním nádorem byl neuroblastom retroperitonea léčený operací, CHT a RT pouze na oblast rezidua nádoru.

Třetím nejčastějším SMN byly v naší studii STS. Celkem jsme diagnostikovali 23 STS u 20 pacientů (11,7 %). U 8 pacientů (tj. u 40 %) předpokládáme za hlavní rizikový faktor prokázáný genetický syndrom (3 Li Fraumeni syndrom, 3 NF1 a 2 změny Rb1 genu) a v dalších dvou případech ho pokládáme za vysoce pravděpodobný. Bohužel jeden z nich zemřel dříve než bylo možné provést genetické vyšetření a druhý byl dále sledován a léčen na dospělé onkologii v místě bydliště a nepodařilo se nám ho dále zkontaktovat. V prvním případě se jednalo o pacienta s primárním nediferencovaným vřetenobuněčným sarkomem stehna a se SN synoviálním metastatickým sarkomem plic a pleury, zde předpokládáme možnou genetickou predispozici ke vzniku sarkomů. V druhém případě se jednalo o pacientku s retinoblastomem a následným rozvojem mnoha různých SN – maligního melanomu, leiomyosarkomu žaludku, myomů uteru, SAML a mnohočetných neurinomů. Nejčastější lokalizací STS byl močový měchýř (7; 30,4 %

všech sekundárních STS), kde byla kromě genetického syndromu a RT, důležitým rizikovým faktorem předchozí léčba alkylačními činidly (konkrétně cyklofosfamidem). Detailní popis sarkomů močového měchýře uvádí Tabulka 5. U STS v jiných lokalizacích předpokládáme jako hlavní rizikový faktor RT (např. SN sarkom orbity po RT pro retinoblastom).

Tabulka 5. Sarkomy močového měchýře

SN	primární dg	další SN	smrt	CYC	RT	potvrzený genetický syndrom	věk v době dg SN	časový odstup od primární léčby
fibrosarkom	HL	-	ano	ano	ano	-	31,8	21,4
rhabdomyosarkom	HL	menigeom	-	ano	-	-	18,3	14,2
leiomyosarkom	neuroblastom	-	-	ano	-	-	28,1	25,2
leiomyosarkom	Rb	-	-	ano	-	-	25,8	24,4
rhabdomyosarkom	Ewingův sarkom	nediferencovaný sarkom mediastina	ano	ano	ano	Li Fraumeni sy	16,4	5,0
neznámá histologie	Rb	renální angiomyolipom	-	ano	-	Rb mutace	16,0	15,2
fibrosarkom	Rb	testikulární nonseminom	ano	ano	-	-	38,5	38,0

CYC = cyklofosfamid, RT s radiačním polem zahrnujícím močový měchýř nebo v jeho blízkosti

Kvůli komplikacím, které zhoršují kvalitu života přeživších, jsme se dále v naší studii zaměřili na meningeomy a NMSC jakožto na časté „nemaligní“ SN. Celkem jsme diagnostikovali 25 meningeomů, 6 u přeživších před nebo po diagnóze SMN a 19 ve skupině přeživších jen s benigním SN (což tvoří 13 % všech přeživších se SBN). 19 (76 %) meningeomů následovalo po RT pro předchozí nádor mozku a u většiny ostatních také předpokládáme zásadní roli RT jako rizikového faktoru. Jednalo se o pacienty po předchozím celotělovém ozáření (2), profylaktickém ozáření mening při non-Hodgkinovu lymfomu, po RT pro sarkom orbity a frontální kosti, po RT krčních lymfatických uzlin pro HL (SN menigeom ve fossa posterior) a RT krčních lymfatických uzlin pro HL a následnou systémovou RT pro karcinom štítné žlázy.

Z NMSC jsme diagnostikovali 1 spinocelulární karcinom a 17 BCC. Čtrnáct BCC (82,4 %) bylo v ozařované oblasti pro primární nádor, 2 pacienti měli prokázány Gorlinův syndrom a u 1 pacienta jsme neodhalili žádný potenciální rizikový faktor (BCC na kůži hlavy po předchozí léčbě nefroblastomu s nefrektomií, CHT a RT břicha). Spinocelulární karcinom kořene jazyka se vyskytl po předchozí léčbě nasofaryngeálního karcinomu zahrnující RT.

Tabulka 6 zobrazuje výskyt nejčastějších SN z hlediska časového odstupu od léčby. Maximum výskytu karcinomu štítné žlázy a BCC je v druhé dekádě po léčbě. Nádory CNS vykazují stejnou incidenci v prvních 20 letech po léčbě, později dochází k mírnému poklesu. STS i meningeomů s odstupem od léčby výrazně přibývá, maximum vykazují 10 a více let po primární léčbě. V naší studii jsme nedagnostikovali žádný meningeom ani BCC méně než 5 let po léčbě.

Tabulka 6. Výskyt nejčastějších SN z hlediska časového odstupu od konce léčby pro primární tumor

	karcinom štítné žlázy		nádor CNS		sarkom měkkých tkání		meningeom		basocelulární karcinom	
	N	% ze 37	N	% z 25	N	% z 23	N	% z 25	N	% ze 17
<5 let	3	8	7	28	2	8	0	0	0	0
5 až 10 let	7	19	7	28	5	22	3	12	2	12
10 až 20 let	19	51	7	28	8	35	11	44	9	53
>20 let	8	22	4	16	8	35	11	44	6	35

4.2 Angiomyolipomy ledvin

Z 1098 přeživších, kteří podstoupili mezi lety 2014 – 2019 UZ vyšetření ledvin v rámci dlouhodobého sledování po předchozí onkologické terapii, byl u 48 (4,4 %) přítomen angiomyolipom ledviny (a jelikož žádný z nich neměl prokázanou TSC jednalo se ve všech případech o SAML). U 32 z nich byla diagnóza nově potvrzená, u 16 z nich se vyvinul SAML již před rokem 2014, u nikoho však nebyl prokázán v době stanovení diagnózy primárního maligního nádoru. Vzhled SAML na UZ dokumentují Obrázek 3 a Obrázek 4 (snímky poskytl MUDr. M. Kynčl, Ph.D. z Kliniky zobrazovacích metod 2.lékařské fakulty a Fakultní nemocnice Motol). Medián času od diagnózy primárního nádoru do diagnózy SAML byl u našich pacientů 22,62 let (tzv. *observed – median time*). Kaplanův – Meierův odhad proporce pacientů se SAML dosáhl lehce přes 50% (Graf 3, část a). Odhad mediánu času mezi primární diagnózou a vznikem SAML (tzv. *survival – median time*) byl 33,56 let s odhadovanou dvacetiletou prevalencí 7,84 % (95 % konfidenční interval 3,92 – 11,75 %), strmě stoupající k 17,97 % (11,07 – 24,86 %) 25 let od primární diagnózy a 38,21 % (27,49 – 48,93 %) 30 let od primární diagnózy. Medián času sledování přeživších byl 8,52 let (Graf 3, část b), což je výrazně méně než medián času mezi primární diagnózou a vznikem SAML (8,52 vs. 22,62 let). Z tohoto důvodu během našeho sledování nestihl u některých pacientů SAML vzniknout, takže předpokládáme, že s delší dobou sledování bychom diagnostikovali ještě více SAML. Přesto bylo vzhledem k relativně rozsáhlému vzorku přeživších 116 z nich (z 1098 tj. 10,6 %) sledováno déle než 20 let po vzniku primárního nádoru. Medián věku vzniku SAML u našich pacientů byl 27,91 let, vztah věku k diagnóze SAML ukazuje Graf 3, část c. V Grafu 3 části d vidíme Kaplanovu – Meierovu křivku zobrazující odhad incidence v závislosti na věku.

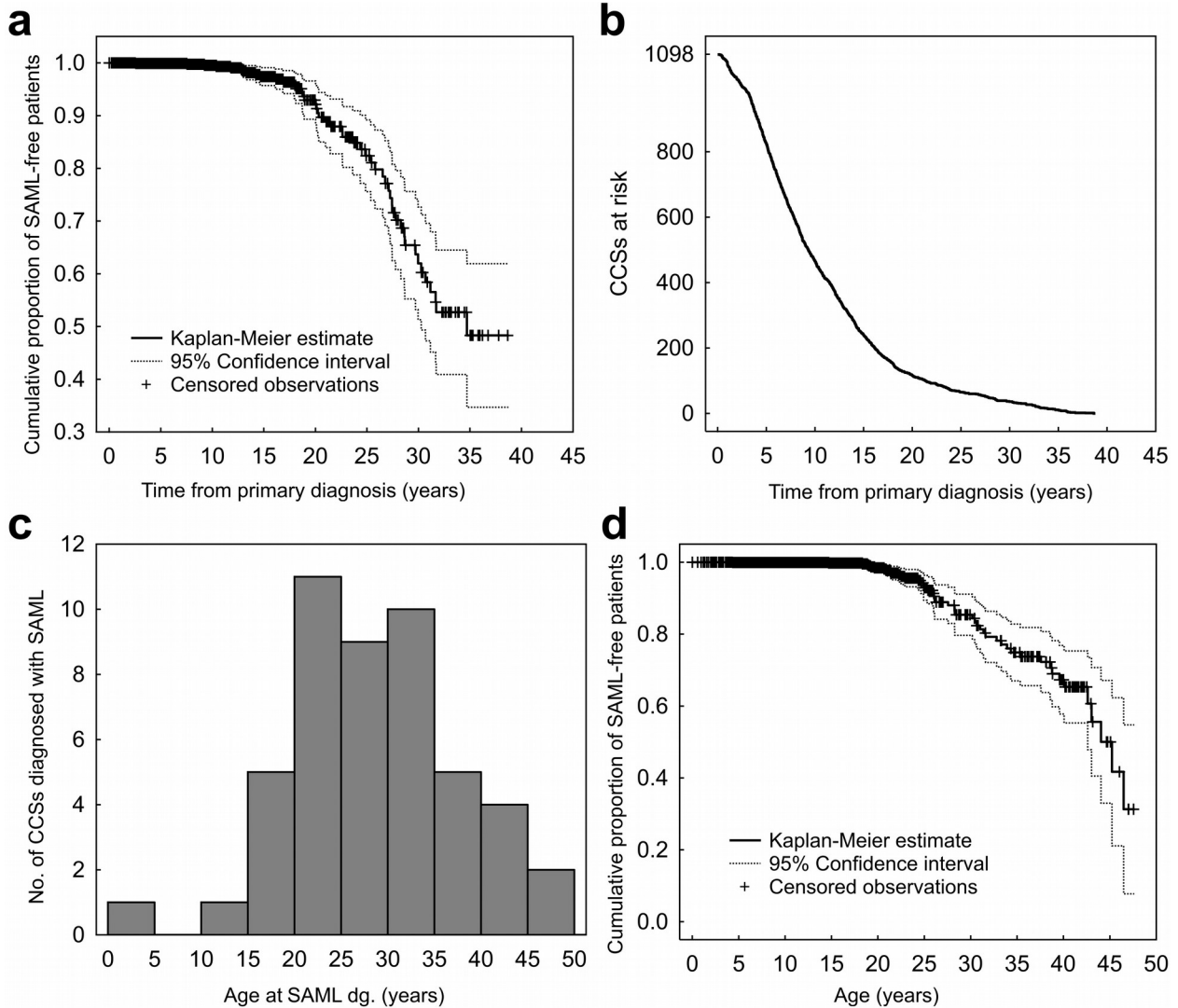
Čtyřicet přeživších bylo během studované periody vyšetřováno opakovaně, u 14 (35 %) z nich byla zaznamenána progresse ve velikosti a u 9 (23 %) progresse v počtu lézí. Průměrná progresse v nejdelším rozměru byla 4 mm a žádná z těchto lézí nevykazovala na následných UZ vyšetřeních atypické znaky.



Obrázek 3. Angiomyolipom ledviny na UZ (náš pacient)



Obrázek 4. Angiomyolipom ledviny na UZ (náš pacient)

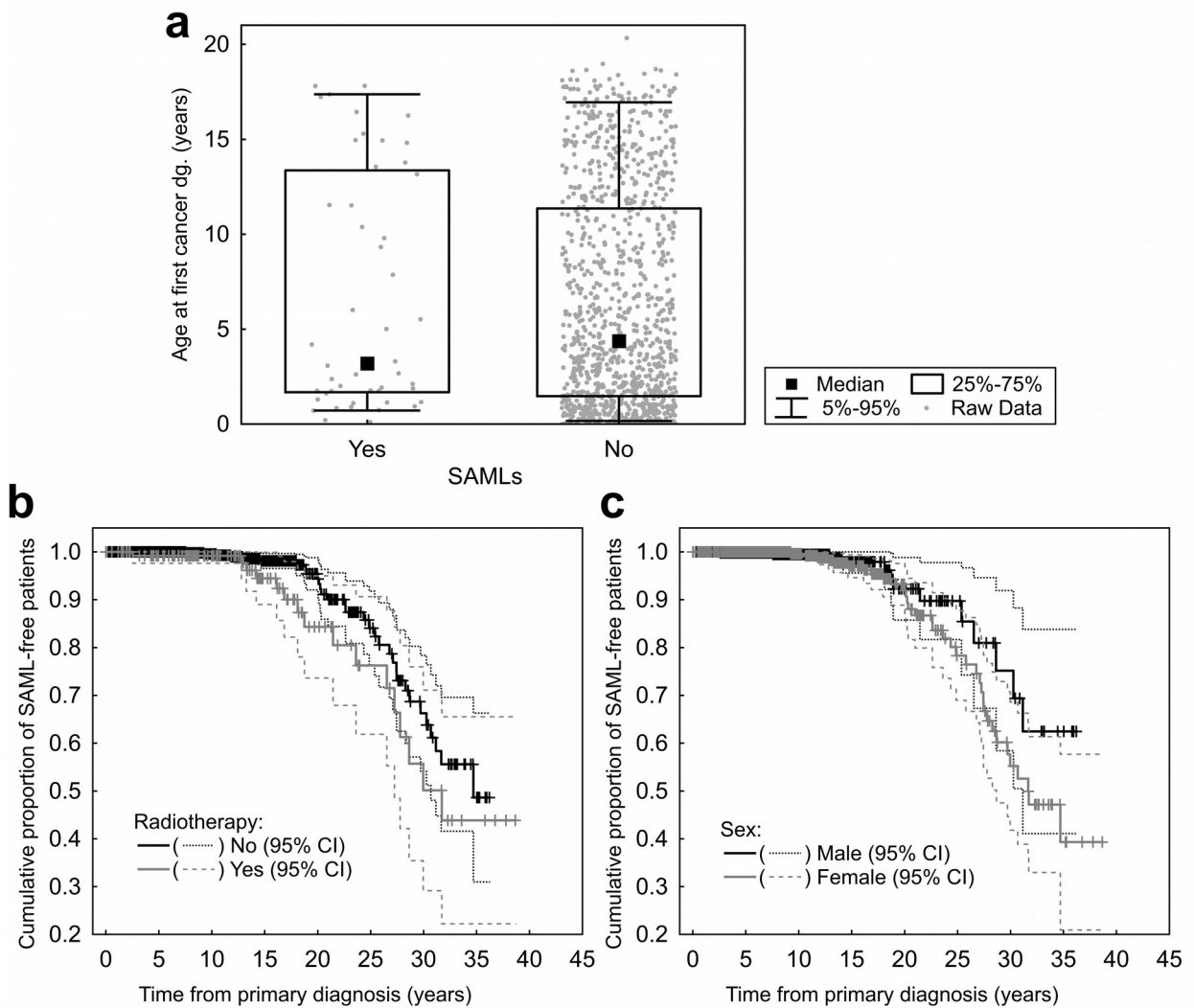


Graf 3. Výskyt sporadických angiomyolipomů ledvin (SAML)

