

Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Klinika Pneumologie a Ftiziologie LF UK v Plzni a FN Plzeň

**Klinické využití stanovení genové exprese RNA u
nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC)**

Dizertační práce

Studijní program: Vnitřní nemoci

Plzeň, 2017

Autor práce: MUDr. Martin Svatoň

Školitel: prof. MUDr. Miloš Pešek, CSc.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předkládanou dizertační práci vypracoval samostatně, a že jsem všechny použité informační zdroje řádně uvedl v příloženém seznamu literatury. Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Plzni dne 5.9.2017

Předmluva

Tato práce vznikla na základě spolupráce Kliniky pneumologie a ftizeologie FN a LF UK v Plzni, Šiklova ústavu patologie, Ústavu biologie a Ústavu lékařské chemie a biochemie LF UK v Plzni pod odborným vedením prof. MUDr. Miloše Peška, CSc.

Chtěl bych velice poděkovat školiteli prof. MUDr. Miloši Peškovi, CSc. za jeho cenné rady, podporu a vedení v průběhu celého doktorandského studia, dále mému konzultantovi doc. RNDr. Martinu Peštovi, Ph.D. a MUDr. Vlastimilu Kuldovi za provedení molekulárních analýz a rady v oblasti genetiky tumorů, MUDr. Petrovi Mukenšablovi, Ph.D. za ochotné dohledání a poskytnutí bioptických vzorků, MUDr. Mileně Roušarové za spolupráci na upřesnění klinických dat a v neposlední řadě i prim. MUDr. Gabriela Krákorové, Ph.D. za cenné podněty v oblasti klinické pneumoonkologie.

Abstrakt

Úvod

Nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC) patří k nejčastějším příčinám nádorových úmrtí celosvětově. Chemoterapie (CHT) je dosud (až na výjimku s pemetrexedem) dáována paušálně dle stadia nemoci a jejích komorbidit, bez užití dalších prediktivních markerů. To vede k pouze nízké objektivní léčebné odpovědi, která se liší pacient od pacienta, bez jasněji známých příčin.

Cíle

Cílem našeho výzkumu bylo nalézt možné prediktivní markery v podobě mRNA či miRNA, které by pomohly snížit recidivy NSCLC resp. zlepšit účinek CHT u vybraných skupin pacientů.

Metody

Ve třech souborech pacientů (42 pacientů s radikálně resekovánými adenokarcinomy stadia 1; 90 pacientů s NSCLC, kteří podstoupili chirurgickou resekci a 59 z nich pak i adjuvantní CHT; 81 pacientů paliativně léčenými CHT v kombinaci platinový derivát + paclitaxel/gemcitabin +/- sekvenční radioterapie s pokročilými dlaždicovými NSCLC stadií 3B, 4) jsme zkoumali vliv exprese vybraných mRNA a miRNA na dobu do recidivy onemocnění (DFI) resp. progresu onemocnění (PFS) a dobu celkového přežití (OS). Exprese byly stanovovány real-time PCR metodikou za užití UPL sond. Statistické analýzy využívaly Coxův regresní model a Kaplan-Meierovy distribuční funkce.

Výsledky

V první skupině nemocných jsme neprokázali žádný statisticky významný vztah mezi expresí vybraných markerů a DFI/OS v celkovém souboru. Pouze u podskupiny kuřáků/exkuřáků byl prokázán signifikantní vztah mezi hladinou mRNA BRCA1 a OS. U druhé skupiny pacientů jsme v celkové populaci nezaznamenali signifikantní vztah k DFI a OS, tyto výsledky byly signifikantní pouze pro vybrané podskupiny. V analýze více proměnných jsme nenašli žádné posilující/zeslabující kombinace exprese daných mRNA. U paliativně léčených pacientů jsme neprokázali vztah stanovovaných markerů k PFS a v celkové skupině ani k OS. Statisticky významné rozdíly v OS byly získány opět v určitých podskupinách pro některé miRNA (miR-342-3p, miR-34a a miR-224). Těž jsme poukázali na vazby mezi těmito miRNA.

Závěry

U pacientů s plicními adenokarcinomy stadia 1 se nám nepodařilo nalézt ve vybraném panelu marker, který by byl vhodným prediktorem podání či nepodání adjuvantní chemoterapie. Pacienti s nepokročilým onemocněním s vysokou expresí opravných genů DNA mají po chirurgické léčbě dobrou prognózu, naše práce pak nepotvrdila prediktivní význam námi zkoumaných genů na adjuvantní CHT. U skupiny paliativně léčených nemocných s dlaždicovými NSCLC stadií 3B a 4 je na základě našich výsledků exprese některých miRNA spojená s OS a mohou tak sloužit jako potenciální prognostické markery v daných skupinách nemocných.

Abstract

Introduction

Non-small cell lung cancer (NSCLC) belongs to the most frequent causes of cancer deaths worldwide. Chemotherapy (CHT) has still (except pemetrexed) administered according to stages and patients comorbidities, without the use of other predictive markers. It results into only low objective therapeutical response that differs in individual patients without more clearly known causes.

Aims

The aim of our research was to find possible predictive markers in the form of mRNA or miRNA, which would help to reduce the effect of NSCLC / CHT for selected groups of patients.

Methods

In three groups of patients (42 patients with radically resected adenocarcinomas stage 1; 90 patients with NSCLC who have undergone surgical resection and 59 of them consequently adjuvant CHT; 81 patients palliatively treated in combination platinum derivative + paclitaxel/gemcitabine +/- sequential radiotherapy with advanced squamous NSCLC stages 3B, 4), we examined the effect of expression of mRNA and miRNA until relapse (DFI) / progression (PFS) and overall survival (OS). Expressions were determined with the real-time PCR methodology using UPL probes. Statistical analysis used cox regression model and Kaplan - Meier distribution functions.

Results

In the first group of patients we demonstrated no statistically significant relationship between expression of selected markers and DFI / OS in the whole set. Only a subset of smokers/exsmokers shown significant relationship between levels of mRNA BRCA1 and OS. The second group of patients of the general population has no significant relationship to DFI and OS, these results were significant only for the selected subgroups. In the analysis of more variables we found no reinforcing/debilitating combinations of expression of given mRNA. In palliatively treated patients we didn't prove relationship arranged expression markers to PFS and in the overall group neither to OS. Statistically significant differences in the OS were obtained in certain subgroups for some miRNA (miR - 342 - 3p, miR - 34a and miR - 224). We also pointed out the complex links between these miRNAs.

Conclusion

In patients with lung adenocarcinomas stage 1 we didn't manage to find in the selected panel the marker, which would be an appropriate predictor of administration or non-administration of adjuvant chemotherapy. Patients with non-advanced disease with a high expression of DNA repair genes have had good prognosis after surgery, our investigation hasn't confirmed the predictive significance of predictive genes which we investigated to adjuvant CHT. In the palliatively treated patients with squamous NSCLC of stages 3B and 4 on the basis of our results the expression of certain miRNA is associated with OS and may serve as a potential prognostic markers in these groups of patients.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah	6
Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	12
2 Cíl práce	14
3 Popis současného stavu a problematiky	15
3.1 Epidemiologie karcinomu plic	15
3.2 Etiologie karcinomu plic	16
3.3 Histopatologická klasifikace plicních karcinomů	17
3.4 Diagnostika	17
3.4.1 Klinické projevy	17
3.4.2 Screening	19
3.4.3 Staging a morfologická diagnostika	20
3.4.4 Další vyšetření nutná k výběru léčby	26
3.5 Léčba NSCLC	27
3.5.1 Jednotlivé léčebné modality	28
3.5.2 Preparáty používané u terapie metastatického NSCLC	30
3.5.3 Léčebné schéma	69
3.5.4 Vybrané časté speciální paliativní postupy u NSCLC	76
3.5.5 Dispenzarizace	83
3.6 Prediktivní a prognostické markery NSCLC	83
3.6.1 Klinické markery	83
3.6.2 Molekulární markery	86
4 Řešení vlastní studie	100
4.1 Vliv exprese vybraných protein kódujících genů a mikroRNA na riziko relapsu plicních adenokarcinomů stadia 1	100
4.2 Prognostický význam ERCC1, RRM1 a BRCA1 u chirurgicky léčených pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem	110

4.3. Prognostický význam miR-34a, miR-224 a miR-342 u pacientů léčených paliativní chemoetapií pro pokročilé dlaždicové plicní karcinomy	118
5 Závěry.....	131
6 Seznam literatury.....	132
7 Seznam obrazů, tabulek a schémat.....	163
8 Přednášková a publikační činnost autora	166

Seznam použitých zkratk

3D-CT – třídimenzionální CT
ABC – ATB binding cassette
ACC – adenokarcinom
AFB – autofluorescenční bronchoskopie
ACTH - adrenokortikotropní hormon
ADH – antidiuretický hormon
ALI – advance lung cancer inflammation index
ALP – alkalická fosfatáza
ALK – anaplastic lymphoma kinase
AK – aminokyselina
AKT – serine-threonine protein kinase
AUC – plocha pod křivkou
 β TubIII – β -tubulin třídy III
BALP – bone specific alkaline phosphatase
Bcl-2 – B-cell lymphoma 2
BER – base excision repair
BFSK – bronchofibroskopie
BSC – nejlepší podpůrná léčba
BRAF – B-raf proto-oncogene
BRCA1 – breast cancer type 1 susceptibility protein
CEA – karcinoembryonální antigen
CECs – cirkulující endoteliální buňky
CEP17 – pericentromeric alpha satellite repeat on chromosome 17
CEPs – cirkulující endoteliální progenitorové buňky
CNS – centrální nervová soustava
cMET – mesenchymal-epithelial transition factor
COX2 – cyklooxygenáza 2
CRP – C-reaktivní protein
CT – počítačová tomografie
CTCs – cirkulující nádorové buňky
ctDNA – cirkulující nádorová DNA
CTLA-4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CTR-1 – constitutive triple response 1
CYFRA-21-1 – cytokeratinový fragment 21-1
ČR – Česká republika
DDOT – dlouhodobá domácí oxygenoterapie
DDR2 – discoidin death receptor 2
DFI – interval doby bez recidivy onemocnění (disease free interval)
DLCO – difusní kapacita plic pro oxid uhelnatý
DNA – deoxynukleová kyselina
DRC – DNA repair capacity
dTMP – deoxythymidinmonofosfát
dUMP – deoxyuridinmonofosfát
EBUS – endobronchiální endosonografie
ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group
EKG – elektrokardiogram

ErbB - avian erythroblastosis oncogene B = epidermal growth factor family of receptor tyrosine kinases
ERCC1 – excision repair cross-complementation group 1
EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor
EML-4 – microtubule-associated protein-like 4
EMN – elektromagnetická navigace
EMT – epithelial to mesenchymal transition
ER1 – estrogenový receptor 1
ERS – Europe respiratory society
ESMO – Europe society for medical oncology
EUS – jícnová endosonografie
FDA – Food and Drug Administration
FEV1 – forced expiratory volume in first second
FFPE – formalinem fixované parafinové bločky
FGF – fibroblast growth factor
FHIT – fragile histidine triad protein
FISH – fluorescenční in situ hybridizace
FOXM1 – Forkhead box M1
GAPDH – glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza
GDP – guanosindifosfát
GG-NER – global genome NER
GSH – glutathion
GTP – guanosintrifosfát
HDAC – histon deacetylázy
HE – hematoxylin a eosin
hENT1 – human equilibrative nukleoside transporter 1
HER-2 – human epidermal growth factor 2 = ErbB-2 receptor tyrosine kinase 2
H-FABP – heart fattyacid-binding protein
HGF – hepatocyte growth factor
HIF-1 α – hypoxia-inducible factor-1 alpha
HR – hazard ratio
HRR – homologous recombination repair
CHOPN – chronická obstrukční plicní nemoc
CHT – chemoterapie
CHT-RT - chemoradioterapie
IDO1 – indoleamine 2,3-dioxygenase 1
IFN – interferon
IGF – insulin-like growth factor
IGF1R – insulin-like growth factor receptor-1
IHC – imunohistochemie
IMRT – intensity modulate RT
IT – imunoterapie
KRAS – Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog = V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LAG-3 – lymphocyte-activation gene
LD – laktát dehydrogenáza
LDCT – nízkodávkové CT
LIRG – rich repeats and immunoglobulin-like domains
LKB1 – liver kinase B1
lncRNA – dlouhé nekódují RNA

LMWH – nízkomolekulární heparin
LU – lymfatické uzliny
LVD – lymphatic vascular density
MAP – mitogen-activated protein
MAGE-A3 – melanoma-associated antigen A3
MEK – mitogen activated extracellular signal-regulated kinase
MET – hepatocyte growth factor receptor (HGFR)
MIC – mitomycin C + isofosfamid + cisplatina
miRNA – mikro RNA
MMP – matrixové metaloproteinázy
MMR – mismatch repair
MPV – mitomycin + cisplatina + vinblastin
MR – magnetická rezonance
mRNA – mediátorová RNA
mTOR – mammalian target of rapamycin
MTV – metabolic tumor volume
MUC1 – episialin
NBI – narrow band imaging
NCCN – National Comprehensive Cancer Network
ncRNA – nekódující RNA
NER – nucleotide excision repair
NF- κ B – nukleární faktor kappa B
NGS – next generation sequencing
NHET – non-homologous end joining
NICE – National Institute for Health and Care Excellence
NK – natural killer
NK-1 – neurokinin 1
Nrf2 – nuclear factor erythroid 2-like factor 2
NSCLC – nemalobuněčný plicní karcinom
NSCLC NOS - NSCLC not otherwise specified
NSE – neuron-specifická enoláza
NTX – N-telopeptide of type I collagen
NÚ – nežádoucí účinky
ORR – objektivní odpověď na léčbu
OS – celkové přežití
OSR – one step repair
PARP1 – poly adenosine diphosphate-ribose polymerase 1
PCR – polymerázová řetězová reakce
PD-1 – programmed cell death protein 1
PD-L1 – Programmed death-ligand 1
PDGF – platelet derived growth factor
PGE2 – prostaglandin E2
PET – pozitronová emisní tomografie
PFS – doba do progrese onemocnění
PIK3 – phosphoinositide 3-kinase
PIK3CA – phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha polypeptide
PKC – protein kináza C
PLKs – polo-like kinases
PORT – pooperační radioterapie
PS – stav výkonnosti (dle ECOG)

PTEN – phosphatase and tensin homolog
PTHrP – parathyroid hormon-related protein
QoL – kvalita života
R – receptor (označuje receptor daného faktoru připojením na konce jeho zkratky)
RANKL – ligand pro receptor aktivátoru nukleárního faktoru kB
Rb – retinoblastoma gen
RET – ret proto-oncogene
ROS 1 – C-ros oncogene 1 receptor tyrosine kinase
RECIST – Response Evaluation Criteria In Solid Tumors
RECK – reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs
RING – really interesting new gene
RNA – ribonukleová kyselina
RNAPII – RNA polymeráza II
RRM1 – ribonucleotide reductase M1
RT - radioterapie
ROS1 – proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS 1
SABR – stereotactic ablative body radiotherapy
SCC – dlaždicový karcinom
SCLC – malobuněčný plicní karcinom
SIADH – syndrom nadměrná sekrece antidiuretického hormonu
sICAM-1 - soluble intercellular adhesion molecule-1
SNPs – jednonukleotidové polymorfismy
SPC – souhrn údajů o (léčivém) přípravku
SRE – skeletal-related events
SRS – stereotaktická radiochirurgie
STAT 3 – signal transducer and activator of transcription 3
SUV – standard uptake value
TAMs – tumor asociované makrofágy
TBNA – transbronchial needle aspiration
TC-NER – trascription coupled NER
TEN- tromboembolická nemoc
TGFβ – transforming growth factorβ
Tim3 – T-cell immunoglobulin-3
TIMP – tissue inhibitor of metalloproteinase
TK – thymidinkináza
TKI – tyrozinkinázový inhibitor
TLG – total lesion glycolysis
TOP2α – topoisomerase IIα
TS – thymidylátsyntáza
TTF-1 – thyroid transcription factor-1
UPL sonda – Universal Probe Library sonda
USG – ultrasonografické vyšetření
VAMS – video asistovaná mediastinoskopie
VATS – video asistovaná torakoskopie
VEGF – vascular endothelial growth factor
VCS – vena cava superior
XP – xeroderma pigmentosum (3. písmeno pak značí konkrétní gen této rodiny – např. XPC)
WBRT – celkové ozáření mozku
WHO – World Health Organization
WT – wild type

1 Úvod

Plicní karcinom zaujímá přední pozice v incidenci i mortalitě na nádorová onemocnění v České republice (ČR) i celosvětově. Na základě morfologie ho lze rozdělit na dva základní typy – malobuněčný plicní karcinom (SCLC) a nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC), který s více než 80% výskytem dominuje. Oba typy tumorů jsou diagnostikovány obvykle v pokročilých stádiích, kdy je možná již pouze paliativní léčba. Navíc i část pacientů, kteří podstoupí radikální resekci, se dočká recidivy onemocnění a to i přes adjuvantně podávanou chemoterapii (CHT) u stadií 2 a 3.

Plicní karcinom byl dlouhou dobu v pokročilých stádiích neléčitelným onemocněním a časná operovaná stádia měla vysoký výskyt recidiv. Situaci částečně změnila podávaná paliativní a adjuvantní chemoterapie, která však s sebou přináší též řadu nežádoucích účinků a rozdílné efekty u jednotlivých nemocných. Bylo tedy jasné, že v dalším vývoji bude nutný posun od léčby charakterizované heslem „jedna léčba pro všechny“ („one fits for all“) k léčbě cílené dle individuálních dispozic a znaků daných pacientů – tzv. personalizované medicíně. Jejím základním předpokladem je nalezení potřebných prediktivních a prognostických markerů pro výběr jednotlivých léčebných modalit pro konkrétní nemocné. Tyto markery mohou být klinického rázu (pohlaví, etnikum, gradu tumoru, histologie apod.), tak i molekulární povahy. Prognostickým markerem se obvykle rozumí parametr ukazující na další průběh onemocnění bez vlivu na podanou léčbu. Prognostické markery tak nacházejí uplatnění především v bedlivějším sledování léčebných odpovědí resp. remisí nádorech onemocnění, případně pak v agresivnějších léčebných postupech. Prediktivní marker je naopak spojen s danou konkrétní léčbou a měl by tedy, v ideálním případě, poskytnout odpověď na otázku, zda tuto léčbu nasadit či užít jinou terapeutickou modalitu. Některé markery pak mohou plnit roli prognostického i prediktivního markeru zároveň.

V naší práci se věnujeme užití ribonukleových kyselin (RNA) jako markerů predikce a prognózy u pacientů s NSCLC. Ze široké palety podtypů RNA jsme se zabývaly vybranými mRNA (mediátorové RNA) a tzv. miRNA (mikro RNA). Oba typy mají jako možné markery v klinické praxi jisté výhody i nevýhody oproti případným ostatním molekulárním cílům (což bude dále diskutováno v textu) a potvrzují tak, že zcela ideální marker zatím není a patrně ani nebude nalezen. Řešení může potenciálně přinést užití panelu více markerů zároveň nebo u některých molekul více měření daného markeru v průběhu onemocnění. I přes řadu nedostatků se již u NSCLC dostaly do praxe první z markerů na bázi deoxynukleových

kyselin (DNA). Mutační stav genu EGFR (receptor pro epidermální růstový faktor) či zjišťování případných translokací genu ALK (anaplastic lymphoma kinase) pomáhá při výběru tzv. cílené léčby. Řada markerů bude patrně v blízké době následovat.

2 Cíl práce

Tato práce se zabývá možným využitím mRNA a miRNA jako potencionálních prediktivních či prognostických markerů u NSCLC, což by mohlo napomoci lépe cílit léčbu u těchto pacientů.

Této problematice byly věnovány tři práce týkající se odlišných problematik. První z nich řeší možné využití vybraných tzv. opravných genů v managementu pacientů s resekovanými plicními karcinomy, kde je nadále diskutována otázka výběru pacientů vhodných pro adjuvantní léčbu. Druhá a třetí práce pak zkoumá panel vybraných mRNA a miRNA u dvou souborů nemocných. Zaprvé u pacientů stadia I s radikální chirurgickou léčbou a bez podávané adjuvantní chemoterapie, kdy nás zajímal možný vliv exprese vybraných markerů na zvolení pacientů vhodných k podání adjuvantní léčby i v této skupině nemocných. Cílem druhého souboru pak byli pacienti s pokročilými tumory, kdy jsme zkoumali možnou souvislost našeho panelu mRNA a miRNA na odpověď chemoterapie a prognózu těchto pacientů.

3 Popis současného stavu a problematiky

3.1 Epidemiologie karcinomu plic

Obyvatelstvo ČR čítalo mezi lety 2013-2015 cca 10,5 milionu obyvatel (s mírnou převahou mužů), z čehož roční úmrtnost se pohybovala v rozmezí 105-110 tisíc obyvatel [1]. Obyvatelstvo Plzeňského kraje čítá cca 577 tisíc obyvatel [1]. Naděje na dožití se u mužů uvádí na 75 let a u žen na 81 let [1]. Mezi nemoci, které tento věk mohou výrazně zkrátit, patří v ČR i celosvětově bronchogenní karcinom, který se řadí na první příčky mezi příčinami nádorových úmrtí i nejčastější typy zhoubných nádorů [2].

V ČR je uváděna incidence [3] (všechna níže data standardizována na světový věkový standard, všechny data vztáhnuta na 100 000 obyvatel) bez ohledu na pohlaví v roce 2014 28,38, mortalita pak 24,7. V incidenci i mortalitě výrazně převažují muži nad ženami - 42,25 vůči 17,38 resp. 38,7 vůči 13,63. Příznivou zprávou je pokles incidence u mužů a stagnace u žen v posledních několika letech.

Co se týče stadií tumorů je dobrou diagnostickou vizitkou poměrně výrazný pokles neznámého stadia projevující se cca od roku 2006 (incidence/mortalita v roce 2014 = 2,31/2,05). Trvale převažuje stadium IV (14,8/14,11), následované stadiem III (6,19/5,81), stadia I (2,88/1,28) a II (2,19/1,44) měla v roce 2014 incidenci i mortalitu obdobnou. Věkově v ČR dominují u obou pohlaví nemocní mezi 60-75ti lety [3].

Pro Plzeňský kraj incidence dosahovala hodnoty 32,85 a mortalita 28,58. Opět bylo patrné vyšší zastoupení mužů vůči ženám v incidenci i mortalitě (48,15 vůči 20,01 resp. 43,7 vůči 16,12). Celkově patřil Plzeňský kraj v incidenci v letech 2007-2014 na 3. místo v ČR, přičemž u mužů obsadil 3. místo a u žen 5. místo mezi kraji. Incidence tedy byla nad průměrem ČR. Stran stadií ve srovnání s ČR se mírně více objevuje stadium I a IV, naopak neznámých stadií je značně méně. Věkové rozložení obyvatel je obdobné, dominují nemocní mezi 60-75ti lety [3].

Ve srovnání s okolními státy [3] obsadila (dle posledně dostupných dat z roku 2008, data na 100 000 obyvatel) ČR v Evropě 9. místo (incidence 34 vs. 1. Maďarsko 52), což bylo více než incidence v rámci Evropská unie (30,2). Při posuzování dle pohlaví byl výskyt bronchogenní karcinomu mezi muži i ženami na 11. místě v Evropě. Výskyt incidence v ČR byl vyšší i než průměr na všech kontinentech vyjma Severní Ameriky (incidence

41,51). Proto nepřekvapí, že v rámci celosvětového srovnání (posuzováno 183 zemí) byla ČR na 13. místě (13. mezi muži a 24. mezi ženami).

Pokud bychom se zaměřili na publikovaný výskyt EGFR mutací v České republice přináší dosud patrně největší publikovaný soubor práce Fialy et al. [4]. Zde byly senzitivní EGFR mutace uváděny u 15,2% obyvatel, přičemž u mužů dosahoval jejich výskyt 8,8% procent, naopak u žen 24,3%. Vyšší výskyt byl též pozorován u nekuřáků a nemocných do 65- ti let věku.

Pro rok 2016 pak bylo v Modré knize [5] predikovaná incidence NSCLC (který by měl čítat cca 65% všech zhoubných nádorů plic) 4690 pacientů. Dle stadií se očekávaly tyto počty nemocných: stadium I 571, stadium II 339, stadium III 1221 a pro stadium IV 2170, kdy pro 389 pacientů je predikované neznámé stadium. Prevalence by pak měla dosáhnout více než 15 000 nemocných s opět převahou stadia IV. Počet nově léčených pacientů je predikován na 4343 nemocných.

3.2 Etiologie karcinomu plic

[2, 6, 7, 8]

Je všeobecně známo, že nejdůležitějším etiologickým faktorem karcinomu plic je kouření tabákových výrobků, které zvyšuje riziko onemocnění bronchogenním karcinomem u mužů 24,2x a u žen 12,5x. Rovněž i pasivní kuřáctví zvyšuje riziko vzniku plicního karcinomu o 20-35%. U kuřáků stoupá riziko vzniku plicního karcinomu zejména mezi nemocnými s poklesem FEV1 (forced expiratory volume in first second).

Plicní karcinom u nekuřáků (tedy pacientů, kteří za celý život nevykouřili více než 100 cigaret) je dle WHO diagnostikován u přibližně 25% případů. Nicméně jsou popisovány značné rozdíly mezi západními zeměmi (cca 10% případů) a ženami v Asii (až 40% případů). U nekuřáků je jako možný etiologický vliv diskutováno ionizující záření (v ČR se týká především radonu v prostředí a horníků z uranových dolů). Dále se diskutuje o expozici těžkým kovům (rtuť, nikl, chrom, arzen), azbestu, některým organickým sloučeninám (např. chlorované uhlovodíky), výparům olejů při vaření či vaření na otevřeném ohni v domě (týká se především asijského prostředí), znečištění ovzduší, chronickým plicním zánětlivým a fibrotizujícím chorobám či vlivu hormonální substituční léčby u žen (nejednoznačné výsledky). Rovněž nelze opomenout hereditární vlivy.

3.3 Histopatologická klasifikace plicních karcinomů

Klasifikace plicních tumorů se řídí novým doporučením WHO z roku 2015 [9]. Ta člení plicní tumory na epitelální, mesenchymální, lymfohistiocytické, ektopického origa a metastatické. Tato práce se pak zabývá částí epitelálních plicních tumorů, které jsou v klinické praxi označovány jako NSCLC. Mezi NSCLC se obvykle řadí skupina (při vyšetření resektátu) adenokarcinomu, dlaždicového karcinomu, adenoskvamozního karcinomu, velkobuněčného karcinomu a sarkomatoidního karcinomu. Z malých diagnostických vzorků tak zbývá dělení na adenokarcinom (ACC) a dlaždicový karcinom (SCC), což je klíčové pro některé druhy léčby. Někdy je pouze morfologické odlišení těchto dvou typů obtížné. V tomto případě se lze ve většině případů přiklonit k jednomu z těchto typů za pomoci imunohistochemického vyšetření pomocí protilátek TTF1 (thyroid transcription factor-1) pro ACC a p40 (synonymum interleukin-12B) pro SCC. Pokud ani za pomoci tohoto vyšetření nelze rozhodnout mezi danými dvěma typy tumorů, přikláníme se k diagnóze NSCLC NOS (NSCLC not otherwise specified). U ACC, spíše ACC a NSCLC NOS je pak standardem vyšetření na přítomnost EGFR senzitivních mutací a ALK translokací, neboť jejich průkaz je prediktorem pro nasazení příslušné cílené terapie [10].

3.4 Diagnostika

3.4.1 Klinické projevy

[2, 6, 7, 11, 12]

Klinické projevy NSCLC lze rozdělit na několik skupin. Jednak na symptomy lokální, dále příznaky ze vzdálených metastáz, paraneoplastické projevy a klinické příznaky zjištěné při fyzikálním vyšetření. Část nemocných je bezpříznakových (okolo 10% pacientů) - jsou diagnostikováni náhodně při jiném vyšetření. Výskyt příznaků je obvykle spojen s pokročilými tumory a tudíž horší prognózou.

Lokální příznaky

Mezi lokální příznaky patří zejména kašel (případně změna jeho charakteru), kdy jeho četnost v době diagnózy je obvykle přes 50%. Až u 1/3 nemocných (obzvláště u nemocných s SCC pro jeho čtenější centrální lokalizaci) lze pozorovat hemoptýzu. Mezi další varovné příznaky patří dušnost, bolest na hrudi, opakované pneumonie či stridor. Obzvláště u kuřáků by tyto projevy měly vést k indikaci odborného vyšetření. Další progresí nádoru může docházet k chrapotu při postižení nervus laryngeus recurrens,

projevům syndromu horní duté žíly, polykacím obtížím při prorůstání do jícnu či jeho útlaku, neurologickým obtížím při růstu do páteřního kanálu a zvětšení krční mízní uzliny. Pancoastův tumor (tumor plicního hrotu) se může projevit krutými bolestmi horní končetiny při postižení plexus brachialis nebo Hornerovým syndromem (mióza-ptóza-noftalmus) díky postižení sympatiku.

Příznaky ze vzdálených metastáz

Metastázy do CNS (centrální nervové soustavy) vyvolávají neurologické či psychické obtíže. Prorůstání do skeletu vede k bolestem a frakturám a případně hematologickému útlumu při šíření do kostní dřeně. Metastázy do jater obvykle zůstávají dlouhou dobu němé, při jejich výraznější progresi lze někdy pozorovat ikterus či bolest v podžebří z důvodu distenze jaterního pouzdra při hepatomegalii. Klinické příznaky metastáz do nadledvin jsou raritní.

Paraneoplastické projevy

Mezi celkové příznaky (nespecifické paraneoplastické projevy) patří zejména hubnutí, nechutenství, nauzea, ortostatická hypotenze a celková slabost. Někdy lze pozorovat zvýšené pocení a teploty.

Mezi endokrinními syndromy patří zejména hypertrofická osteoartropatie (s paličkovitými prsty díky působení vazoaktivních substancí), Cushingův syndrom z ektopické produkce ACTH (častěji však vídaný u SCLC), syndrom nepřiměřené sekrece antidiuretického hormonu (SIADH) - též častější u SCLC- vedoucí k hyponatremii a hypochloremii. Dále pak maligní hyperkalcemie (patrně vlivem produkce PTHRP – parathyroid hormon-related proteinu) vedoucí k nechutenství, zácpě, polyurii, zmatenosti až arytmií a úmrtí.

Mezi další paraneoplastické příznaky můžeme řadit různé kožní projevy (např. migrující tromboflebitida), neurologické syndromy (především periferní neuropatie), hematologické projevy (zejména anemie), koagulopatie (sklon k trombózám), výjimečně (literární údaje) pak autoimunitní choroby – např. vaskulitidy, renální postižení (glomerulonefritidy) a metabolické projevy (laktátová acidóza, hypourikémie).

Fyzikální vyšetření může prokázat zvětšení nadklíčkových lymfatických uzlin, příznaky syndromu horní duté žíly, zkrácený hrudní poklep při výpotku, hepatomegalii, oslabený poslech při plicní atelektáze apod.

3.4.2 Screening

[13, 14, 15, 16, 17]

Je známo, že nižší stadia NSCLC jsou spojena s vyšším pětiletým přežitím a dokonce i velikost tumoru v rámci daného stadia patrně odráží pětileté přežití (u stadia IA se např. uvádí 80% pětileté přežití u tumorů velikosti 1,6-2cm, 85% pro velikost 1-1,5cm a 100% u tumorů menších než 1cm). To by se též mělo odrazit v nově chystané TNM klasifikaci tumorů (viz níže). Zdá se tedy, že plicní screening, který by odhalil plicní tumory v nižších stadiích, by mohl přispět ke snížení mortality na toto onemocnění.

Původní práce zabývající se screeningem plic (mimo jiné i respektovaná Czechoslovak study) porovnávaly skiagram plic se sledováním rizikových pacientů. Výsledek však nevedl ke snížení mortality ve screeningovém rameni, a proto bylo od myšlenky screeningu na nějaký čas upuštěno. Počítačová tomografie (CT) byla zpočátku zatížena neúměrnou dávkou záření, nový impuls tak přinesla až možnost provádění nízkodávkového CT (LDCT) v dostatečné kvalitě.

Studie NLST byla první prací, která prokázala snížení mortality za užití LDCT. Jednalo se o rozsáhlou americkou studii (čítající 54349 účastníků), která porovnávala LDCT se skiagramem hrudníku (obě prováděné 3 roky po sobě) u vysoce rizikové skupiny těžkých kuřáků. LDCT skupina zachytila více plicních karcinomů (obzvláště časných stadií) než skiagram hrudníku (1,1 vs. 0,7%). Výsledkem bylo 20% snížení mortality spojené s karcinomem plic a 6% snížení mortality celkově. I přes vysoké procento falešně pozitivních nálezů (screening byl brán jako pozitivní u 27,3% sledovaných) se zdá být nákladově efektivní pro americké prostředí. Jelikož nelze zcela vztáhnout americké výsledky na evropskou populaci, objevily se i další evropské studie.

Nejprve vznikly menší dánské (DLST) a italské studie (Italung, DANTE, MILD), které na svých 1000-2000 účastnících nepotvrdily výsledky studie NLST. To mohlo být dáno jednak malým souborem nemocných a též odlišnostmi v protokolu studie, kdy např. výsledek studie DANTE vykazoval nízkou senzitivitu a navíc byla nemalá část pacientů při dalším vyšetřování podrobena chirurgickému výkonu s negativním výsledkem.

Tyto nedostatky se snaží odstranit svým designem belgicko-nizozemská studie NELSON, která zahrnuje 15822 těžkých kuřáků (s mírně odlišnými kritérii než ve studii NLST). Účastníci byli randomizováni mezi LDCT a kontrolní rameno. LDCT bylo prováděno ve zvyšujících se intervalech (1, 2 a 2,5 roku). Při LDCT zde byla nově využita volumetrie

a dvojestupňový proces vyhodnocení výsledků, kdy pacienti se „střední“ hodnotou výstupy byly zařazeni mezi pozitivní či negativní na základě dalšího LDCT provedeného po 3-6 měsících. Tím se podařilo výrazně redukovat falešně pozitivní nálezy screeningu, které dosáhly pouze 2,7%. Výsledky na mortalitu nejsou prozatím známy.

Zatímco americké NCCN guidelines již zanesla screeningem do svých algoritmů, evropské standardy Evropské respirační společnosti (ERS) jsou prozatím obezřetnější – víceméně se čeká na výsledky studie NELSON a jsou vyhodnocovány možná úskalí screeningu z předchozích studií. Je zřejmé, že kvalitní screening se musí opírat o správný výběr rizikové populace a následné co nejlepší vyhodnocení negativních vs. pozitivních výsledků a jejich další optimální management. Rovněž nelze zapomínat na možná rizika radiace při příliš častých opakováních LDCT, kdy by měly být nápomocné nové přístroje a techniky značně redukující dávku jednoho vyšetření. Též je diskutováno zapojení dalších klinických parametrů (např. přítomnost chronické obstrukční plicní nemoci = CHOPN) a biomarkerů k výběru rizikové populace. V neposlední řadě je třeba pomýšlet na benefit zachycení vedlejších diagnóz jako je emfyzém u CHOPN, intersticiální plicní onemocnění či osteoporóza. Pouze po důkladném zvážení a rutinním zvládnutí všech těchto bodů je možné uvažovat o nákladově efektivním screeningu plicního karcinomu v ČR.

3.4.3 Staging a morfoloická diagnostika

Základem úspěšné léčby NSCLC je provedení kvalitního stagingu a morfoloické potvrzení histologického typu tumoru.

Klasifikace pro stážování

Stážování se v současné době řídí 7. TNM klasifikací zhoubných nádorů [35], ačkoliv brzy vstoupí v platnost 8. verze TNM klasifikace [18, 19], která má lépe odrážet prognózu jednotlivých skupin pacientů. 7. verzi TNM klasifikace shrnuje Tabulka 1, stážování pak Tabulka 2.

8. verze TNM [19] pak přinese jednak lepší rozčlenění prognostických skupin na základě rozsáhlého sběru dat, ale též určité praktické stránky pro léčbu. U stadia I bude díky rozčlenění na stadia IA až IC snadnější vyčlenit možnou skupinu nemocných, u kterých by snad postačovala jako radikální léčba pouze segmentektomie či SABR (stereotactic ablative body radiotherapy). Naopak u stadia IV bude díky úpravě faktoru M1b (jedna vzdálená metastáza) možné zkoumat přínos radikálnějšího postupu (např. SABR na

metastatické ložisko a chemoradioterapie, CT-RT, hrudníku) vůči stávajícímu postupu (systémová léčba).

Tabulka 1 – TNM klasifikace karcinomu plic [35]

T- primární nádor	
TX	Primární nádor nelze hodnotit nebo je nádor prokázán pouze na základě přítomnosti maligních buněk ve sputu nebo bronchiálním výplachu, ale není viditelný zobrazovacími vyšetřovacími metodami nebo bronchoskopicky
T0	Bez známek primárního nádoru
Tis	Karcinom in situ
T1	Nádor ≤ 3 cm v největším rozměru, obklopený plicí nebo viscerální pleurou, bez bronchoskopických známek postižení proximálněji od lobárního bronchu (tj. ne v hlavním bronchu)
<i>T1a</i>	Nádor do 2cm v největším rozměru
<i>T1b</i>	Nádor větší než 2cm, ne však více než 3cm v největším rozměru
T2	Nádor > 3 cm, ne však více než 7 cm; nebo nádor s některou z následujících charakteristik: Postihuje hlavní bronchus 2cm a distálněji od kariny; šíří se na viscerální pleuru; je spojen s atelektázou nebo obstrukčním zánětem plic, který se šíří až k hilu, ale nepostihuje celou plicí
<i>T2a</i>	Nádor > 3 cm, ne však více než 5 cm v největším rozměru
<i>T2b</i>	Nádor > 5 cm, ne však více než 7 cm v největším rozměru
T3	Nádor > 7 cm nebo přímo postihující některou z následujících struktur: Hrudní stěny (včetně nádorů horního sulku), bránice, frenického nervu, mediastinální pleury, parietálního perikardu nebo Nádor hlavního bronchu ve vzdálenosti do 2cm od kariny, avšak bez postižení kariny nebo Přidružená atelektáza či obstrukční pneumonitida celé plíce nebo Samotný nádorový uzel (uzly) v témže laloku jako primární nádor
T4	Nádor jakékoli velikosti, který postihuje některou z následujících struktur: mediastinum, srdce, velké cévy, trachea, nervus laryngeus recurrens, jícen, tělo obratle, karina, nebo samotný nádorový uzel (uzly) v jiném stejnostranném laloku než primární nádor
N – regionální mízní uzliny	
NX	Regionální uzliny nelze hodnotit
N0	V regionálních uzlinách nejsou metastázy
N1	Metastázy ve stejnostranných peribronchiálních a/nebo stejnostranných hilových uzlinách a uzlinách intrapulmonálních, včetně postižení přímým šířením

N2	Metastázy ve stejnostranných mediastinálních a/nebo subkarinních mízních uzlinách (uzlině)
N3	Metastázy v druhostranných mediastinálních, druhostranných hilových, stejnostranných či druhostranných skalenických nebo supraklavikulárních mízních uzlinách (uzlině)
M – vzdálené metastázy	
MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	Nejsou vzdálené metastázy
M1	Vzdálené metastázy
<i>M1a</i>	Samostatný uzel (uzly) v druhostranném laloku, nádor s pleurálními uzly nebo s maligním pleurálním či perikardiálním výpotkem
<i>M1b</i>	Vzdálené metastázy

Tabulka 2) Stážování karcinomu plic.

Stadium	T	N	M
Okultní karcinom	TX	N0	M0
Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium IA	T1a, T1b	N0	M0
Stadium IB	T2a	N0	M0
Stadium IIA	T2b	N0	M0
	T1a, T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
Stadium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stadium IIIA	T1a, T1b, T2a, T2b	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
	T4	N0, N1	M0
Stadium IIIB	T4	N2	M0
	Jakékoliv T	N3	M0
Stadium IV	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1

Zobrazovací metody stážování

[2, 7, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26]

Prvotní zobrazovací metodou nadále zůstává skiagram hrudníku, který je obvykle vodítkem k indikaci dalších vyšetření – např. při podezření na pleurální výpotek může díky včasné indikaci torakocentézy výrazně urychlit diagnostiku. Základní zobrazovací

technikou pak zůstává CT plic a mediastina (s kontrastní látkou nejsou-li kontraindikace) s rozšířením na horní břišní partie s důrazem na zobrazení jater a nadledvin. Některá doporučení pak doporučují provedení kompletního CT břicha, jiná naopak připouštějí doplnění USG břicha (někdy doplňované i o oblast nadklíčků pro lepší citlivost na tuto oblast). Při podezření na metastazování do skeletu je vhodné doplnění scintigrafického vyšetření skeletu, případně rentgenové vyšetření oblasti s podezřením na metastatické postižení. U nemocných s neurologickými projevy se doporučuje doplnění MR (magnetická rezonance) mozku, v případě jeho kontraindikace (magnetické kovové implantáty v těle pacienta) CT mozku s kontrastní látkou. MR se též doporučuje u tumorů horního plicního sulku (Pancoastův tumor) nebo při podezření na prorůstání do hrudní stěny, páteře či syndromu horní duté žíly. K potvrzení podezření na pleurální výpotek je vhodné USG (ultrasonografické vyšetření) pleury. Alternativou k výše popsanému stagingovému postupu je provedení PET/CT (pozitronová emisní tomografie/CT) a MR mozku, které slučují řadu výše popsaných postupů. Navíc u nemalého počtu nemocných vedou k následnému přestážování choroby (obvykle k vyššímu stadiu). Proto jsou tato vyšetření jednoznačně doporučena u nemocných s kurativním záměrem dle mezinárodních (NCCN, ESMO, NICE) i českých guidelines. PET/CT je též výhodné při tumorech s okolní atelektázou. U již prokázaného metastatického onemocnění není jejich provedení nezbytně nutné, neboť by v drtivé většině případů neměnilo diagnostický postup, a proto se při omezené dostupnosti (a vysokých nákladech) tato vyšetření u stadia IV v řadě zemí neprovádí. Nedílnou součástí stagingu je, z definice TNM klasifikace, též bronchoskopické vyšetření, neboť až u 40% pacientů (obvykle v pokročilém stadiu) se vyskytuje endobronchiální růst tumoru.

Metody morfologické diagnostiky

[2, 7, 16, 20, 21, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30]

Podezření na plicní karcinom a klinické stadium určené na základě zobrazovacích metod by mělo být standardně potvrzeno morfologickým vyšetřením. Vzhledem k narůstající náročnosti molekulárních analýz je preferován bioptický odběr, v případě jeho neúměrné náročnosti ho však může nahradit cytologický preparát – optimálně zpracovaný ve formě cytobloku. Vždy by měla být snaha morfologicky potvrdit místo určující nejvyšší stadium onemocnění (vyjma zjevně generalizovaného tumoru). To platí zejména o průkazu solitární

metastázy a dále u mízních uzlin u lokálně pokročilého onemocnění, neboť potvrzení resp. vyloučení těchto postižení může sehrát kritickou úlohu v léčebném plánu.

Primární tumor je morfoloogicky diagnostikován obvykle pomocí bronchofibroskopie (BFSK) či transtorakální biopsie (Core jehlou či tenkou jehlou), která je metodou volby pro periferně uložené tumory větší než 1-2 cm. Bronchoskopický přístup se liší v závislosti na viditelnosti tumoru v dohledu přístroje. Při tumorech objevujících se ve větších průduškách je metodou volby obvykle biopsie za pomoci kleští či kryobiopsie, při nekrotickém povrchu tumoru může být nápomocná punkce jehlou. Složitější (a ne vždy úspěšný) postup nastává v případě periferněji uloženého tumoru. Lze využít několik metod s různou mírou výtěžnosti, ale i náročnosti na přístrojové vybavení a s různým rizikem komplikací. Nejsnáze dostupnou metodou je aspirace/brush ze segmentu určeného na podkladě CT vyšetření. Sofistikovanější metody obnáší užití navigace pomocí skioskopu či radiálního EBUS (endobronchiální endosonografie), optimálně pak za jejich kombinace s následným odběrem jehlou/kleštěmi/kryosondou. Poslední možností zůstává využití elektromagnetické navigace (EMN). Její rutinní využití naráží na enormně vysoké náklady a nedostatečnou výtěžnost v případě absence tzv. „bronchus sign“ (viditelné průdušky na CT snímku procházející v oblasti tumoru). Nadějně jsou některé nově vyvíjené metody (použití tenkých fibroskopů, vytvoření přímého „tunelu“ z větších bronchů přímo k požadované lézi apod.). V případě nevířetnosti výše popsaných metod a nutnosti ověření primární léze (nejde o lokálně pokročilý či metastatický karcinom) zbývá užití chirurgických technik. Dle zkušenosti pracoviště a dostupnosti léze za užití VATS (video asistovaná torakoskopie) či otevřené torakotomie s provedením peroperační zmrazené biopsie, s případným dokončením radikálního chirurgického výkonu dle jejího výsledku.

Lymfatické uzliny (LU) lze v případě podezření na postižení LU nadklíčků potvrdit punkcí pod kontrolou hmatu nebo USG. Náročnější je pak průkaz metastáz do hilových a mediastinálních LU. V případě zvětšených dolních paratracheálních, subkarinních a příznivě uložených hilových LU se lze pokusit o transbronchiální punkci jehlou (TBNA) při znalosti CT nálezu. Při jejím neúspěchu je metodou volby punkce za pomoci EBUS či EUS (jícnová endosonografie), případně jejich kombinace (záleží na místě daných uzlin). Pokud jsou jediné suspektní LU v aortopulmonálním okně, je nutné provedení VATS. V případě zvažovaného operačního výkonu u pacientů s PET/CT negativními LU je

diskutována vhodnost provedení systematického samplingu mediastinálních LU v určitých případech. Dle dostupných studií a doporučení tento postup není nutný u periferních tumorů menších než 3 cm, které vykazují pozitivitu na PET/CT, neboť pravděpodobnost pozitivních LU stadia N2/N3 je menší než 6%. Naopak u tumorů centrálněji lokalizovaných, větších než 3 cm (zvláště u adenokarcinomů), s pozitivními N1 uzlinami dle PET/CT či nevykazujících PET pozitivitu (tudíž s podezřením na absenci této positivity i v N2/N3 LU) je dle ERS systematický sampling doporučován (na nízké úrovni doporučení). Uvádí se, že při kombinaci EBUS + EUS a při jejich negativitě provedení VAMS se prokáže 6-30% pacientů s pozitivními N2/N2 LU, kteří tak nemusí podstoupit lobektomii. Na druhou stranu tato data nepocházejí z velkých randomizovaných studií, a proto toto doporučení není předmětem jiných guidelines včetně českých. Naopak s vysokou mírou jistoty lze konstatovat, že při tomto typu stážování by měl být prioritně použit EBUS spolu s EUS optimálně v jednom sezení.

Metastatické onemocnění může být diagnostikováno pomocí torakocentézy či torakoskopie (chirurgické či medicínské) v případě podezření na maligní výpotek. Kostní metastázy či metastázy do jater bývají obvykle dosažitelné punkcí pod USG či CT kontrolou, při podezření na generalizaci do kostní dřene lze přistoupit k sternální punkci. Metastázy do mozku se ověřují chirurgickou cestou na pracovištích neurochirurgie. Metastázu v levé nadledvině lze někdy ověřit pomocí EUS, v případě neúspěchu je obvykle nutná chirurgická cesta. Ta je též preferována při suspektní metastáze do pravé nadledviny.

Odebraný vzorek je následně barven a podroben cytologickému či histologickému vyšetření. Histologické vzorky by měly být dále zpracovány za pomoci IHC (imunohistochemie), jak je popsáno výše. Nedílnou součástí vyšetření vzorků je u nedlaždicových NSCLC a vybraných SCC (zejména mladé nekuřáčky) vyšetření na přítomnost EGFR a ALK mutací. U EGFR se doporučuje minimálně vyšetření tzv. častých mutací (bodová mutace L858R na exonu 21 a delece na exonu 19) validovanou metodou (obvykle založené na PCR = polymerázová řetězová reakce). Optimální je pak vyšetření všech mutací na exonech 18 až 21. Stran ALK translokací se v současné době doporučuje testovat pomocí IHC a nízcce pozitivní vzorky (1+/2+) následně konfirmovat pomocí FISH (fluorescenční in situ hybridizace). Dle NCCN je v případě dostupné léčby (po schválení ke klinickému užití či v rámci klinických studií) též na zvažení vyšetření mutací genu HER2 (ErbB-2 receptor tyrosine kinase 2) a BRAF (B-raf proto-oncogene) - zejména typu

V600E, translokací ROS1 (proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS 1) a RET (ret proto-oncogene) a MET (hepatocyte growth factor receptor) amplifikací. V době nastupující imunoterapie se objevuje požadavek na vyšetřování PD-1 (programmed cell death protein 1) pozitivitu.

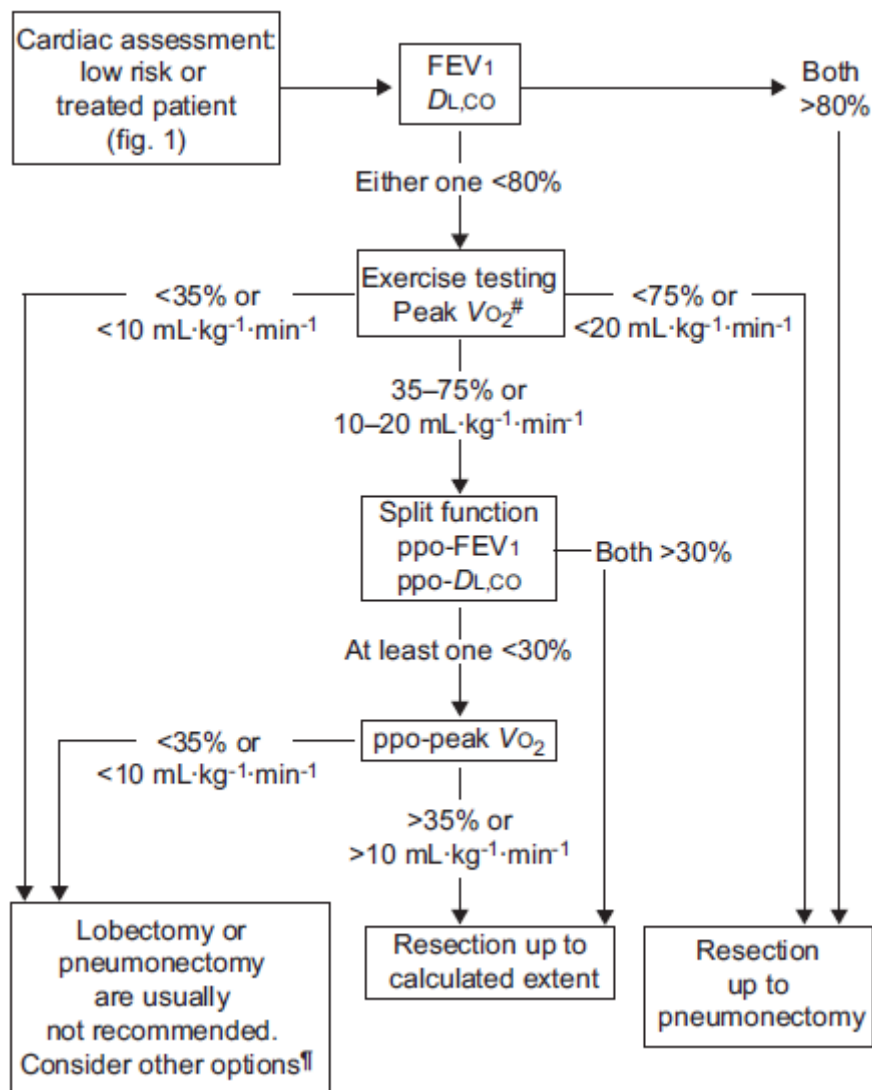
3.4.4 Další vyšetření nutná k výběru léčby

[2, 7, 20, 21, 22, 31]

Při výběru léčby zastávají, krom přesného stážování a určení typu tumoru, důležitou roli i další faktory. Je nutné vzít v potaz další komorbidity nemocného (především stran únosnosti plánované operační či celkové léčby), ztrátu hmotnosti v posledních měsících a jeho celkový stav obvykle vyjádřený jako performance status (PS) dle ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group). Dále je nutné znát laboratorní parametry pacienta (především krevní obraz, jaterní a renální panel, stav výživy, iontogram a laktát dehydrogenázu). Úloha stanovení onkomarkerů není jasná, ESMO guidelines jejich rutinní užívání nedoporučují. Před zvažovanou radikální léčbou je nutné stanovit únosnost pacienta k tomuto postupu. Jasně parametry ohledně celkového stavu či spirometrických hodnot stran únosnosti k radioterapii nejsou dány, pacienty by měl posuzovat multidisciplinární tým. Naopak ERS vypracovala poměrně jasná doporučení pro posouzení únosnosti resekčního výkonu z hlediska kardiopulmonálních funkcí.

Kardiální hledisko je na zvážení interního lékaře (resp. kardiologa), který by měl vyhodnotit pacientovu anamnézu, fyzikální vyšetření, EKG (elektrokardiogram) a dostupný index rizikovosti, na jejichž základě zváží doplnění echokardiografie či dalších vyšetření a upraví případně medikaci pacienta. Pacienti schopní operace z kardiálního hlediska by měli podstoupit bodypletygmografické vyšetření se stanovením zejména FEV1 a DLCO (difusní kapacita plic pro oxid uhelnatý). Pokud jsou obě hodnoty nad 80% je pacient schopen pneumektomie. Jestliže je jednak z nich (případně obě) nižší, je vhodné doplnění spiroergometrie, na základě které je pacient určen jako únosný či neúnosný pneumektomie, případně s možností operace do vypočítaného rozsahu (viz Schéma 1 níže). Tento výpočet se provádí buď na základě znalosti zbylých segmentů nebo přesněji pomocí ventilačně-perfusní scintigrafie. Orientačně lze výše zmíněné postupy nahradit testem chůze po schodech. Všem nemocným před operačním výkonem by mělo být doporučeno důsledné nekuřáctví a nácvik dechové rehabilitace.

Schéma 1 – určení rozsahu chirurgického výkonu na základě kardiopulmonální rezervy [31]



3.5 Léčba NSCLC

Léčba nemalobuněčného plicního karcinomu se odvíjí především od histologického a genetického typu tumoru, jeho rozsahu a v neposlední řadě i dle celkového stavu nemocného. V podkapitolách níže je uveden jednak přehled používaných léčebných modalit včetně popisu preparátů využívaných k celkové léčbě a léčebná schémata jednotlivých stadií včetně častých paliativních postupů a dispenzarizace.

3.5.1 Jednotlivé léčebné modalitty

Chirurgická léčba

Radikální chirurgická resekce zůstává metodou volby pro stadia I a II, po projednání multidisciplinárním týmem je jí možno zvažovat i u vybraných pacientů stadia IIIA [7]. Vyjma stadia I jde obvykle o léčbu kombinovanou (viz níže). Standardním postupem je provedení lobektomie [7, 14, 18, 20, 21, 32]. Menší operační výkony (segmentektomie, klínovité resekce) jsou přípustné pouze u pacientů, kteří nemají rezervy na standardní výkon a ESMO je dále připouští též pro pacienty s ACC in situ a případně nesolidními lézemi do velikosti 2cm. Větší rozsahy operačního výkonu by měly být zváženy multidisciplinárním týmem, neboť je známo, že obzvláště pneumektomie vedou ke zvýšení postoperační morbidity a mortality. Některým těmto výkonům se lze vyhnout za použití bronchoplastických výkonů.

Standardní součástí provedení radikálního chirurgického výkonu je též disekce mediastinálních a hilových lymfatických uzlin [7, 14, 20, 21, 25, 32]. NICE guidelines doporučují provedení „en bloc“ disekce, zatímco ESMO guidelines a britská hrudní společnost se kloní k systémovému nodálnímu samplingu, kdy se doporučuje odebrat LU ze 6 etáží, kdy alespoň 3 by měly být z mediastina a jedna z nich přítom subkarinní.

VATS je brána jako přípustná metoda v rukou zkušeného týmu, kdy její užití může vést k lepším krátkodobým pooperačním výsledkům [16, 25]. Robotické operace nejsou dle ESMO doporučovány [25].

Výjimečně je chirurgická léčba indikována u generalizovaného onemocnění. Jde jednak o případy vybraných solitárních metastáz (viz níže) nebo o paliativní postupy (řešení jedné metastázy do CNS, útlaku míšního kmene, provádění pleurodézy apod.) [22]. V ostatních případech radikálně inoperabilních tumorů není chirurgická léčba doporučována.

Radioterapie

SABR (stereotactic ablative body radiotherapy) je metodou volby pro pacienty se stadiem I, kteří nejsou schopni podstoupit či odmítají operační řešení [16, 25]. U periferních lézí je dle dostupných dat výstup této metody patrně srovnatelný s chirurgickým řešením [33].

Další možností je ozáření oligometastáz [34]. Jednak jde o zavedené užití při oligometastázách do CNS, kde se zdá být metodou volby. Rovněž je diskutováno užití při cílené léčbě a oligometastatické progresi, kdy by mohla tato metoda vést k delší kontrole

onemocnění a tím i kvalitě života pacientů. Nicméně prozatím nejde o standardní metodu klinické praxe.

Radikální radioterapie pomocí fotonové léčby je pak metodou volby u pacientů se stadiem II (případně nevhodně centrálně uloženými stadii I) při nemožnosti podstoupit chirurgický výkon [25]. Měla by pak být doplněna následnou chemoterapií. Případně lze použít konkomitantní chemoradioterapii [16].

Pooperační radioterapie (PORT) není běžně indikována [16, 20, 25]. Užívána by měla být pouze u pacientů s neradikální resekcí a zvažována je při průkazu N2 pozitivních LU v resektátu, kde patrně prodlužuje přežití nemocných. Předoperační RT je běžně užívána v konkomitanci s CHT u tumorů horního plicního sulku a v některých případech též při multimodální léčbě stadia IIIA po konzultaci multidisciplinárním týmem [16]. V této indikaci je doporučovaná dávka mezi 40 a 50Gy [25].

Pro stadium III je u inoperabilních pacientů radioterapie spolu s chemoterapií základem léčby. Historie užití radioterapie v této indikaci sahá až do 60. let 20. století [36], kdy RT prokázala zlepšení přežití ve srovnání s observací pacientů. Postupně byla jako standardní dávka určena 60 Gy podávaných po frakcích 2 Gy. Studie fáze 3 CHART poukázala na možný benefit hypofrakcionace na přežití, ale tato metoda se dodnes, vzhledem k náročnější logistice, nestala běžně užívanou a je voleno spíše zvyklé schéma 30 x 2 Gy. Následně studie CALBG poukázala na benefit sekvenční léčby ve schématu CHT-RT. Poslední výraznější posun přinesla studie RTOG0941, která prokázala benefit konkomitantně podávané CHT-RT nad sekvenčním schématem. To bylo následně potvrzeno i metaanalýzou dalších prací [37], kdy zlepšení pětiletého přežití ve srovnání se sekvenčním schématem dosáhlo 4,5% za cenu vyšší toxicity na jícen. Zvýšení dávky na 74Gy nevedlo ve studii RTOG0617 ke zlepšení přežití (ba naopak), což je přikládáno jednak nežádoucímu účinku na okolní tkáň (zejména srdce) a přílišnou dobou klasického režimu s vyšší dávkou [36]. Standardem dle ESMO i NCCN guidelines je tedy nadále konkomitantní CHT-RT v dávce 60 GY s jednotlivou frakcí 2Gy podávanou jednou denně [16, 26]. Standardem je rovněž plánování pomocí třídimenzionálního CT (3D-CT), které vede též k lepším výsledkům u pacientů [16]. Další snížení toxicity (a potencionálně zlepšení přežití) může přinést technika intenzity modulované RT (IMRT) a souhra podávané RT s dechem nemocného (např. tzv. 4D-CT technika) [16]. Sekvenční RT-CHT

je určena pro pacienty s horším stavem výkonosti či komorbiditami neumožňujícími konkomitantní CHT-RT [7, 16, 26].

Radioterapie je též užívána jako paliativní metoda u stadia IV (viz níže). Zvláštní postavení zde hrají roli metastázy do mozku – jejich management je popsán v sekci speciálních paliativních postupů.

Nově diskutovanou otázkou je užití protonové léčby místo klasické fotonové terapie [38]. Ta vychází z odlišného fyzikálního chování protonů vůči fotonům, což by mělo vést k nižší toxicitě léčby. To může pomoci zvýšit dávku záření s přijatelnými nežádoucími účinky s následným prodloužením života nemocných. Velké randomizované studie na toto téma probíhají, výsledky zatím nejsou známy. Naděje jsou též vkládány do kombinace imunoterapie s radioterapií [39].

Celková léčba

Do celkové léčby lze zařadit chemoterapii užívanou v prakticky všech stádiích NSCLC [6]. Dále pak cílenou léčbu, biologickou léčbu a imunoterapii, které jsou prozatím doménou metastatického NSCLC (případně lokálně pokročilého NSCLC bez možnosti podání RT) [2]) – blíže jsou popsány níže, stejně jako principy CHT u stadia IV.

Chemoterapie je u resekovaných pacientů užívána obvykle jako adjuvantní léčba ve stadiu II, případně u stadia IB s tumorem větším než 4 cm [2, 7]. U stadia IIIA je též podávána buď jako neoadjuvantní či adjuvantní léčba. U tumorů horního plicního sulku pak v podobě neoadjuvantní CHT-RT [16]. U neresekovaných pacientů ve stadiu III je CHT podávána buď jako součást konkomitantní CHT-RT či před RT při sekvenčním schématu [7, 26].