(CCSs = childhood cancer survivors = přeživší, dg = diagnóza)

- a) Kaplanův – Meierův odhad proporce přeživších bez SAML
- b) Počet přeživších bez SAML zůstávajících ve studii v určitém času sledování
- c) Histogram ukazující distribuci věku v době diagnózy SAML
- d) Kaplanova – Meierova křivka ukazující incidenci SAML v závislosti na věku

Přeživší se SAML měli jako primární nádor následující diagnózy: HL (11), neuroblastom (9), nefroblastom (6), retinoblastom (5), STS (5), non-Hodgkinův lymfom (4), germinální nádor (3), nádor kostí (3) a dva jiné maligní nádory. Genetický syndrom byl přítomen u sedmi přeživších se SAML (15 %), konkrétně se jednalo o čtyři přeživší s delecí Rb1 genu, jednoho s Li – Fraumeni syndromem, jednoho s NF1 a jednoho s familiární adenomatózní polypózou. Nezaznamenali jsme vztah mezi genetickým syndromem a zvýšeným rizikem vzniku SAML. Také jsme neprokázali žádný vztah věku v době primární diagnózy a rizika rozvoje SAML (Graf 4, část a). Pozorovali jsme zvýšený výskyt SAML u žen, u přeživších po předchozí RT retroperitonea a u přeživších po předchozí CHT (Tabulka 7), nicméně jednoznačně zvýšené riziko vzniku SAML jsme prokázali pouze po RT retroperitonea (1,6krát vyšší riziko, 95 % CI 0,84 – 3,03 viz Graf 4, část b). Častější výskyt SAML u žen a přeživších po předchozí CHT mohl být v důsledku delšího sledování těchto přeživších (1,33krát delší u žen a 1,7krát delší u pacientů po předchozí CHT).



Graf 4. Vztah věku v době primární diagnózy/RT retroperitonea/pohlaví a rizika vzniku SAML

(dg = diagnóza, SAMLs = sporadické angiomyolipomy ledvin, CI = konfidenční interval)

- a) Vztah věku v době primární diagnózy a rizika vzniku SAML
- b) Vztah radioterapie retroperitonea a rizika vzniku SAML
- c) Vztah pohlaví a rizika vzniku SAML

Tabulka 7. Počet SAML s ohledem na pohlaví, CHT, RT retroperitonea, genetický syndrom a přítomnost SN

	bez SAMLs ^a	všechny SAMLs ^b	jedna unilaterální léze SAMLs ² ; P/L ^c	více lézí, unilaterálně SAMLs ^b	bilaterálně SAMLs ^b
všichni přeživší	1050	48	27 (56 %); 13/14	11 (23 %)	10 (21 %)
ženy	490 (47 %)	35 (73 %)	-	-	-
přeživší po CHT	862 (82 %)	47 (98 %)	-	-	-
přeživší po RT retroperitonea	117 (11 %)	16(33 %)	10 (21 %)	4 (8 %) ^d	2 (4 %)
přeživší s prokázaným genetickým syndromem	103 (10 %)	7(15 %)	2 (4 %)	2 (4 %)	3 (6 %)
přeživší se SN	112 (11 %)	20 (42 %)	11 (23 %)	7 (15 %)	2 (4 %)

(SAML = sporadický angiomyolipom ledviny, CHT = chemoterapie, RT = radioterapie, SN = sekundární nádor, P = pravá ledvina, L = levá ledvina)

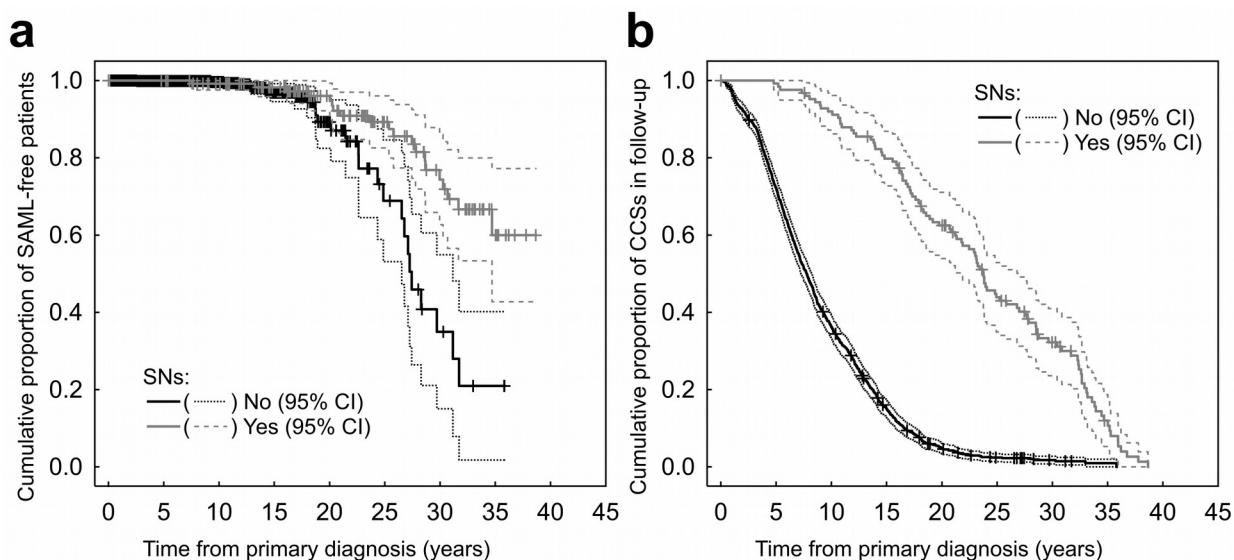
a) procenta vypočítaná z celkového počtu 1050 přeživších bez SAML

b) procenta vypočítaná z celkového počtu 48 přeživších se SAML

c) P/L = postižení pravé/levé ledviny

d) u tří ze čtyřech pacientů po RT retroperitonea byl přítomen ještě další SN

Ze 48 přeživších se SAML byl u z nich 20 (42 %) diagnostikován také jiný SN. Korelace mezi zvýšeným rizikem SAML a vznikem jiného SN byla v naší studii prokázána pouze pro přeživší s dobou sledování delší než 20 let (Graf 5, část a). Relativně vyšší výskyt SAML u přeživších s jiným SN může být tedy důsledkem delšího sledování těchto přeživších (4,76krát vyšší, viz Graf 5, část b). Přehled přeživších se SAML a dalším SN ukazuje Tabulka 8.



Graf 5. Vztah vzniku sekundárního nádoru a SAML

(SN = sekundární nádor, SAML = sporadický angiomyolipom ledviny, CCSs = *childhood cancer survivors* = přeživší po předchozí onkologické léčbě v dětství)

a) Vztah vzniku SN a SAML

b) Doba sledování pacientů se SN vs. bez SN

Tabulka 8. Přeživší se SAML a dalším SN

primární diagnóza	N	medián věku v době dg SAML (roky)	medián času sledování do dg SAML (roky)	Ž/M	GS	SMN ^a	SBN ^b
celkem	20	34,6 (19,1 – 47,5)	27,3 (6,6 – 34,4)	15/5	2	10	17
germinální nádor	3	27,5 (22,9 – 30,2)	26,4 (21,0 – 30,0)	2/1	0	1	2
Hodgkinův lymfom	8	40,9 (21,5 – 47,5)	25,3 (6,6 – 31,7)	7/1	FAP	2	7
neuroblastom	4	30,3 (19,1 – 42,7)	28,5 (18,1 – 32,9)	1/3	0	4	3
nefroblastom	1	27,6	27,5	1/0	0	0	1
non Hodgkinův lymfom	3	38,6 (35,4 – 43,7)	30,7 (20,1 – 34,4)	3/0	0	2	4
retinoblastom	1	26,1	25,4	1/0	Rb1 del	1	0

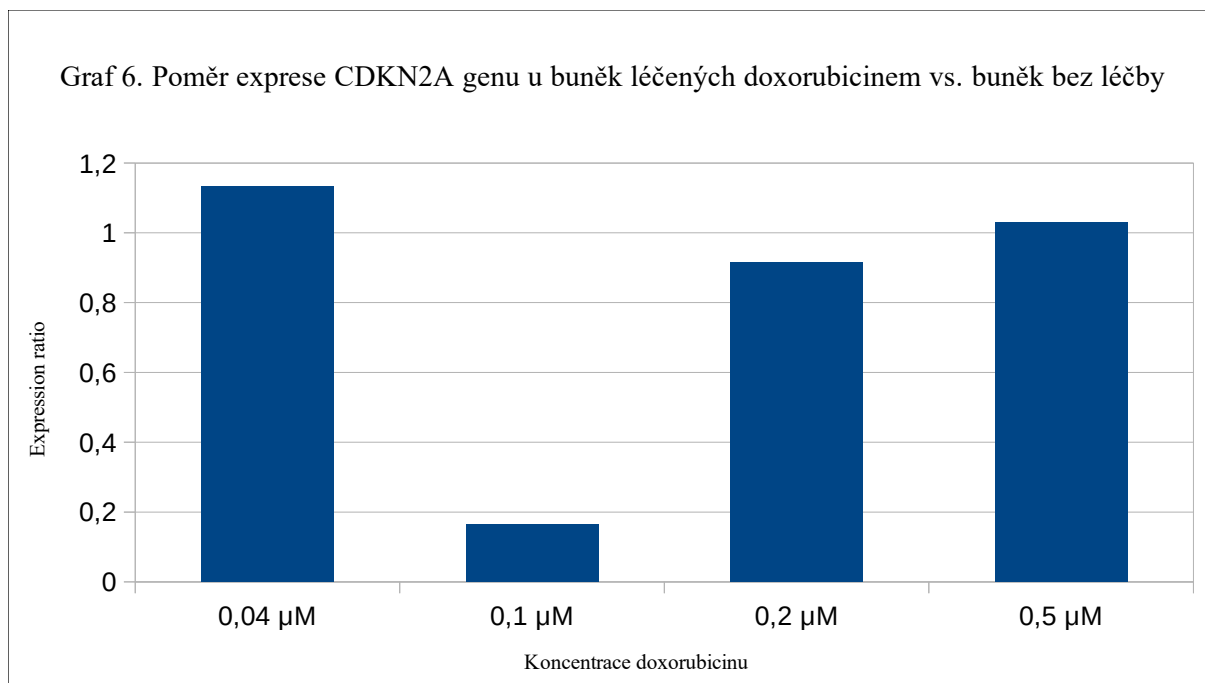
(SAML = sporadický angiomyolipom ledviny, SN = sekundární nádor, SMN = sekundární maligní nádor, SBN = sekundární benigní nádor, GS = genetický syndrom, Ž = ženy, M = muži, GS = genetický syndrom, N = počet diagnóz, dg = diagnóza, FAP = familiární adenomatózní polypóza, Rb1 del = delece Rb1 genu)

^akarcinom (5), nádor centrálního nervového systému (2), germinální nádor (1), neuroblastom (1), sarkom měkkých tkání (1)

^bfibroepiteliální nádor (8), myom (4), nemelanomový kožní nádor (NMSC) (2), nádor kosti nebo chrupavky (2), nádor pochvy periferního nervu (1)

4.3 Vliv cytostatik na buněčnou senescenci *in vitro*

K posouzení vlivu CHT na buněčnou senescenci jsme provedli *in vitro* pokusy s HDF inkubovanými s doxorubicinem. Jako marker buněčné senescence jsme zvolili expresi genu CDKN2A, jehož exprese se prokazatelně zvyšuje při stárnutí a byla popsána i u osob po onkologické léčbě (Campisi J., 1997; Kuilman T. et al., 2010; Alcorta D. A. et al., 1996; Sanoff H. K. et al., 2014). Kultivace probíhala po dobu 24 hodin s různými koncentracemi doxorubicinu i bez doxorubicinu, následně byly buňky sklizené a zamražené při teplotě -196°C . Po rozmražení jsme izolovali jejich RNA, provedli reverzní transkripci a amplifikaci vzniklé komplementární DNA pomocí metody real-time PCR. Získané Ct hodnoty (tzv. *threshold cycle*) jsme pomocí statistického softwaru Rest verze 384 zhodnotili a porovnali mezi sebou. Graf 6 zobrazuje hodnoty *expression ratios* pro jednotlivé použité koncentrace doxorubicinu, hodnoty vyšší než jedna naznačují zvýšenou expresi genu CDKN2A u buněk kultivovaných s doxorubicinem oproti buňkám kultivovaným bez cytostatika, hodnoty nižší než jedna sníženou expresi. Žádný z výsledků nebyl statisticky významný na hladině významnosti 0,05 (1,134 s p-hodnotou 0,649; 0,165 s p-hodnotou 0,06; 0,915 s p-hodnotou 0,414; 1,029 s p-hodnotou 0,547).