3.5.2 Preparáty používané u terapie metastatického NSCLC

A) Chemoterapie

Cisplatina

Cisplatina byla první používaná látka z řady platinových derivátů. Její objev je datován již do roku 1844, protinádorová aktivita pak byla prokázána v 60. letech. Počátek jejího schváleného užívání (od FDA = Food and Drug Administration) se datuje do roku 1976, kdy byla registrována pro léčbu testikulárních a ovariálních nádorů [40]. Svůj

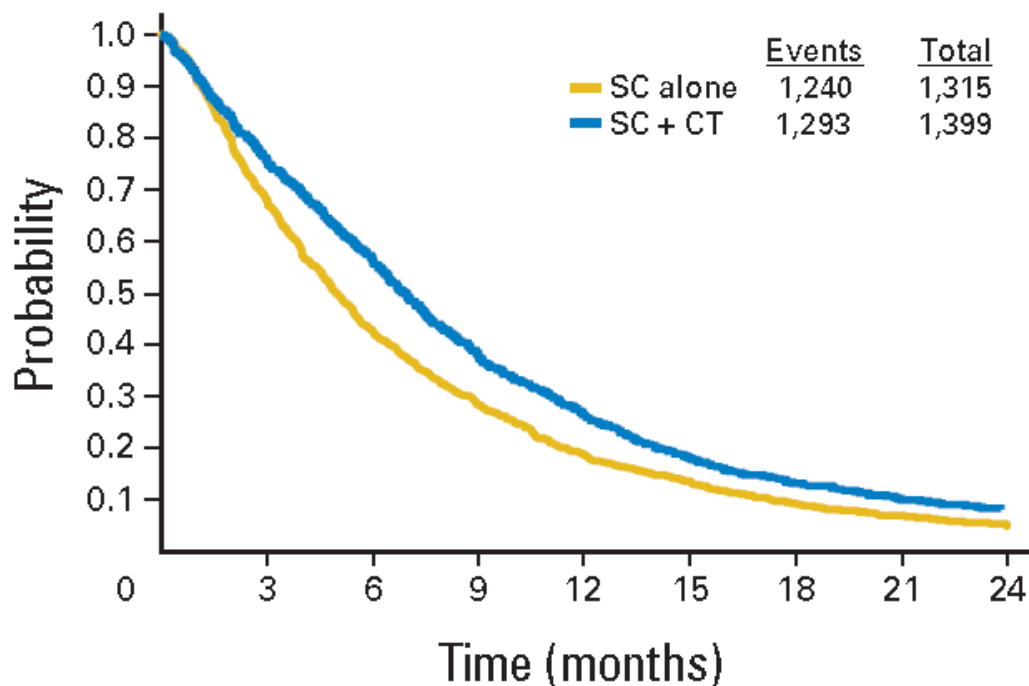
antitumorózní efekt dosahuje pomocí tvorby tzv. aduktů (tedy kovalentní vazby cisplatinu na DNA), čímž je poškozeno vlákno DNA (především guaninu) [41].

V 80. letech 20. století je cisplatinu zkoušena i u plicních tumorů ať už v monoterapii či v kombinaci s tehdejšími chemoterapeutiky (především mitomycin, v Evropě vinca alkaloid vindesin, etoposid a isofosfamid). Objektívni odpovědi byly pozorovány u max. 20% pacientů a nebylo jasné, zda tato léčba přináší benefit stran přežití, kdy 1 rok přežívalo méně než 20% pacientů s generalizovaným NSCLC. Nicméně u části nemocných docházelo ke zmenšení nádoru a zlepšení kvality života pacientů. Ukázalo se, že silný vliv má celkový stav nemocného, kdy nemocní s PS 2 dosahovali významně horších výsledků než pacienti s PS 0/1. Rovněž byl diskutován vliv dávky cisplatinu – souhrnem prací se dospělo k tomu, že v dávce 20 -200 mg/m² je efekt léčby obdobný a patrně tedy existuje pouze dolní práh, pod kterým již ztrácí podání cisplatinu význam. Jako nejperspektivnější se jevil režim cisplatinu spolu s etoposidem či vindesinem [42].

V této době bylo realizováno též 6 randomizovaných studií fáze III porovnávající efekt těchto léků [43]. Klastersky et al. ve své studii porovnávali u 162 pacientů režim s cisplatinou vůči cisplatině s etoposidem [44]. Studie neprokázala signifikantní rozdíl v OS (celkové přežití). Rosso et al. v obdobně designované studii srovnávající rovněž etoposid vůči etoposidu s cisplatinou u 216 pacientů s opět srovnatelným OS i přes vyšší ORR (objektívni odpověď na léčbu) v kombinovaném režimu [45]. Crino et al. porovnávali u 156 pacientů 3 režimy léčby – cisplatinu, cisplatinu + etoposid a cisplatinu + etoposid + mitomycin C [46]. Režim se samotnou cisplatinou byl předčasně zastaven pro nedostatečnou ORR. Nicméně i tak byl prokázán benefit stran OS dvou kombinovaných režimů vůči samotné cisplatině, přidání mitomycinu C pak již k dalšímu zlepšení OS nevedlo. Lawrence et al. ve studii čítající 124 pacientů porovnávala vindesin jednak vůči vindesinu s cisplatinou a také vůči vindesinu + cisplatině + mitomycinu C [47]. Studie neprokázala zlepšení OS kombinovaných režimů vůči samotnému vindesinu. Elliott et al. též porovnávali vindesin samotný vůči vindesinu s cisplatinou u 205 pacientů [48]. Tato studie naopak prokázala signifikantní prodloužení přežití (4 vs. 11 měsíců). Sørensen et al. ve své studii čítající 279 pacientů porovnávali efekt vindesinu vůči lumustinu + cyklofosfamid + metotrexátu či kombinaci všech těchto čtyř léků [49]. Kombinované režimy neprokázali zlepšení přežití. Bonomi et al. ve studii EST 1583 porovnávali u 699 pacientů celkem 5 režimů (1. cisplatinu + vinblastin + mitomycin, 2. vinblastin a cisplatinu,

3. režim 1. střídající se s cyclophosphamidem, doxorubicinem, metotrexátem a procarbazinem, 4. carboplatina následovaná po progresi režimem 1., 5. iproplatina střídaná režimem 1. po progresi) [50]. Režim číslo 1. prokázal nejlepší ORR, a proto bylo porovnáno jeho přežití s ostatními režimy první linie, kde však carboplatina dosáhla lepšího výsledku za cenu nižší toxicity. Autoři proto doporučovali další studie zabývající se monoterapií v 1. linii NSCLC. Z dnešního pohledu chybí studie fáze III porovnávající dané režimy s BSC (best supportive care) a též bychom očekávali větší počet pacientů u řady studií. Výsledky tedy byly nadále rozporuplné.

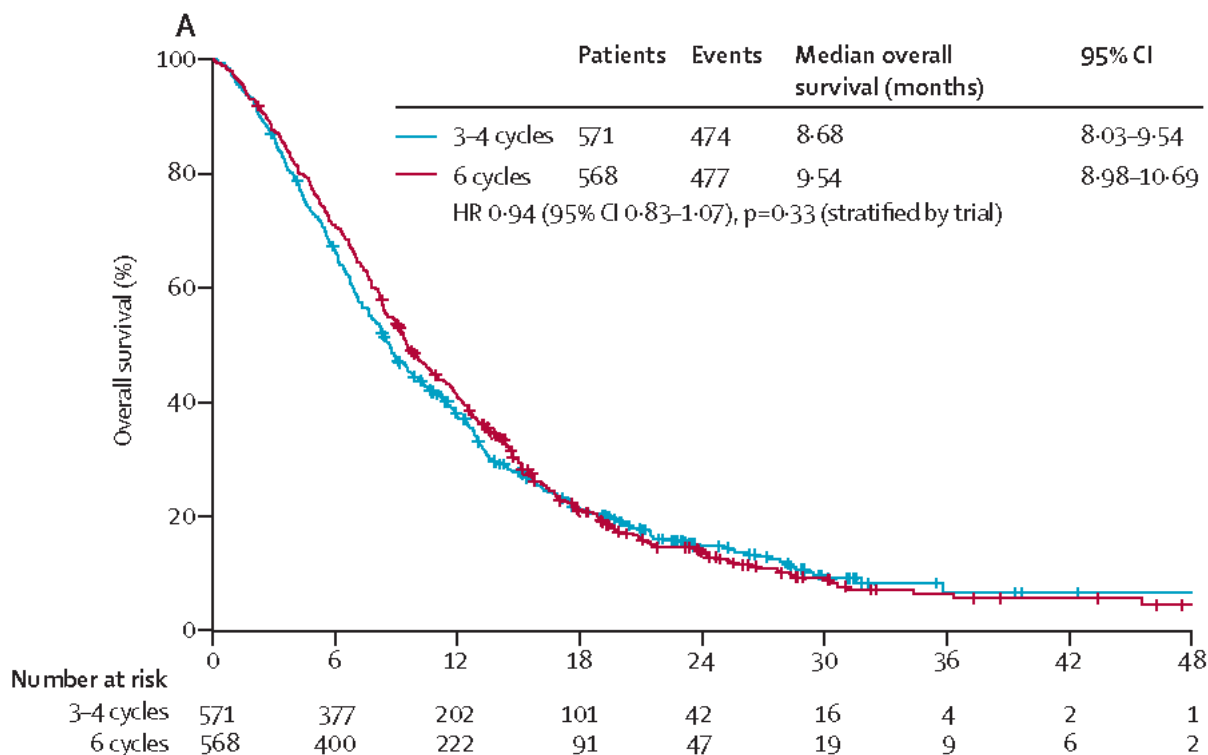
Potvrzení ohledně prodloužení přežití přinesly až metaanalýzy z 90. let 20. století. V roce 1995 byla publikována metaanalýza více než 50 předchozích studií, která dokládala signifikantně zlepšení přežití u pacientů s plicním karcinomem vůči placebu a to i u generalizovaného onemocnění [51]. Zde bylo 1 roční přežití zlepšeno o 10% a medián přežití stoupl o zhruba 1,5 měsíce. Nejčastěji užívané režimy byly kombinace cisplatiny s etoposidem či cisplatiny s vinca alkaloidy. Metaanalýza z roku 2008 potvrdila předchozí výsledek (viz Obraz 1) i pro pouze skupinu pokročilých nemalobuněčných plicních karcinomů, kdy CHT významně zlepšila přežití vůči nejlepší podpůrné léčbě (BSC) [52]. HR (hazard ratio) dosáhlo hodnoty 0,77, 1 roční přežití bylo zlepšeno o 9% z 20 na 29%. Studie neprokázala rozdíl mezi jednotlivými léčebnými modalitami, což bylo patrně dáno zastoupením studií se staršími léčebnými kombinacemi.



Patients at risk									
SC alone	1,315	884	552	363	231	161	107	77	55
SC + CT	1,399	1,052	779	519	349	233	165	115	91

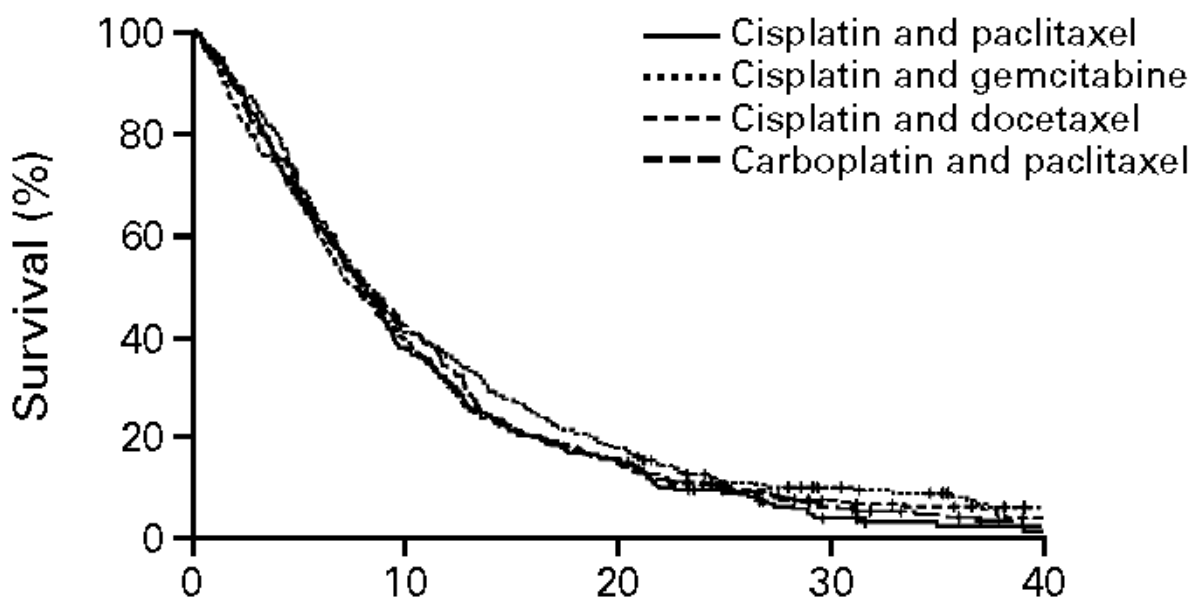
Obraz 1 – CHT vs. BSC v 1. linii léčby NSCLC [52]

Následně bylo metaanalýzou prokázáno, že režim obsahující platinový derivát dosahuje lepších výsledků stran OS (HR = 0,88, snížení rizika refrakterity na CHT) při obdobném výskytu nežádoucích účinků (NÚ) [53]. Další metaanalýza pak prokázala na více než 13000 pacientech zlepšení přežití při užití monoterapie či dvojkombinace chemoterapeutik, ale přidání 3. léku již vedlo pouze ke zvýšení nežádoucích účinků [54]. Další práce se zabývaly počtem cyklů léčby. Korejská práce zkoumala podání 2 či 4 cyklů CHT po úvodních 2 cyklech léčby u neprogredujících pacientů [55]. Ve studii bylo randomizováno 314 pacientů, kdy nemocní se 6 cykly dosáhli lepší PFS (doba do progresu) (6,2 vs. 4,6 měsíce), avšak OS bylo obdobné (1 roční přežití dosáhlo 59% pro celkem 4 cykly léčby a 62,4% při užití 6 cyklů léčby). Tyto závěry potvrzuje i metaanalýza neprokazující rozdíl mezi podáním 3 či 4 cyklů léčby vůči 6 cyklům (Obraz 2) [56]. Platinový doublet s obvyklými 4 cykly se tak stal zlatým standardem v léčbě NSCLC.



Obraz 2 – Přežití při podání 3 či 4 cyklů léčby platinovým doubletem vůči 6 cyklům [56]

Během 90. let 20. století byly objeveny tzv. cytostatika 3. generace (docetaxel, paclitaxel, gemcitabin, vinorelbin), které zlepšily výsledky vůči předchozím režimům (blíže u daných chemoterapeutik níže). Bylo tedy otázkou, zda by měl být některý z nich preferován v léčbě 1. linie. Na toto odpověděly shodně dvě metaanalýzy. Scagliotti et al. porovnávali 3 platinové doublety (cisplatina+gemcitabin, cisplatina+vinorelbin a carboplatina plus paclitaxel) mezi sebou u 612 pacientů [57]. Bylo dosaženo obdobného OS (mezi 9,5 a 10 měsíci), objektivní odpovědi na léčbu i PFS. Jednotlivé režimy se významně lišily pouze ve spektru nežádoucích účinků, kdy kombinace s vinorelbinem byla spjata s větším výskytem neutropenií a nauzey, gemcitabin s více trombocytopeniemi a paclitaxel s více neuropatiemi a alopeciemi. Schiller et al. pak porovnávali 4 léčebné režimy (cisplatina+paclitaxel, carboplatina+paclitaxel, cisplatina+gemcitabine, cisplatina+docetaxel) u 1155 pacientů, kdy bylo dosaženo obdobného OS (Obraz 3), které v mediánu dosahovalo 7,9 měsíce s 1 ročním přežitím u 33% nemocných [58]. Rovněž bylo zaznamenáno odlišné spektrum NÚ v závislosti na vybraném léčebném režimu. Výběr partnera k cisplatině tedy závisí na očekávaném spektru nežádoucích účinků v porovnání s jednotlivými komorbiditami pacienta.



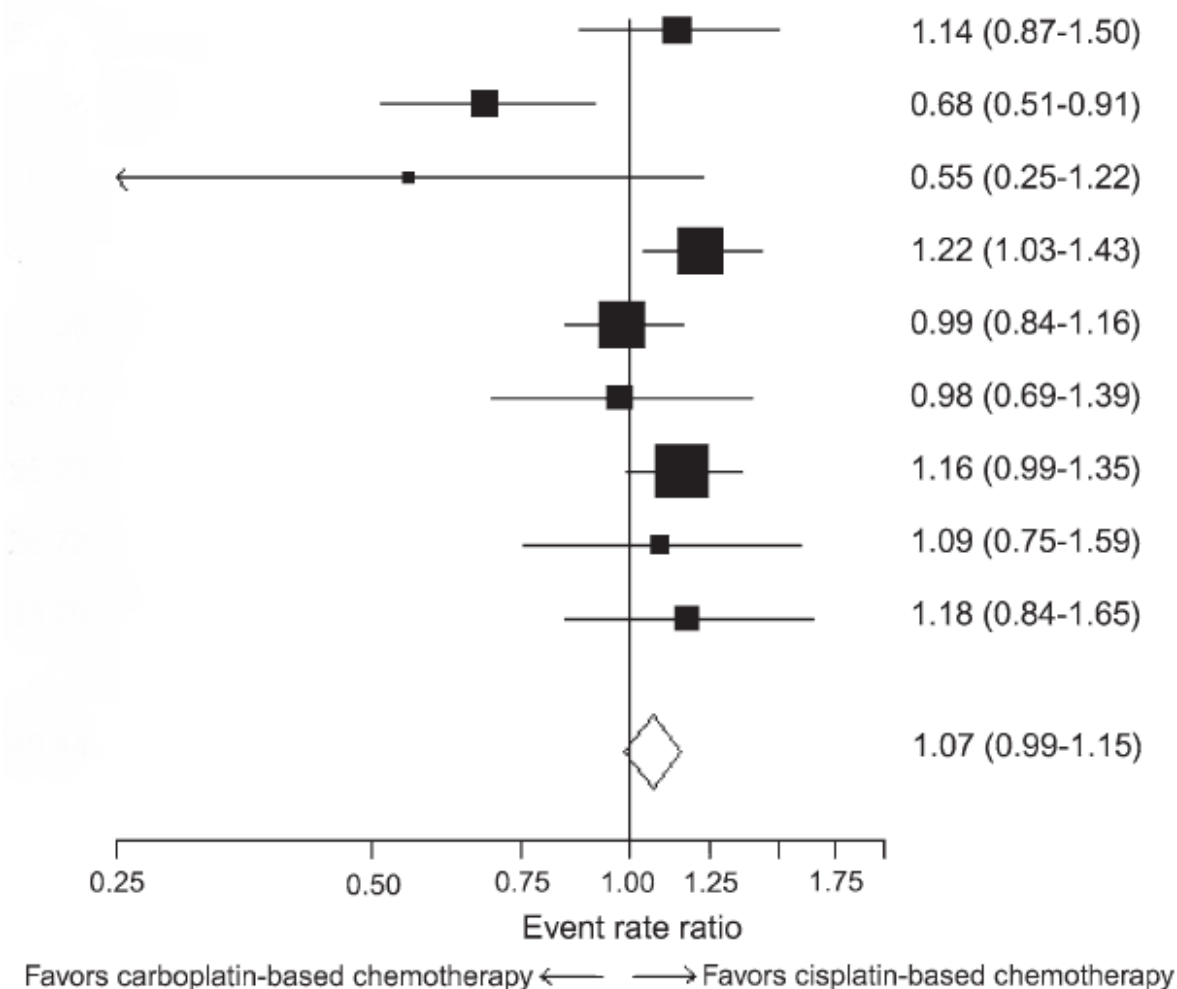
Obraz 3 – Porovnání přežití u režimů kombinujících platinový derivát s cytostatikem 3. generace [58]

V kombinovaném režimu je doporučované dávkování cisplatinu 80 mg/m² jednou za 3 týdny (se snížením při poruše renálních funkcí či myelosupresi) [59]. Vzhledem k nefrotoxicitě je nutná dostatečná hydratace pacienta před podáním léčby a doporučované je též podání manitolu či diuretika po podání. Podání cisplatinu je kontraindikováno při známe hypersenzitivitě, u pacientů s poškozením sluchu, dehydratací či významnější myelosupresí nebo poruchou ledvin. Mezi nejčastější NÚ patří nefrotoxicita, neuropatie, ototoxicita, emetický a myelosupresivní účinek. Léčba (obdobně jako u jiných vysoce a středně emetogenních chemoterapeutických režimů) je nutně provázená podáváním antiemetik (kortikoidy, setrony, antagonisty NK1 (Neurokinin 1) receptorů, případně olanzapin) dle příslušných ESMO schémat [60]. Rovněž jsou vypracovány ESMO doporučení pro výskyt febrilní neutropenie po podání chemoterapie zaměřující se především na užití granulocytů stimulujících faktorů a antibiotik [61].

Carboplatina

Vzhledem k řadě nežádoucích účinků cisplatinu volili někteří lékaři u nemocných režim s carboplatinou, i přesto, že zpočátku nebylo jasné, zda dosahuje obdobné účinnosti. Tuto otázku se pokusila zodpovědět metaanalýza čítající 2968 pacientů [62]. Režimy s cisplatinou byly spojeny s vyšší ORR. V celkovém souboru se OS nelišilo mezi oběma

skupinami (HR = 1,07, p = 1,0). To ale neplatilo pro pacienty s nedlaždicovými karcinomy a pro pacienty, kteří byli léčeni cytostatiky 3. generace, kde bylo přežití mírně lepší pro pacienty léčených cisplatinou (HR = 1,11 resp. 1,12) (Obraz 4). Tento režim byl ale spjat s vyšším výskytem NÚ (především nauzey/zvracení, nefrotoxicit a neuropatií, naopak carboplatina vykazala více trombocytopenií). Platinový doublet s cisplatinou je tak preferován pro pacienty v dobrém celkovém stavu (PS 0-1), kteří nemají kontraindikaci jejího podání [22].



Obraz 4 – Přežití u pacientů léčených platinovým doublety – porovnání cisplatinu a carboplatiny v jednotlivých podskupinách [62]

Naopak u pacientů s PS2 je dle ESMO doporučován režim s carboplatinou, který prokázal lepší přežití než monoterapie cytostatiky 3. generace [22]

V kombinovaném režimu se doporučované dávkování karboplatiny odvíjí od glomerulární filtrace a požadované AUC (area under the curve) s výpočtem konkrétní dávky podle

vzorci dle Calverta [59]. Určení AUC se odvíjí především od celkového stavu pacienta a jeho renálních parametrů. Léčba je kontraindikována při hypersenzitivitě na léčbu či těžké myelosupresi nebo renální insuficienci. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří myelosuprese, neuropatie, ototoxicita, emetický efekt, nefrotoxicita a alopecie.

Vinorelbin

Vinorelbin patří mezi 2. generaci vinca-alkaloidů. Jako i ostatní zástupci této skupiny spočívá jeho efekt ve vazbě na tubulin (základní součást mikrotubul) a tím narušení mitotického vřeténka [63]. Díky výsledku svých studií byl schválen k léčbě NSCLC jak v monoterapii, tak společně s platinovým derivátem [64]. Svůj potenciál prokázal jako monoterapie již v multicentrické studii porovnávající u 216 pacientů léčbu vinorelbinem (v dávce 30 mg/m²) ve srovnání s fluorouracilem spolu s leucovorinem (v dávce 425 mg/m² resp. 20 mg/m²) [65]. Vinorelbin dosáhl staticky lepšího přežití ($p = 0,03$), kdy medián pro vinorelbin činil 30 týdnů a pro kombinaci fluorouracil+leucovorine 22 týdnů. Ve studii SWOG prokázal dále vinorelbin svojí superioritu nad samotnou cisplatinou jak v PFS (2 vs. 4 měsíce), tak v OS (6 vs. 8 měsíců) [66]. Následovali tedy studie srovnávající kombinované režimy. Chevalier et al. ve své studii srovnávali zavedený režim vindesine+cisplatinu vůči vinorelbinu+cisplatině a samotnému vinorelbinu [67]. V této studii byl vinorelbin spolu s cisplatinou lepší v ORR i OS vůči zbylým dvěma režimům, zatímco vinorelbin samotný dosáhl obdobných výsledků jako kombinace cisplatinu s vindesinem. Depierre et al. pak porovnávali samotný vinorelbin (30 mg/m² 1x týdně) vůči cisplatině (80 mg/m² a 3 týdny)+vinorelbinu (30 mg/m² 1x týdně) u 231 pacientů [43]. Stejně jako ve studii Chevaliera et al. dosáhli vůči samotnému vinorelbinu významně lepšího ORR (43 vs. 16%) a PFS (20 vs. 10 týdnů), ale OS dosáhlo stejných hodnot (33 vs. 32 týdnů). Vzhledem k velkému rozpětí PFS a ORR a předchozí studii Chevaliera se však vinorelbin používá v kombinaci s cisplatinou, kde dosáhl obdobných výsledků jako další moderní režimy chemoterapie [68]. Studie GLOB3 pak prokázala možný režim s p.o. vinorelbinem v den 8. [68]. U 381 pacientů byl porovnán režim docetaxel+cisplatinu vs. cisplatinu+vinorelbine i.v. (den 1.) a vinorelbin p.o. (den 8.), kdy bylo dosaženo obdobné ORR, PFS, OS i QoL (kvality života). Perorální vinorelbin se díky této a několika dalším menším studiím stal alternativou k i.v. podání [69].

Při monoterapii je podávána dávka 25-30 mg/m² jednou týdně, v kombinované léčbě pak 25-30 mg/m² spolu s cisplatinou (80 mg/m²) 1. den. Následně samotný vinorelbin (25-30

mg/m²) 8. den [59]. 30 mg/m² i.v. vinorelbinu odpovídá dávka 80 mg/m² p.o. vinorelbinu (25 mg/m² pak 60 mg/m²). Kontraindikováno je jeho podání při známe hypersenzitivitě a závažné myelosupresi, při těžké poruše jater se doporučuje redukce jeho dávky na 20 mg/m². Mezi nejčastější NÚ patří myelosuprese, alopecie, neurotoxicita, stomatitidy a emetický efekt.

Gemcitabin

Gemcitabin je deoxycytidinový analog, který je intracelulárně aktivován fosforylací na aktivní metabolity inhibující DNA syntézu [70]. Svoji protinádorovou aktivitu u NSCLC potvrdil v monoterapii v několika studiích fáze II [70]. Studie fáze III srovnávající režimy cisplatina+gemcitabin oproti samotnému gemcitabinu prokázala superioritu kombinované léčby vůči monoterapii stran ORR, PFS i OS [71]. Studie fáze III proto dále porovnávali jeho efekt ve srovnání s cisplatinou a cisplatinou s etoposidem [72, 73]. Sandler et al. porovnávali účinnost kombinace cisplatina + gemcitabin (100 mg/m² v den 1 + 1000 mg/m² v den 1, 8 a 15 z 28 denního cyklu) vůči samotné cisplatině (100 mg/m² 1. den z 28 denního cyklu) u 522 pacientů. Gemcitabin byl superiorní v ORR (30,4 vs. 11,1%), PFS (5,6 vs. 3,7 měsíce) i OS (9,1 vs. 7,6 měsíce) při vyšší myelosupresivní toxicitě. Cardenal et al. tedy následně srovnávali režimy cisplatina (100 mg/m² – den 1) + gemcitabin (1250 mg/m² – den 1 a 8) vůči režimu cisplatina (100 mg/m² – den 1) + etoposid (100 mg/m² – den 1 a 3) u 135 pacientů ve 21-denních cyklech léčby. Gemcitabin s cisplatinou dosáhl lepšího ORR (40,6 vs. 21,9%) a PFS (6,9 vs 4,3 měsíce) při podobném výskytu NÚ. Nebyl však prokázán benefit v OS (8,7 vs. 7,2 měsíce, p = 0,18), což mohlo být dáno malým počtem pacientů ve studii (primárním cílem byla ORR, na kterou byla designována velikost studie). Obdobné výsledky přinesla italská studie porovávající u 307 pacientů režim cisplatina+gemcitabin oproti cisplatině s mitomycinem a isofosfamidem [74]. Opět byl signifikantně zlepšen ORR při nezhoršené QoL, avšak OS dosahovalo opět obdobných hodnot (p = 0,877). Je však nutno poznamenat, že primárním cílem opět nebyl OS, ale QoL. Práce srovnávající režim cisplatin+gemcitabin s ostatními platinovými doublety s cytostatiky 3. generace prokázala srovnatelné přežití mezi těmito režimy (viz Cisplatina). Následně vznikla metaanalýza předchozích prací, která prokázala zlepšení OS pro cisplatinu+gemcitabin vůči cytostatikům 1. a 2. generace (HR = 0,84), nikoliv však 3. generace (zde pouze patrný trend bez statistické významnosti) [75]. Gemcitabin s cisplatinou se tak staly jedním ze standardních chemoterapeutických režimů u NSCLC.

Další otázkou bylo, zda by nebylo možné užít carboplatinu místo cisplatinu v režimu s gemcitabinem. Rudd et al. provedli studii fáze III porovnávající režim gemcitabin+carboplatina vůči cisplatině s isofosfamidem a mitomycinem (MIC) u 422 pacientů [76]. Režim s gemcitabinem prokázal zlepšení OS (HR = 0,76, p = 0,008) při zlepšení QoL. Danson et al. provedli obdobou studie fáze III, která porovnávala u 372 pacientů opět gemcitabin + carboplatinu vůči režimu MIC nebo vůči režimu MVP (mitomycin + vinblastin + cisplatinu) [77]. Tato práce neukázala žádný benefit gemcitabinu + carboplatiny vůči režimům MIC a MVP. Další studie fáze III pak prokázala benefit ročního přežití režimu carboplatina + gemcitabin oproti cisplatině s vinblastinem při obdobné toxicitě [78]. Přímé srovnání cisplatinu s gemcitabinem vůči carboplatině s gemcitabinem přinesla česká multicentrická studie fáze III [79]. Zatloukal et al. u 176 randomizovaných pacientů neprokázali významný rozdíl v účinnosti těchto CHT při odlišném spektru toxicity související s výběrem platinového derivátu. Vzhledem k průkazu zlepšení OS režimu s carboplatinou v provedené metaanalýze vůči starším režimům a lepší toleranci carboplatiny se tento režim jeví jako schůdný pro nemocné, kteří nemohou být léčeni cisplatinou (s přihlédnutím k metaanalýze favorizující cisplatinu nad carboplatinou) [62, 75, 80].

Další práce se zabývaly též posouzením kombinované léčby moderními cytostatiky vůči zavedeným platinovým doubletům. Metaanalýzy srovnávající léčbu gemcitabinem + docetaxelem [81], gemcitabinem + paclitaxelem [82], studie fáze III s gemcitabinem+vinorelbinem [83] a studie fáze II s gemcitabinem + pemetrexedem [84] prokázali obdobné přežití vůči platinovým doubletům 3. generace. Tyto režimy se však v klinické praxi neujali, patrně i z důvodu metaanalýzy, která poukázala na lepší výsledky režimů s platinou [53]. Obdobnou účinností stran OS skončila i práce porovnávající režim vinorelbin + gemcitabin následovaný docetaxelem vůči paclitaxelu s carboplatinou [85]. Rovněž byla provedena studie porovnávající režim s gemcitabinem a oxaliplatinou proti zavedenému schématu carboplatina + paclitaxel, kdy bylo dosaženo obdobné účinnosti obou režimů [86]. Přesto se oxaliplatinu v klinické praxi neujala pro své limity ohledně toxicity.

Gemcitabin byl též zkoumán jako možný lék druhé linie, kdy řada prací fáze II ukázala na jeho možnou aktivitu, nicméně studie fáze III nebyla nikdy provedena [87]. Rovněž byly provedeny studie stran jeho možného užití jako udržovací léčby po 1. linii CHT. Studie

fáze III CECOG srovnávala u 352 pacientů udržovací terapii (neprogredující nemocní po 1. linii léčby) gemcitabinem vůči BSC po 1. linii léčby (gemcitabin + cisplatina) s cílem prokázat významný rozdíl v čase dogrese mezi těmito dvěma režimy [88]. Ačkoliv byla doba dogrese zlepšena v rameni s gemcitabinem, OS se významně nelišilo ($p=0,195$). To však nebyl primární cíl práce, a proto byly doporučeny další studie na toto téma. Francouzská studie fáze III (IFCT) srovnávala opět udržovací léčbu gemcitabinem (či erlotinibem) vůči BSC u neprogredujících pacientů po 1. linii léčby (cisplatina+gemcitabin) [89]. Opět bylo významně prodlouženo PFS při léčbě gemcitabinem (i erlotinibem) vůči BSC a studie tak splnila svůj primární cíl. OS opět významně prodlouženo nebylo. Následná metaanalýza prací srovnávající data z celkem 8 studií (3736 pacientů), včetně těch s gemcitabinem, potvrdila zlepšení v PFS, ale ne v OS při srovnání kontinuální udržovací terapie ve srovnání s BSC ($p = 0,124$) [90]. Vzhledem k tomu, že všechny 3 studie této metaanalýzy s gemcitabinem byly ve schématu kontinuální léčby, nejví se tato terapie jako vhodná.

Doporučené dávkování gemcitabinu při monoterapii je 1000 mg/m^2 ve 21 denních cyklech. V kombinované léčbě s cisplatinou je doporučená dávka 1250 mg/m^2 1. a 8. den cyklu [59]. Režim s carboplatinou není u NSCLC zahrnut do SPC (souhrn údajů o léčivém přípravku). Gemcitabin je kontraindikován při hypersenzitivitě. Mezi nejčastější NÚ patří myelotoxicita, elevace jaterních enzymů, emetický účinek, hematurie či mírná proteinurie, syndromy podobné chřipce a někdy respirační obtíže (dušnost, kašel, rinitida).

Docetaxel

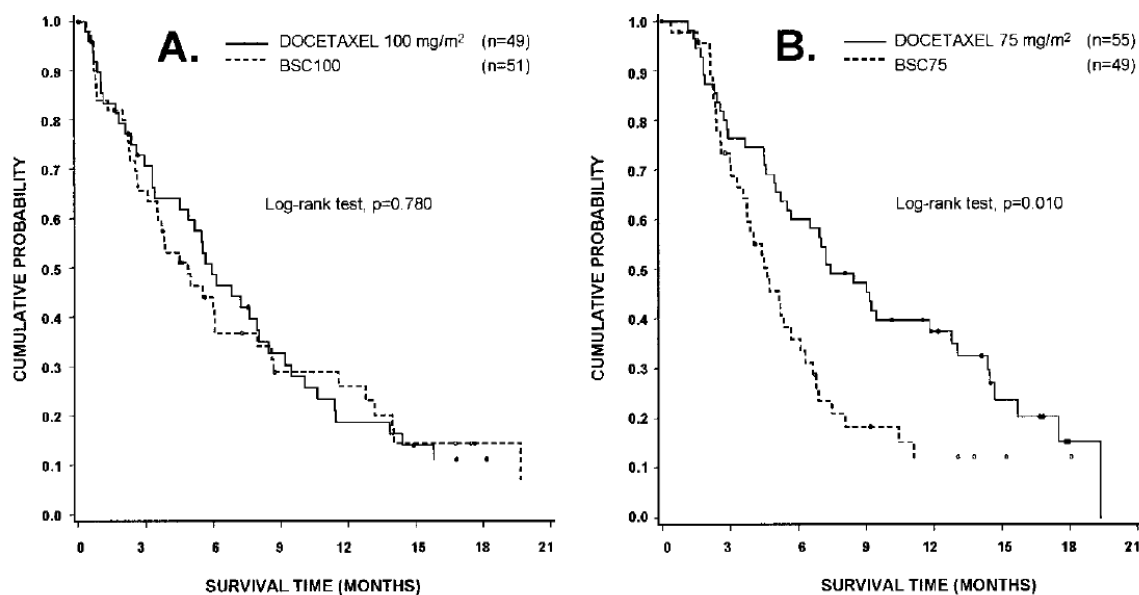
Docetaxel patří mezi taxany, jejichž mechanismem účinku je vazba na mikrotubuly, což inhibuje buněčné dělení [91]. Rozskowski et al. prokázali účinnost docetaxelu ve studii fáze III, kdy docetaxel prodloužil OS a zlepšil tumorózní obtíže pacientů ve srovnání s BSC [92].

Následovali proto práce porovnávající efekt platinového doubletu s docetaxelem vůči ostatním režimům. Kubota et al. srovnávali docetaxel s cisplatinou vůči vindesinu s cisplatinou u 302 pacientů [93]. Docetaxel s cisplatinou zaznamenaly lepší ORR (37 vs 21%, $p < 0,01$), OS (11,3 vs. 9,6 měsíce, $p = 0,014$) i QoL ($p = 0,02$). Další studie porovnávala docetaxel s carboplatinou s režimy MIC a MVP u 433 pacientů [94]. Oba režimy měli obdobnou účinnost, ale docetaxel s carboplatinou vykázaly lepší QoL. Následovala registrační studie TAX 326 srovnávající celkem u 1218 pacientů docetaxel

(75 mg/m²) s cisplatinou (75 mg/m²) resp. carboplatinou (AUC 6) vůči modernímu režimu cisplatiny (100 mg/m²) + vinorelbínu (25 mg/m²) [95]. Režim docetaxelu s cisplatinou prokázal signifikantně lepší ORR (31,6 vs 24,5%, p = 0,029) i medián OS (11,3 vs. 10,1 měsíce, p = 0,044). Naopak režim docetaxelu s carboplatinou byl stran OS i ORR srovnatelný s vinorelbínem a cisplatinou. Oba režimy s docetaxelem navíc prokázaly zlepšení QoL ve srovnání s cisplatinou a vinorelbínem. Následné metaanalýzy však prokázaly srovnatelné výsledky platinových derivátů s cytostatiky 3. generace [57, 58]. Docetaxel s cisplatinou se tak staly další možností volby pro 1. linii léčby.

Další práce se zabývaly srovnáním docetaxelu v monoterapii s kombinovanými režimy. Studie fáze III s docetaxelem + gemcitabinem vůči samotnému gemcitabinu byla předčasně zastavena pro nižší přežití v rameni s monoterapií [96]. Naopak docetaxel s carboplatinou [97] i docetaxel s cisplatinou [98] ve studiích fáze III neprokázaly zlepšení OS vůči monoterapii s docetaxelem. Nicméně studie s carboplatinou podávala nižší dávky carboplatiny (AUC4) než je zvyklé, měla signifikantně lepší PFS pro platinový doublet a OS bylo číselně v mediánu o 2,5 měsíce vyšší s pouze mírně nadhraniční p hodnotou, což mohlo být dáno pouze 132 pacienty ve studii. Studie s cisplatinou pak v kombinovaném režimu prokázala vyšší ORR a též vyšší přežití ve 2. roce (49 vs. 15%). Kombinovaný režim tak zůstává nadále volbou v 1. linii léčby pro únosné pacienty.

Docetaxel v monoterapii se naopak prosadil ve 2. linii léčby díky studiím TAX 317 a TAX 320 [99, 100]. TAX 317 srovnávala ve 2. linii léčby docetaxel (v režimech 75mg/m² a 100 mg/m²) s BSC u 204 pacientů. Docetaxel významně prodloužil PFS i OS, kdy bylo dosaženo lepších výsledků při dávkování 75 mg/m² (medián OS 7,5 vs. 4,6 měsíce, p = 0,01), naopak pro režim se 100 mg/m² se OS významně nelišilo (Obraz 5). Na základě této studie byl docetaxel schválen k léčbě pacientů ve 2. linii NSCLC v dávce 75 mg/m². TAX320 pak porovnávala ve 2. linii léčby docetaxel s vinorelbínem a isofosfamidem, kdy docetaxel prokázal lepší ORR, PFS i OS vůči zbylým dvěma režimům (OS pouze pro dávku 75 mg/m²). Japonská studie JCOGO104 srovnávala ve 2. linii monoterapii s docetaxelem oproti režimu docetaxel + gemcitabin [102]. Studie byla pro neočekávaný výskyt intersticiálních plicních procesů v kombinovaném režimu předčasně ukončena.



Obraz 5 – Docetaxel vs. BSC ve 2. linii léčby NSCLC [99]

Další práce se zabývaly srovnáním týdenního režimu podávání docetaxelu v dávkách 33,3 / 35 / 36 mg/m² vůči docetaxelu ve zvyklém třítýdenním režimu v dávce 75 mg/m² [102, 103, 104]. Všechny práce prokázaly obdobné OS pro oba režimy s mírně odlišným profilem toxicity, který spolu s QoL favorizoval spíše týdenní režim. Ten se tak stal alternativou třítýdenního podávání, v praxi však naráží na logistické obtíže a neuvedení tohoto režimu v SPC přípravku [59].

Docetaxel byl též zkoušen ve studiích fáze III v alternativním režimu s gemcitabinem, který se však v klinické praxi neujal a to i přes slibné výsledky [91]. Rovněž byl zkoumán možný přínos docetaxelu jako udržovací léčby po 1. linii platinového doubletu (gemcitabin + carboplatina) vůči docetaxelu podávaného až standardně ve 2. linii po progresi onemocnění u pacientů, kteří neprogredovali po 1. linii CHT [105]. Ačkoliv bylo prokázáno zvýšení PFS při udržovací léčbě ve srovnání s opožděnou léčbou, OS nebylo signifikantně vyšší (i přes vyšší absolutní hodnotu – 12,3 vs. 9,7 měsíce, z části danou i tím, že část pacientů s odloženým režimem již na 2. linii léčby nedosáhla) a tento režim se v klinické praxi neujal.

Obvyklé dávkování je v 1. i vyšší linii léčby (po selhání předchozí chemoterapie) 75 mg/m² jednou za tři týdny, kdy v první linii je docetaxel kombinován s cisplatinou [59]. Docetaxel je kontraindikován při známé hypersenzivitě na jeho podání, těžké neutropenii a

závažné poruše funkce jater. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří neutropenie, anemie, alopecie, nauzea, zvracení, stomatitida, průjem a astenie.

Paclitaxel

Paclitaxel patří stejně jako docetaxel mezi taxany [106]. Svůj protinádorový efekt po několika studiích fáze II potvrdil i ve studii fáze III porovnávací paclitaxel s BSC u 157 pacientů [107]. Paclitaxel prokázal nejen prodloužení přežití (medián OS 6,8 vs. 4,8 měsíce), ale i zlepšení kvality života v porovnání s BSC.

Další studie fáze III srovnávaly jeho efekt v režimu s cisplatinou se staršími režimy CHT. Gatzemeier et. al. ve své práci prokázali zlepšení ORR a PFS pro režim cisplatin+paclitaxel vůči samotné vysokodávkované cisplatině při podobné QoL, OS však zlepšeno nebylo [108]. Bonomi etl. al. srovnávali účinnost paclitaxelu (v dávce 135 a 250 mg/m²) s cisplatinou vůči cisplatině s etoposidem u 599 pacientů [109]. Medián OS byl signifikantně zlepšen pro režim s paclitaxelem (9,9 vs. 7,6 měsíce, p=0,048) při podobné QoL. Nebyl prokázán rozdíl v přežití mezi nízkou a vysokou dávkou paclitaxelu. Giaccone et al. porovnávali cisplatinu s paclitaxelem (175 mg/m²) vůči režimu cisplatin + teniposid u 332 pacientů [110]. Režim s paclitaxelem opět prokázal lepší ORR. OS i PFS byly obdobné, ale QoL i spektrum NÚ byly lepší pro režim s paclitaxelem. Paclitaxel s cisplatinou se tak celkově zdál být vhodnější volbou než starší režimy CHT.

Rovněž probíhali studie fáze III kombinující paclitaxel s carboplatinou. Lilenbaum et al. porovnávali účinek samotného paclitaxelu vůči kombinaci paclitaxel + carboplatina u 561 pacientů [111]. Kombinovaný režim dosáhl zlepšení v ORR a PFS, avšak celkové OS bylo obdobné. Je zajímavé, že pro podskupinu nemocných s PS 2 bylo OS vyšší pro kombinovaný režim. Režim carboplatina + paclitaxel byl též superiorní v ORR vůči cisplatině s etoposidem, ale opět nedosáhl lepšího OS, nicméně QoL byla ve prospěch režimu s paclitaxelem [112]. Následně byla prokázána též obdobná účinnost paclitaxelu s carboplatinou jako carboplatiny s vinorelbinem stran OS za lepšího profilu NÚ [113]. Treat et al. dále poukázali na obdobné přežití ve své studii o ramenech carboplatina + paclitaxel vs. gemcitabin + carboplatina vs. gemcitabin + paclitaxel [114]. Jednotlivé režimy se lišily pouze ve spektru NÚ. Rosell et al. pak porovnávali paclitaxel s carboplatinou nebo cisplatinou u 618 pacientů [115]. Jejich práce prokázala obdobnou QoL a ORR obou režimů, ale OS bylo signifikantně zlepšeno u režimu cisplatin + paclitaxel (medián OS 9,8 vs. 8,2 měsíce, p = 0,019).

Metaanalýzy pak prokázaly obdobný efekt kombinace paclitaxel + carboplatina jako ostatních kombinací platinového derivátu a cytostatika 3. generace a tento režim se stal dalším možným při léčbě pokročilého NSCLC [57, 58]. Režim s cisplatinou se v klinické praxi příliš neujal, mimo jiné i pro vyšší výskyt trombocytopenie [106].

Další studie zkoumaly účinnost paclitaxelu s gemcitabinem vůči platinovému doubletu. Práce Treata, Egberta i Kosmidise [114, 116, 117] potvrdily stejnou účinnost i QoL obou režimů, kdy rozdíly byly pouze ve spektru NÚ. Posun v OS nepřinesla ani studie srovnávající týdenní podávání paclitaxelu spolu s carboplatinou podávanou jednou za 4 týdny vůči standardnímu 3 týdennímu podávání paclitaxelu + carboplatiny [118].

Ve 2. linii léčby proběhlo několik nadějných studií fáze II, avšak studie fáze III nebyla nikdy pro samotný paclitaxel provedena [106].

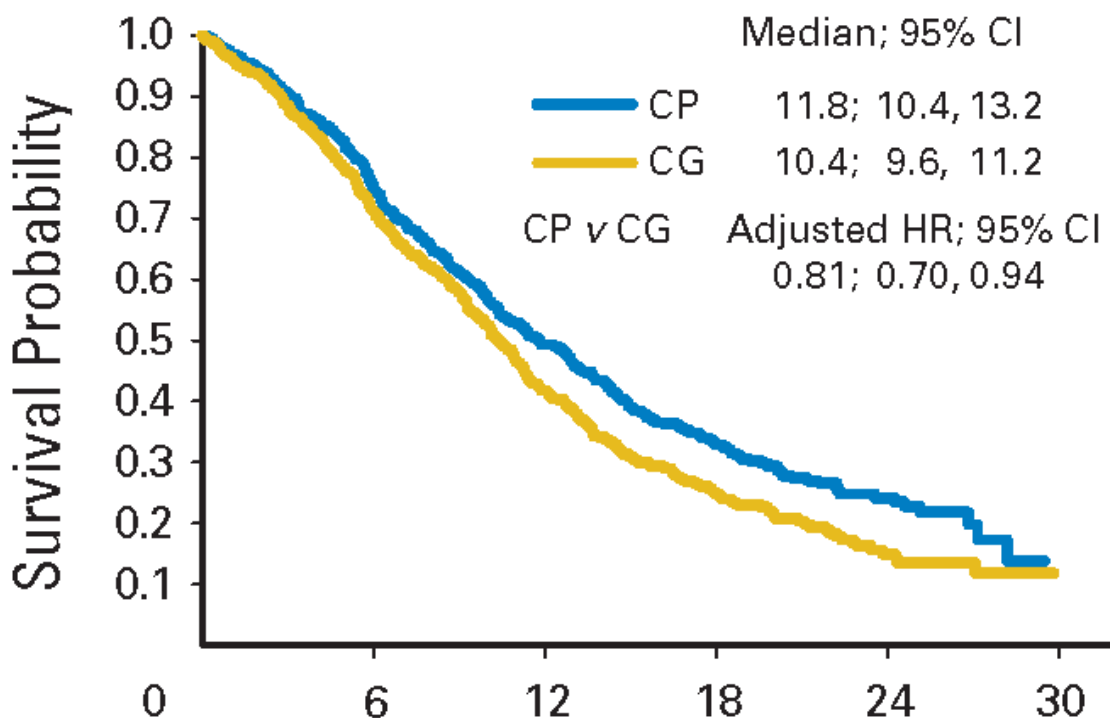
Paclitaxel se dle SPC podává v dávce 175 mg/m^2 spolu s cisplatinou [59], ačkoliv Modrá kniha naopak zmiňuje pouze kombinaci s carboplatinou [4]. Kontraindikován je u pacientů s prokázanou hypersenzitivitou a významnou neutropenií. Mezi závažné NÚ patří reakce z přecitlivělosti (těžké se objevují u cca 1% nemocných, ale v mírnějších formách až u 34% pacientů). Mezi časté NÚ řadíme útlum kostní dřeně, periferní neuropatie, artralgie a myalgie, alopecie, zvýšení hodnot AST a průjmy či zvracení.

Nab-paclitaxel

Paclitaxel vázající nanopartikule albuminu (nab-paclitaxel) byl vyvinut s cílem zmenšit některé NÚ klasického paclitaxelu [119]. Jeho účinnost demonstrovala studie fáze III srovnávající efekt nab-paclitaxelu (100 mg/m^2 týdně) + carboplatiny (AUC6 a 21 dní) vůči klasickému paclitaxelu (200 mg/m^2 a 21 dní) s carboplatinou (AUC6 a 21 dní) [120]. Nab-paclitaxel s carboplatinou prokázal signifikantně vyšší ORR (33 vs. 25%, $p = 0,05$) v celkové skupině nemocných, z pohledu histologie toto platilo pouze pro SCC, u ACC byla ORR obdobná. OS i PFS bylo pro celkový soubor obdobné, vyšší OS pak bylo prokázáno u pacientů starších 70-ti let. Nab-paclitaxel byl spjat s nižším výskytem neuropatií, neutropenií, artralgií a myalgií, ale s vyšším počtem trombocytopenií. Nab-paclitaxel s carboplatinou je tak možným režimem pro první linii SCC, kde by měl být preferován zejména u starších pacientů. V ČR má však úhradu zatím pouze pro vybrané pacientky s karcinomy prsu [59].

Pemetrexed

Pemetrexed představuje antifolát působící na více enzymatických cílů, díky čemuž inhibuje syntézu jak purinů, tak pyrimidinů [121]. Schválen byl k léčbě pokročilých ACC v 1. linii (v režimu cisplatina + pemetrexed) na základě studie Scagliottiho et al. [122]. Jejich práce porovnávala cisplatinu ($75\text{mg}/\text{m}^2$) s gemcitabinem ($1250\text{mg}/\text{m}^2$) vůči cisplatině ($75\text{mg}/\text{m}^2$) s pemetrexedem ($500\text{mg}/\text{m}^2$) na základě prokázané aktivity pemetrexedu spolu s platinovým derivátem ve studiích fáze II. Jednalo se o non-inferiorní studii fáze III (s účastí 1725 pacientů) srovnávající OS, bylo podáváno (pokud možno) celkem 6 cyklů léčby v obou ramenech. Studie splnila svůj primární cíl, kdy prokázala non-inferioritu režimu pemetrexed + cisplatina v celkovém souboru pacientů. Tato kombinace pak měla lepší OS pro pacienty s ACC (medián OS 12,6 vs. 10,9 měsíce) a velkobuněčnými karcinomy (medián OS 10,4 vs. 6,7 měsíce) (Obraz 5), zato u nemocných s SCC měli lepší OS pacienti léčení cisplatinou s gemcitabinem (medián OS 10,8 vs. 9,4 měsíce). Navíc kombinace s pemetrexedem vykazovala nižší výskyt většiny NÚ (vyšší výskyt měla jen nauzea). Pemetrexed s cisplatinou se tak staly standardem pro 1. linii nemocných s ACC (pokud nejsou kontraindikováni k této léčebné kombinaci).



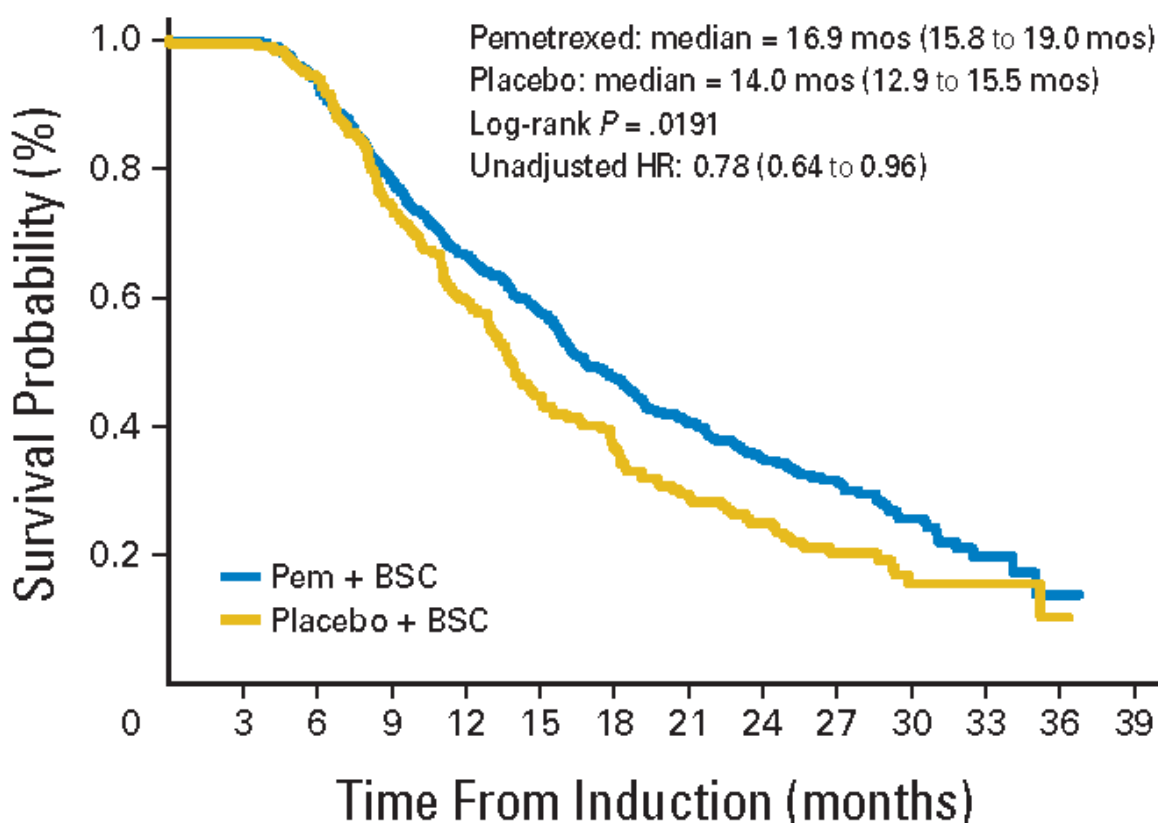
Obraz 6 – OS pacientů s pokročilými nedlaždicovými NSCLC léčených pemetrexedem + cisplatinou vs. gemcitabinem + cisplatinou [122]

Norská práce (fáze III) pak porovnávala v 1. linii léčby režim pemetrexed + carboplatina vůči gemcitabinu s carboplatinou [123]. Oba režimy byly porovnatelné stran QoL (primární cíl). OS též dosáhlo srovnatelných hodnot při nižším výskytu hematologických toxicit v režimu s pemetrexedem. Další studie fáze III srovnávala u pacientů s horším stavem výkonnosti (ECOG PS 2) monoterapii pemetrexedem vůči kombinované léčbě pemetrexed + carboplatina (AUC 5). Kombinovaný režim prokázal superioritu stran OS za cenu vyššího výskytu anemií a neutropenií.

Hanna et al. se ve své studii fáze III zabývali účinností pemetrexedu ($500\text{mg}/\text{m}^2$) ve 2. linii léčby NSCLC, kdy jako komparátor sloužila zavedená terapie docetaxelem [124]. Na souboru 571 pacientů byla prokázána obdobná účinnost stran ORR, PFS i OS při lepším profilu toxicity pemetrexedu. Jeho praktické užití je však s ohledem na horší účinnost u SCC omezeno pouze na nedlaždicové karcinomy [125]. Cullen et al. následně porovnávali možnost zlepšení výsledů ve 2. linii léčby při užití vysoce dávkovaného pemetrexedu ($900\text{mg}/\text{m}^2$) vůči standardní dávce ($500\text{mg}/\text{m}^2$) [126]. Studie byla předčasně ukončena,

neboť interní analýza poskytovala pouze malou šanci na zlepšení OS ve vysoce dávkovaném režimu. Standardem je proto nadále dávkování 500mg/m².

Pemetrexed byl navíc zkoumán i jako možný lék vhodný pro udržovací léčbu po 1. linii CHT. Byly posuzovány 2 schémata – ve studii JMEN tzv. switch udržovací léčba (tedy změna z jiné první linie CHT na nový lék – zde pemetrexed) a ve studii PARAMOUNT tzv. kontinuální udržovací léčba (tedy pokračování lékem, který byl podáván v předchozím režimu – zde tedy pemetrexed po cisplatině s pemetrexedem) [127, 128, 129]. Obě studie srovnávaly pemetrexed s placebem u neprogredujících pacientů po 4 cyklech předchozí léčby – ve studii JMEN platinový doublet, ve studii PARAMOUNT pemetrexed + cisplatina. Studie shodně prokázaly signifikantní zlepšení PFS i OS i pacientů s nedlaždicovými karcinomy (JMEN – 15,5 vs. 10,3 měsíce; PARAMOUNT – 16,9 vs. 14 měsíců – Obráz 7). Udržovací léčba u nemocných s ACC se tak stala standardem.



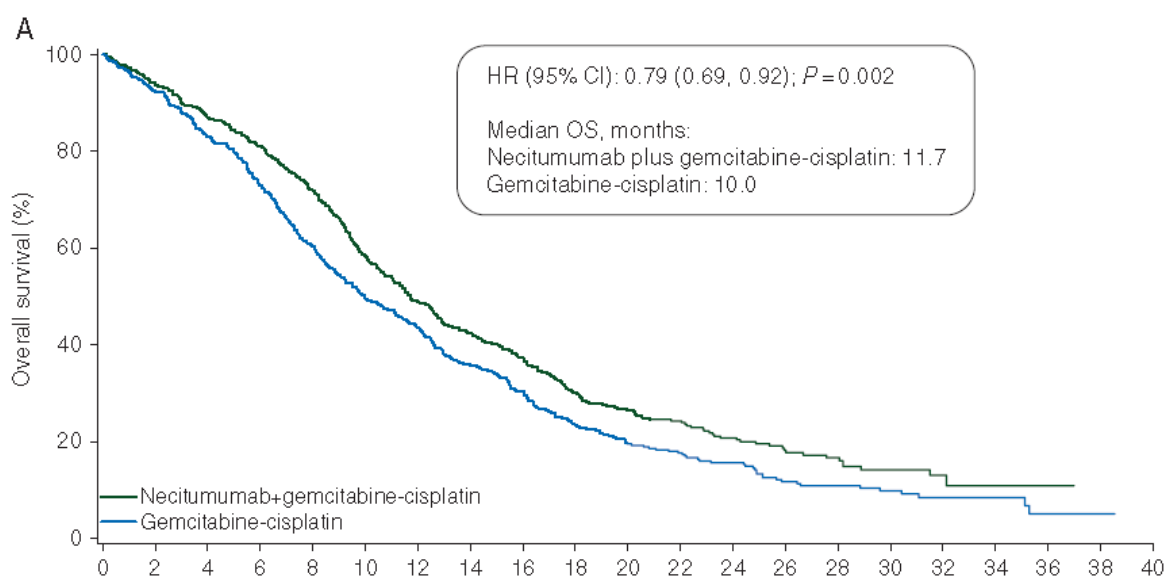
Obráz 7 – Výsledky OS ze studie PARAMOUNT – kontinuální udržovací léčba pemetrexedem vs. placebem [128]

Pemetrexed je dle SPC indikován v dávce 500 mg/m² v 1. linii pokročilých nedlaždicových NSCLC spolu s cisplatinou, dále pak u stejné skupiny pacientů v monoterapii k udržovací léčbě po 1. linii CHT (pokud nedošlo k progresi během 4 cyklů léčby) a též ke 2. linii léčby [59]. Pacienti musí být suplementováni kyselinou listovou a vitamínem B12. Kontraindikací je opět hypersenzitivita. Mezi nejčastější NÚ patří myelosuprese, gastrointestinální obtíže a vyrážky.

B) Cílená a biologická léčba

Necitimumab

Necitimumab je lidská protilátka 2. generace cílící na EGFR, s vyšší vazbou na receptor než cetuximab, který představoval 1. generaci těchto látek [130]. Ačkoliv cetuximab ve své studii fáze III FLEX prokázal u 1125 pacientů po přidání cetuximabu k cisplatině s vinorelbinem signifikantně delší OS (HR = 0,871, medián OS 11,3 vs. 10,1 měsíce, p = 0,044) pro celkovou populaci s lepším výsledkem skupiny s SCC (HR = 0,80), v klinické praxi se neujal [117]. Na tento výsledek navázala studie fáze III SQUIRE porovnávající u 1093 nemocných režim cisplatinu + gemcitabin s/bez přidání necitimumabu v 1. linii léčby u pacientů se SCC s ECOG PS 0-2 [130]. Gemcitabinu s cisplatinou byly podávány 4 cykly, v případě neprogredujícího onemocnění bylo v rameni s necitimumabem pokračováno udržovací léčbou. Kombinovaná léčba přinesla zlepšení přežití (HR = 0,84, medián OS 11,5 vs. 9,9 měsíce, p=0,01) za přijatelné toxicity (vzestup NÚ byl patrný pro hypomagnezémii a rash, obě dobře zvládnutelné). Paz-Ares et al. pak prokázali, že efekt na přežití byl vyšší ve skupině s EGFR expresí (HR = 0,79, medián OS 11,7 vs. 10 měsíců, p = 0,002) (Obraz 8), naopak u pacientů neexprimujících EGFR (pouze 5% pacientů) nebyl efekt na OS prokázán [131]. Necitimumab se tak stal součástí léčby SCC podobně jako pemetrexed u ACC. V ČR však prozatím nemá úhradu.