Statisticky významný rozdíl v expresi CDKN2A jsme zaznamenali pouze po kultivaci HDF s doxorubicinem o koncentraci 0,1 μ M po dobu 24 hodin s následným promytím a další kultivací po 72 hodin již bez doxorubicinu. Exprese byla snížena s průměrným *expression ratio* 0,382 a $p = 0,001$.

5. Diskuse

Naše výsledky i výsledky dosud publikované v literatuře ukazují, že incidence SMN je relativně častá. Vyvinou se u 3 – 10 % přeživších po předchozí onkologické léčbě v dětství a jsou spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou (Friedman D. L. et al., 2010; Teepen J. C. et al., 2017; Armstrong G. T. et al., 2009; Garwicz S. et al., 2011; Fidler M. M. et al., 2016). Pro porovnání, v naší studii byl diagnostikován SN (SMN, SBN i NMSC) u 7,3 % přeživších a ve velké americké studii CCSS u 9,8 % (Friedman D. L. et al., 2010). Největší rozdíl mezi našimi studii byl v počtu přeživších s NMSC jakožto se SN (6 % vs. 58,2 %). Tento rozdíl mohl být způsoben vyšší incidencí NMSC ve Spojených státech amerických (USA). V USA je incidence NMSC v populaci odhadována na téměř 400/100 000 obyvatel a rok, zatímco v České republice v roce 2018 byla incidence 268,4/100 000 obyvatel a rok (Mudigonda T. et al., 2010; Krejčí D. et al., 2021). Dále se může uplatnit delší doba sledování přeživších v CCSS, rozdíl v zastoupení primárních diagnóz (např. do CCSS byli narozdíl od naší studie zahrnuti i přeživší po léčbě leukémie v dětství) a/nebo rozdíly v použité léčbě u primárního onemocnění (Watt T. C. et al., 2012). Kromě NMSC byl v CCSS vyšší podíl přeživších s karcinomem prsu jakožto SN, v naší studii tvořili přeživší s karcinomem prsu 9,8 % (19 z 193 SMN) a v CCSS 31,4 % (252 z 802 SMN), což mohlo být v důsledku vyšší incidence karcinomu prsu v USA a částečně také v důsledku většího množství přeživších po diagnóze HL v CCSS v porovnání s naší studií (dříve byli všichni pacienti s HL léčeni pomocí RT krku a mediastina což vedlo k častému vzniku karcinomu prsu) (Travis L. B. et al., 2005; Dores G. M. et al., 2010). Další velká studie zaměřená na přeživší po nádorové léčbě v dětství, DCOG LATER Study, popsala výskyt NMSC jen u 3,3 % přeživších, ale vyloučila BCC, které v naší studii tvořily naprostou většinu NMSC (Teepen J. C. et al., 2017). Přeživší s karcinomem prsu jako SN tvořili v DCOG LATER studii 17,3 %, což je hodnota mezi našimi výsledky a výsledky americké CCSS. Výskyt ostatních SN byl obdobný. Nezbytné je však zmínit rozdíl ve skladbě primárních diagnóz v naší, CCSS a DCOG LATER studii, jelikož jiné primární diagnózy, stejně tak jako různě dlouhá doba sledování, vedou ke vzniku různých SN. Zásadním rozdílem byla absence přeživších po léčbě leukémie v naší studii, naopak v CCSS nebyli žádní přeživší po léčbě retinoblastomu nebo germinálního nádoru. Nejčastější diagnóza byla v naší studii i CCSS stejná – HL, nicméně v americké CCSS byla četnost této diagnózy signifikantně vyšší než u nás, naopak v naší studii jsme měli více přeživších po nádorech CNS, ledvin a neuroblastomu. Zastoupení ostatních primárních diagnóz (např. STS, non Hodgkinových lymfomů, osteosarkomu nebo Ewingova sarkomu) bylo v obou

studiích obdobné. V dánské DCOG LATER studii měli statisticky významně více STS a méně HL, ostatní primární diagnózy (s výjimkou leukémie) byly podobné jako v naší studii.

Jedinečnost naší studie spočívá ve faktu, že jsme se zabývali nejen SMN ale i SBN. Jelikož SBN většinou neohrožují život pacienta, nebývá jim v rámci studií zabývajících se SN věnována větší pozornost. Pokud je mi známo, tak jediné dva dosud publikované články zahrnující také různé SBN (nejen meningeomy) jsou jedna studie vycházející z americké CCSS a druhá naše publikace (Turcotte M. L. et al., 2015; Zichova et al., 2020). Ačkoliv SBN způsobují smrt pacienta zcela výjimečně, bývají provázeny řadou komplikací, vyžadují opakovaná lékařská vyšetření, mají negativní vliv na psychické zdraví a kvalitu života pacienta a v neposlední řadě zatěžují zdravotnický i ekonomický systém. Navíc nám SBN mohou sloužit jako rizikový faktor rozvoje SMN. Ze 170 pacientů se SMN v naší studii, jich 34 mělo zároveň maligní i benigní SN a z toho v 12 případech SBN předcházely vzniku SMN. Problematika vícečetných SN byla již dříve studována a publikované výsledky ukazují na výrazně vyšší riziko rozvoje dalšího SN tam, kde již jeden SN vznikl (SMN, SBN i NMSC). U pacientů s NMSC jakožto prvním SN bylo popsáno riziko vzniku SMN 20 %, což se zdá vyšší než po prvním maligním SN, nicméně tento rozdíl může být důsledkem vyšší mortality na SMN než na NMSC (Armstrong G. T. et al., 2011; Cho H. G. et al., 2018).

I když není HL nejčastějším dětským nádorem, u pacientů se SN bývá tato primární diagnóza jedna z nejčastějších (Meadows A. T. et al., 2009; Teepen J. C. et al., 2017). Zaprvé je to v důsledku relativně dobré šance na vyléčení pacientů s primární diagnózou HL, což vede k většímu množství přeživších po této diagnóze. Zadruhé bývalo v minulosti často při léčbě těchto pacientů použito ozařování krku, což při vysoké citlivosti štítné žlázy na radiaci, vede k častému vzniku karcinomů štítné žlázy (Bhatia S. et al., 2003; Bhatti P. et al., 2010; O'Brien M. M. et al., 2010). Moderní léčebné protokoly HL z tohoto důvodu u pacientů s dobrou odpovědí na iniciační léčbu RT krku a hrudníku již nepoužívají (Ozuah N. W. et al., 2018; Burnelli R. et al., 2018). Histologické typy karcinomů štítné žlázy způsobených radiací jsou, podle našich výsledků i výsledků ostatních publikovaných studií, stejné jako v běžné populaci s výjimkou medulárního karcinomu, který se jako SN nevyskytuje (Oeffinger K. C., 2013). Důležitost časně detekce SN demonstruje případ dívky s anaplastickým karcinomem štítné žlázy, která díky jeho časně detekci v rámci pravidelné UZ kontroly přežila 20 let, zatímco běžná doba přežití u anaplastického karcinomu štítné žlázy se pohybuje v řádech měsíců (Maniakas A. et al., 2020; Smallridge R. C. et Copland J. A., 2010).

RT je jasně prokázáný karcinogen a rizikový faktor nejen pro karcinom štítné žlázy, ale i pro karcinom prsu, BCC kůže a meningeom (Bhatti P. et al, 2010; Watt T. C. et al., 2012; Dores G. M. et al., 2010). V mnoha případech se ani nemusí jednat o přímé zasažení rizikového orgánu, stačí i jen menší dávka záření z okraje ozařovaného pole. Příkladem může být zasažení štítné žlázy po ozařování kraniospinální osy, zadní jámy lební, žeber, mediastina nebo systémové podání radiojodu v rámci diagnostického či terapeutického ¹³¹I-MIBG (van Santen H. M. et al., 2012; Clement S. C. et al., 2013). Ve všech těchto případech je tedy nutné myslet na riziko sekundárního karcinomu štítné žlázy a štítnou žlázu při použití těchto metod dostatečně chránit.

Dále jsme na základě našich výsledků zavedli pravidelné dermatologické vyšetření u všech přeživších po předchozí RT s cílem časně detekce BCC, případně spinocelulárního karcinomu kůže. U pacientů s diagnostikovaným SN NMSC jsme pak z důvodu vyššího rizika vzniku dalšího SN zavedli častější kontroly (Cho H. G. et al., 2018). Naopak, ačkoliv jsou meningeomy častým SN po předchozí RT mozku a kraniospinální osy, ani literatura ani naše výsledky neukazují na výrazněji zvýšené riziko vzniku dalšího SN po SN meningeomu (Broniscer A. et al., 2004; Armstrong G. T. et al., 2009).

Přeživší po léčbě dětského nádoru jsou dále ve zvýšeném riziku vzniku STS, v naší studii se jednalo o třetí nejčastější SN. Významnou roli při rozvoji těchto SN hraje genetická predispozice. Mezi našimi přeživšími měla potvrzený nebo vysoce pravděpodobný gentický syndrom polovina ze všech pacientů se sekundárním STS, přičemž většinou byla přítomna hereditární patogenní změna v Rb1 genu (MacCarthy A. et al., 2013; Wong J. R. et al., 2014; Bright C. J. et al., 2018). Nejčastější lokalizací STS byl u našich pacientů močový měchýř. Jednalo se o třetinu přeživších se SN STS a u všech byl v rámci léčby prvního nádoru použit cyklofosfamid. V literatuře lze najít několik kazuistik zmiňujících souvislost leiomyosarkomu močového měchýře a předchozí terapie cyklofosfamidem (Tanguay C. et al., 2003). Kromě genetického syndromu a předchozí léčby alkylačními činidly (zejména cyklofosfamidem) je zde důležitým rizikovým faktorem také RT. Jednotlivé rizikové faktory mohou působit samostatně nebo se jejich účinky potencují.

V naší kohortě jsme prokázali genetický syndrom u 25 přeživších se SMN (14,7 % přeživších se SMN) a 16 přeživších pouze se SBN (13,4 % přeživších se SBN), což je relativně málo. Vzhledem k dříve publikovaným výsledkům i patogenezi nádorových onemocnění jsme předpokládali vyšší vliv genetické predispozice mezi našimi přeživšími (Wang Z. et al., 2018). Nižší podíl prokázaných genetických syndromů je zaprvé z důvodu odmítnutí genetického

vyšetření zákonným zástupcem pacienta a zadruhé z důvodu, že ne u všech pacientů je toto vyšetření indikováno. Kromě toho mohou být v řadě případů za zvýšené riziko SMN zodpovědné změny v tzv. genech nízkého účinku (*low effect genes*), které v současnosti nebývají součástí běžných genetických vyšetření (Wu P. E. et Shen Ch. Y., 2011; Kuhlen M. et al., 2019).

Dále jsme u 41 přeživších (1 % ze všech přeživších) diagnostikovali SAML, což, pokud je nám známo, nebylo dosud publikováno v literatuře. Prevalence tohoto benigního nádoru v běžné populaci bývá udávána v rozmezí 0,1 – 0,6 % (Vos N. et Oyen R., 2018; Flum A. S. et al., 2016; Fittschen A. et al., 2014; Chan K. E. et al., 2018). Z těchto důvodů jsme se rozhodli pro bližší popsání výskytu SAML a jejich rizikových faktorů u našich přeživších. Riziko vzniku SAML je v první řadě odvislé od délky sledování – čím déle jsou přeživší sledováni, tím vyšší je riziko vzniku SAML. Reálně jsme diagnostikovali SAML u 4,4 % přeživších s dostupným UZ břicha (48 z 1098), ale dle Kaplan – Meierova odhadu by při delším odstupu od léčby původního nádoru vznikl SAML u většího počtu přeživších (predikce ukazuje výskyt u 40 % 30 let od léčby prvního nádoru). Tento odhad může být nadhodnocený, nicméně vzhledem k tomu, že většina přeživších s UZ břicha nebyla sledována dostatečně dlouho na to, aby se u ní vyvinul SAML, lze předpokládat, že tento odhad odpovídá skutečnosti více, než naše aktuálně dostupné výsledky. Fittschen et al. ve své studii s 61 389 osobami bez předchozí onkologické léčby zjistili prevalenci SAML 0,44 %, což je desetkrát méně než u našich přeživších po onkologické terapii v dětství s provedeným UZ břicha. Naši přeživší byli navíc podstatně mladší než osoby zahrnuté v ostatních studiích (medián věku, přeživší vs. běžná populace, 27,9 let vs. 50 – 60 let) (Lee K. H. et al., 2019; Swärd J. et al., 2020; Fittschen A. et al., 2014; Fernández-Pelo S. et al., 2020), což nás opět vede k předpokladu, že při srovnatelném věku bude prevalence SAML u přeživších mnohem vyšší než u osob bez předchozí onkologické léčby. Naopak velikost léze a stejná pravděpodobnost postižení obou ledvin byla v rámci naší studie v souladu s dříve publikovanými výsledky u osob z běžné populace (Hussain T. et al., 2020; Lee K. H. et al., 2019; Swärd J. et al., 2020). Medián velikosti našich SAML byl 8 mm, podobně jako výsledky, které publikoval Chan et al. (medián velikosti SAML u 217 pacientů byl 9 mm) (Chan et al., 2018). Na rozdíl od běžné populace však byly u 23 % přeživších prokázány vícečetné léze a u 21 % bilaterální. Hussain et al. ve své kohortě 1493 osob bez předchozí protinádorové léčby prokázal pouze 11 % mnohočetných lézí a 6 % bilaterálních (Hussain T. et al., 2020). Předpokládali jsme v tomto případě roli RT jako rizikového faktoru, nicméně tento předpoklad se nepotvrdil (jen 8 % přeživších s vícečetnými lézemi a 2 % s bilaterálními lézemi mělo předchozí RT postihující oblast ledvin). Dalším rozdílem mezi naší studií u přeživších a studiích u běžné tzn.