Obraz 8 – OS pro režim cisplatinu + gemcitabin +/- necitumumab u pacientů s SCC s EGFR expresí v 1. linii léčby [131]

EGFR-TKI

Senzitivní EGFR mutace se ukázaly být významným prediktivním markerem účinnosti léčby pomocí EGFR-TKI. V současné době jsou jediným klinicky používaným biomarkerem užívaným v klinické praxi pro první linii léčby těmito preparáty. Celosvětově se uvádí výskyt EGFR mutací u zhruba 20% pacientů. Jejich četnost je ale vyšší u asijské populace, žen, nekuřáků a především adenokarcinomu. Nicméně je známo, že EGFR-TKI jsou účinné i u části nemocných bez těchto mutací ve vyšších liniích terapie, kde se však používají de facto necíleně. Tyto léky lze rozdělit do 3 generací [132].

1. generace EGFR-TKIs

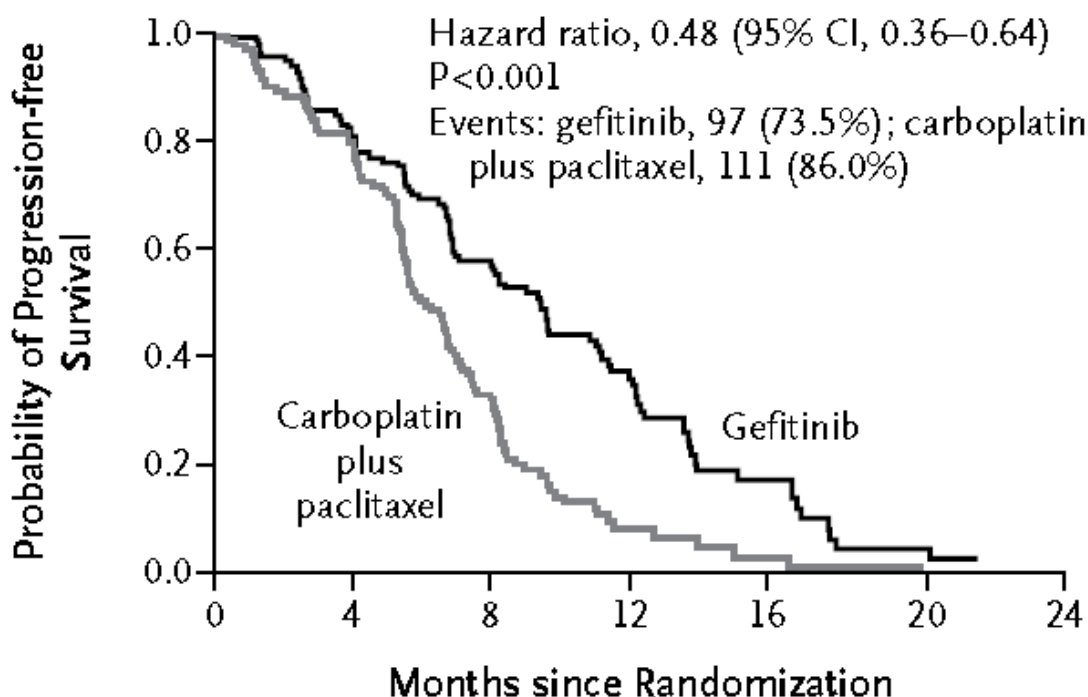
Z této skupiny léků se v klinické praxi používají v první linii léčby u pokročilého NSCLC dvě reverzibilní EGFR-TKI – gefitinib a erlotinib.

Gefitinib

První studií fáze III, která jasně dokumentovala prediktivní potenciál EGFR senzitivních mutací ve vztahu k léčbě EGFR-TKI byla asijská studie IPASS, na základě které EGFR-TKI vstoupily do první linie léčby u takto selektovaných nemocných [133]. Studie porovnávala účinnost gefitinibu (v dávce 250 mg/den p.o.) s kombinací paclitaxel-carboplatina u pacientů s pokročilými NSCLC. Primárním cílem byla PFS. V celkové

skupině neselektovaných nemocných byl PFS vyšší ve skupině s gefitinibem. Pokud se však provedlo rozdělení podle EGFR statusu, ukázalo se, že nemocní bez EGFR senzitivních mutací profitovali více z chemoterapie a naopak ti s EGFR mutacemi signifikantně z podávání gefitinibu (HR = 0.48; 95% CI, 0.36 to 0.64; p < 0.001) (Obraz 9). Bylo tedy jasné, že PFS v celkové skupině bylo zlepšeno právě díky této populaci (u Asiatů jsou EGFR mutace poměrně četné). ORR byla u mutované skupiny též významně vyšší ve prospěch gefitinibu (71,2 vs. 47,3%). Mezi nejčastější nežádoucí účinky gefitinibu patřil rash, průjmy a elevace jaterních enzymů. Výsledky nepřinesly zlepšení OS ve srovnání s chemoterapií, což je však dáváno do souvislosti se značným překřížením („crossover“) mezi oběma větvemi studie [134].

EGFR-Mutation-Positive



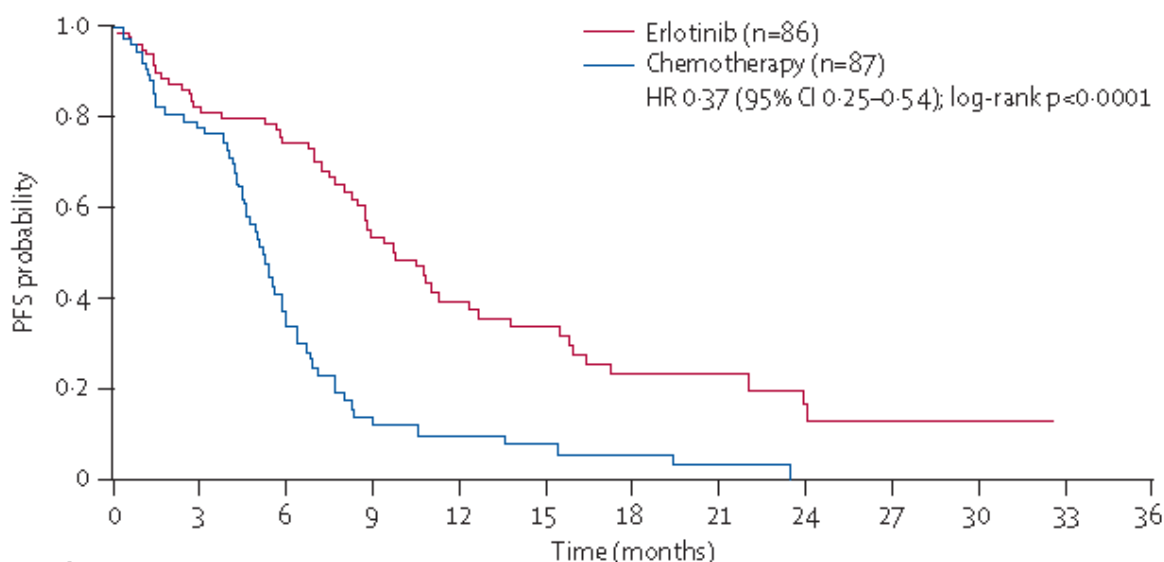
Obraz 9 – PFS pro EGFR mutované pacienty ve studii IPASS (paclitaxel + carboplatina vs. gefitinib) [133]

Další práce asijských autorů potvrdily tento výsledek ve svých studiích fáze III [135, 136]. Účinnost a dobrá snášenlivost gefitinibu na kavkazské populaci byla demonstrována studií fáze IV [137]. Gefitinib se tak stal standardem pro 1. linii léčby u pacientů s EGFR senzitivními mutacemi.

Gefitinib byl též zkoumán jako možnost léčby 2. linie NSCLC. Ve studii fáze III INTEREST byl srovnáván gefitinib s docetaxelem s cílem průkazu non-inferiority stran OS [138]. Gefitinib splnil tento primární cíl a navíc ukázal obdobné PFS jako docetaxel. Další studie fáze III V15-32 tento závěr ale nepotvrdila (ačkoliv OS i PFS též nebyly signifikantně odlišné) [139]. Navíc gefitinib ve studii fáze III neprokázal zlepšení přežití vůči BSC [140], a proto se v této indikaci nepoužívá.

Erlotinib

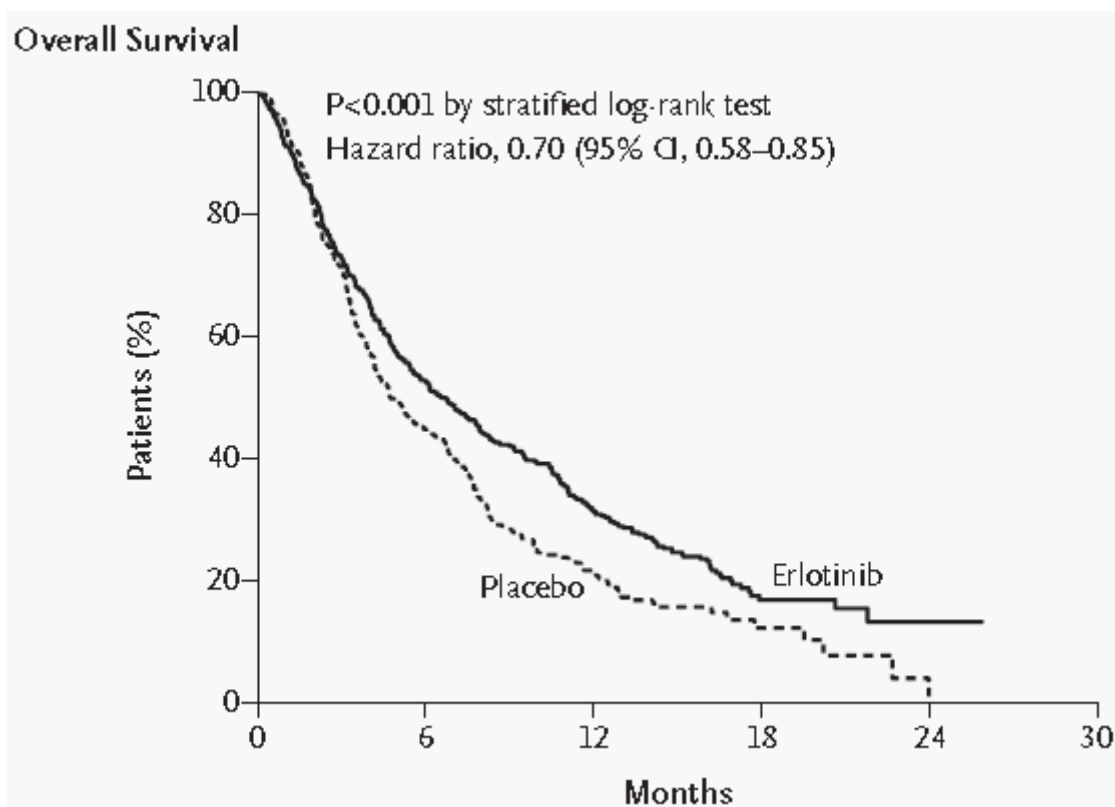
Druhým lékem, který prokázal svoji účinnost u pacientů s pokročilým NSCLC nesoucími EGFR mutace byl erlotinib. Z pohledu Evropy je zásadní především studie fáze III EURTAC, která porovnávala účinnost erlotinibu (v dávce 150 mg/den p.o.) ve srovnání s platinovým doubletem (=cisplatina, popř. carboplatina + docetaxel/gemcitabin) u nepředléčených nemocných s pokročilými NSCLC jednak u pouze evropské populace a jednak pouze u pacientů s EGFR senzitivními mutacemi [141]. Primárním cílem byl rovněž PFS. Studie splnila svůj cíl, kdy PFS bylo při léčbě erlotinibem signifikantně prodlouženo (HR = 0,37, medián PFS 9,7 vs. 5,2 měsíce, $p < 0,0001$) (Obraz 10). Hlavními nežádoucími účinky byl opět výskyt rash a průjmů. Prodloužení OS ani v této studii (opět nejspíše v důsledku crossover) nebylo dosaženo [134].



Obraz 10 – PFS u 1. linie léčby erlotinibem vs. platinovým-doubletem u EGFR + pacientů ve studii EURTAC [141]

Erlotinib byl dále zkoumán jako možný lék vyšších linií NSCLC. Jeho přínos prokázala studie BR.21 srovnávající efekt erlotinibu (150mg/den) vůči BSC ve 2. a 3. linii léčby

NSCLC celkem u 731 pacientů [142]. Erlotinib dosáhl zlepšení přežití (HR = 0,70, medián OS 6,7 vs. 4,7 měsíce) (Obraz 11) a stal se tak používaným lékem ve 2. a 3. linii léčby NSCLC. Jelikož je známo, že aktivní nikotinismus může negativně ovlivnit výsledky léčby erlotinibem, vznikla následně studie fáze III srovnávající dávku 150mg/den a 300mg/den u této skupiny pacientů. Vyšší dávka nepřinesla zlepšení výsledků, dávka 150 mg/den tak zůstává standardní zahajovací dávkou.



Obraz 11 – OS v 2. a 3. linii léčby ve studii BR.21 srovnávající erlotinib s BSC [142]

V době vzniku studie však nebyl ještě ve 2. linii léčby zaveden docetaxel a pemetrexed a nebylo tedy jasné, jak by dopadlo porovnání erlotinibu s těmito režimy. Na tuto otázku odpověděla studie TITAN srovnávající u 2590 pacientů léčbu erlotinibem vůči docetaxelu u pacientů ve 2. linii NSCLC bez ohledu na mutační status EGFR [143]. PFS i OS bylo obdobné pro oba režimy léčby. Potvrzený EGFR wt (wild type) status byl jen u cca 40% nemocných, ale i zde byly výsledky stran OS obdobné. Nelze ale vyloučit, že tyto hodnoty mohla ovlivnit další léčba. Obdobná řecká práce srovnávala pemetrexed s erlotinibem u 357 pacientů, kdy primární cílem bylo PFS [144]. PFS i OS byli vyrovnané pro oba typy léčby v celkové populaci, erlotinib pak převyšoval pemetrexed u SCC. EGFR status byl znám pouze u 123 pacientů, kdy EGFR-wt (55 pacientů) měli rovněž obdobnou PFS i OS.

Ohledně OS však tato studie neměla dostatečnou sílu k prokázání rozdílů a navíc nelze opět vyloučit vliv následné léčby. Chybělo tedy stále definitivní srovnání pro EGFR-wt pacienty stran PFS a OS. Studie DELTA porovnávala erlotinib s docetaxelem u 301 pacientů s předem definovanou podskupinou EGFR-wt nemocných (199 pacientů) [145]. Primárním cílem bylo PFS, mezi sekundární patřilo OS. Studie neprokázala signifikantně delší PFS v rameni s docetaxelem vůči erlotinibu (3,2 vs. 2 měsíce, $p=0,09$), stejně tak OS bylo obdobné. V podskupině pacientů s EGFR-wt (užity citlivější detekční metody než ve studii TITAN) bylo naopak PFS významně prodlouženo pro docetaxel vůči erlotinibu (medián PFS 2,9 vs. 1,3 měsíce, $p=0,01$), OS bylo obdobné, což mohlo být ovlivněno jednak díky crossover mezi rameny studie a nelze vyloučit ani vliv nižší dávky docetaxelu (60 mg/m^2). Následně studie TAILOR srovnávala u 222 pacientů s EGFR-wt efekt erlotinibu (150 mg/den) vůči docetaxelu (75 mg/m^2 a 3 týdny nebo 35 mg/m^2 v týdenním režimu) [146]. Primárním cílem bylo OS, crossover nebyl povolen. Studie prokázala signifikantně lepší přežití při užití docetaxelu oproti erlotinibu ($\text{HR} = 0,73$, medián OS 8,2 vs. 5,4 měsíce, $p=0,05$) a potvrdila výsledek studie DELTA stran PFS. Docetaxel se tudíž stal preferovanější volbou ve 2. linii léčby u pacientů v dobrém klinickém stavu.

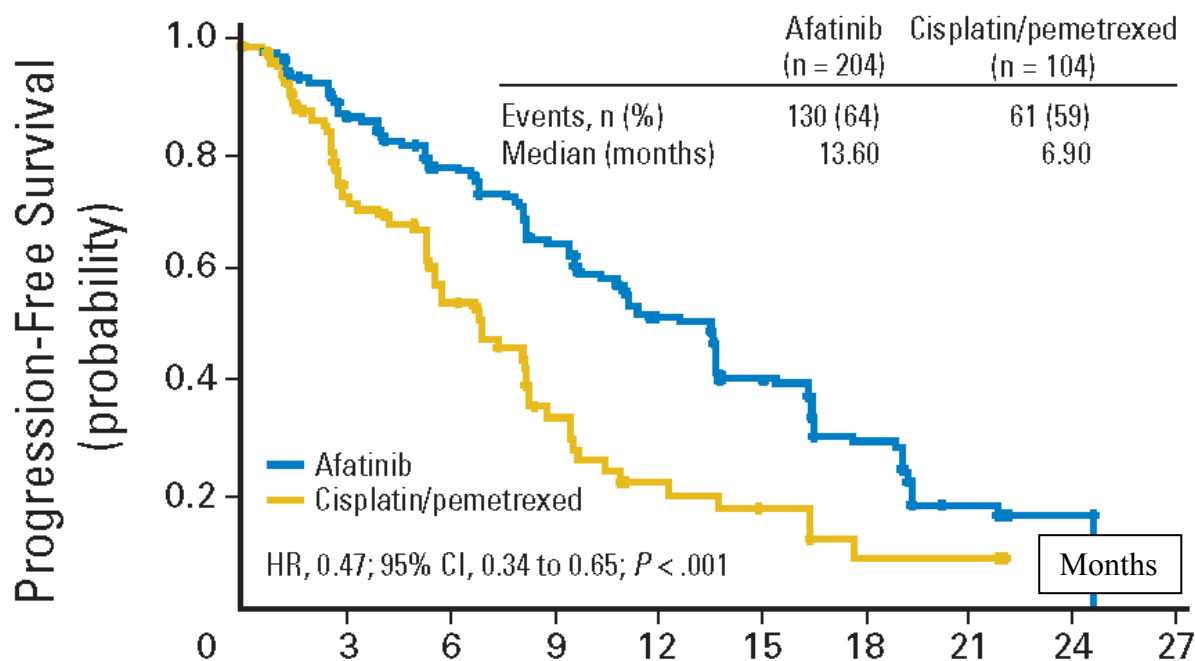
Erlotinib byl zkoumán i jako možný lék pro použití v udržovací léčbě po 1. linii CHT. Touto problematikou se zabývala studie SATURN srovnávající u 844 pacientů (neprogredujících po 4 cyklech CHT) erlotinib (150 mg/den) s placebem [147, 148]. Nemocní nebyli stratifikováni stran EGFR mutačního stavu. Studie prokázala zlepšení PFS, OS pak bylo významně zlepšeno pouze ve skupině pacientů dosahujících jen stabilizace onemocnění po 4 cyklech CHT ($\text{HR} = 0,72$). U nemocných s parciální/kompletní odpovědí na úvodní léčbu nebyl přínos erlotinibu na OS patrný. Léčba se i přes nadějně výsledky v klinické praxi neujala.

2. generace EGFR-TKIs

Vzhledem ke vzniku rezistence na léčbu EGFR-TKI mj. v důsledku rezistentních EGFR mutací (např. T790M) a neověření jejich účinku na tzv. vzácné EGFR mutace byly hledány cesty, jak tyto výsledky zlepšit (studie IPASS i EURTAC byly prováděny jen u pacientů s tzv. častými EGFR mutacemi – tedy bodové mutaci na exonu 21 L858R a delecích na exonu 19 – tvořícími téměř 90% spektra EGFR mutací). Naděje na překonání těchto obtíží byly vkládány do ireverzibilních EGFR-TKI účinných i na další receptory z rodiny ErbB, z nichž se do klinické praxe prosadil afatinib [132].

Afatinib

Afatinib je první perorální, vysoce selektivní, ireverzibilní blokátor ErbB (epidermal growth factor family of receptor tyrosine kinases) rodiny. Toho dosahuje díky kovalentní vazbě na tyrosin kinázovou doménu receptorů ErbB 1,2 a 4. Receptor ErbB3 nemá tyrosin kinázovou doménu, a proto nemůže být afatinibem blokován přímou cestou. Blokace je zde dosaženo díky vazbě na ostatní molekuly ErbB rodiny a tím pádem znemožněním tvorby heterodimerů s ErbB3 [386]. Jeho účinnost u pacientů s pokročilým NSCLC se senzitivními EGFR mutacemi prokázaly studie LUX-LUNG 3 a LUX-LUNG 6 [149, 150]. Studie LUX-LUNG 3 u evropské i neevropské populace porovnávala afatinib (40mg/den s případnou redukcí dávky při nežádoucích účincích) s nejúčinnějším platinovým doubletem (cisplatina-pemetrexed) v první linii u 345 nemocných s pokročilým NSCLC s EGFR mutacemi. Primárním cílem byla opět PFS, která byla při léčbě afatinibem signifikantně zlepšena – celkově o 4,4 měsíce (11,1 vs. 6,7 měsíce) a u skupiny s častými mutacemi dokonce o 6,7 měsíce (13,6 vs. 6,9 měsíce) (Obraz 12). Rovněž byla signifikantně zlepšena ORR a kvalita života nemocných (QoL). Studie LUX-LUNG 6 pak dosáhla obdobných výsledků na čistě asijské populaci, kdy byl afatinib srovnáván s chemoterapeutickou kombinací gemcitabin-cisplatina. V obou studiích mezi nejčastější nežádoucí účinky spojené s afatinibem patřil průjem, rash, stomatitidy a paronychia. OS nebyl v celkovém souboru zlepšen (opět patrně vliv crossover), ale následná metaanalýza vzniklá spojením obou zmíněných studií prokázala jako první práce prodloužení přežití u EGFR-TKIs – zde konkrétně pro subpopulaci pacientů s EGFR mutacemi s delecí 19 [151]. To může poukazovat na odlišný mechanismus účinku mezi dvěma tzv. častými mutacemi.



Obraz 12 – Srovnání PFS afatinibu vs. cisplatinu + pemetrexedu v 1. linii léčby u EGFR + (tzv. časté mutace) pacientů ve studii LUX-LUNG 3 [149]

Dřívější řada studií fáze III tedy prokázala benefit EGFR-TKI 1. a 2. generace u pacientů se senzitivními EGFR mutacemi ve srovnání s platinovými doublety. Přímé srovnání těchto léků v první linii léčby mezi sebou dlouhou dobu neproběhlo a bylo k dispozici pouze několik metaanalýz, dle kterých se zdála účinnost těchto léků obdobná [152]. Tento nedostatek nabourala studie LUX-LUNG 7 [153]. Šlo o otevřenou randomizovanou explorativní studii fáze 2B srovnávající afatinib s gefitinibem v první linii léčby u pacientů s pokročilými plicními karcinomy nesoucí tzv. časté EGFR senzitivní mutace. Studie prokázala především rozdíl v PFS, kdy HR dosáhlo signifikantní úrovně ($HR = 0,73$), přičemž počet pacientů s ukončenou léčbou pro NÚ byl obdobný (6%). Nicméně je nutno poznamenat, že se nejednalo o klasickou superiorní studii. Pro jednoznačné závěry by tedy výsledky měly být potvrzeny studií fáze 3.

Studie fáze III LUX-LUNG 8 se věnovala 2. linii léčby, kde srovnávala účinnost erlotinibu vůči afatinibu u pacientů se SCC (a tedy pravděpodobně EGFR-wt). Studie prokázala lepší PFS ($HR = 0,82$, medián PFS 2,6 vs. 1,9 měsíce, $p = 0,0103$) i OS ($HR = 0,81$, medián OS 7,9 vs. 6,8 měsíce, $p = 0,0077$) při vyšší incidenci průjmů a stomatitid u afatinibu a akné u erlotinibu. Celkový počet NÚ 3. a vyššího stupně byl obdobný. Afatinib se tedy stal

možností volby u pacientů se SCC ve vyšších liniích po selhání přechází CHT (v ČR však není v této indikaci hrazen) [59].

3. generace EGFR-TKIs

Přes své úspěchy, a možnou aktivitu u pacientů s některými tzv. vzácnými EGFR mutacemi, nenaplnil afatinib svá očekávání ve vztahu k EGFR mutaci T790M, která je nejčastější příčinou rezistence na EGFR-TKI. Proto se dále hledaly molekuly, které by s vysokou efektivitou cílily právě na tuto mutaci. Naplnění očekávání přinesly EGFR-TKI 3. generace, kde do klinické praxe vstoupil osimertinib (AZD9291). Nicméně i na tyto preparáty jsou již potvrzené mechanismy rezistence, v budoucnu lze tudíž očekávat další generaci EGFR-TKI čelící tomuto problému [132]. Dle dostupných údajů je již 4. generace EGFR-TKI ve vývoji a např. preparát EAI-045 patrně dokáže překonat rezistenci na mutaci C797S – dle současných poznatků nejčastější příčiny vzniku rezistence na osimertinib [154].

Osimertinib

AZD9291 je perorálně podávaný irreverzibilní EGFR-TKI citlivý vůči EGFR senzitivním mutacím i rezistentní mutaci T790M, naopak citlivost vůči EGFR-wt buňkám je menší oproti předchozím EGFR-TKI. To přináší menší nežádoucí účinky, mezi které patří očekávaný průjem a rash a dále se uvádí zvracení [155]. V klinické studii AURA fáze I/II s navyšováním klinické dávky u pacientů s pokročilým NSCLC po selhání EGFR-TKI v první linii bylo dosaženo pro celkovou skupinu ORR 51%. ORR byl výrazně vyšší pro nemocné s rezistentní mutací T790M v porovnání s pacienty, u kterých nebyla tato mutace prokázána (61% vs. 21%) [156]. Stejný rozdíl byl pozorován i v PFS, kdy pro pacienty s mutací T790M dosáhl 9,6 měsíce, naopak pro nemocné bez této mutace pak jen 2,8 měsíce. Následně osimertinib v dávce 80mg/den dosáhl ve studii fáze II (AURA2) u pacientů předléčených EGFR 1. či 2. generace PFS 11 měsíců [155, 157]. Celkově osimertinib dosáhl u 441 pacientů ve studiích fáze II (rozšířená studie AURA a studie AURA 2) ORR 66%, kontroly onemocnění u 91% pacientů a PFS 9,7 měsíce [59, 154]. Na základě těchto dat byla schválena jeho indikace u pacientů s prokázanou mutací T790M v dávce 80mg/den, s možností jejího snížení na 40mg/den v případě výskytu výraznějších NÚ [59]. Nadějně výsledky recentně potvrdila studie fáze III AURA3, která prokázala signifikantně vyšší PFS u pacientů s mutací T790M (předléčených již 1- linií EGFR-TKI) léčených osimertinibem vůči těm, kteří byly léčeni standardním platinovým doubletem

(cis/carbo-platina + pemetrexed). PSF bylo v mediánu vyšší o 5,7 měsíce při HR = 0,30 a p <0.001 [158].

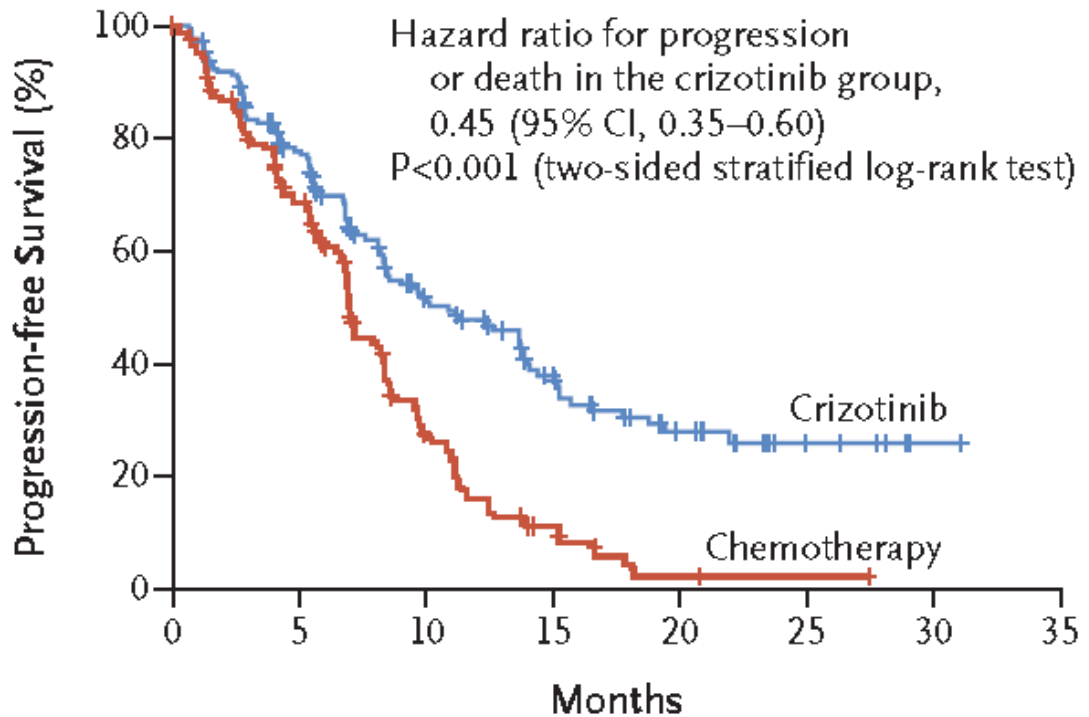
ALK-TKI

Pouze několik let po zavedení EGFR-TKI do běžné praxe byl vyvíjen lék – crizotinib - pro další řídicí onkogen ALK, který u části pacientů vytváří fúzní gen s genem EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4). U NSCLC se objevuje translokace genu ALK u zhruba 5% nemocných (celosvětově). Její častější výskyt je též spjatý s mladšími ženami, nekuřáckým statutem a adenokarcinomy. Zlatým standardem diagnostiky je FISH, jako screening slouží IHC (i když u jasně pozitivních typů již přejímá roli FISH – viz výše). Omezeními crizotinibu se ukázal opět vznik rezistence po určité době terapie a dále nízký průnik do CNS, kdy jedním z možností jejího překonání je podávání preparátu vyšší generace. [132, 159].

Crizotinib

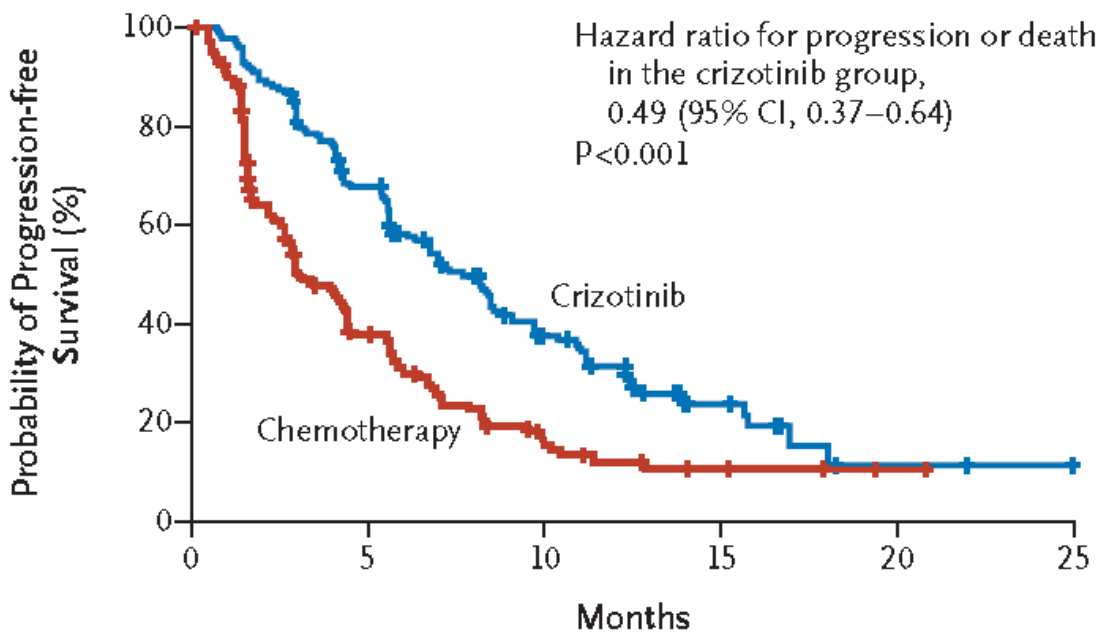
Crizotinib představuje dalšího zástupce cílených léčiv ze skupiny TKI, který je účinný i na některé další onkogeny – např. ROS1 [170]. Na základě studií fáze III (PROFILE 1014 a 1007) prokázal účinnost v dávce 250md 2x denně u pacientů s fúzním genem EML4-ALK jak v první, tak ve druhé linii léčby [160, 161]. U druhé linie léčby bylo dosaženo mediánu PFS 7,7 měsíce, v první linii pak 10,9 měsíce, v obou případech signifikantně více než u porovnávané chemoterapie (medián PFS pro první linii CHT 7,0 měsíce, pro 2. linii CHT pak 3,0 měsíce; HR = 0,45 resp. 0,49) (Obraz 13, Obraz 14). OS nebyl v obou studiích významně prodloužen – opět nejspíše v důsledku cross-overu. Crizotinib je obvykle pacienty dobře snášen, k nejčastějším nežádoucím účinkům ve studiích patřily poruchy vízu, gastrointestinální obtíže, elevace jaterních enzymů a periferní otoky. Při terapii je dále třeba dávat pozor na možný vznik pneumonitidy a prodloužení QTc intervalu [59]. V ČR měl tento lék dočasnou úhradu, pro léčbu pacientů s ALK translokacemi ve 2. linii léčby, do 1. 3.2017, která však nebyla prozatím prodloužena.

Progression-free Survival



Obraz 13 – PFS pro 1. linii léčby crizotinibem vs. cisplatinou/carboplatinou + pemetrexedem u ALK + pacientů [161]

Progression-free Survival



Obraz 14 – PFS pro 2. linii léčby crizotinibem vs. pemetrexedem/docetaxelem u ALK + pacientů [160]

Ceritinib

Stejně jako u jiných cílených léčiv, tak i na crizotinib si tumor obvykle postupně vytvoří rezistenci. Jsou popsány dvě hlavní skupiny příčin – tzv. ALK dominantní (ALK mutace, ALK amplifikace, metastázy do CNS) a ALK nedominantní cesta (mutace či amplifikace jiných řídicích genů popřípadě přeměna v sarkomatoidní typ tumoru) [159]. Právě na první skupinu cílí tzv. ALK inhibitory 2. generace, jejichž snahou je jednak zlepšení průniku do CNS a pak i účinnost proti některým známým rezistentním mutacím (svat-cíl.tp.). Mezi tyto léky patří i ceritinib. Jeho účinnost u pacientů předléčených crizotinibem prokázala klinická studie fáze I/II [162]. Jako optimální dávka bylo stanoveno podání 750mg ceritinibu jednou denně, kdy PFS činilo 7 měsíců. Hlavní nežádoucí účinky měl lék na zažívací trakt. Na základě této studie byl lék předčasně schválen k užívání u pacientů po předchozí léčbě crizotinibem [132]. Dále byl publikován update této studie (ASCEND-1) [163]. U pacientů předléčených crizotinibem dosáhla ORR 56%, PFS 6,9 měsíce a míra kontroly metastáz do CNS činila 65%. Pro pacienty nepředléčené ALK inhibitorem dosáhly tyto hodnoty: ORR 61%, PFS 18,4 měsíce, kontrola metastáz do CNS 79%. V obou ramenech mezi nejčastější NÚ patřil průjem, zvracení a elevace jaterních enzymů. Spektrum NÚ dále potvrdila studie fáze II ASCEND-2 provedená u 140 pacientů předléčených crizotinibem [164]. Výsledky účinnosti ceritinibu zde byly mírně horší (ORR 38,6%, PFS 5,7 měsíce). Na světové konferenci o plicních nádorech pak byly v prosinci 2016 představeny výsledky studie fáze III ASCEND-4, která srovnávala u pacientů s prokázanou ALK translokací (imunohistochemicky) podávání ceritinibu vůči standardnímu platinovému doubletu v první linii léčby [165]. PFS pro ceritinib dosáhlo v celkové skupině pro ceritinib 16,6 měsíce vs. 8,1 měsíce pro CHT (HR = 0,55, $p < 0.001$). Pro nemocné bez metastáz do CNS byl rozdíl v mediánu PFS ještě markantnější (26,3 vs. 8,3 měsíce). Nejčastější NÚ ceritinibu byly nauzea, průjem a elevace jaterních enzymů.

Alectinib

Alectinib patří stejně jako ceritinib mezi ALK-TKI 2. generace [166]. Jeho účinnost potvrdily dvě studie fáze II, na základě kterých byl FDA i evropskou lékovou agenturou schválen k užití u pacientů progredujících na crizotinibu či těch, co ho netolerují [167, 383]. V obou studiích fáze II byl alectinib podáván v dávce 600mg 2x denně perorálně [168, 169]. Ou et al. ve své práci demonstrovali u crizotinibem předléčených pacientů ORR 50% a medián PFS 8,9 měsíce. Nejčastější NÚ byly zácpa (ve 33%), slabost (26%) a

periferní edémy (25%), obvykle stupně 1 a 2. Shaw et al. ve své práci prokázali obdobnou účinnost (ORR 52%, PFS 8,1 měsíce) i spektrum nežádoucích účinků (více byly popisovány myalgie). Obě práce též ukázaly na dobrou účinnost alectinibu v CNS. Díky slibným výsledkům byla provedena studie fáze III J-ALEX srovnávající u ALK + pacientů (s ECOG PS 0-2 s žádnou nebo jednou předchozí CHT) léčebný režim s alectinibem vůči crizotinibu [166]. Výsledky byly prezentovány na konferenci ASCO 2016. Studie byla pro velmi dobrý efekt alectinibu dle 2. interní analýzy předčasně ukončena. Celkem tedy bylo randomizováno 207 pacientů. Celkový bezpečnostní profil byl lepší pro alectinib, stejně jako ORR (91,6 vs. 78,9%). PFS jednoznačně favorizovalo alectinib při HR = 0,34 (medián pro alectinib zatím nedosažen, pro crizotinib činil 10,2 měsíce). Výsledky je nutno brát zatím s opatrností, neboť obě ramena studie nebyla vyvážena v počtu mozkových metastáz (13,6 v rameni s alectinibem vs. 27,9% v rameni s crizotinibem). Bude tedy zajímavé sledovat, zda japonskou práci bude ve výsledcích podporovat i studie ALEX probíhající ve zbytku světa.

ROS1 – TKI

[170, 171]

Gen ROS1 (proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS 1) není v normální plicní tkáni exprimován. Jeho ligand není dosud znám, nicméně jeho nitrobuněčné dráhy dokládají jeho onkogenní efekt. Trvalá aktivita ROS1 pak může být navozena jeho translokací, které byly prokázány i u některých pacientů s NSCLC. V současné době je známo minimálně 6 fúzních partnerů tohoto genu, přičemž kódovaný rozsah ROS1 domény zůstává stále stejný. Výskyt tohoto onkogenu je uváděn u NSCLC přibližně u 1% populace, některé práce popisují i vyšší výskyt. Jejich zastoupení je vyšší u pacientů s adenokarcinomem, nekuřáků/lehkých kuřáků a žen. Zlatým standardem diagnostiky je, stejně jako u translokace genu ALK, opět metoda FISH, která na rozdíl od PCR (polymerázová řetězová reakce) dokáže spolehlivě detekovat různé fúzní partnery genu ROS1. IHC vyšetření je pro možnou falešnou negativitu vhodnější spíše jako screeningový test. Vzhledem k podobnosti s molekulou ALK byla na základě preklinických nadějných výsledků realizována studie fáze I s crizotinibem s jeho zvyklým dávkováním 250md 2x denně. Výsledkem bylo dosažení velmi slibného ORR dosahujícího 72%. Na základě tohoto obdržel od FDA, podobně jako ceritinib, status průlomového léčiva s možným klinickým využitím. Na naší klinice již evidujeme jednu úspěšně léčenou pacientku.

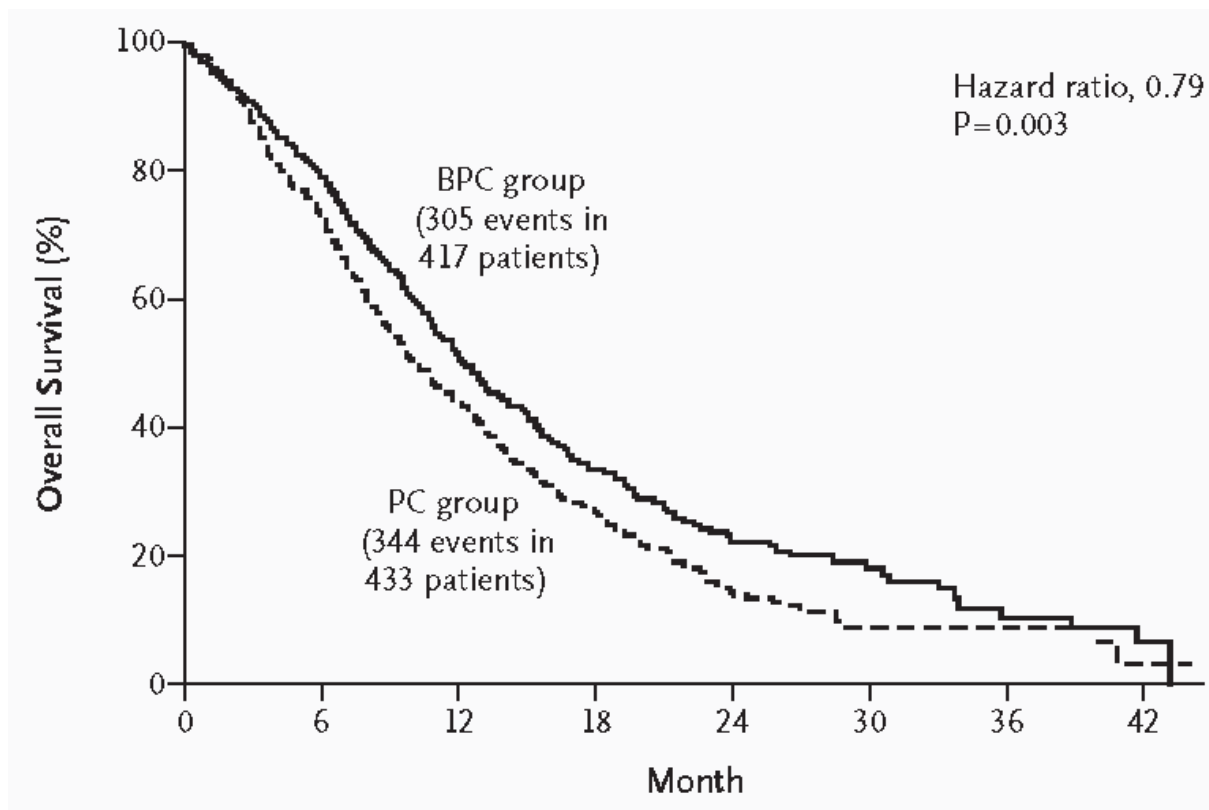
Inhibitory angiogeneze

U mnoha nádorů, včetně NSCLC, byl prokázán významný vliv proangiogenních cest na šíření, progresi a metastazování nádorů. Preklinický výzkum vytyčil jako zásadní molekuly podporující angiogenezi především vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF). Proto vznikly snahy vyvinout preparáty, které by tuto funkci mohly blokovat. Byla zkoušena řada molekul jednak na bázi protilátek z kategorie biologické léčby, tak i cílených chemoterapeutik blokujících zmíněné tyrosin kinázy, avšak do současné reálné klinické praxe pronikly doposud jen 3 léky v kombinaci s klasickými chemoterapeutickými režimy. Trvajícím nedostatkem těchto léků je nadále absence prediktivních markerů pro jejich použití [132].

Bevacizumab

Bevacizumab představuje rekombinantní monoklonální humanizovanou protilátku proti VEGF, která je schválena k léčbě pokročilého nemalobuněčného plicního nedlaždicového NSCLC v kombinaci s platinovým doubletem v první linii léčby [59]. Svoji účinnost ukázal v několika klinických studiích. Studie fáze III ECOG 4599 porovnávala terapii paclitaxel + carboplatina +/- bevacizumab (15mg/kg) u neskvamózního pokročilého NSCLC (pacienti s dlaždicobuněčným typem tumorů byly na základě předchozích studií pro zvýšené riziko krvácení vyřazeny). Výsledkem přidání bevacizumabu bylo signifikantní zlepšení ORR (35 vs. 15%), PFS (6,4 vs. 4,5 měsíce) i OS (12,3 vs. 10,3 měsíce) (Obraz 15) [172]. Další studie fáze III AVAiL porovnávala účinnost režimů cisplatina + gemcitabin +/- bevacizumab (15mg/kg nebo 7,5 mg/kg) opět u neskvamózního pokročilého NSCLC. Studie prokázala signifikantní benefit stran PFS u obou dávek bevacizumabu, avšak OS tentokrát signifikantně zvýšeno nebylo [173, 174]. To mohlo být způsobeno jednak odlišným chemoterapeutickým režimem (u dalších molekul bylo též dosaženo pozitivních výsledků také s taxany) nebo následnou léčbou vyšších linií [132]. Nelze však vyloučit ani falešně pozitivní výsledek u studie s paclitaxelem, kdy dostupná souhrnná metaanalýza studií fáze III neprokázala zlepšení OS při léčbě s bevacizumabem [175]. Pro riziko krvácení není tato léčba doporučována u pacientů s předchozí anamnézou hemoptýzy v anamnéze a tumorů v blízkosti větších cév. Podezření na riziko podávání pacientům s metastázami do mozku se naopak pozdějšími pracemi nepotvrdilo [132]. Mezi nejčastější nežádoucí účinky léku patří, mimo zmíněné hemoptýzy, výskyt arteriální

hypertenze a proteinurie [59]. Přijatelnou bezpečnost bevacizumabu potvrdila dále studie fáze IV Sail [176]. Jeho účinnost pak potvrdila metaanalýza studií fáze II a III, která dokládá zlepšení nejen stran PFS, ale i OS [177].



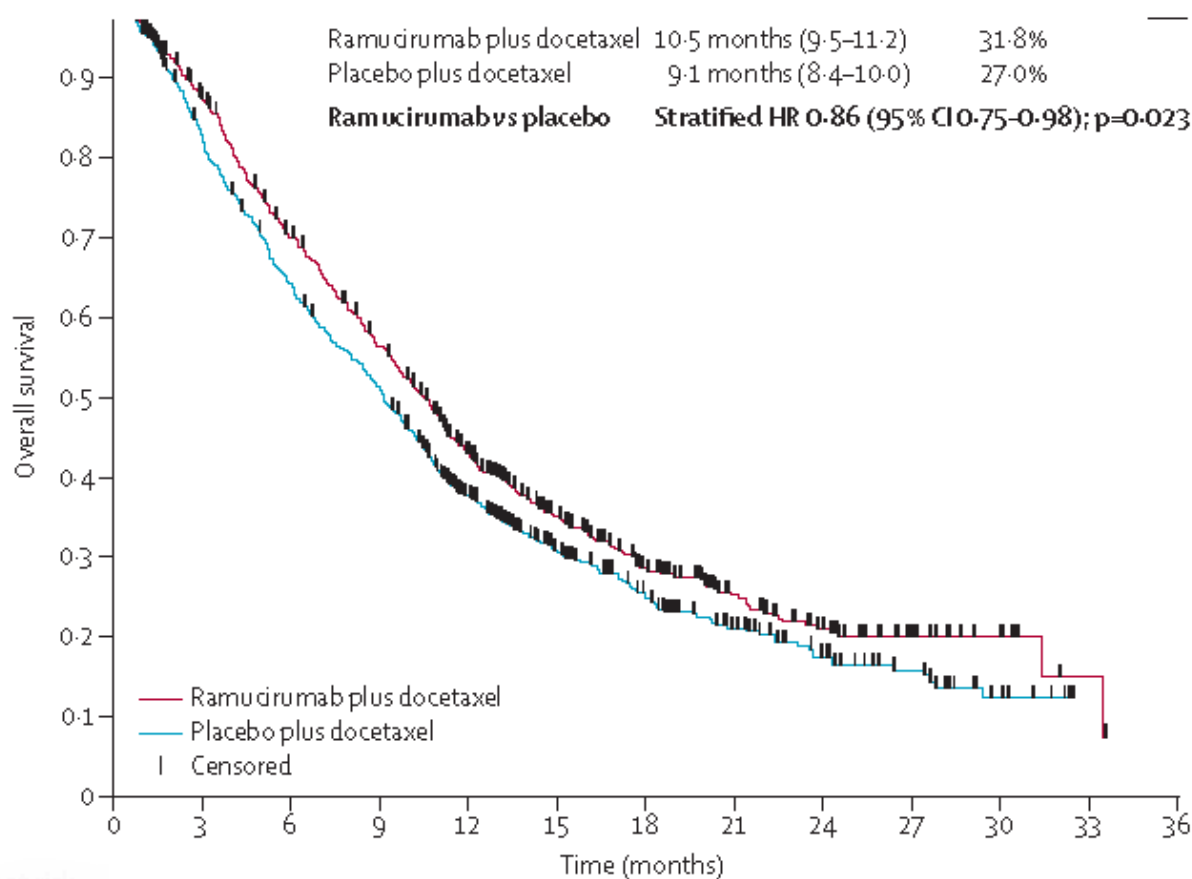
Obraz 15 – Výsledky OS v režimu paclitaxel + carboplatina +/- bevacizumab ve studii ECOG 4599 [172]

Bevacizumab se ve studii ECOG 4599 ukázal být též vhodným lékem pro udržovací léčbu, kdy následné analýzy poukázaly na zlepšení PFS i OS u pacientů léčených bevacizumabem v udržovacím režimu vůči pacientům s CHT bez udržovací léčby [178]. V observační kohortové studii ARIES byly sledováni pacienti neprogredující po úvodních 4 až 6 cyklech léčby (CHT + bevacizumab). 540 pacientů obdrželo a 675 neobdrželo bevacizumab [179]. PFS i OS byly opět lepší v režimu s bevacizumabem. Studie AVAPERL (fáze III) porovnávala u 376 pacientů udržovací léčbu bevacizumabem vs. bevacizumabem + pemetrexedem při neprogresi po 4 cyklech léčby cisplatina + pemetrexed + bevacizumab [180]. PFS od doby randomizace bylo zlepšeno pro režim s bevacizumabem + pemetrexedem vůči samotnému bevacizumabu (HR = 0,48, medián PFS 7,4 vs. 3,4 měsíce, $p < 0,001$). Následně studie fáze III PointBreak podávala pacientům léčbu bevacizumab + carboplatina + pemetrexed (4 cykly) následovanou

udržovací terapií bevacizumab + pemetrexed nebo byl podán druhý léčebný režim spočívající v úvodních 4 cyklech bevacizumabu + carboplatiny + paclitaxelu následovanou udržovací terapií bevacizumabem. Studie nesplnila svůj primární cíl, neboť OS bylo obdobné v obou ramenech ($p = 0,949$). Rovněž další menší studie potvrdila stejné PFS u režimu pemetrexed + bevacizumab vs. pemetrexed v udržovací léčbě po úvodních 4 cyklech CHT [184]. Probíhající studie fáze III ECOG 5508 porovnává udržovací léčbu pemetrexedem vs. bevacizumabem vs. oběma modalitami dohromady po 4 cyklech léčby paclitaxel + carboplatina + bevacizumab [185]. Primárním cílem je OS a výsledky by měly být publikovány v roce 2018. Studie fáze III S130 si dala za cíl porovnat PFS v režimu pemetrexed + carboplatina následovaná pemetrexedem vůči paclitaxelu + carboplatině + bevacizumabu následované bevacizumabem [186]. Výsledky zatím nebyly publikovány.

Ramucirumab

Ramucirumab představuje humánní monoklonální protilátku cílicí na extracelulární doménu receptoru VEGFR-2. Klinická studie fáze III REVEL porovnávala jeho účinnost v druhé linii léčby, kde byl podáván docetaxel (75 mg/m² každé 3 týdny) s/bez tohoto preparátu [388]. Bylo prokázáno signifikantní prodloužení PFS (4,5 vs. 3 měsíce) i OS (10,5 vs. 9,1 měsíce, HR 0,86, $p=0,023$) po přidání ramucirumabu pro skvamózní i neskvamózní NSCLC (Obraz 16). Nejčastějšími nežádoucími účinky gradu ≥ 3 byla neutropenie (resp. febrilní neutropenie) a únava (obojí vyšší ve větvi s ramucirumabem).



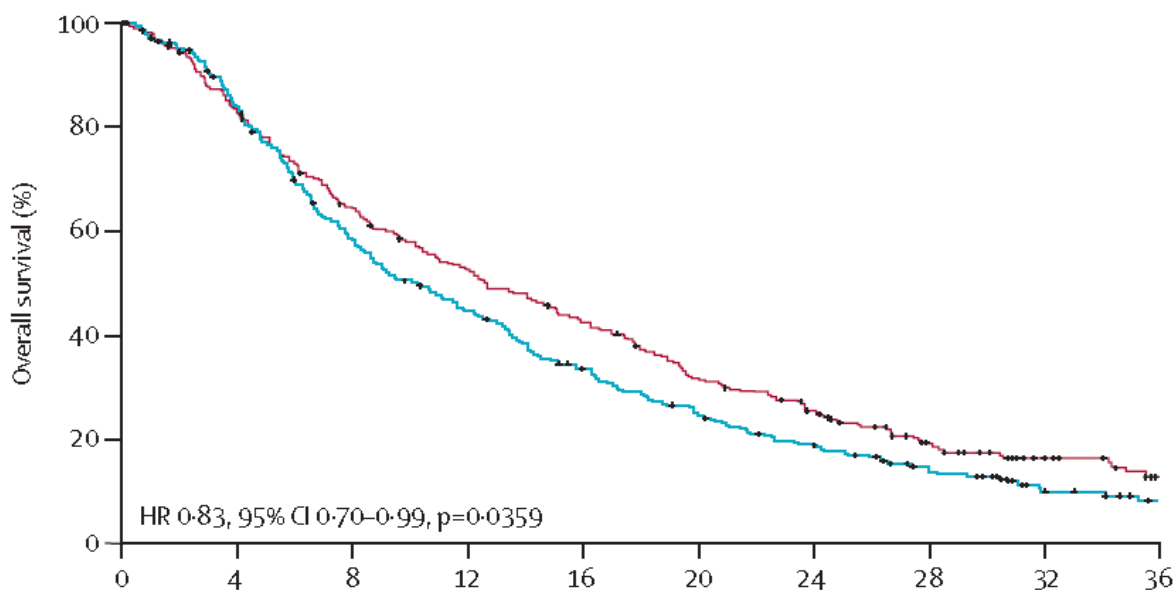
Obraz 16 – OS ve 2. linii léčby NSCLC studie REVEL – ramucirumab + docetaxel vs. docetaxel [388]

Nintedanib

Nintedanib představuje TKI, který cílí jednak na VEGFR a dále na PDGFR a FGFR.

V klinických studiích LUME-lung 1 a 2 bylo zkoumáno zvýšení účinnosti druhé linie léčby po jeho přidání k docetaxelu resp. pemetrexedu [184]. Ve studii LUME-lung 1 byl podáván docetaxel (v dávce 75mg/m² každé 3 týdny) s/bez nintedanibu (v dávce 200mg 2x denně) [185]. Bylo dosaženo signifikantního nárůstu v PFS (3,4 vs. 2,7 měsíce) a pro předem definovanou skupinu adenokarcinomů v OS (12,6 vs. 10,3 měsíce, HR = 0,83, p = 0,0359). Mezi nejčastější nežádoucí účinky patřilo zvracení, průjemy a zvýšení jaterních enzymů. Celkový počet nežádoucích účinků byl srovnatelný v obou ramenech. Studie LUME-lung 2, kde byl podáván pemetrexed s/bez nintedanibu, byla po subanalýze naznačující nedosažení primárního cíle (PFS) předčasně ukončena [184]. Nakonec se však ukázalo, že bylo dosaženo významného zvýšení PFS. Hodnoty OS byly obdobné, to ovšem

mohlo být ovlivněno předčasným ukončením studie bez vyhodnocení potřebného počtu pacientů.



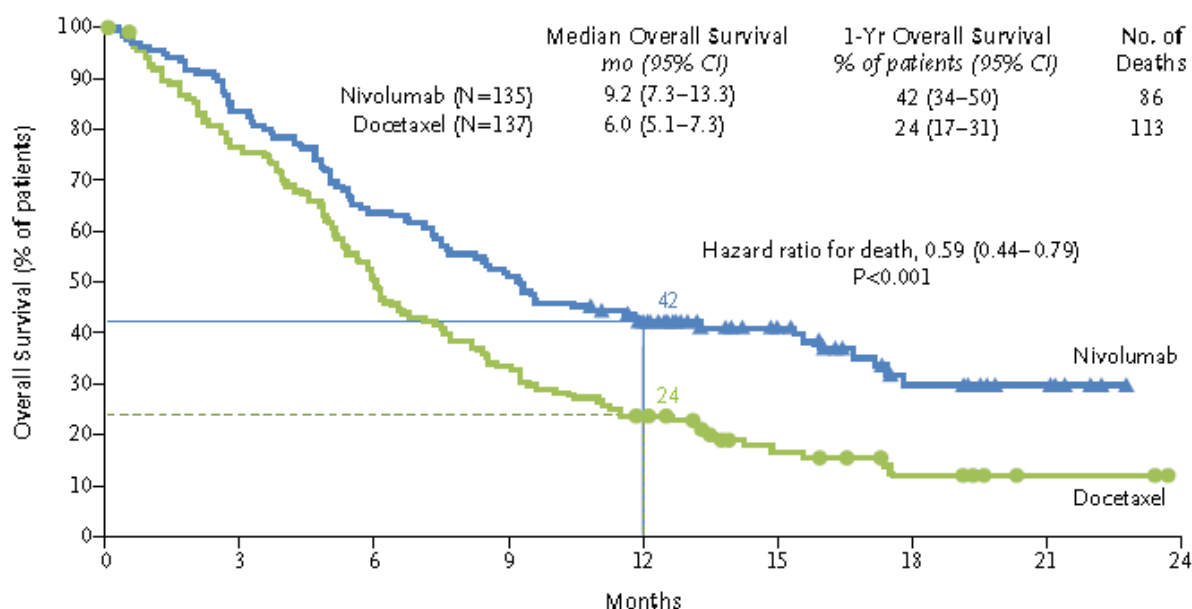
Obraz 17 – OS ve 2. linii léčby ACC – studie LUE-lung 1 – nintedanib + docetaxel vs. docetaxel [185]

C) Imunoterapie (IT)

Imunoterapie zažívá po řadě neúspěchů renesanci na poli NSCLC. Jejím cílem je umožnit imunitě rozpoznat a eradikovat tumor nápravou imunitní odpovědi pozměněné nádorovým mikroprostředím. V tomto hrají zásadní roli T- lymfocyty, jejichž aktivace je závislá především na dvou signálech – od hlavního histokompatibilního komplexu a od dalšího receptoru, který může být kostimulační či inhibiční (44). Jako inhibiční signály vysílané tumorem a jeho mikroprostředím byla rozpoznána mimo jiné i molekula PD-1 (programmed death-1), resp. její receptor, na něž pak cílí v klinické praxi recentně používané molekuly [387]. Mezi typické NÚ těchto látek patří únava, snížená chuť k jídlu a tělesná slabost, zvýšeně je pak třeba dávat pozor na možné autoimunitní NÚ (průjemy při kolitidách, pneumonitidy, artralgie a další) [186]. Vzhledem k možné tzv. pseudoprogresi po začátku terapie (v důsledku zánětlivé infiltrace tumoru) je diskutována vhodná alternativa používaným RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) kritériím. Stejně tak je stále zkoumána a upřesňována role PD-L1 (Programmed death-ligand 1) jako prediktivního markeru [186].

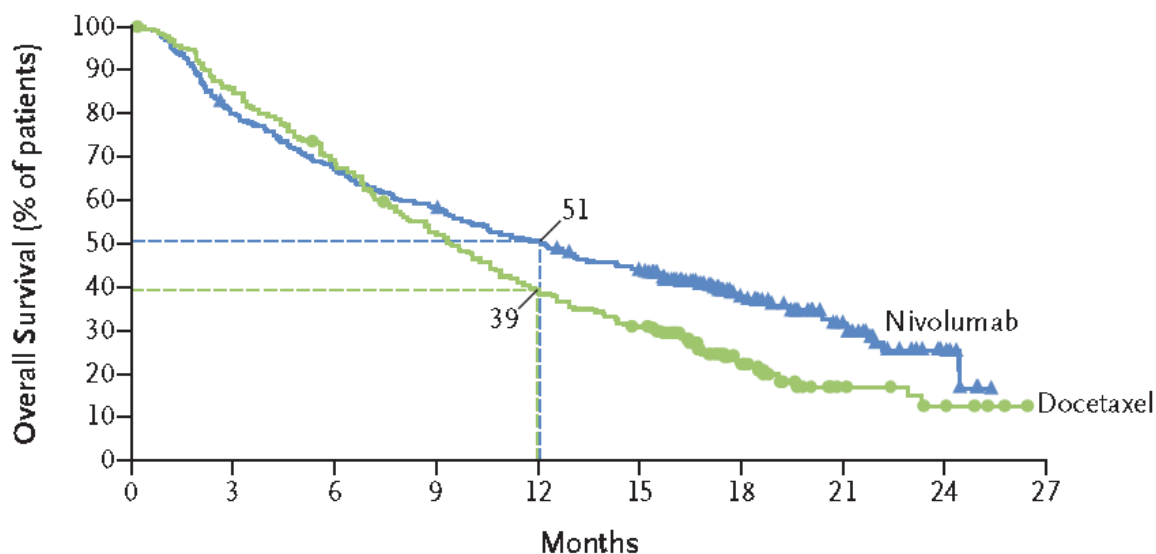
Nivolumab

Nivolumab je protilátka cílící na PD-1 receptor podávaná v dávce 3mg/kg váhy každé dva týdny i.v. Svoji účinnost ve srovnání s docetaxelem ve 2. linii léčby prokázal jak u skvamozního tak i neskvamozního dlaždicového karcinomu ve studiích CheckMate 017 a CheckMate 057 [187, 188]. U skvamozních karcinomů byl medián přežití zlepšen o 3,2 měsíce (9,2 vs. 6 měsíců, HR = 0,59) a u neskvamozních tumorů pak o 2,8 měsíce (12,2 vs. 9,4 měsíce, HR = 0,73) (Obraz 18 a 19). Význam exprese receptoru PD-L1 nebyla přesvědčivým prediktivním markerem. Obě studie prokázaly významné snížení těžkých NÚ oproti docetaxelu.