„neonkologické“ populace byla rychlost progresu. Vzhledem k limitujícím možnostem UZ při měření rozměrů SAML jsme progresi definovali jako nárůst o více než 3 mm v nejdelším rozměru. Zaznamenali jsme progresi u 14 přeživších se SAML (29 %) během 44 měsíců, což byl rozdíl oproti běžné populaci, kde je většina SAML stacionární (Hussain T. et al., 2020; Fernández-Pelo S. et al., 2020; Chan K. E. et al., 2018). Lze tedy uzavřít, že u přeživších je častější výskyt SAML, které se navíc od SAML v „neonkologické“ populaci liší časnějším věkem vzniku, častější progresí a vícečetným nebo bilaterálním výskytem. Ačkoliv žádný z našich pacientů se SAML neměl prokázanou TSC, tyto charakteristiky více odpovídají právě angiomyolipomům vyskytujícím se při TSC než sporadickým angiomyolipomům. Tato podobnost naznačuje možnou společnou patogenezi těchto onemocnění, ale tuto hypotézu je třeba ověřit dalším výzkumem. Obdobně byla popsána korelace mezi vznikem SAML a přítomností dalších genetických syndromů jako jsou NF1, Li Fraumeni syndrom a syndrom mnohočetné endokrinní neoplázie typu 1, nicméně s daleko nižším procentem výskytu než u TSC, kde je angiomyolipom přítomen u 55 – 90 % pacientů (Swärd J. et al., 2020; Flum A. S. et al., 2016; Neofytou K. et al., 2015; Stone N. N. et al., 1993; Dong Q. et al., 1997). V naší studii byl navíc prokázán zvýšený výskyt SAML u pacientů s dalším SN a ve 30 % diagnóza SAML předcházela vzniku SN. Z tohoto důvodu bychom mohli SAML použít jako marker zvýšeného rizika rozvoje dalšího SN, zejména SMN. U přeživších se SAML je z těchto důvodů indikováno pravidelné, pečlivé a dlouhodobé sledování, nicméně plný význam SAML u přeživších není dosud objasněn a vyžaduje další studium.

Za společný mechanismus vzniku pozdních následků je považováno urychlené buněčné stárnutí neboli senescence. Tento fakt podporují zaprvé podobnost pozdních následků a patologií u starších osob v běžné populaci a zadruhé zvýšená exprese markerů buněčné senescence u osob po předchozí onkologické léčbě (Sanoff H. K. et al., 2014; Armenian S. H. et al., 2019; Marcoux S. et al., 2013). Naším cílem bylo prokázat zvýšenou expresi p16 (produktu genu CDKN2A) *in vitro* po vystavení buněk působení cytostatika, v našem případě doxorubicinu. Při použitých koncentracích doxorubicinu 0,04 μ M; 0,1 μ M; 0,2 μ M a 0,5 μ M jsme však nezaznamenali statisticky významný rozdíl. Jednalo se o koncentrace, které nezpůsobily buněčnou smrt při jednodenní inkubaci. Je možné, že vyšší koncentrace doxorubicinu skutečně povedou ke zvýšení exprese p16, nicméně zároveň představují zvýšené riziko smrti buněk. Je proto předmětem dalšího výzkumu objasnit jaké koncentrace doxorubicinu ještě nezvyšují expresi markerů buněčné senescence a jaké již ano a také zda dříve dojde ke zvýšení exprese p16 či ke smrti buněk. Navíc exprese p16 nemusela být zvýšena *in vitro* a může být zvyšována *in*

vivo z důvodu uplatnění komplexnějších mechanismů, které se *in vitro* neprojeví, např. z důvodu působení volných kyslíkových radikálů.

6. Závěr

V disertační práci jsme se zaměřili na pozdní následky po onkologické léčbě v dětství, zejména pak na SN a jejich rizikové faktory. Závěrem bychom rádi zdůraznili několik souvislostí mezi primární léčbou a vznikem SN. Pro vznik sekundárního karcinomu štítné žlázy nebo nádoru CNS je zásadním rizikovým faktorem RT, přičemž RT se uplatní i na okraji ozařovacího pole (např. vznik karcinomu štítné žlázy po iradiaci kraniospinální osy, po ozáření zadní jámy lební nebo RT hrudníku). Ve dvou případech jsme pozorovali vznik karcinomu thyroidey po aplikaci radiojódů (^{131}I -MIBG) při diagnostice nebo léčbě neuroblastomu, u těchto pacientů je tedy nutná adekvátní blokáda štítné žlázy před aplikací radiojódů a všichni přeživší zasluhují stejnou intenzitu dlouhodobého sledování jako přeživší po předchozí RT krku. Nejčastější primární diagnózou byl u našich pacientů HL, tyto přeživší jsou ve zvýšeném riziku vzniku karcinomu štítné žlázy a karcinomu prsu, je proto nutné důkladné dlouhodobé sledování včetně pravidelných UZ kontrol. Vzhledem k riziku pozdního vzniku sekundárního nádoru CNS nebo menigeomu je u pacientů po předchozí RT zahrnující neurokranium nutná magnetická rezonance v rámci pravidelných kontrol při dlouhodobém sledování. S ohledem na častý výskyt BCC doporučujeme pravidelné dermatologické vyšetření u všech pacientů po předchozí RT. U pacientů, u kterých vznikne sekundární NMSC je nutné zvýšené sledování vzhledem k vyššímu riziku rozvoje SMN. Vznik SN STS ovlivňuje nejen RT, ale i CHT a přítomný genetický syndrom (zejména změny Rb1 genu). Cyklofosfamid je významným rizikovým faktorem rozvoje sarkomu močového měchýře a spolu s předchozí diagnózou retinoblastomu jsou indikací k pravidelným UZ kontrolám břicha a malé pánve.

Nejčastějším SBN byl mezi našimi pacienty SAML a pokud je nám známo, tak dosud v literatuře nebyl popsán výskyt těchto nádorů u přeživších po onkologické léčbě. V podrobnější studii zaměřené na SAML byla jejich incidence 4,4 % což je cca 10 krát více než v běžné populaci. Navíc byl u našich přeživších typický časnější věk vzniku, častější progresse a častější vícečetný či bilaterální výskyt. Ačkoliv žádný z našich pacientů se SAML neměl prokázanou TSC, tyto charakteristiky více odpovídají právě angiomyolipomům vyskytujícím se při TSC než sporadickým angiomyolipomům. Tato podobnost naznačuje možnou společnou patogenezi těchto onemocnění, ale hypotézu je třeba ověřit dalším výzkumem.

V třetí části práce jsme se pokusili prokázat vliv doxorubicinu na buněčnou senescenci *in vitro* a nastínit tak nové možnosti a směr výzkumu vzniku pozdních následků na buněčné úrovni.

Vliv doxorubicinu na expresi markerů buněčné senescence nebyl při zvolených koncentracích statisticky významný, nicméně další podrobnější výzkum s použitím více různých cytostatik by mohl tento vztah lépe objasnit.

7.1 Souhrn

Naším cílem bylo zmapovat aktuální poznatky týkající se pozdních následků po onkologické léčbě v dětství se zaměřením na sekundární nádory (SN) a jejich rizikové faktory a zhodnotit jejich výskyt na Klinice dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol (KDHO). Druhým cílem bylo popsat výskyt a rizikové faktory sporadických angiomyolipomů ledvin (SAML) jakožto nejčastějších benigních SN v naší studované kohortě. Třetím cílem bylo shrnout poznatky o buněčné senescenci u onkologických pacientů (buněčná senescence je společným biologickým mechanismem rozvoje většiny pozdních následků) a prokázat vliv CHT na buněčnou senescenci *in vitro*.

Z celkového počtu 4059 přeživších léčených mezi lety 1975 až 2018 pro solidní nádor na KDHO byl u 170 (4,2 %) diagnostikován alespoň jeden SMN a u 119 přeživších (2,9 %) byl diagnostikován jeden či více SBN (a zároveň žádný SMN). Nejčastější SMN byly karcinomy štítné žlázy (37; 19,2 %), nádory CNS (25; 13 %) a STS (23; 11,9 %). Nejčastějšími SBN byly angiomyolipomy ledvin (41; 28,1 % což činí 1 % ze všech přeživších), meningeomy (19; 13 %) a adenomy štítné žlázy (15; 10,3 %). Mortalita mezi přeživšími se SMN činila 38,2 % (1,6 % ze všech přeživších). Genetický syndrom byl potvrzen u 41 pacientů, nejčastější byly NF1, Li Fraumeni syndrom a patogenní změna Rb1 genu. U karcinomu štítné žlázy a nádorů CNS byla nejčastějším rizikovým faktorem RT, u STS (zejména močového měchýře) převažoval vliv CHT a genetického syndromu.

Mezi našimi přeživšími jsme zaznamenali přibližně 10 krát vyšší výskyt SAML než u „neonkologické“ populace, přičemž typický byl nižší věk v době diagnózy, mnohočetné nebo bilaterální léze a častější progrese nálezu. Všechny tyto charakteristiky odpovídají více angiomyolipomům ledvin při TSC (nicméně žádný z našich pacientů neměl TSC), což naznačuje jejich možnou společnou patogenezi, nutné jsou však další studie.

Pomocí stanovení exprese genu CDKN2A jsme se pokusili prokázat, že CHT urychluje buněčnou senescenci (tj. zvyšuje expresi CDKN2A genu), nicméně rozdíl mezi buňkami kultivovanými s doxorubicinem a buňkami bez doxorubicinu nebyl statisticky významný. Vzhledem k dosud publikovaným výsledkům v literatuře však tento vliv i nadále předpokládáme, změna nemusela být signifikantní z důvodu nízkých použitých koncentrací doxorubicinu, případně se na urychlené senescenci *in vivo* podílí ještě další mechanismus, který se neprojeví *in vitro*.

7.2 Summary

First, the study aimed to review knowledge about late effects after oncology treatment in pediatric patients (particularly about subsequent neoplasms (SN) and their risk factors) and describe SN presented at the Department of Pediatric Haematology and Oncology Motol University Hospital, Prague (KDHO). Second, we wanted to study the development and risk factors of sporadic renal angiomyolipomas (SAML) as our most frequent SBN. Third, we wanted to prove the impact of CHT on cellular senescence *in vitro* (cellular senescence is an important biological mechanism of development of the majority of late effects).

Out of 4,059 survivors treated between 1975 - 2018 on KDHO for a solid tumor, 170 (4.2 % of all survivors) developed at least one SMN, and 119 (2.9 %) developed only SBN. The most common SMN was thyroid carcinoma (37; 19.2 %), CNS tumors (25; 13 %) and STS (23; 11.9 %). The most common SBN were renal angiomyolipomas (41; 28.1 % i.e. 1 % of all survivors), meningiomas (19; 13 %) and thyroid adenomas (15; 10.3 %). Mortality among patients with SMN was 38 % i.e. 1.6 % of all survivors. The genetic syndrome was confirmed in 41 survivors, the most common being NF1, Li Fraumeni syndrome and Rb1 mutation. Among thyroid carcinomas and CNS tumors, the main risk factor was RT. Among STS (particularly bladder sarcomas), there was a dominant role of CHT as a risk factor.

Compared to general population, there was a ten times higher occurrence of SAML among our group of survivors. Moreover, our patients were younger at the time of SAML diagnosis, often diagnosed with multiple or bilateral lesion and with more frequent progression. These characteristics are typical for angiomyolipomas in TSC (but none of our patients had TSC), which suggest possible similar pathogenesis, but further studies are needed.

Results from the literature suggest that CHT accelerates cellular senescence and that there is an elevation of markers of cellular senescence after CHT. There was no significant difference in CDKN2A expression between cells treated by doxorubicin and untreated cells *in vitro*, but this could be due to small concentrations of used doxorubicin, and there might also be some mechanisms which accelerate cellular senescence in whole organism, but are not efficient *in vitro*.

8. Literatura

- Adam, Z., Krejčí, M., Vorlíček, J. et al. (2010). *Speciální onkologie. Příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Kapitola: Úvod do onkologie dětského věku, str. 349-352, Bajčiová, V.. První vydání. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-648-9
- Alcorta, D. A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., Barrett, J. C. (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(24):13742-7.
- Allodji, R. S., Hawkins, M. M., Bright, C. J., Fidler-Benaoudia, M. M., Winter, D. L., Alessi, D., Fresneau, B., Journy, N., Morsellino, V., Bárdi, E., Bautz, A., Byrne, J., Feijen, E. L. A., Teepen, J. C., Vu-Bezin, G., Rubino, C., Garwicz, S., Grabow, D., Gudmundsdottir, T., Guha, J., Hau, E. M., Jankovic, M., Kaatsch, P., Kaiser, M., Linge, H., Muraca, M., Llanas, D., Veres, C., Øfstaas, H., Diallo, I., Mansouri, I., Ronckers, C. M., Skinner, R., Terenziani, M., Wesenberg, F., Wiebe, T., Sacerdote, C., Jakab, Z., Haupt, R., Lähteenmäki, P., Zdravec Zaletel, L., Kuehni, C. E., Winther, J. F., Michel, G., Kremer, L. C. M., Hjorth, L., Haddy, N., de Vathaire, F., Reulen, R. C. (2019). Risk of subsequent primary leukaemias among 69,460 five-year survivors of childhood cancer diagnosed from 1940 to 2008 in Europe: A cohort study within PanCareSurFup. *Eur J Cancer* 117:71-83.
- Armenian, S. H., Gibson, C. J., Rockne, R. C., Ness, K. K. (2019). Premature Aging in Young Cancer Survivors. *J Natl Cancer Inst.* 111(3):226-232.
- Armstrong, G. T., Liu, Q., Yasui, Y., Neglia, J. P., Leisenring, W., Robison, L. L., Mertens, A. C. (2009). Late mortality among 5-year survivors of childhood cancer: a summary from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol.* 27(14):2328-2338.
- Armstrong, G. T., Liu, Q., Yasui, Y., Huang, S., Ness, K. K., Leisenring, W., Hudson, M. M., Donaldson, S. S., King, A. A., Stovall, S., Krull, K. R., Robison, L. L., Packer, R. J. (2009). Long-term outcomes among adult survivors of childhood central nervous system malignancies in the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst.* 101(13):946-958.
- Armstrong, G. T., Stovall, M., Robison, L. L. (2010). Long-Term Effects of Radiation Exposure among Adult Survivors of Childhood Cancer: Results from the Childhood Cancer Survivor Study. *Radiat Res.* 174(6): 840-850.
- Armstrong, G. T., Liu, W., Leisenring, W., Yasui, Y., Hammond, S., Bhatia, S., Neglia, J. P., Stovall, M., Srivastava, D., Robison, L. L. (2011). Occurrence of Multiple Subsequent Neoplasms in Long-Term Survivors of Childhood Cancer: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol.* 29(22): 3056-3064.
- Armstrong, G. T., Kawashima, T., Leisenring, W., Stratton, K., Stovall, M., Hudson, M. M., Sklar, Ch. A., Robison, L. L., Oeffinger, K. C. (2014). Aging and risk of severe, disabling, life-threatening, and fatal events in the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol* 32(12):1218-27.
- Armstrong, G. T., Chen, Y., Yasui, Y., Leisenring, W., Gibson, T. M., Mertens, A. C., Stovall, M., Oeffinger, K. C., Bhatia, S., Krull, K. R., Nathan, P. C., Neglia, J. P., Green, D. M., Hudson, M. M., Robison, L. L. (2016). Reduction in Late Mortality among 5-Year Survivors of Childhood Cancer. *N Engl J Med* 374(9):833-42.
- Bagnasco, F., Caruso, S., Andreano, A., Valsecchi, M. G., Jankovic, M., Biondi, A., Miligi, L., Casella, C., Terenziani, M., Massimino, M., Sacerdote, C., Morsellino, V., Erminio, G., Garaventa, A., Faraci, M., Micalizzi, C., Garrè, M. L., Pillon, M., Basso, G., Biasin, E., Fagioli, F., Rondelli, R., Pession, A., Locatelli, F., Santoro, N., Indolfi, P., Palumbo, G., Russo, G., Verzegnassi, F., Favre, C., Zecca, M., Mura, R., D'Angelo, P., Cano, C., Byrne, J., Haupt, R., OTR-AIEOP Registry (2019). Late mortality and causes of death among 5-year survivors of childhood cancer diagnosed in the period 1960-1999 and registered in the Italian Off-Therapy Registry. *Eur J Cancer* 110:86-97.
- Bahuau, M., Vidaud, D., Jenkins, R. B., Bieche, I., Rinunci, D. W., Assouline, B., Smith, J. S., Alderete, B., Cayuela, J. M., Harpey, J. P., Caille, B., Vidaud, M. (1998). Germ-Line Deletion Involving the INK4 Locus in Familial Proneness to Melanoma and Nervous System Tumors. *Cancer Research* 58:2298-2303.
- Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., Saltness, R. A., Jeganathan, K. B., Versoza, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature* 530(7589):184-189.

- Baker, K. S., Leisenring, W. M., Goodman, P. J., Ermoian, R. P., Flowers, M. E., Schoch, G., Storb, R., Sandmaier, B. M., Deeg, H. J. (2019). Total body irradiation dose and risk of subsequent neoplasms following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 133(26):2790-2799.
- Bhakta, N., Liu, Q., Ness, K. K., Baassiri, M., Eissa, H., Yeo, F., Chemaitilly, W., Ehrhardt, M. J., Bass, J., Bishop, M. W., Shelton, K., Lu, L., Huang, S., Li, Z., Caron, E., Lancot, J., Howell, C., Folse, T., Joshi, V., Green, D. M., Mulrooney, D. A., Armstrong, G. T., Krull, K. R., Brinkman, T. M., Khan, R. B., Srivastava, D. K., Hudson, M. M., Yasui, Y., Robison, L. L. (2017). The cumulative burden of surviving childhood cancer: an initial report from the St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE). *Lancet* 390(10112):2569-2582.
- Bhatia, S., Yasui, Y., Robison, L. L., Birch, J. M., Bogue, M. K., Diller, L., DeLaat, C., Fossati-Bellani, F., Morgan, E., Oberlin, O., Reaman, G., Ruymann, F. B., Tersak, J., Meadows, A. T., Late Effects Study Group (2003). High risk of subsequent neoplasms continues with extended follow-up of childhood Hodgkin's disease: report from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol* 21(23):4386-94.
- Bhatt, J. R., Richard, P. O., Kim, N. S., Finelli, A., Manickavachagam, K., Legere, L., Evans, A., Pei, Y., Sykes, J., Jhaveri, K., Jewett, M. A. S. (2016). Natural History of Renal Angiomyolipoma (AML): Most Patients with Large AMLs 4cm Can Be Offered Active Surveillance as an Initial Management Strategy. *Eur Urol*. 70(1):85-90.
- Bhatti, P., Veiga, L. H. S., Ronckers, C. M., Sigurdson, A. J., Stovall, M., Smith, S. A., Weathers, R., Leisenring, W., Mertens, A. C., Hammond, S., Friedman, D. L., Neglia, J. P., Meadows, A. T., Donaldson, S. S., Sklar, Ch. A., Robison, L. L., Inskip, P. D. (2010). Risk of second primary thyroid cancer after radiotherapy for a childhood cancer in a large cohort study: an update from the Childhood Cancer Survivor Study. *Radiat Res*. 174(6):741-752.
- Blackburn, E. H., Szostak, J. W. (1984). The molecular structure of centromeres and telomeres. *Annu Rev Biochem*. 53:163-194.
- Bøhn, S. K. H., Thorsen, L., Kiserud, C. E., Fosså, S. D., Lie, H. C., Loge, J. H., Wisløff, T., Haugnes, H. S., Reinertsen, K. V. (2019). Chronic fatigue and associated factors among long-term survivors of cancers in young adulthood. *Acta Oncologica* 58:753-62.
- Boorjian, S. A., Sheinin, Y., Crispen, P. L., Lohse, C. M., Kwon, E. D., Leibovich, B. C. (2008). Hormone Receptor Expression in Renal Angiomyolipoma: Clinicopathologic Correlation. *Urology*. 72(4):927-932.
- Bowers, D. C., Nathan, P. C., Constine, L., Woodman, C., Bhatia, S., Keller, K., Bashore, L. (2013). Subsequent neoplasms of central nervous system among survivors of childhood cancer: a systematic review *Lancet Oncol* 14(8):e321-8.
- Bowers, D. C., Moskowitz, Ch. S., Chou, J. F., Mazewski, C. M., Neglia, J. P., Armstrong, G. T., Leisenring, W. M., Robison, L. L., Oeffinger, K. C. (2017). Morbidity and Mortality Associated With Meningioma After Cranial Radiotherapy: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 35(14):1570-1576.
- Bright, C. J., Hawkins, M. M., Winter, D. L., Alessi, D., Allodji, R. S., Bagnasco, F., Bárdi, E., Bautz, A., Byrne, J., Feijen, E. A. M., Fidler, M. M., Garwicz, S., Grabow, D., Gudmundsdottir, T., Guha, J., Haddy, N., Jankovic, M., Kaatsch, P., Kaiser, M., Kuehni, C. E., Linge, H., Øfstaas, H., Ronckers, C. M., Skinner, R., Teepen, J. C., Terenziani, M., Vu-Bezin, G., Wesenberg, F., Wiebe, T., Sacerdote, C., Jakab, Z., Haupt, R., Lähteenmäki, P., Zdravec Zaletel, L., Kuonen, R., Winther, J. F., de Vathaire, F., Kremer, L. C., Hjørth, L., Reulen, R. C., PanCareSurFup Consortium (2018). Risk of soft-tissue sarcoma among 69 460 five-year survivors of childhood cancer in Europe. *J. Natl Cancer Inst*. 110(6):649-660.
- Brodeur, G. M., Nichols, K. M., Plon, S. E., Schiffman, J. D., Malkin, D. (2017). Pediatric Cancer Predisposition and Surveillance: An Overview, and a Tribute to Alfred G. Knudson Jr. *Clin Cancer Res* 23(11):e1-e5.
- Broniscer, A., Ke, W., Fuller, C. E., Wu, J., Gajjar, A., Kun, L. E. (2004). Second neoplasms in pediatric patients with primary central nervous system tumors: the St. Jude Children's Research Hospital experience. *Cancer* 100:2246-2252.
- Burnelli, R., Rinieri, S., Rondelli, R., Todesco, A., Bianchi, M., Garaventa, A., Zecca, M., Indolfi, P., Conter, V., Santoro, N., Arico, M., Cesaro, S., D'Amico, S., Farruggia, P., De Santis, R., Locatelli, F., Pileri, S. A., Scarzello, G., Mascarini, M., Vecchi, V., AIEOP (Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology) and Pediatric Hodgkin's Lymphoma Working Group (2018). Long-term results of the AIEOP MH'96 childhood Hodgkin's lymphoma trial and focus on significance of response to chemotherapy and its implication in low risk patients to avoid radiotherapy. *Leuk. Lymphoma* 59:2612-2621.

- Calìo, A., Brunelli, M., Segala, D., Zamboni, G., Bonetti, F., Pea, M., Martignoni, G. (2021). Angiomyolipoma of the kidney: from simple hamartoma to complex tumour. *Pathology*. 53(1):129–140.
- Campisi, J. (1997). The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* 33(5):703-9.
- Clement, S. C., van Eck-Smit, B. L. F., van Trotsenburg, A. S. P., Kremer, L. C. M., Tytgat, G. A. M., van Santen, H. M. (2013). Long-term follow-up of the thyroid gland after treatment with ¹³¹I-Metaiodobenzylguanidine in children with neuroblastoma: Importance of continuous surveillance. *Pediatr Blood Cancer* 60(11):1833-8.
- Deng, Y., Chan, S. S., Chang, S. (2008). Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nat Rev Cancer* 8(6):450-8.
- Díaz-Piña, G., Montes, E., Checa, M., Becerril, C., García de Alba, C., Vega, A., Páramo, I., Ordoñez-Razo, R., Ruiz, V. (2015). Profibrosing effect of angiotensin converting enzyme inhibitors in human lung fibroblasts. *Lung* 193(2):199-202.
- Dixon, S. B., Bjornard, K. L., Alberts, N. M., Armstrong, G. T., Brinkman, T. M., Chemaitilly, W., Ehrhardt, M. J., Fernandez-Pineda, I., Force, L. M., Gibson, T. M., Green, D. M., Howell, C. R., Kaste, S. C., Kirchoff, A. C., Klosky, J. L., Krull, K. R., Lucas Jr, J. T., Mulrooney, D. A., Ness, K. K., Wilson, C. L., Yasui, Y., Robison, L. L., Hudson, M. M. (2018). Factors influencing risk-based care of the childhood cancer survivor in the 21st century. *CA Cancer J Clin* 68(2):133-152.
- Dixon, S. B., Chen, Y., Yasui, Y., Pui, C. H., Hunger, S. P., Silverman, L. B., Ness, K. K., Green, D. M., Howell, R. M., Leisenring, W. M., Kadan-Lottick, N. S., Krull, K. R., Oeffinger, K. C., Neglia, J. P., Mertens, A. C., Hudson, M. M., Robison, L. L., Armstrong, G. T., Nathan, P. C. (2020). Reduced Morbidity and Mortality in Survivors of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. *J. Clin. Oncol.* 38(29):3418-3429.
- Dong, Q., Debelenko, L. V., Chandrasekharappa, S. C., Emmert-Buck, M. R., Zhuang, Z., Guru, S. C., Manickam, P., Skarulis, M., Lubensky, I. A., Liotta, L. A., Collins, F. S., Marx, S. J., Spiegel, A. M. (1997). Loss of heterozygosity at 11q13: analysis of pituitary tumors, lung carcinoids, lipomas, and other uncommon tumors in subjects with familial multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(5):1416-1420.
- Dores, G. M., Anderson, W. F., Beane Freeman, L. E., Fraumeni Jr, J. F., Curtis, R. E. (2010). Risk of breast cancer according to clinicopathologic features among long-term survivors of Hodgkin's lymphoma treated with radiotherapy. *Br J Cancer* 103(7):1081-1084.
- Duggan, C., Risques, R., Alfano, C., Prunkard, D., Imayama, I., Holte, S., Baumgartner, K., Baumgartner, R., Bernstein, L., Ballard-Barbash, R., Rabinovitch, P., McTiernan, A. (2014). Change in Peripheral Blood leukocyte telomere length and mortality in breast cancer survivors. *J Natl Cancer Inst* 106(4):dju035.
- Dunham, M. A., Neumann, A. A., Fasching, C. L., Reddel, R. R. (2000). Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet.* 26(4):447-50.
- Ehrhardt, M. J., Howell, C. R., Hale, K., Baassiri, M. J., Rodriguez, C., Wilson, C. L., Joshi, S. S., Lemond, T. C., Shope, S., Howell, R. M., Wang, Z., Srivastava, D., Mulrooney, D. A., Zhang, J., Robison, L. L., Ness, K. K., Hudson, M. M. (2019). Subsequent Breast Cancer in Female Childhood Cancer Survivors in the St Jude Lifetime Cohort Study (SJLIFE). *J Clin Oncol* 37(19):1647-1656.
- Ezoe, S. (2012). Secondary leukemia associated with anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 9(7):2444-2453.
- Fernández-Pello, S., Hora, M., Kuusk, T., Tahbaz, R., Dabestani, S., Abu-Ghanem, Y., Albiges, L., Giles, R. H., Hofmann, F., Kuczyk, M. A., Lam, T. B., Marconi, L., Merseburger, A. S., Powles, T., Staehler, M., Volpe, A., Ljungberg, B., Bex, A., Bensalah, K. (2020). Management of Sporadic renal angiomyolipoma: a systematic review of available evidence to guide recommendations from the European association of urology renal cell carcinoma guidelines panel. *Eur Urol Oncol* 3(1):57-72.
- Fidler, M. M., Reulen, R. C., Winter, D. L., Kelly, J., Jenkinson, H. C., Skinner, R., Frobisher, C., Hawkins, M. M., British Childhood Cancer Survivor Study Steering Group (2016). Long term cause specific mortality among 34 489 five year survivors of childhood cancer in Great Britain: population based cohort study. *BMJ* 354:i4351.