Obraz 18 – v OS ve studii CHeckmate 017 – nivolumab vs. docetaxel ve 2. linii léčby SCC
[187]

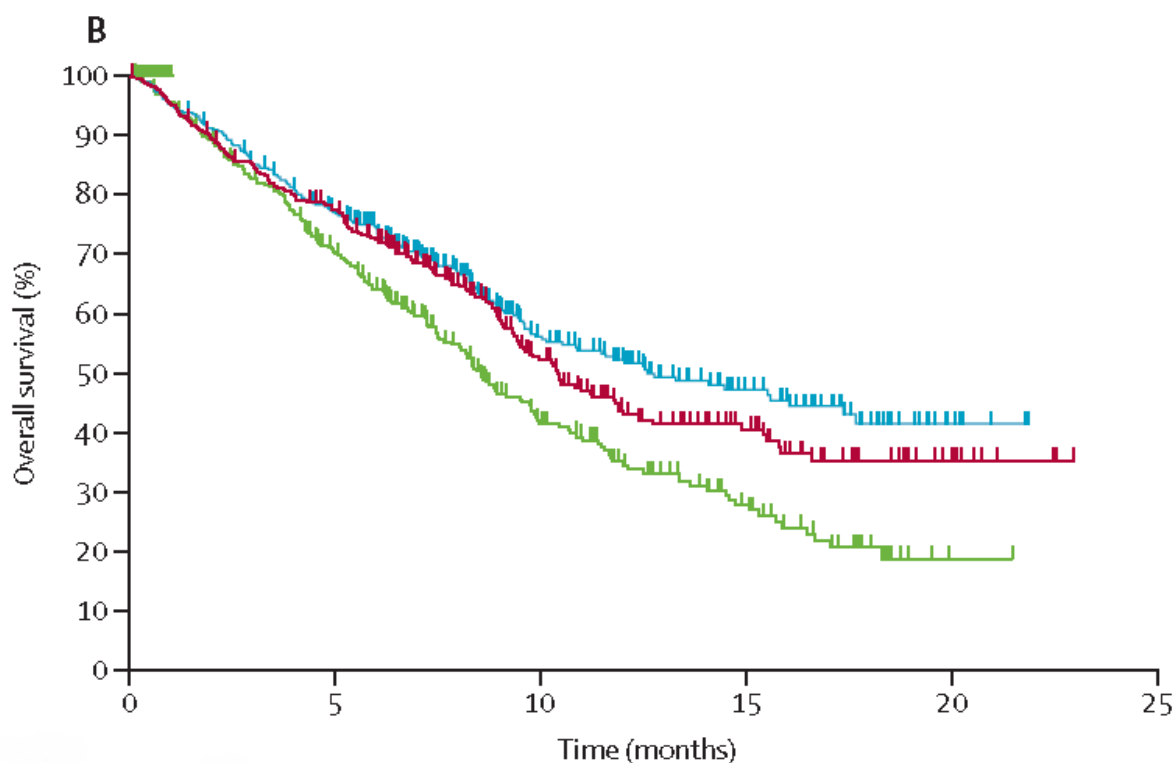
Overall Survival



Obraz 19 – OS ve studii Checkmate 057 – nivolumab vs. docetaxel ve 2. linii léčby nonSCC [188]

Pembrolizumab

Pembrolizumab ve studii KEYNOTE-010 [189] rovněž prokázal svoji superioritu v mediánu celkového přežití vůči docetaxelu (10,4 měsíce pro pembrolizumab v dávce 2mg/kg – HR = 0,71; 12,7 měsíce pro pembrolizumab v dávce 10mg/kg – HR = 0,61, vůči 8,5 měsíce pro docetaxel) ve 2. linii léčby obou histologických subtypů (Obraz 20) u pacientů s PD-L1 expresí alespoň 1%. Rozdíly mezi pembrolizumabem a docetaxelem byly dále zvýrazněny při expresi PD-L1 přes 50%, kdy medián OS dosáhl 14,9 měsíce (HR = 0,54) pro dávku 2 mg/kg, 17,3 měsíce (HR = 0,50) pro dávku 10 mg/kg vůči 8,2měsícům u docetaxelu. Nežádoucí účinky byly opět nižší při užití imunoterapie. Na základě této studie byl pembrolizumab FDA schválen pro léčbu vyšších linií u pacientů s prokázanou PD-L1 expresí [190].



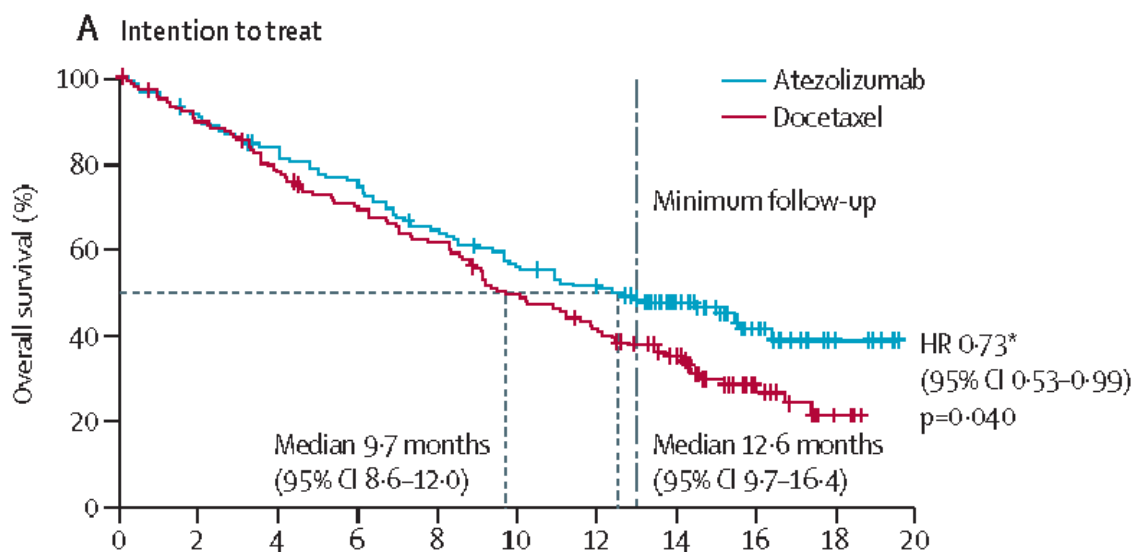
Obraz 20 – v OS ve studii KEYNOTE-010 (pembrolizumab vs – docetaxel) [189]

Pembrolizumab v 1. linii léčby byl nejprve zkoušen spolu s kombinací pemetrexed + carboplatina, kdy ve studii fáze II KEYNOTE 021 dosáhla IT signifikantně lepší ORR než rameno se samotnou CHT při obdobných NÚ [191]. Studie fáze III KEYNOTE 024 pak již u 305 pacientů, s expresí PD-L1 vyšší než 50%, porovnávala pembrolizumab v dávce 200mg každé 3 týdny s platinovým doubletem [192]. Primárním cílem bylo PFS, crossover byl povolen po progresi onemocnění. Studie dosáhla svého primárního cíle, kdy pembrolizumab významně prodloužil PFS (HR = 0,50, medián PFS 10,3 vs. 6,0 měsíce, $p < 0,001$). Pembrolizumab též dosáhl zlepšení ORR a OS po 6-ti měsících od počátku léčby (HR = 0,60). Obdobná studie fáze III (KEYNOTE 042), která by mohla potvrdit účinnost pembrolizumabu v 1. linii léčby u pacientů s vysokou PD-L1 expresí, probíhá [193]. Nicméně již na základě výsledků studie KEYNOTE 021 byl pembrolizumab schválen (FDA) pro 1. linii léčby pacientů s PD-L1 expresí přes 50%, kdy tito nemocní zároveň nemají EGFR senzitivní mutaci či ALK translokaci [194].

Atezolizumab

Atezolizumab představuje další anti-PD-L1 protilátku zkoušenou u NSCLC [186]. Ve studii fáze II POPLAR byla srovnávána jeho účinnost s docetaxelem u 287 pacientů u

pacientů léčených ve 2. resp. 3. linii léčby [195]. Studie splnila svůj primární cíl, kdy prokázala zlepšení OS v rameni s docetaxelem (HR = 0,73, medián OS 12,6 vs. 9,7 měsíce, $p = 0,04$) (Obraz 21). Tyto výsledky pak potvrdila studie fáze III OAK [196]. U 850 pacientů demonstrovala zlepšení PFS i OS (HR = 0,73) atezolizumabu (v dávce 1200 mg i.v. a 3 týdny) vůči docetaxelu a to bez ohledu na histologii či PD-L1 status. Nicméně o obou zmíněných studiích byla vyšší exprese PD-L1 spjata s tendencí k lepším výsledkům [195, 196]. Na základě těchto výsledků byl atezolizumab též schválen (FDA) pro vyšší linie léčby [194].



Obraz 21 – Výsledky OS ze studie fáze II POPLAR (atezolizumab vs. docetaxel ve 2. a 3. linii léčby) [195]

3.5.3 Léčebné schéma

Onemocnění stadia I a II

Metodou volby je radikální chirurgické řešení tumoru, jak je popsáno výše. V případě, že pacient nemůže podstoupit resekci tumoru je pro nemocné se stadiem I používán přednostně SABR obvykle bez adjuvantní CHT. Pro pacienty stadia II pak CHT kombinovaná s RT (při únosnosti pacienta konkomitantně). Pro nemocné stadia II je indikovaná adjuvantní CHT, pro stadium I je na zvážení pouze u pacientů s tumory většími než 4cm [7, 16, 26].

Role adjuvantní CHT nebyla zprvu příliš jasná. Ačkoliv metaanalýza z roku 1995 prokázala zlepšení pětiletého přežití o 5%, výsledek nedosáhl statistické významnosti [197,

198]. Následovala navíc studie ALPI porovnávající 3 cykly adjuvantní CHT v režimu mitomycin + vindesin + cisplatina vůči samotné dispenzarizaci u 1088 resekovaných pacientů stadia I-IIIa, kdy výsledek opět nedosáhl statistické významnosti při HR = 0,96 [197]. Další studie fáze III již používaly moderní kombinace CHT a znamenaly průlom na tomto poli [197, 198]. První z nich byla studie IALT, které u 1867 pacientů stadií I-III (s PS 0-1) porovnávala podání 3-4 cyklů adjuvantní CHT vůči sledování nemocných. Nejčastější CHT režimy byly kombinace cisplatin s vinorelbinem a cisplatin s etoposidem. Studie prokázala signifikantně lepší nejen DFI (interval doby bez recidivy onemocnění) (HR = 0,83), ale také OS (HR = 0,86), kdy 5 leté přežití bylo ve skupině s adjuvantní CHT zlepšeno o 4,1%. Tento výsledek následně potvrdily studie JBR10 a ANITA. Studie JBR10 byla provedena u 482 pacientů stadií IB a II, kdy byly srovnávány 4 cykly adjuvantní CHT v kombinaci cisplatina-vinorelbin se sledováním nemocných. HR dosáhlo hodnoty 0,69 a 5-leté přežití bylo zlepšeno o 15%. Studie ANITA se zúčastnilo celkem 840 pacientů stadií IB až IIIa, kdy léčená skupina obdržela CHT ve složení cisplatina-vinorelbin. Opět bylo dosaženo významného prodloužení přežití pacientů ve skupině s adjuvantní léčbou (HR = 0,80) se zlepšením pětiletého přežití o 8,6%. Tyto závěry potvrdila metaanalýza LACE čítající 4584 nemocných, kdy bylo potvrzeno signifikantně lepší přežití u pacientů léčených adjuvantní CHT. Nicméně výsledky nebyly optimální pro stadium IA a otazné u stadia IB. Proto vznikla studie fáze III CALBG 9633 čítající 344 pacientů stadií IB, kteří byly buď sledováni, nebo obdrželi 4 cykly CHT ve složení carboplatina (AUC 6) + paclitaxel. Výsledek nedosáhl statistické významnosti stran přežití (p=0,12), nicméně post-hoc analýza prokázala významně lepší přežití u pacientů s tumorem větším než 4 cm. Na základě těchto dat se stala adjuvantní CHT standardní součástí léčby pro pacienty se stadii II a III po radikální plicní resekci nádoru. U stadia IB zůstává možností pro nemocné s tumorem větším než 4 cm, ačkoliv existuje metaanalýza, která poukazuje na možný benefit 6 cyklů adjuvantní CHT u stadia IB komplexně [199]. U stadia IA tato léčba doporučována není [7].

V roli adjuvantní léčby byla (a nadále je) zkoumána též cílená léčba. První práce se zabývala použitím EGFR-TKI bez vztahu k mutacím na genu EGFR [200]. Studie fáze III BR19 neprokázala přínos gefitinibu v adjuvantním podání u pacientů stadií IB až III u populace bez ohledu na EGFR status. Neúspěchem skončila též studie fáze III RADIANT, kdy erlotinib neprokázal přínos u pacientů stadií IB až III, kteří měli pozitivní status EGFR na základě IHC či FISH. Nově se proto zájem zaměřuje na mutované pacienty s EGFR

mutacemi či ALK translokacemi, kteří by mohli mít prospěch z podávání TKI. Tuto problematiku současně řeší například studie fáze III ALCHEMIST [200].

Lokálně pokročilé onemocnění (stadium III)

Stadium III je heterogenním onemocněním s vždy multimodálním léčebným přístupem. Jednotlivé léčebné schéma by mělo být posouzeno na základě multidisciplinárního týmu, který určí pacienty směřující k operačnímu řešení s následnou adjuvantní CHT (stejná jako u stadia II), pacienty s podáním neoadjuvantní CHT (schéma též jako u adjuvantní léčby stadia II) či výjimečně neoadjuvantní CHT-RT (především tumory horního plicního sulku) s navazující operací následovanou případně CHT či RT. A dále vybere kandidáty na konkomitantní CHT-RT (preferovaná volba), případně sekvenční CHT-RT. U nemocných, kteří nejsou schopni podstoupit jednu z výše uvedených léčebných modalit, je buď volena pouze paliativní RT či celková léčba jako u stadia IV [7, 16, 26].

Chirurgická léčba musí být zvažována především u tumorů stadia III s TNM klasifikací T3N1M0 (resekce metodou volby), T1-3N2M0 (resekce za předpokladu možnosti dosažení radikality stran mediastinálních LU, někdy předchází neoadjuvantní CHT) a T4N0-1M0. U tumorů charakterizovaných jako T4 je nutné pečlivě posoudit možnost resekce postižených struktur (zvážit lze resekci levé srdeční síně, velkých cév, trachey či obratlového těla spolu s tumorem). Resekce hrudní stěny „en bloc“ či bránice u stadií T3 lze provést s patrně pozitivním efektem na přežití nemocných [20]. Stadium IIIB je obecně bráno jako neoperabilní [7].

Chemoterapie u pacientů ve stadiu III lze rozdělit na adjuvantní přístup a neoadjuvantní podání. Adjuvantní CHT se řídí principy, jak je uvedeno výše pro stadium II. Neoadjuvantní CHT podávaná před operačním výkonem byla zkoumána v menších randomizovaných studiích na počátku 90. let. Tyto práce srovnávaly resekční výkon u stadia IIIA s nebo bez neoadjuvantní léčby. Jak studie Rosella et al., tak i práce Rotha et al. prokázaly lepší přežití při aplikaci této léčby. Nicméně pro určité pochybnosti ohledně jejich designu byly žádány potvrzující práce [201]. To přinesly následně zejména studie SWOG 9900 a CHEST [201]. Studie SWOG 9900 prokázala číselně prodloužení přežití (62 versus 41 měsíců) u pacientů, kteří před radikálním operačním výkonem obdrželi neoadjuvantní CHT (paclitaxel+carboplatina) ve srovnání s těmi, kteří podstoupili pouze operační výkon. Studie nedosáhla statistické významnosti, což však mohlo být způsobeno jejím předčasným ukončením z důvodu výrazného číselného rozdílu v přežití mezi oběma

skupinami. Studie CHEST porovnávají pacienty stadií IB až IIIA, kteří byli léčeni pouze chirurgicky nebo neoadjuvantní CHT (cisplatina+gemcitabin) spolu s resekčním výkonem, prokázala statisticky významné zlepšení DFI a OS u pacientů s neoadjuvantní léčbou. Obdobného výsledku dosáhla i metaanalýza, která prokázala zlepšení pětiletého přežití o cca 5% [202]. Stejně jako u adjuvantní léčby nebyl prokázán benefit neoadjuvantní CHT pro stadium IA ve studii NATCH (srovnávající 3 ramena léčby, která však dosáhla statisticky neodlišného přežití). Následovaly práce porovnávající neoadjuvantní a adjuvantní podání CHT, kdy již zmíněná studie NATCH neprokázala významný rozdíl v přežití mezi těmito dvěma režimy. Tento výsledek byl potvrzen i metaanalýzou. Výhodou adjuvantní léčby může být větší adherence nemocných, nevýhodou pak oddálení chirurgického výkonu (zejména objeví-li se nežádoucí účinky CHT). Další práce se zabývaly možným benefitem zařazení neoadjuvantní RT, u pacientů se stadiem IIIA s pozitivními N2 uzlinami, k neoadjuvantní CHT před resekčním výkonem. Zde několik studií fáze III (byť s poněkud rozdílným designem) – např. švýcarská studie SAKK či obdobně laděná německá práce – neprokázaly vliv na přežití. Tato léčba se proto v běžné klinické praxi prozatím neujala.

Generalizované onemocnění (stadium IV)

V případě stadia IV je v drtivé většině případů indikována celková paliativní léčba. Výjimku tvoří tumory s pouze jednou resekovatelnou metastázou (do mozku, plic či nadledviny) a bez průkazu postižení mediastinálních LU, kdy lze zvažovat chirurgické řešení spolu s adjuvantní či neoadjuvantní léčbou [7, 20]. Radioterapie je též pouze paliativní možností s cílem zlepšit kvalitu života nemocných – zejména u pacientů s metastázami do mozku, syndromem horní duté žíly, bolestivými metastázami do kostí či stenózou dýchacích cest [2, 7]. Diskutované je užití SABR – viz výše. Níže bude popsána zvláště léčba generalizovaného ACC a SCC. Obecně se jejich léčba doporučuje u pacientů s ECOG PS 0-2, pro pacienty s PS 3-4 (v důsledku tumoru) je preferována pouze symptomatická léčba [22].

A) Adenokarcinom

[4, 7, 16, 22, 384, 385]

U plicních adenokarcinomů je především třeba již na počátku vyčlenit pacienty s možností cílené léčby (jak blíže ukazuje schéma z Modré knihy – Schéma 2). V ČR je zatím jasný postup ohledně testování EGFR mutací a ALK translokací, obdobně jsou koncipována i

ESMO doporučení. NCCN pak doporučuje i testování ROS1 a PD-L1. V ČR je prozatím testování ROS1 doporučeno na žádost klinika, podobně jako u PD-L1.

Pacienti s EGFR senzitivními mutacemi jsou vhodní kandidáti k podání EGFR-TKI 1. či 2. generace (erlotinib, gefitinib či afatinib). V případě progresie je v ČR zatím možné pouze zahájení CHT 1. linie. Světová doporučení (ESMO a NCCN) postupují naopak dle několika kritérií. Zaprvé je třeba rozlišení symptomatické (nutná úprava terapie) a asymptomatické progresie (na zvážení pokračování v léčbě). Zadruhé je třeba rozlišit oligoprogresi (možná lokální léčba např. pomocí SABR) a celkovou progresi, kdy je nutná změna léčebného režimu. A za třetí je vhodné provedení rebiopsie (ať už klasickou cestou histologie či cytologie nebo užitím tzv. „tekuté biopsie“ z krve) s cílem odhalení EGFR mutace T790M na exonu 20. V případě jejího průkazu mohou mít pacienti benefit z nasazení EGFR-TKI 3. generace osimertinibu. V opačném případě je pak nutné zahájit buď léčbu pembrolizumabem (v závislosti na PD-L1 expresi) či 1. linii CHT.

Nemocní s prokázanou ALK translokací profitují v 1. linii léčby z podávání crizotinibu, který by tedy měl být (prozatím) lékem volby. V ČR bohužel má tento preparát dosud úhradu až pro 2. linii léčby, kdy je tedy předem nutné předlčení CHT. Při progresi na ALK-TKI 1. generace (zmiňovaný crizotinib) je dle ESMO a NCCN postup obdobný jako u EGFR mutovaných pacientů (v ČR takovýto postup možný není a po progresi je nutné požádat o léčbu ceritinibem, popř. zahájit léčbu 3. linie). U asymptomatických nemocných je na zvážení pokračování léčby crizotinibem, u oligoprogrese (zejména při metastázách v mozku) je doporučována lokální terapie (např. SABR), při celkové symptomatické progresi pak užití ALK-TKI vyšší generace - ceritinibu či alectininibu. Po progresi na této léčbě je doporučována léčba pembrolizumabem (v závislosti na PD-L1 expresi) nebo 1. linie CHT.

U nemocných s prokázanou translokací ROS1 NCCN doporučuje užití crizotinibu v první linii a po progresi následně léčbu pembrolizumabem (v závislosti na PD-L1 expresi) nebo 1. linii CHT. Do českých ani ESMO doporučení tento model ještě nepronikl (je nutno vzít v úvahu častější obměny NCCN guidelines oproti ESMO a Modré knize).

V NCCN je rovněž doporučeno testování PD-L1 exprese a u nemocných, u kterých je vyšší než 50% (a zároveň nemají EGFR, ALK či ROS1 senzitivní mutaci) je doporučeno podání pembrolizumabu v 1. linii léčby.

V ČR (v USA v případě exprese PD-L1 pod 50%) je u nemocných s negativním testováním na senzitivní mutace (EGFR, ALK, případně ROS1) či po progresi na dostupných preparátech cílené léčby (popř. IT) je pro první linii adenokarcinomu vyhrazena CHT. Podává se v kombinaci cisplatina + pemetrexed, v případě nemožnosti podávat cisplatinu pak carboplatiny s cytostatikem 3. generace (docetaxel, paclitaxel, gemcitabin, vinorelbin, nab-paclitaxel). U minoritní části nemocných s PS2 a/nebo vážnými komorbiditami, kde není možné ani podání redukované dávky karboplatiny, se doporučuje monoterapie cytostatikem 3. generace. U nemocných, kde není kontraindikován bevacizumab, by jeho podání mělo být zváženo spolu s platinovým doubletem.

U pacientů, kteří dosáhnou stabilizace či regrese onemocnění, je dále vhodná udržovací léčba pemetrexedem, případně bevacizumabem, po 4 cyklech úvodní léčby. Pokud dojde k progresi během prvních 4 podání CHT 1. linie, je u nemocných s trvajícím dobrým stavem výkonosti (ECOG PS 0-2) vhodná další linie léčby.

V ČR má pro 2. linii léčby adenokarcinomu prozatím schválenou úhradu pouze pemetrexed, docetaxel a erlotinib, který je však povětšinou ponecháván až do linie třetí. ESMO i NCCN guidelines již zapracovaly i novější léky pro vyšší linie (zvažování nemocní bez možnosti cílené léčby). Konkrétně je na výběr z pemetrexedu, docetaxelu, erlotinibu (již není součástí NCCN), nivolumabu, pembrolizumabu (při alespoň 1% expresi PD-L1), atezolizumabu (pouze dle NCCN), kombinací docetaxelu s ramucirumabem či docetaxelu s nintedanibem (pouze dle ESMO), NCCN uvádějí též gemcitabin (ačkoliv nemá potřebná data ze studie fáze III pro tento typ léčby).

B) Dlaždicový karcinom

[4, 16, 22]

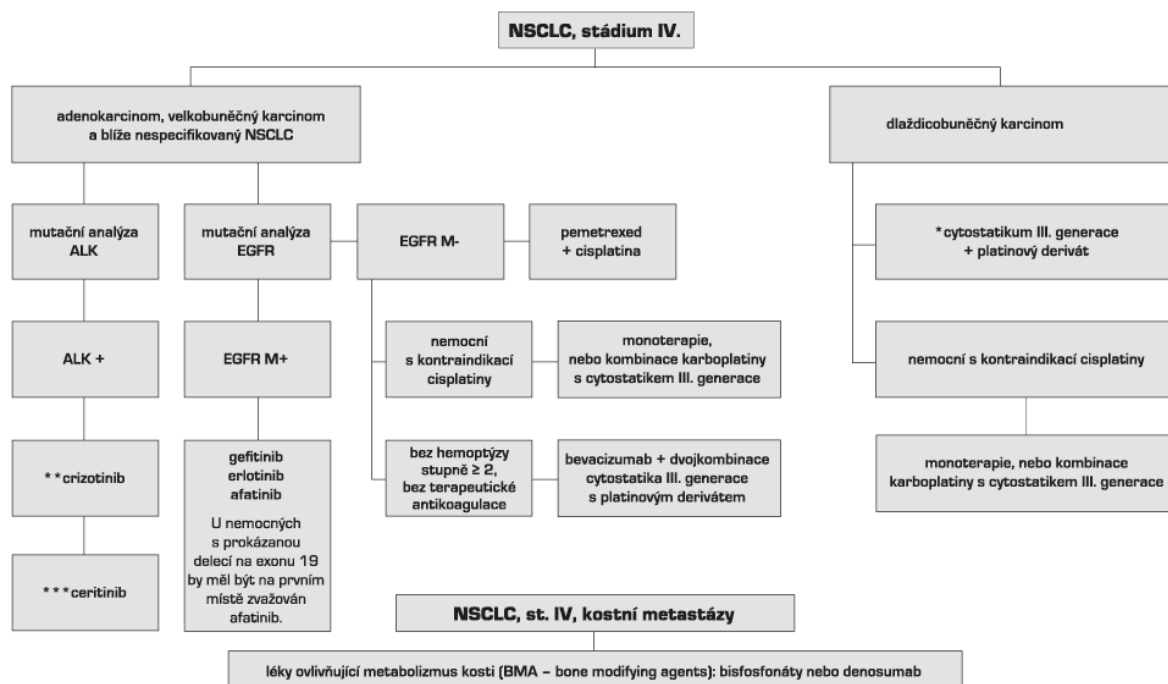
U SCC není testování senzitivních mutací rutinně prováděno (jejich průkaz je raritní a je otázkou, zda nejde o smíšené adenoskvamozní karcinomy, kdy byla díky malé biopsii zachycena pouze dlaždicová komponenta), na zvážení je u nekuřáků/lehkých kuřáků, kde je dále postupováno jako u ACC (viz výše).

Obdobně jako u ACC je i pro SCC v NCCN guidelines rovněž vhodné testování PD-L1 exprese. U nemocných, u kterých je vyšší než 50% (a zároveň nemají EGFR, ALK či ROS1 senzitivní mutaci) je doporučeno podání pembrolizumabu v 1. linii léčby.

U ostatních nemocných (a v ČR i při průkazu vysoké exprese PD-L1) je indikována CHT první linie platinovým derivátem (preferována cisplatina před carboplatinou) a cytostatikem 3. generace (docetaxel, paclitaxel, gemcitabin, vinorelbin, nab-paclitaxel). ESMO guidelines nově uvádí též možnost užití kombinace cisplatinu + gemcitabinu + necitimumabu. NCCN naopak operují s udržovací léčbou gemcitabinem či docetaxelem, tyto léčebné modalitty však nemají jasná data pro zlepšení přežití, a proto nejsou v Evropě podávána.

V ČR má pro 2. linii léčby dlaždicového karcinomu prozatím schválenou úhradu pouze docetaxel a erlotinib, který je však povětšinou ponecháván až do linie třetí. ESMO i NCCN guidelines již zapracovaly i novější léky pro vyšší linie (zvažování nemocní bez možnosti cílené léčby). Konkrétně je na výběr z docetaxelu, erlotinibu (již není součástí NCCN), afatinibu (pouze dle ESMO), nivolumabu, pembrolizumabu (při alespoň 1% expresi PD-L1), atezolizumabu (pouze dle NCCN) či kombinací docetaxelu s ramucirumabem, NCCN uvádějí též gemcitabin (ačkoliv nemá potřebná data ze studie fáze III pro tento typ léčby).

Schéma 2 – Modrá kniha – doporučení pro léčbu 1. linie NSCLC stadia IV v ČR [5]



* Kromě pemetrexedu, který je registrován pro léčbu 1. linie NSCLC jiného histologického typu, než predominantně z dlaždicových buněk pouze v kombinaci s cisplatinou.
 ** Podání crizotinibu je možné až po selhání chemoterapie.
 *** Podání ceritinibu je možné po selhání crizotinibu; o úhradě ceritinibu z prostředků veřejného zdravotního pojištění nebylo k 1. 3. 2016 rozhodnuto.

3.5.4 Vybrané časté speciální paliativní postupy u NSCLC

Hemoptýza

[2, 7, 203]

Hemoptýza se vyskytuje u více než poloviny pacientů s plicním karcinomem a zároveň plicní karcinom patří mezi nejčastější příčiny hemoptýzy. Obvykle jde o mírnou až středně těžkou formu, kterou se daří zvládnout symptomatickými postupy (klid na lůžku v polosedě, ledování hrudníku, antitusika, hemostyptika, případně oxygenoterapie). V případě neúspěchu je indikována bronchoskopie s pokusem o lokální ošetření krvácejícího místa, při dalších obtížích provedení embolizace bronchiální arterie na pracovišti invazivní radiologie nebo i konzultace hrudního chirurga ke zvážení resekčního výkonu (s přihlédnutím k prognóze nemocného). Masivní hemoptýza (obvykle provázející pokročilá onemocnění) bývá často fatální.

Syndrom horní duté žíly

[2, 7, 204]

Syndrom horní duté žíly vzniká na podkladě sníženého průtoku vena cava superior (VCS) nejčastěji na podkladě jejího útlaku tumorem. Následně dochází ke stáze krve ve VCS s otokem obličeje, krku a horních končetin. Toto je doprovázeno dilatací žil v horní polovině těla, dušností a kašlem. Diagnóza je pak potvrzena CT vyšetřením. Symptomatická léčba spočívá v podávání kortikoidů a diuretik. Řešením může být zavedení stentu, paliativní RT či zmenšení masy tumoru celkovou léčbou.