- Fidler, M. M., Reulen, R. C., Winter, D. L., Allodji, R. S., Bagnasco, F., Bárdi, E., Bautz, A., Bright, Ch. J., Byrne, J., Feijen, E. A. M., Garwicz, S., Grabow, D., Gudmundsdottir, T., Guha, J., Haddy, N., Jankovic, M., Kaatsch, P., Kaiser, M., Kuonen, R., Linge, H., Maule, M., Merletti, F., Øfstaas, H., Ronckers, C. M., Skinner, R., Teepen, J., Terenziani, M., Vu-Bezin, G., Wesenberg, F., Wiebe, T., Jakab, Z., Haupt, R., Lähteenmäki, P., Zdravec Zaletel, L., Kuehni, C. E., Winther, J. F., de Vathaire, F., Kremer, L. C., Hjorth, L., Hawkins, M. M. (2018). Risk of Subsequent Bone Cancers Among 69 460 Five-Year Survivors of Childhood and Adolescent Cancer in Europe. *J Natl Cancer Inst* 110(2).
- Fijneman, R. J. A. (2005). Genetic predisposition to sporadic cancer: How to handle major effects of minor genes? *Cell Oncol* 27(5-6):281-92.
- Fittschen, A., Wendlik, I. N., Oeztuerk, S., Kratzer, W., Akinli, A. S., Haenle, M. M., Graeter, T. (2014). Prevalence of sporadic renal angiomyolipoma: a retrospective analysis of 61389 in- and out- patients. *Abdom Imaging*. 39:1009-1013.
- Flum, A. S., Hamoui, N., Said, M. A., Yang, X. J., Casalino, D. D., McGuire, B. B., Perry, K. T., Nadler, R. B. (2016). Update on the Diagnosis and Management of Renal Angiomyolipoma. *J Urol*. 195(4 Pt 1):834-846.
- Friedman, D. L., Whitton, J., Leisenring, W., Mertens, A. C., Hammond, S., Stovall, M., Donaldson, S. S., Meadows, A. T., Robison, L. L., Neglia J. P. (2010). Subsequent Neoplasms in 5-Year Survivors of Childhood Cancer: The Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst* 102(14):1083-95.
- Friedman, G. D., Tekawa, I. S. (2000). Association of basal cell skin cancers with other cancers (United States). *Cancer Causes Control* 11(10):891-7.
- Garwicz, S., Anderson, H., Olsen, J. H., Winther, J. F., Sankila, R., Langmark, F., Tryggvadóttir, L., Möller, T. R., Association of the Nordic Cancer Registries, Nordic Society for Pediatric Hematology Oncology (2011). Late and very late mortality in 5-year survivors of childhood cancer: changing pattern over four decades—Experience from the Nordic countries. *Int J Cancer* 131(7):1659-66.
- Geenen, M. M., Cardous-Ubbink, M. C., Kremer, L. C., van den Bos, C., van der Pal, H. J. H., Heinen, R. C., Jaspers, M. W. M., Koning, C. C. E., Oldenburger, F., Langeveld, N. E., Hart, A. A. M., Bakker, P. J. M., Caron, H. N., van Leeuwen, F. E. (2007). Medical assessment of adverse health outcomes in long-term survivors of childhood cancer. *JAMA* 297(24):2705-15.
- Giannikou, K., Malinowska, I. A., Pugh, T. J., Yan, R., Tseng, Y. Y., Oh, C., Kim, J., Tyburczy, M. E., Chekaluk, Y., Liu, Y., Alesi, N., Finlay, G. A., Wu, Ch. L., Signoretti, S., Meyerson, M., Getz, G., Boehm, J. S., Henske, E. P., Kwiatkowski, D. J. (2016). Whole exome sequencing identifies TSC1/TSC2 biallelic loss as the primary and sufficient driver event for renal angiomyolipoma development. *PLoS Genet* 12(8):e1006242.
- Gramatges, M. M., Liu, Q., Yasui, Y., Okcu, M. F., Neglia, J. P., Strong, L. C., Armstrong, G. T., Robison, L. L., Bhatia, S. (2014). Telomere Content and Risk of Second Malignant Neoplasm in Survivors of Childhood Cancer: A Report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Clin Cancer Res*. 20(4): 904-911.
- Greider, C. W., Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43(2 Pt 1):405-13.
- Greider, C. W., Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51(6):887-98.
- Greider, C. W., Blackburn, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337(6205):331-7.
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J. B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., Zhang, K. (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell* 49(2):359-367.
- Hawkins, M. M., Kingston, J. E., Wilson, L. M. K. (1990). Late deaths after treatment for childhood cancer. *Arch Dis Child* 65(12):1356-63.
- Hayflick, L., Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25(3):585-621.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 37:614-636.

Henderson, T. O., Rajaraman, P., Stovall, M., Constine, L. S., Olive, A., Smith, S. A., Mertens, A., Meadows, A., Neglia, J. P., Hammond, S., Whitton, J., Inskip, P. D., Robison, L. L., Diller, L. (2012). Risk factors associated with secondary sarcomas in childhood cancer survivors: a report from the childhood cancer survivor study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 84(1):224-30.

Henderson, T. O., Moskowitz, C. S., Chou, J. F., Bradbury, A. R., Neglia, J. P., Dang, Ch. T., Onel, K., Novetsky Friedman, D., Bhatia, S., Strong, L. C., Stovall, M., Kenney, L. B., Barnea, D., Lorenzi, E., Hammond, S., Leisenring, W. M., Robison, L. L., Armstrong, G. T., Diller, L. R., Oeffinger, K. C. (2016). Breast Cancer Risk in Childhood Cancer Survivors Without a History of Chest Radiotherapy: A Report From the Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 34(9):910-8.

Henske, E. P., Neumann, H. P., Scheithauer, B. W., Herbst, E. W., Short, M. P., Kwiatkowski, D. J. (1995). Loss of heterozygosity in the tuberous sclerosis (TSC2) region of chromosome band 16p13 occurs in sporadic as well as TSC-associated renal angiomyolipomas. *Genes Chrom Cancer*. 13(4):295-298.

Heuser, M. (2016). Therapy-related myeloid neoplasms: Does knowing the origin help to guide treatment? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016(1):24-32.

Hisada, M., Garber, J. E., Fung, C. Y., Fraumeni Jr., J. F., Li, F. P. (1998). Multiple Primary Cancers in Families With Li–Fraumeni Syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 90(8):606-11.

Holt, S. E., Wright, W. E., Shay, J. W. (1997). Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *Eur J Cancer* 33(5):761-6.

Hooten, N. N., Evans, M. K. (2018). Techniques to Induce and Quantify Cellular Senescence. *Journal of Visualized Experiments* (123):55533.

Horvath, S. C. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14:3156.

Howlader, N., Noone, A. M., Krapcho, M., Miller, D., Brest, A., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D. R., Chen, H. S., Feuer, E. J., Cronin, K. A. (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016*, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019.

Huang, R. S., Kistner, K. O., Bleibel, W. K., Shukla, S. J., Dolan, M. E. (2007). Effect of population and gender on chemotherapeutic agent–induced cytotoxicity. *Mol Cancer Ther* 6(1):31-36.

Hudson, M. M., Ness, K. K., Gurney, J. G., Mulrooney, D. A., Chemaitilly, W., Krull, K. R., Green, D. M., Armstrong, G. T., Nottage, K. A., Jones, K. E., Sklar, Ch. A., Srivastava, D. K., Robison, L. L. (2013). Clinical ascertainment of health outcomes among adults treated for childhood cancer. *JAMA* 309(22):2371-81.

Hussain, T., Lam, V., Farhad, M., Lee, S., Stephenson, J. A., Kockelbergh, R., Rajesh, A. (2020). Can subcentimetre ultrasound detected angiomyolipomas be safely disregarded? *Clin Radiol*. 75(4):287-292.

Chan, K. E., Chedgy, Ecp., Bent, C. L., Turner, K. J. (2018). Surveillance imaging for sporadic renal angiomyolipoma less than 40 mm: lessons learnt and recommendations from the experience of a large district general hospital. *Ann R Coll Surg Engl*. 100(6):480-484.

Chemaitilly, W., Sklar, Ch. A. (2019). Childhood Cancer Treatments and Associated Endocrine Late Effects: A Concise Guide for the Pediatric Endocrinologist. *Horm Res Paediatr* 91:74-82.

Chen, J., Ruczinski, I., Jorgensen, T. J., Yenokyan, G., Yao, Y., Alani, R., Liégeois, N. J., Hoffman, S. C., Hoffman-Bolton, J., Strickland, P. T., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J. (2008). Nonmelanoma skin cancer and risk for subsequent malignancy. *J Natl Cancer Inst* 100(17):1215-22.

Cho, H. G., Kuo, K. Y., Li, S., Bailey, I., Aasi, S., Chang, A. L. S., Oro, A. E., Tang, J. Y., Sarin, K. Y. (2018). Frequent basal cell cancer development is a clinical marker for inherited cancer susceptibility. *JCI Insight* 3(15):e122744.

Inskip, P. D., Sigurdson, A. J., Veiga, L., Bhatti, P., Ronckers, C., Rajaraman, P., Boukheris, H., Stovall, M., Smith, S., Hammond, S., Henderson, T. O., Watt, T. C., Mertens, A. C., Leisenring, W., Stratton, K., Whitton, J., Donaldson, S. S., Armstrong, G. T., Robison, L. L., Neglia, J. P. (2016). Radiation-related New Primary Solid Cancers in the Childhood Cancer Survivor Study: Comparative Radiation Dose-response and Modification of Treatment Effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 94(4):800-7.

Jacks, S. K., Witman, P. M. (2015). Tuberous Sclerosis Complex: An Update for Dermatologists. *Pediatr Dermatol*. 32(5):563-70.

- Johnson, A. A., Shokhirev, M. N., Wyss-Coray, T., Lehallier, B. (2020). Systematic review and analysis of human proteomics aging studies unveils a novel proteomic aging clock and identifies key processes that change with age. *Aging Res. Rev.* 60:101070.
- Jones, G. E., Wise, C. J. (1997). Establishment, maintenance, and cloning of human dermal fibroblasts. *Methods Mol Biol.* 75:13-21.
- Kamb, A., Gruis, N. A., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavitgian, S. V., Stockert, E., Day 3rd, R. S., Johnson, B. E., Skolnick, M. H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264:436-40.
- Kamran, S. C., Berrington de Gonzalez, A., Ng, A., Haas-Kogan, D., Viswanathan, A. N. (2016). Therapeutic Radiation and the Potential Risk of Second Malignancies. *Cancer* 122(12):1809-21.
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, Ch., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J. F., Wyczalkowski, M. A., Leiserson, M. D. M., Miller, Ch. A., Welch, J. S., Walter, M. J., Wendl, M. C., Ley, T. J., Wilson, R. K., Raphael, B. J., Ding, L. (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502:333-339.
- Kenney, L. B., Yasui, Y., Inskip, P. D., Hammond, S., Neglia, J. P., Mertens, A. C., Meadows, A. T., Friedman, D., Robison, L. L., Diller, L. (2004). Breast cancer after childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Ann Intern Med.* 141(8):590-7.
- Kepák, T., Štěřba, J., Kadlecová, V., Holcnerová, P. (2005). Kdy pomýšlet na nádorové onemocnění v ambulanci praktického lékaře pro děti a dorost? *Pediatric pro praxi* 2(2):76-80
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266(5193):2011-5.
- Kisiel, M. A., Klar, A. S. (2019). Isolation and Culture of Human Dermal Fibroblasts. *Methods Mol Biol.* 1993:71-78.
- Knudsen, E. S., Nambiar, R., Rosario, S. R., Smiraglia, D. J., Goodrich, D. W., Witkiewicz, A. K. (2020). Pan-cancer molecular analysis of the RB tumor suppressor pathway. *Commun Biol* 3(1):158.
- Konończuk, K., Latoch, E., Żelazowska-Rutkowska, B., Krawczuk-Rybak, M., Muszyńska-Roslan, K. (2021). Increased Levels of Adipocyte and Epidermal Fatty Acid-Binding Proteins in Acute Lymphoblastic Leukemia Survivors. *J Clin Med.* 10(8): 1567.
- Koutecký, J., Kabičková, E., Starý, J. (2002). *Dětská onkologie pro praxi*. První vydání. Praha: Triton. ISBN 80-7254-288-5
- Krejčí, D., Pehalová, L., Talábová, A., Pokorová, K., Katinová, I., Mužík, J., Dušek, L. *Novotvary 2018* [online]. 2021 [cit. 2023-4-8]. Dostupné z: www.uzis.cz
- Krejčí, D., Ščavnický, J., Zapletalová, M., Svobodová, I., Karolyi, M., Mužík, J., Jarkovský, J., Klimeš, D., Loula, Z., Komenda, M., Štěřba, J., Starý, J., Dušek, L. *Czech Childhood Cancer Information System* [online]. 2018 [cit. 2022-6-21]. Dostupné z: <https://ccc-is.uzis.cz>.
- Krishnamurthy, J., Torrice, Ch., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* 114:1299-1307.
- Kruseová, J., Gottfriedová, B., Zichová, A., Švojgr, K., Hošek, P., Lukš, A., Kynčl, M., Eckschlager, T. (2021). Is There a Higher Incidence of Sporadic Renal Angiomyolipoma in Childhood Cancer Survivors? *Clinical Epidemiology* 13:707-716.
- Kruseová, J., Vícha, A., Feriančíková, B., Eckschlager, T. (2021). Possible Mechanisms of Subsequent Neoplasia Development in Childhood Cancer Survivors: A Review. *Cancers* 13(20):5064.
- Kruseová, J., Zichová, A., Eckschlager, T. (2023). Premature ageing in childhood cancer survivors. *Oncology Letters* 25(2):43.
- Krutílková, V., Eckschlager, T. (2009). The survey of syndromes with the risk of cancer in children age. *Klin Onkol* 22 Suppl:S45-9.
- Kuhlen, M., Taubner, J., Brozou, T., Wicczorek, D., Siebert, R., Borkhardt, A. (2019). Family-based germline sequencing in children with cancer. *Oncogene* 38(9):1367-1380.

- Kuilman, T., Michaloglou, Ch., Mooi, W. J., Peeper, D. S. (2010). The essence of senescence. *Genes Dev.* 24(22): 2463-2479.
- Kurt, B. A., Nolan, V. G., Ness, K. K., Neglia, J. P., Tersak, J. M., Hudson, M. M., Armstrong, G. T., Hutchinson, R. J., Leisenring, W. M., Oeffinger, K. C., Robison, L. L., Arora, M. (2012). Hospitalization rates among survivors of childhood cancer in the Childhood Cancer Survivor Study cohort. *Pediatr Blood Cancer* 59(1):126-32.
- Kutsenko, A., Berrington de Gonzalez, A., Curtis, R. E., Rajaraman, P. (2014). Risk of second benign brain tumors among cancer survivors in the surveillance, epidemiology, and end results program. *Cancer Causes Control* 25(6):659-68.
- Lebl, J., Janda, J., Pohunek, P., Starý, J. et al. (2014). *Klinická pediatrie*. Kapitola 14: Onkologie str. 569-594, Starý, J.. Druhé vydání. Praha: Galén a Karolinum. ISBN 978-80-7492-131-5 (Galén) a ISBN 978-80-246-2697-0 (Karolinum)
- Lee, K. H., Tsai, H. Y., Kao, Y. T., Lin, H. C., Chou, Y. C., Su, S. H., Chuang, C. K. (2019). Clinical behavior and management of three types of renal angiomyolipomas. *J Formos Med Assoc.* 118:162-169.
- Levine, M. E., Hosgood, H. D., Chen, B., Absher, D., Assimes, T., Horvath, S. (2015). DNA methylation age of blood predicts future onset of lung cancer in the women's health initiative. *Aging* 7(9):690–700.
- Li, P., Hou, M., Lou, F., Björkholm, M., Xu, D (2012). Telomere dysfunction induced by chemotherapeutic agents and radiation in normal human cells. *Int J Biochem Cell Biol* 44(9):1531-40.
- Liu, Y., Sanoff, H. K., Cho, H., Burd, Ch. E., Torrice, Ch., Ibrahim, J. G., Thomas, N. E., Sharpless, N. E. (2009). Expression of p16INK4a in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell.* 8(4):439-448.
- Little, M. P., de Vathaire, F., Shamsaldin, A., Oberlin, O., Campbell, S., Grimaud, E., Chavaudra, J., Haylock, R. G., Muirhead C. R. (1998). Risk of brain tumor following treatment for cancer in childhood: modification by genetic factors, radiotherapy and chemotherapy. *Int J Cancer* 78(3):269-75.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., Kroeme, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell* 153(6):1194-1217.
- Lorenzi, M. F., Xie, L., Rogers P. C., Pritchard, S., Goddard, K., McBride, M. L. (2011). Hospital-related morbidity among childhood cancer survivors in British Columbia, Canada: Report of the childhood, adolescent, young adult cancer survivors (CAYACS) program. *Int J Cancer* 128(7):1624-31.
- Lu, Y., Leong, W., Guérin, O., Gilson, E., Ye, J. (2013). Telomeric impact of conventional chemotherapy. *Front Med* 7(4):411-7.
- Lundblad, V., Szostak, J. W. (1989). A mutant with a defect in telomere elongation leads to senescence in yeast. *Cell* 57(4):633-43.
- MacArthur. A. C., Spinelli, J. J., Rogers, P. C., Goddard, K. J., Phillips, N., McBride, M. L. (2007). Risk of a second malignant neoplasm among 5-year survivors of cancer in childhood and adolescence in British Columbia, Canada. *Pediatr Blood Cancer* 48(4):453-9.
- MacCarthy, A., Bayne, A. M., Brownbill, P. A., Bunch, K. J., Diggens, N. L., Draper, G. J., Hawkins, M. M., Jenkinson, H. C., Kingston, J. E., Stiller, C. A., Vincent, T. J., Murphy, M. F. G. (2013). Second and subsequent tumours among 1927 retinoblastoma patients diagnosed in Britain 1951–2004. *Br. J. Cancer* 108(12):2455-2463.
- MacKeigan, J. P., Krueger, D. A. (2015). Differentiating the mTOR inhibitors everolimus and sirolimus in the treatment of tuberous sclerosis complex. *Neuro Oncol.* 17(12):1550-1559.
- Maggio, I., Franceschi, E., Tosoni, A., Nunno, V. D., Gatto, L., Lodi, R., Brandes, A. A. (2021). Meningioma: not always a benign tumor. A review of advances in the treatment of meningiomas. *CNS Oncol.* 10(2):CNS72.
- Maniakas, A., Dadu, R., Busaidy, N. L., Wang, J. R., Ferrarotto, R., Lu, Ch., Williams, M. D., Gunn, G. B., Hofmann, M. C., Cote, G., Sperling, J., Gross, N. D., Sturgis, E. M., Goepfert, R. P., Lai, S. Y., Cabanillas, M. E., Zafereo, M. (2020). Evaluation of Overall Survival in Patients With Anaplastic Thyroid Carcinoma, 2000 – 2019. *JAMA Oncol.* 6(9):1397-1404.
- Marcoux, S., Le, O. N. L., Langlois-Pelletier, Ch., Laverdiere, C., Hatami, A., Robaey, P., Beauséjour, Ch. M. (2013). Expression of the senescence marker p16INK4a in skin biopsies of acute lymphoblastic leukemia survivors: a pilot study. *Radiation Oncology* 8:252.

- Meadows, A. T., Baum, E., Fossati-Bellani, F., Green, D., Jenkin, R. D., Marsden, B., Nesbit, M., Newton, W., Oberlin, O., Sallan, S. G. (1985). Second malignant neoplasms in children: an update from the Late Effects Study Group. *J Clin Oncol.* 3:532-538.
- Meadows, A. T., Friedman, D. L., Neglia, J. P., Mertens, A. C., Donaldson, S. S., Stovall, M., Hammond, S., Yasui, Y., Inskip, P. D. (2009). Second Neoplasms in Survivors of Childhood Cancer: Findings From the Childhood Cancer Survivor Study Cohort. *J Clin Oncol.* 27(14):2356-2362.
- Meignin, V., Gluckman, E., Gambari, D., Devergie, A., Ramee, M. P., Janin, A., Socié, G. (1998). Meningioma in long-term survivors after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 22:723-724.
- Meijer, A. J. M., Diepstraten, F. A., Langer, T., Broer, L., Domingo, I. K., Clemens, E., Uitterlinden, A. G., de Vries, A. C. H., van Grotel, M., Vermeij, W. P., Ozinga, R. A., Binder, H., Byrne, J., van Dulmen-den Broeder, E., Garrè, M. L., Grabow, D., Kaatsch, P., Kaiser, M., Kenborg, L., Winther, J. F., Rechnitzer, C., Hasle, H., Kepak, T., Kepakova, K., Tissing, W. J. E., van der Kooi, A. L. F., Kremer, L. C. M., Kruseova, J., Pluijm, S. M. F., Kuehni, C. E., van der Pal, H. J. H., Parfitt, R., Spix, C., Tillmanns, A., Deuster, D., Matulat, P., Calaminus, G., Hoetink, A. E., Elsner, S., Gebauer, J., Haupt, R., Lackner, H., Blattmann, C., Neggers, S. J. C. M. M., Rassekh, S. R., Wright, G. E. B., Brooks, B., Nagtegaal, A. P., Drögemöller, B. I., Ross, C. J. D., Bhavsar, A. P., am Zehnhoff-Dinnesen, A. G., Carleton, B. C., Zolk, O., van den Heuvel-Eibrink, M. M., the PanCareLIFE Consortium and the CPNDS Consortium (2021). TCERG1L allelic variation is associated with cisplatin-induced hearing loss in childhood cancer, a PanCareLIFE study. *NPJ Precis Oncol.* 5:64.
- Morgenstern, P. F., Shah, K., Dunkel, I. J., Reiner, A. S., Khakoo, Y., Rosenblum, M. K., Gutin, P. (2016). Meningioma after radiotherapy for malignancy. *J Clin Neurosci* 30:93-97.
- Moskowitz, Ch. S., Malhotra, J., Chou, J. F., Wolden, S. L., Weathers, R. E., Stovall, M., Armstrong, G. T., Leisenring, W. M., Neglia, J. P., Robison, L. L., Oeffinger, K. C. (2015). Breast Cancer Following Spinal Irradiation for a Childhood Cancer: A Report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Radiother Oncol* 117(2):213-6.
- Mudigonda, T., Pearce, D. J., Yentzer, B. A., Williford, P., Feldman, S. R. (2010). The economic impact of non-melanoma skin cancer: a review. *J Natl Compr Canc Netw.* 8(8):888-896.
- Neglia, J. P., Friedman, D. L., Yasui, Y., Mertens, A. C., Hammond, S., Stovall, M., Donaldson, S. S., Meadows, A. T., Robison L. L. (2001). Second malignant neoplasms in five-year survivors of childhood cancer: childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst* 93(8):618-29.
- Neglia, J. P., Robison, L. L., Stovall, M., Liu, Y., Packer, R. J., Hammond, S., Yasui, Y., Kasper, C. E., Mertens, A. C., Donaldson, S. S., Meadows, A. T., Inskip P. D. (2006). New primary neoplasms of the central nervous system of survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivors Study. *J Natl Cancer Inst* 98(21):1528-37.
- Neofytou, K., Famularo, S., Khan, A. Z. (2015). PEComa in a young patient with known Li-Fraumeni syndrome. *Case Rep Med.* 2015:906981.
- Ness, K. K., Krull, K. R., Jones, K. E., Mulrooney, D. A., Armstrong, G. T., Green, D. M., Chemaitilly, W., Smith, W. A., Wilson, C. L., Sklar, Ch. A., Shelton, K., Srivastava, D. K., Ali, S., Robison, L. L., Hudson, M. M. (2013). Physiologic Frailty As a Sign of Accelerated Aging Among Adult Survivors of Childhood Cancer: A Report From the St Jude Lifetime Cohort Study. *Journal of Clinical Oncology* 31:36, 4496-4503.
- Ngeow, J., Eng, C. (2016). Precision medicine in heritable cancer: when somatic tumour testing and germline mutations meet. *npj Genomic Med* 1:15006
- Nicholson, H. S., Fears, T. R., Byrne, J. (1994). Death during Adulthood in Survivors of Childhood and Adolescent Cancer. *Cancer* 73(12):3094-102.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D. J., Lois, A., Takabayashi, K., Carson, D. A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368:753-6.
- Norsker, F. N., Rechnitzer, C., Cederkvist, L., Holmqvist, A. S., Tryggvadottir, L., Madanat-Harjuoja, L. M., Øra, I., Thorarinsdottir, H. K., Vetterranta, K., Bautz, A., Schröder, H., Hasle, H., Winther, J. F. (2018). Somatic late effects in 5-year survivors of neuroblastoma: a population-based cohort study within the Adult Life after Childhood Cancer in Scandinavia study. *Int J Cancer* 143 (12):3083-3096.
- Nottage, K., Lanctot, J., Li, Z., Neglia, J. P., Bhatia, S., Hammond, S., Leisenring, W., Meadows, A., Srivastava, D., Robison, L. L., Armstrong, G. T. (2011). Long-term risk for subsequent leukemia after treatment for childhood

- cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *Blood* 117(23):6315-8.
- O'Brien, M. M., Donaldson, S. S., Balise, R. R., Whittemore, A. S., Link, M. P. (2010). Second Malignant Neoplasms in Survivors of Pediatric Hodgkins Lymphoma Treated With Low-Dose Radiation and Chemotherapy. *J Clin Oncol* 28(7):1232-9.
- Oeffinger, K. C., Baxi, S. S., Friedman, D. N., Moskowitz, Ch. S. (2013). Solid Tumor Second Primary Neoplasms: Who is at Risk, What Can We Do? *Semin Oncol* 40(6):676-89.
- Oeffinger, K. C., Hudson, M. M. (2014). Long-term Complications Following Childhood and Adolescent Cancer: Foundations for Providing Risk-based Health Care for Survivors. *CA Cancer J Clin* 54(4):208-36.
- Oeffinger, K. C., Mertens, A. C., Sklar, Ch. A., Kawashima, T., Hudson, M. M., Meadows, A. T., Friedman, D. L., Marina, N., Hobbie, W., Kadan-Lottick, N. S., Schwartz, C. L., Leisenring, W., Robison, L. L. (2006). Chronic Health Conditions in Adult Survivors of Childhood Cancer. *N Engl J Med* 355;15.
- Ozuah, N. W., Marcus, K. J., LaCasce, A. S., Billett, A. L. (2018). Excellent outcomes following response-based omission of radiotherapy in children and adolescents with intermediate or high-risk hodgkin lymphoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 40:e338-e342.
- Pacientům a rodinám* (2021) [online]. Klinika dětské hematologie a onkologie 2.LF UK a FN Motol [cit. 2021-11-21]. Dostupné z: <http://www.fnmotol.cz/microsite-kdho/>
- Perkins, S. M., Dewees, T., Shinohara, E. T., Reddy, M. M., Frangoul, H. (2013). Risk of subsequent malignancies in survivors of childhood leukemia. *J Cancer Surviv.* 7(4):544-50.
- Perrino, M., Cooke-Barber, J., Dasgupta, R., Geller, J. I. (2019). Genetic predisposition to cancer: Surveillance and intervention. *Semin Pediatr Surg* 28(6):150858.
- Pffaf, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical anylysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36.
- Portocarrero, L. K. L., Quental, K. N., Samorano, L. P., Prado de Oliveira, Z. N., Rivitti-Machado, M. C. M. (2018). Tuberous sclerosis complex: review based on new diagnostic criteria. 93(3):323-331.
- Prowse, K. R., Greider, C. W. (1995). Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(11): 4818-4822.
- Randle, S. C. (2017). Tuberous Sclerosis Complex: A Review. *Pediatr Ann.* 46(4):e166-e171.
- Rebholz, C. E., Reulen, R. C., Toogood, A. A., Frobisher, C., Lancashire, E. R., Winter, D. L., Kuehni, C. E., Hawkins, M. M. (2011). Health care use of long-term survivors of childhood cancer: the British Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol* 29(31):4181-8.
- Robison, L. L., Hudson, M. M. (2014). Survivors of Childhood/Adolescent Cancer: Life-long Risk and Responsibilities. *Nat Rev Cancer* 14(1): 61–70.
- Sadowski, K., Kotulska, K., Schwartz, R. A., Józwiak, S. (2016). Systemic effects of treatment with mTOR inhibitors in tuberous sclerosis complex: a comprehensive review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 30(4):586-94.
- Saha, A., Salley, Ch. G., Saiga, P., Rolnitzky, L., Goldberg, J., Scott, S., Olshefski, R., Hukin, J., Sands, S. A., Finlay, J., Gardner, S. L. (2014). Late effects in survivors of childhood CNS tumors treated on Head Start I and II protocols. *Pediatr Blood Cancer.* 61(9):1644-1672.
- Sanoff, H. K., Deal, A. M., Krishnamurthy, J., Torrice, Ch., Dillon, P., Sorrentino, J., Ibrahim, J. G., Jolly, T. A., Williams, G., Carey, L. A., Drobish, A., Gordon, B. B., Alston, S., Hurria, A., Kleinhans, K., Rudolph, K. L., Sharpless, N. E., Muss, H. B. (2014). Effect of Cytotoxic Chemotherapy on Markers of Molecular Age in Patients With Breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 106(4):dju057.
- Satyanarayana, A., Rudolph, K. L. (2004). p16 and ARF: activation of teenage proteins in old age. *J Clin Invest.* 114(9):1237-1240.
- Smallridge, R. C., Copland, J. A. (2010). Anaplastic thyroid carcinoma: pathogenesis and emerging therapies. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 22(6):486-497.
- Smith, M. A., Rubinstein, L., Ungerleider, R. S. (1994). Therapy-related acute myeloid leukemia following treatment with epipodophyllotoxins: Estimating the risks. *Medical and Pediatric Oncology* 23(2):86-98.

- Sørensen, G. V., Winther, J. F., de Fine Licht, S., Andersen, K. K., Holmqvist, A. S., Madanat-Harjuoja, L., Tryggvadottir, L., Bautz, A., Lash, T. L., Hasle, H. (2019). Long-Term Risk of Hospitalization Among Five-Year Survivors of Childhood Leukemia in the Nordic Countries. *J Natl Cancer Inst* 111 (9): 943-951.
- Spathis, A., Hatcher, H., Booth, S., Gibson, F. Stone, P., Abbas, L., Barclay, M., Brimicombe, J., Thiemann, P., McCabe, M. G., Campsey, R., Hooker, L., Moss, W., Robson, J., Barclay, S. (2017). Cancer-Related Fatigue in Adolescents and Young Adults After Cancer Treatment: Persistent and Poorly Managed. *J Adolesc Young Adult Oncol*. 6:489-493.
- Stelwagen, J., Lubberts, S., Steggink, L. C., Steursma, G., Kruyt, L. M., Donkerbroek, J. W., van Roon, A. M., van Gessel, A. I., van de Zande, S. C., Meijer, C., zu Eulenburg, Ch. H. G., Oosting, S. F., Nuver, J., Walenkamp, A. M. E., de Jong, I. J., Lefrandt, J. D., Gietema, J. A. (2020). Vascular aging in long-term survivors of testicular cancer more than 20 years after treatment with cisplatin-based chemotherapy. *Br J Cancer*. 123:1599-607.
- Stewart, S. A., Weinberg, R. A. (2006). Telomeres: cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:531-57.
- Stokkevåg, C. H., Engeseth, G. M., Ytre-Hauge, K. S., Röhrich, D., Odland, O. H., Muren, L. P., Brydøy, M., Hysing, L. B., Szostak, A., Palmer, M. B., Petersen, J. B. B. (2014). Estimated risk of radiation-induced cancer following paediatric cranio-spinal irradiation with electron, photon and proton therapy. *Acta Oncol* 53(8):1048-57.
- Stone, N. N., Atlas, I., Kim, U. S., Kwan, D., Leventhal, I., Waxman, J. S. (1993). Renal angiomyolipoma associated with neurofibromatosis and primary carcinoid of mesentery. *Urology*. 41(1):66-71.
- Strahm, B., Malkin, D. (2006). Hereditary cancer predisposition in children: Genetic basis and clinical implications. *Int J Cancer* 119(9):2001-6.
- Swärd, J., Henrikson, O., Lyrdal, D., Peeker, R., Lundstam, S. (2020). Renal angiomyolipoma-patient characteristics and treatment with focus on active surveillance. *Scand J Urol*. 54(2):141-146.
- Tanaka, T., Biancotto, A., Moaddel, R., Moore, A. Z., Gonzalez-Freire, M., Aon, M. A., Candia, J., Zhang, P., Cheung, F., Fantoni, G., CHI consortium, Semba, R. D., Ferrucci, L. (2018). Plasma proteomic signature of age in healthy humans. *Aging Cell* 17(5): e12799.
- Tanguay, C., Harvey, I., Houde, M., Srigley, J. R., Têtu, B. (2003). Leiomyosarcoma of urinary bladder following cyclophosphamide therapy: report of two cases. *Mod. Pathol*. 16:512-514.
- Taylor, A. J., Little, M. P., Winter, D. L., Sugden, E., Ellison, D. W., Stiller, Ch. A., Stovall, M., Frobisher, C., Lancashire, E. R., Reulen, R. C., Hawkins, M. M. (2010). Population-Based Risks of CNS Tumors in Survivors of Childhood Cancer: The British Childhood Cancer Survivor Study. *J Clin Oncol*. 28(36): 5287-5293.
- Teepen, J. C., van Leeuwen, F. E., Tissing, W. J., van Dulmen-den Broeder, E., van den Heuvel-Eibrink, M. M., van der Pal, H. J., Loonen, J. J., Bresters, D., Versluys, B., Neggers, S. J. C. M. M., Jaspers, M. W. M., Hauptmann, M., van der Heiden-van der Loo, M., Visser, O., Kremer, L. C. M., Ronckers, C. M., DCOG LATER Study Group (2017). Long-term risk of subsequent malignant neoplasms after treatment of childhood cancer in DCOG Later study cohort: Role of Chemotherapy. *J Clin Oncol* 35(20):2288-2298.
- Travis, L. B., Hill, D., Dores, G. M., Gospodarowicz, M., van Leeuwen, F. E., Holowaty, E., Glimelius, B., Andersson, M., Pukkala, E., Lynch, Ch. F., Pee, D., Smith, S. A., Van 't Veer, M. B., Joensuu, T., Storm, H., Stovall, M., Boice Jr, J. D., Gilbert, E., Gail, M. H. (2005). Cumulative absolute breast cancer risk for young women treated for Hodgkin lymphoma. *J. Natl. Cancer Inst*. 97:1428-1437.
- Tukenova, M., Guibout, C., Hawkins, M., Quiniou, E., Mousannif, A., Pacquement, H., Winter, D., Bridier, A., Lefkopoulos, D., Oberlin, O., Diallo, I., de Vathaire, F. (2011). Radiation therapy and late mortality from second sarcoma, carcinoma, and hematological malignancies after a solid cancer in childhood. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 80(2):339-46.
- Turcotte, L. M., Whitton, J. A., Friedman, D. L., Hammond, S., Armstrong, G. T., Leisenring, W., Robison, L. L., Neglia, J. P. (2015). Risk of Subsequent Neoplasms During the Fifth and Sixth Decades of Life in the Childhood Cancer Survivor Study Cohort. *J Clin Oncol* 33(31):3568-75.
- Turcotte, L. M., Liu, Qi, Yasui, Y., Arnold, M. A., Hammond, S., Howell, R. M., Smith, S. A., Weathers, R. E., Henderson, T. O., Gibson, T. M., Leisenring, W., Armstrong, G. T., Robison, L. L., Neglia, J. P. (2017). Temporal trends in treatment and subsequent neoplasm risk among five-year survivors of childhood cancer, 1970-2015. *JAMA* 317(8):814-824.

- Turcotte, L. M., Liu, Q., Yasui, Y., Henderson, T. O., Gibson, T. M., Leisenring, W., Arnold, M. A., Howell, R. M., Green, D. M., Armstrong, G. T., Robison, L. L., Neglia, J. P. (2019). Chemotherapy and Risk of Subsequent Malignant Neoplasms in the Childhood Cancer Survivor Study Cohort. *J Clin Oncol* 37(34):3310-3319.
- Turnbull, C., Sud, A., Houlston, R. S. (2018). Cancer genetics, precision prevention and a call to action. *Nat Genet* 50(9):1212-1218.
- Tuttle, C. S. L., Waaijer, M. E. C., Slee-Valentijn, M. S., Stijnen, T., Westendorp, R., Maier, A. B. (2019). Cellular senescence and chronological age in various human tissues: A systematic review and meta-analysis. *Aging Cell* 19(2):e13083.
- Van Cott, Ch. (2020). Cancer Genetics. *Surg Clin North Am* 100(3):483-498.
- van den Berg, H., Paulussen, M., Le Teuff, G., Judson, I., Gelderblom, H., Dirksen, U., Brennan, B., Whelan, J., Ladenstein, R. L., Marec-Berard, P., Kruseova, J., Hjorth, L., Kühne, T., Brichard, B., Wheatley, K., Craft, A., Juergens, H., Gaspar, N., Le Deley, M. C., Euro-EWING99 Group (2015). Impact of gender on efficacy and acute toxicity of alkylating agent -based chemotherapy in Ewing sarcoma: Secondary analysis of the Euro-Ewing99-R1 trial. *Eur J Cancer* 51(16):2453-64.
- van Santen, H. M., Tytgat, G. A. M., van de Wetering, M. D., van Eck-Smit, B. L. F., Hopman, S. M. J., van der Steeg, A. F., van Dijkum, E. J. M. N., van Trotsenburg, A. S. P. (2012). Differentiated Thyroid Carcinoma After ¹³¹I-MIBG Treatment for Neuroblastoma During Childhood: Description of the First Two Cases. *Thyroid* 22(6):643-6.
- Vodicka, P., Kumar, R., Stetina, R., Sanyal, S., Soucek, P., Haufroid, V., Dusinska, M., Kuricova, M., Zamecnikova, M., Musak, L., Buchancova, J., Norppa, H., Hirvonen, A., Vodickova, L., Naccarati, A., Matousu, Z., Hemminki, K. (2004). Genetic polymorphisms in DNA repair genes and possible links with DNA repair rates, chromosomal aberrations and single-strand breaks in DNA. *Carcinogenesis* 25(5):757-63.
- Vos, N., Oyen, R. (2018). Renal angiomyolipoma: the good, the bad, and the ugly. *J. Belg. Soc. Radiol.* 102(1):41.
- Wang, S., Prizment, A., Thyagarajan, B., Blaes, A. (2021). Cancer Treatment-Induced Accelerated Aging in Cancer Survivors: Biology and Assessment. *Cancers* 13:427.
- Wang, Z., Wilson, C. L., Easton, J., Thrasher, A., Mulder, H., Liu, Q., Hedges, D. J., Wang, S., Rusch, M. C., Edmonson, M. N., Levy, S., Lanctot, J. Q., Caron, E., Shelton, K., Currie, K., Lear, M., Patel, A., Rosencrance, C., Shao, Y., Vadodaria, B., Yergeau, D., Sapkota, Y., Brooke, R. J., Moon, W., Rampersaud, E., Ma, X., Chang, T. Ch., Rice, S. V., Pepper, C., Zhou, X., Chen, X., Chen, W., Jones, A., Boone, B., Ehrhardt, M. J., Krasin, M. J., Howell, R. M., Phillips, N. S., Lewis, C., Srivastava, D., Pui, CH. H., Kesserwan, Ch. A., Wu, G., Nichols, K. E., Downing, J. R., Hudson, M. M., Yasui, Y., Robison, L. L., Zhang, J. (2018). Genetic Risk for Subsequent Neoplasms Among Long-Term Survivors of Childhood Cancer. *J Clin Oncol* 36(20):2078-2087.
- Watt, T. C., Inskip, P. D., Stratton, K., Smith, S. A., Kry, S. F., Sigurdson, A. J., Stovall, M., Leisenring, W., Robison, L. L., Mertens, A. C. (2012). Radiation – related risk of basal cell carcinoma: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst.* 104(16):1240-1250.
- Witkiewicz, A. K., Knudsen, K. E., Dicker, A. P., Knudsen, E. S. (2011). The meaning of p16^{ink4a} expression in tumors. Functional significance, clinical associations and future developments. *Cell Cycle* 10(15):2497-2503.
- Wong, J. R., Morton, L. M., Tucker, M. A., Abramson, D. H., Seddon, J. M., Sampson, J. N., Kleinerman, R. A. (2014). Risk of subsequent malignant neoplasms in long-term hereditary retinoblastoma survivors after chemotherapy and radiotherapy. *J Clin Oncol* 32(29):3284-90.
- Wood, W. A., Krishnamurthy, J., Mitin, N., Torrice, Ch., Parker, J. S., Snavely, A. C., Shea, T. C., Serody, J. S., Sharpless, N. E. (2016). Chemotherapy and Stem Cell Transplantation Increase p16^{INK4a} Expression, a Biomarker of T-cell Aging. *EBioMedicine* 11:227-238.
- Wu, P. E., Shen, Ch. Y. (2011). ‘Hide-then-hit’ to explain the importance of genotypic polymorphism of DNA repair genes in determining susceptibility to cancer. *Journal of Molecular Cell Biology* 3(1):59-65.
- Yu, G. L., Bradley, J. D., Attardi, L. D., Blackburn, E. H. (1990). In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* 344(6262):126-32.
- Zhu, J., Wang, F., Shi, L., Cai, H., Zheng, Y., Zheng, W., Bao, P., Shu, X. O. (2020). Accelerated aging in breast cancer survivors and its association with mortality and cancer recurrence. *Breast Cancer Res Treat.* 180(2):449-459.

Zichova, A., Eckschlager, T., Ganevova, M., Malinova, B., Luks, A., Kruseova, J. (2020). Subsequent neoplasms in childhood cancer survivors. *Cancer Epidemiol* 68:101779.