Obstrukce dýchacích cest tumorem

[2, 7, 205-212]

Obstrukce velkých dýchacích cest (trachea, hlavní bronchy) se vyskytuje asi u 30% pacientů s plicními karcinomy. Přežití nemocných bez léčby dosahuje pouze 1-2 měsíce, kdy úmrtí nastává obvykle v důsledku asfyxie. Intervenční bronchoskopie tak těmto pacientům může nabídnout nejen zlepšení kvality života s ústupem dušnosti, ale nejspíše i prodloužení života (jednoznačná randomizovaná studie není z pochopitelných etických důvodů proveditelná a práce proto obvykle srovnávaly skupinu s provedenou rekanalizací dýchacích cest vůči nemocným, kteří tento postup odmítli, či se nezdařil). V závislosti na

růstu tumoru lze zvolit z řady metod, které dělíme do dvou hlavních skupin – na „resekční“ metody (laser, kryoterapie apod.) a dilatační metody (dilatace samotným bronchoskopem, balonkem či stenty). V praxi se obě metody velmi často kombinují. Zjednodušeně lze říci, že dilatační metody se více hodí pro útlak trachey zvenčí a naopak „resekční“ metody pro endobronchiálně rostoucí masy tumoru. Samostatnou skupinu pak tvoří brachyterapie.

Mezi „resekční“ metody řadíme laserovou koagulaci, kryoterapii, elektrokoagulaci, užití argon-plasmového koagulátoru a fotodynamickou léčbu.

Laserová koagulace představuje poměrně přesný, rychlý a robustní nástroj k řešení endobronchiálních stenóz. Ohřevem dochází ke koagulaci, vaporizaci a karbonizaci tumoru (s únikem karcinogenních výparů). Nevýhodou je nutnost užití rigidního fibroskopu, možnost vzniku „požáru“ v dýchacích cestách, větší riziko hemoptýzy a nezanedbatelné riziko perforace dýchacích cest (zejména při nepřehlednosti dané oblasti), které narůstá směrem do jejich periferie. Proto se doporučuje jeho použití pouze v průdušnici a hlavních bronších.

Kryoterapie představuje metodu zmenšení nádorové masy (debarking), kterou lze provádět jak s flexibilním, tak s rigidním bronchoskopem. Obvykle je spojena s nízkým stupněm krvácení a velmi nízkým rizikem perforace dýchacích cest. Výhodou je rovněž absence rizika vzniku požáru v dýchacích cestách (ve srovnání s laserem), což lze s výhodou použít při řešení granulací v oblasti silikonových či metalických potažených stentů. Limitací je pak především opožděnější efekt léčby (s vykašláváním nekrotických hmot tumoru).

Elektrokoagulace využívá vysokofrekvenčního střídavého napětí. Výhodou jsou jednak nízké pořizovací náklady a možnost použití elektrokoagulační kličky. Nicméně efekt laseru je robustnější při obvykle kratší době výkonu.

Argon-plasmový koagulátor je bezkontaktní difusní metoda s menším destrukčním výkonem oproti laseru. Největší výhodou je pak hemostyptický efekt, který lze využít především u krvácejících či silně prokrvených tumorózních hmot.

Fotodynamická léčba využívá fotodynamického efektu v tkáni po podání tzv. fotosenzitizéru intravenózně a následným lokálním ozářením argonovým laserem či xenonovou lampou. Cytolýzy je pak dosaženo díky vzniku a působení kyslíkových radikálů. Vzhledem k nákladnosti metody není příliš rozšířená.

Dilatační léčba spočívá v nejsnazším případě v dilataci samotným flexibilním či rigidním bronchoskopem případně dilatačním balonkem (s obvykle časově limitovaným efektem), v indikovaných případech pak v aplikaci stentu do dýchacích cest. Stenty můžeme rozdělit na silikonové a metalické (obvykle potažené). Silikonové stenty na rozdíl od (potažených) metalických vyžadují vždy užití celkové anestezie s rigidním bronchoskopem a mají širší stěnu. Je též nutné vybrat jejich přesný rozměr vůči průměru stenotického úseku, nicméně lze obvykle upravit jejich polohu či je extrahovat, což je náročnější až nemožné u stentů metalických. Navíc lze upravit jejich rozměr dle potřeb konkrétního pacienta a obvykle vykazují menší tendenci k mukostáze a tvorbě granulací. Na druhou stranu mají mírně vyšší tendenci k migraci a tvorbě pseudomembrán. Volba tak záleží na konkrétním případě. Mezi nežádoucí projevy obou typů patří zejména mukostáza (nutná inhalace mukolytik a dechová rehabilitace pacienta), tvorba granulací (nad a pod stentem) a migrace stentu. K nadějným směrům mezi stenty, které by mohly odstranit některé z jejich limitací, patří stenty vyrobené na míru danému pacientovi, stenty potažené léky či biodegradabilní stenty.

Brachyterapie představuje paliativní metodu léčby stenózy dýchacích cest, kdy se pomocí zavaděče (tzv. afterloading) do dýchacích cest vpraví obvykle iridiová sonda s aplikací 4-10 Gy ve 2-6 frakcích. Nebezpečí představují postiradiační stenózy a masivní hemoptýzy. Dosud neexistují studie porovnávající efekt brachyterapie se zevní radiací. Vzhledem k náročnosti metody a synchronizace péče mezi intervenčními bronchology a radioterapeuty se provádí pouze na některých pracovištích.

Maligní pleurální či perikardiální výpotek

[2, 7, 203, 204, 213, 214]

Maligní pleurální výpotek se vyskytuje asi u 8-15% pacientů s plicními malignitami. Projevuje se nejčastěji dušností díky kompresi přilehlého plicního parenchymu. Někdy mohou pacienti v důsledku infiltrace pohrudnice udávat i kašel a hrudní bolesti. Nicméně ne všechny výpotky u plicního karcinomu musí být nutně maligní. Krom dalších známých forem (kardiální, zánětlivý, při plicní embolii) se může paramaligní výpotek objevit v důsledku poruchy lymfatické drenáže, hypoalbuminémie či při syndromu VCS. Na přítomnost výpotku často poukazuje již samotný skiagram hrudníku, nicméně definitivní potvrzení výpotku přináší až USG či CT nález. Všechny exudáty při NSCLC jsou podezřelé z malignity, avšak pro jasnou diagnózu maligního fluidothoraxu je nutné

cytologické či histologické ověření maligních buněk ve výpotku či z pleurálních uzlů. To může být zprostředkováno buď torakocentézou či medicínskou nebo chirurgickou torakoskopií. Léčba pak závisí na prognóze pacienta a rychlosti doplňování výpotku. V případě pomalého doplňování si často vystačíme pouze s opakováním torakocentézy, v případě rychlejší tvorby výpotku je nutné volit jiný postup. Ten spočívá v zavedení trvalé hrudní drenáže tenkým drénem u pacientů s nedobrou prognózou (resp. celkovým stavem) nebo v pleurodéze. K pleurodéze se nejčastěji používá talek pro svoji vysokou účinnost s obvykle dobře zvládnutelnými nežádoucími účinky (teplota, pleurální bolesti), alternativou jsou bleomycin, tetracyklin či doxycyklin. Talek lze aplikovat cestou tenkého drénu či tzv. pudráží během torakoskopie. Nutným předpokladem úspěchu je odsátí kompletního výpotku a plné rozvinutí plic před talkáží. Pokud se toto nedaří, je obvykle metodou volby trvalé zavedení drénu.

Perikardiální maligní výpotek se vyskytuje u 10-15% pacientů s karcinomy a představuje potencionálně fatální komplikaci pro dané pacienty. Mezi nejčastější symptomy (které se objevují asi u 1/3 nemocných) jsou dušnost, tachykardie, hypotenze či pulsus paradoxus. Příčina vzniku je obvykle v obstrukci lymfatických cév, přímém prorůstání tumoru nebo metastazování tumoru na perikard. Nutno však poznamenat, že benigní výpotky se mohou vytvořit i na základě infekce, podávané CHT či RT. Podezření na perikardiální výpotek lze vyslovit již na základě skiagramu hrudníku, ale definitivní potvrzení je prováděno pomocí echokardiografie či CT vyšetření. Potvrzení malignity výpotku je opět nutné cytologicky či histologicky, i když diagnostika prováděná pouze z jednoho odběru může být často falešně negativní. U nemocných bez hemodynamických obtíží (zvláště pokud je v plánu celková protinádorová léčba) je preferováno sledování. U symptomatických nemocných je na výběr z drenáže či chirurgického řešení. V případě drenáže se jednoznačně doporučuje její provádění pod echokardiografickou kontrolou – v opačném případě hrozí nadměrný počet komplikací i úmrtí (až 6%) v důsledku výkonu. Samotná perikardiocentéza však u většiny pacientů nevede k trvalému řešení výpotku. Proto je metodou volby při akutním řešení obtíží a měla by být následována buď aplikací sklerotizujících látek (tetracyklin) či lépe chirurgickým řešením. To obvykle spočívá ve vytvoření pleuroperitoneálního okénka nebo subxyfoideální perikardiotomie s vyvedením výpotku do oblasti peritonea.

Respirační insuficience

[2, 7]

Vzhledem k postihu plic a bronchů trpí řada pacientů s pokročilými plicními karcinomy respirační insuficiencí. Pro možnost pokračování v ambulantním ošetřování nemocných je velkým přínosem indikace dlouhodobé domácí oxygenoterapie (DDOT) po splnění náležitých podmínek (zejména objektivní průkaz respirační insuficience a únosný vzestup hyperkapnie na optimálním průtoku kyslíku).

Tromboembolické onemocnění

[2, 203, 204, 215]

Pacienti s nádory mají obecně prokoagulační stav, který může dále umocnit lokální růst tumoru s obstrukcí některých žil (u NSCLC jde zejména o VCS), podávaná léčba (např. bevacizumab) či chirurgický výkon. Výskyt plicní embolie se udává až u 50% pitvaných nemocných se zhoubnými nádory, přičemž za života je zjištěna jen u asi 15% z těchto případů. Celkově je výskyt tromboembolické nemoci (TEN) 4-7x vyšší v nádorové populaci než u nedádorové, kdy žilní trombóza je nacházena až u 18% hospitalizovaných nemocných. Z těchto důvodů se profylaxe TEN nízkomolekulárním heparinem (LMWH) doporučována u všech hospitalizovaných nemocných a dále u ambulantních pacientů do 10-ti dnů po chirurgickém výkonu. U jiných ambulantních pacientů, bez dalších rizikových faktorů, není preventivní podávání LMWH (nízkomolekulární heparin) doporučováno, což podporuje i výsledek studie FRAGMATIC. V této multicentrické randomizované studii bylo srovnávána léčba nádoru s profylaktickým podáváním LMWH či bez něj. Ačkoliv došlo ke snížení výskytu žilních trombóz ve skupině s LMWH, nebylo prokázáno zlepšení přežití této skupiny ve srovnání s kontrolami. Navíc podávání LMWH bylo spojeno s větším počtem krvácivých komplikací.

Hyponatremie

[2, 216, 217]

Hyponatremie se vyskytuje až u cca 20% pacientů s NSCLC. V našem souboru byl její výskyt 21,5%, kdy jsme rovněž potvrdili (stejně jako řada dalších prací) její negativní prognostický význam. Míra zastoupení hyponatremie závisí mimo jiné i na cut-off pro určení hyponatremie, které se pohybuje v závislosti na daných laboratořích obvykle v rozmezí 130-135 mmol/l. Nejčastější příčina je paraneoplastická – jedná se o tzv.

syndrom nepřiměřené sekrece antidiuretického hormonu (ADH) = SIADH. Díky nadměrné sekreci ADH dochází ke zvýšené resorpci vody v ledvinách a tím k hyponatremii a hypoosmolaritě séra se zároveň hyperosmolární močí u euvolemického pacienta. Mírné příznaky se obvykle projevují při poklesu natremie pod 130 mmol/l, kdy se dostavuje zejména nechutenství a nauzea. Při dalším poklesu natremie se objevují neurologické příznaky zhoršující se od zmatenosti až po kóma. Léčba SIADH spočívá jednak v řešení samotné hyponatremie, ale nedílnou součástí je (v případě trvajících možností) i zaléčení samotného nádoru. Hyponatremii lze zlepšit restrikcí tekutin (do 500 ml/den), nízkou dávkou diuretik, infuzním podáním roztoků s chloridem sodným, případně aplikací tolvaptanu (kompetitivní antagonist receptoru pro vasopresin).

Hyperkalcemie

[2, 218]

Hlavními příčinami hyperkalcemie u nádorových onemocnění jsou metastázy do skeletu (diskutované níže) a především paraneoplastická produkce parathyroid hormone-related proteinu (PTHrP). Hyperkalcemie se může manifestovat řadou neurologických (únava až kóma), kardiálních (arytmie), gastrointestinálních (zvracení, zácpa) a renálních (renální selhání) problémů. Při zjištění zvýšeného kalcia by mělo následovat (nejde-li o akutní stav) doplnění ionizovaného vápníku, parathormonu, PTHrP, vitamínu D a vyšetření případných metastáz do skeletu. Terapeuticky lze zasáhnout zavodněním nemocného, podáváním kalcitoninu (krátkodobý efekt) nebo bisfosfonátů (dlouhodobější, ale opožděný efekt) případně denosumabu (v praxi se však preferují spíše bisfosfonáty). V případě renálního selhání je na místě uvažovat o užití hemodialýzy.

Kostní metastázy

Kostní metastázy se vyskytují až u 40% pacientů s NSCLC, kdy mohou významně zkrátit délku i kvalitu života při objevení se tzv. skeletal-related events (SRE) [20, 22]. Jako SRE se označují patologické fraktury, nutnost RT či chirurgický výkon na kostech postiženými metastázami (např. pro fraktury či bolesti) či komprese míchy při metastázách do páteře. NSCLC obsahuje typicky jak osteolytické, tak osteoblastické metastázy s narušeným kostním obrátem. Tento nepříznivý trend se podařilo zvrátit dvěma skupinám léků. První z nich jsou bisfosfonáty (kde nejlepší data jsou známa pro kyselinu zolendronovou), které redukuje aktivitu osteoklastů. Díky tomu se významně snižuje počet SRE a navíc, díky své možné protinádorové aktivitě bisfosfonátů (na angiogenezi, invazivitu, imunomodulaci

a proliferaci tumorů), se patrně zpomaluje progresse onemocnění a prodlužuje život nemocných (data však potřebují potvrzení v dalších studiích). Druhým lékem, který snižuje počet SRE je denosumab [219]. Jde o plně humánní protilátku proti ligandu pro receptor aktivátoru nukleárního faktoru kB (RANKL). RANKL představuje klíčový faktor potřebný k diferenciaci a aktivaci nových generací osteoklastů. Oproti kyselině zolendronové zlepšuje kvalitu života pacientů a patrně i délku jejich života.

Metastázy do mozku

Přístup k mozkovým metastázám se zakládá na stavu výkonosti pacienta (u nemocných ve špatném stavu je preferována pouze symptomatická léčba) a na základě jejich symptomatičnosti [22]. U metastáz, které nevykazují příznaky, a nebyla podána žádná celková léčba, je doporučeno nejprve podání systémové léčby (u ALK případně i vyšší generace TKI) a až v případě neúspěchu přejít k lokálnímu řešení. Pacienti se symptomatickými metastázami by měli být jednak zajištěni kortikoidem (snaha o potlačení mozkového edému, preferován dexamethason v dávce 4mg/den) a při dobrém stavu výkonosti podstoupit lokální léčbu metastáz. V případě oligometastáz (1-3 metastázy) je preferována stereotaktická radiochirurgie (SRS), v případě více metastáz zatím celkové ozáření mozku (WBRT). Ačkoliv práce japonských autorů naznačuje, že by SRS mohla být i pro tyto pacienty stejně účinná jako WBRT stran OS a to s méně nežádoucími účinky [220]. Šlo však pouze o observační studii bez přímého srovnávání dat s WBRT. V případě vícečetných metastáz do mozku bylo navíc donedávna otázkou, zda WBRT přináší další prospěch k dexametahasonu u nemocných s více metastázami. Tímto tématem se zabývala studie fáze III QUARTZ s non-inferiorním designem, kdy interní analýza poukazovala na pravděpodobně stejný efekt WBRT jako symptomatické léčby [221]. Definitivní výsledky v celkové populaci neprokázaly rozdíl mezi OS a kvalitou života [222]. Je však třeba upozornit na rozdíly v podskupinách, kdy nemocní se špatnou kvalitou života neměli žádný benefit z WBRT, naopak mladší pacienti s dobrou kvalitou života, pouze mozgovými metastázami a kontrolovaným celkovým onemocněním patrně profitovali z WBRT. U pacientů s nekontrolovaným plicním tumorem a u starších nemocných se rovněž nezdál být významný vliv WBRT, což by však bylo vhodné potvrdit další studií cílící na tyto skupiny. WBRT je tedy nadále standardem pro vícečetné metastázy do mozku u pacientů s dobrým stavem výkonosti, kdy zvyklými schématy je podání 20Gy v 5 frakcích či 30Gy v 10 frakcích se srovnatelnými výsledky [22].

3.5.5 Dispenzarizace

Po radikální léčbě karcinomu plic je doporučeno další sledování pacientů s cílem včasného zachycení případného relapsu onemocnění či duplicitního tumoru. Součástí sledování je pravidelné vyšetření pacienta s dotazem na možné příznaky nádorového onemocnění, pravidelné skiagramy plic a CT plic + mediastina, kdy v prvním roce jsou doporučeny kontroly po 3 měsících, v dalších letech následně s rozvolňováním časových úseků [2, 7].

3.6 Prediktivní a prognostické markery NSCLC

Prognostickým markerem označujeme klinický či molekulární faktor, který je nezávislý na druhu léčby a předjímá přežití nemocného. Jako prediktivní marker pak označujeme faktor s přímou vazbou na efekt konkrétní léčby (ať už jde o NÚ, PFS či OS). Obecně lze obě skupiny rozdělit na markery klinické (např. demografické údaje, histologie apod.) a molekulární. Tohoto rozdělení se drží text níže, kdy prognostické a prediktivní faktory dále nerozděluje do zvláštních kapitol, neboť řada markerů je jak prognostickým, tak potencionálně i prediktivním markerem [223, 224]. V praxi se však využívá pouze drtivý zlomek zkoumaných markerů, kdy hlavním problémem zůstává jejich validace pro klinické užití, což často naráží na jiné laboratorní postupy mezi zveřejněnými studiemi [225].

3.6.1 Klinické markery

Mezi nejvýznamnější klinické prognostické faktory patří PS (stoupající PS spojeno s horší prognózou), stadium onemocnění vč. jeho TNM predominant (vyšší stadia spjata s horší prognózou), pohlaví (ženy mají lepší prognózu), rasa (delší přežívání popisováno u Asiatů) a kachektizace (spojena se špatnou prognózou). S lepší prognózou se dále pojí nižší úroveň symptomů onemocnění, menší počet komorbidit, nekuřáctví a odpověď na předchozí léčbu, která je zároveň i prediktivním faktorem pro další linii terapie. Sporný je vliv histologie adenokarcinomu (role dostupné léčby) a věku, který patrně není negativním prognostickým faktorem sám o sobě (obvykle se přidružuje vliv komorbidit). [226-232]. Histologické varianty se též ukazují jako faktory mající vliv na prognózu nemocných, stejně jako grade tumoru [233, 234]. Nízké plicní funkce jsou pak negativním prognostickým faktorem u operovaných pacientů [235]. U pokročilých tumorů hraje negativní roli syndrom horní duté žíly [19]. Kouření se navíc jeví i jako negativní prediktivní faktor odpovědi na EGFR-TKIs, zatímco patrně nemá prediktivní vliv na účinek chemoterapie a diskutuje se pozitivní vliv předchozího kouření na účinek PD-L1

inhibitorů [236, 237]. Nemalou úlohu hraje pochopitelně i dostupnost potřebné péče v daném státě [19].

U metastatického onemocnění pak stran prognózy onemocnění záleží i na počtu míst diseminace tumoru. Delší přežití je připisováno oligometastatickému onemocnění (obvykle definováno jako 1 až 3 metastázy) a to obzvláště při jejich metachronní (tedy po řešení primárního tumoru se následně objeví metastázy) než synchronní (metastázy přítomny již od počátku onemocnění). Roli zde hraje i možnost radikálnější léčby (za užití chirurgie či SABR) oproti tumoru s mnohočetnou diseminací [238, 239]. Jako další faktor špatné prognózy byly určeny některými pracemi i mikrometastázy do kostní dřeně (kdy dle metaanalýzy postačuje detekce jedné nádorové buňky) nebo mikrometastázy v resekovaných LU mediastina [240, 241].

Mezi další histologické prognostické (a prediktivní) faktory patří tzv. epitheliálně-mezenchymální přechod (epithelial to mesenchymal transition = EMT), která je spojena jednak s horší prognózou a též s rezistencí na EGFR-TKI. Jde o reverzibilní proces, kdy málo pohyblivé epitheliální buňky podstoupí vlivem okolí morfologické změny, čímž se změní na mesenchymální buňky s možností migrace a zakládání metastáz. Nádor se tak stává více invazivním [242].

Možným prognostickým faktorem může být i stupeň nekróz či apoptóz v tumoru – obvykle vyjádřené jako nekrotický a apoptický index, který může vystihovat stupeň agresivity nádoru. Úloha tohoto markeru ale musí být ještě ověřena [243].

Cirkulující endoteliální (CECs) a endotheliální progenitorové buňky (CEPCs) jsou buňky odloučené z tumoru, které v případě CEPCs mohou exprimovat určité antigeny, nicméně v malé míře jsou z cévní stěny produkovány i u zdravé populace. Uvádí se jejich blízký vztah k angiogenezi nádorů. Mohly by tedy být prediktivním markerem angiogenní terapie, kdy při účinku léčby lze očekávat jejich pokles v krvi [244].

PET/CT se dostalo též do zájmu určení prognózy zejména resekovaných pacientů na základě PET zobrazení tumoru před výkonem. Liu et al. ve své metaanalýze zkoumali vliv SUV (snadard uptake value – tedy semikvantitativního určení koncentrace radiokativity v daném místě), SUV_{max} (= maximálního SUV tumoru) a dvou volumetrických parametrů (MTV – metabolic tumor volume, TLG – total lesion glycolysis) na prognózu resekovaných nemocných s NSCLC. Výsledkem byla zvýšené riziko recidivy tumoru u pacientů s vysokým SUV_{max} a vysokou hodnotou MTV a TLG [245]. Navíc je možné, že

hladina SUV, resp. jeho časné změny, by mohla být i prediktivním markerem odpovědi na protinádorovou léčbu [246]. Dalšími radiologickými parametry sloužícími k prognóze onemocnění či predikci odpovědi na léčbu se zabývá tzv. radiomika. Je zkoumána např. denzita tumoru, jeho tvar, homogenita či vztah k okolí [247].

Mezi negativními prognostickými faktory je uváděna též hypoxie, kdy její efekt na radioterapii je patrně i prediktorem horší odpovědi na léčbu [248]. V biologii tohoto jevu se publikace zaměřují nejvíce na vliv HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 alpha), který je blíže zmíněn níže.

S rozvojem imunoterapie jsou v čím dál tím větší pozornosti klinické imunitní markery [226]. Infiltrace T lymfocyty jsou obecně spojovány s dobrou prognózou, ale rozdíly panují dle typů těchto buněk. Např. regulační T lymfocyty (Tregs) jsou negativním prognostickým faktorem a naopak CD8⁺ lymfocyty se pojí s lepší prognózou a patrně predikují i lepší odpověď na PD-1 inhibitory. Vliv B lymfocytů není tak dobře znám, ale jsou spíše spojovány s lepším přežitím. U NK buněk nebyl zatím vliv na prognózu prokázán. Tumor asociované makrofágy (TAMs) mají prognózu odlišnou dle svého subtypu – zatímco infiltrace fenotypem M1 je pozitivním prognostickým markerem, fenotyp M2 koreluje se špatnou prognózou. Dendritické buňky mají patrně pozitivní prognostický vliv stejně jako buňky Langerhansovy [249, 250]. Dalším zkoumaným faktorem je poměr neutrofilů a lymfocytů, který má dle metaanalýzy prognostický význam u pacientů s NSCLC [236, 251]. Advance lung cancer inflammation index (ALI) patří mezi další možné prognostické imunitní markery. Tento parametr se snaží zahrnout celkový pohled na záněť v době diagnózy, kdy hodnotí váhu, výšku, albumin a poměr neutrofilů k lymfocytům u daného tumoru [252, 253]. Jako prediktivní parametr pro PD-1 inhibitory může sloužit též kuřácký statut (vyšší mutační nálož tumoru) a známky EMT (pojící se se zánětlivým prostředím) [236].

Mezi negativní laboratorní prognostické parametry se obvykle řadí snížení hemoglobinu (Hb), albuminu a natria a naopak elevace CRP (C-reaktivní protein), vápníku, laktát dehydrogenázy (LD) a alkalické fosfatázy (ALP) [217, 224, 226, 254, 255]. Snížení Hb, snížení lymfocytů a naopak elevace neutrofilů, fibrinogenu a destiček se jeví jako negativní prognostický marker u časných stadií NSCLC (pr63). Též je uváděn vliv exprese antigenů krve (AB0 systém) v tumoru na prognózu pacienta stejně jako negativní vliv elevace D-dimerů [256, 257].

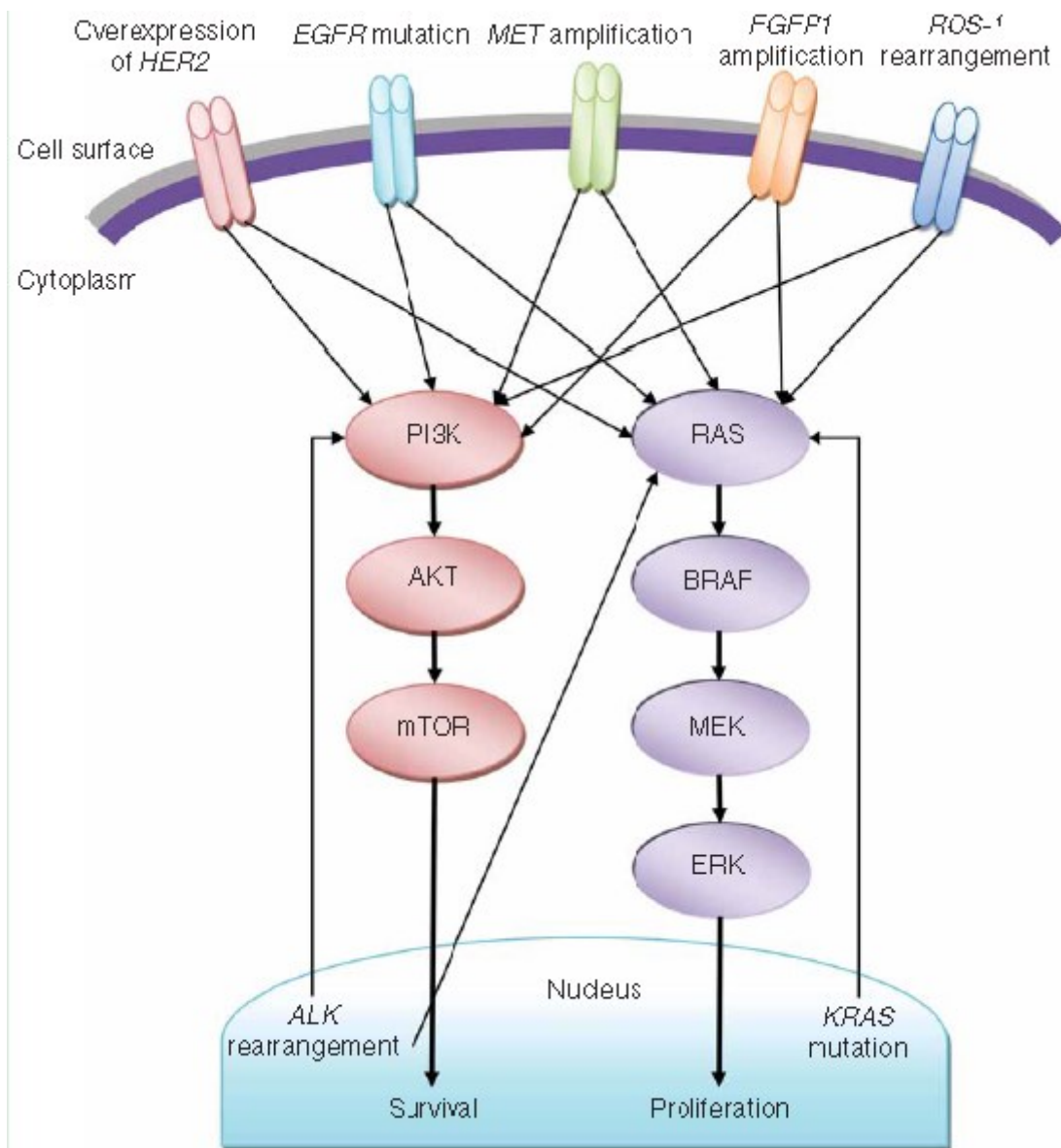
Nádorové markery byly též zkoumány mnoha studiemi. Řada z nich potvrdila negativní korelaci mezi elevací CEA (karcinoembryonální antigen), CYFRA-21-1 (cytokeratinový fragment 21-1), TK (thymidinkináza) a NSE (neuron-specifická enoláza) a negativním OS u časných stadií NSCLC [258-261].

Mezi nadějně prognostické markery se pak řadí průkaz nádorových exosomů zajišťujících komunikaci s okolím nádorových buněk [262]. Dále je popisován vliv prokázané lymfangoinvaze u časných stadií [263], negativní prognostický dopad cévní invaze tumoru v resektátu [264], hustoty cév zhoršující prognózu [265] či rash jako prognostický i prediktivní marker odpovědi na EGFR-TKI [266]. Obdobně byl zkoumán vliv arteriální hypertenze jako predikce terapie inhibitory angiogeneze, kde ale žádná korelace prozatím prokázána nebyla [267]. Naopak byl prokázán vliv negativní prediktivní význam dlaždicové histologie a předchozí hemoptýzy na výskyt hemoptýzy při léčbě bevacizumabem [268].

Jako možné markery dobrého efektu radioterapie se jeví především menší velikost tumoru a absence hypoxie nádorových ložisek [269]. Řada prací se také zabývala predikcí vzniku pneumonitidy při radioterapii. Z jejich metaanalýzy je patrné, že toto riziko významně stoupá při dávce přes 20 Gy na plicní tkáň a dále při užití CHT v kombinaci paclitaxel + carboplatina při konkomitantní CHT-RT (zejména u starších pacientů) [270].

3.6.2 Molekulární markery

Tyrozinkinázy patří mezi nejvíce zkoumané molekulární markery u NSCLC. Jednak jde o sérii tyrozinkinázových receptorů (EGFR, ALK, ROS1, HER2, MET, FGFR apod.) a pak přenosné signály na cestě do jádra kdy mezi nejvýznamnější dráhy patří PIK3-AKT-mTOR a RAS-BRAF-MEK-ERK (Obraz 22, zkratky rozvedeny u jednotlivých genů níže) [271].



Obraz 22 – Významné tyrozin kinázové dráhy u NSCLC – převzato z [271]

Mezi klíčové markery rutinně klinicky stanovované u NSCLC patří EGFR statut. Zvýšená exprese EGFR vede k zvýšené proliferaci, invazivitě a angiogenezi nádorových buněk především díky cestám vedoucím skrze dráhy PI3K-AKT-mTOR a RAS-RAF-MEK. EGFR se obvykle nevyskytuje s dalšími tzv. řídicími mutacemi (ty, které na rozdíl od „cestujících mutací“ dávají „přímo“ selektivní výhodu růstu nádorovým buňkám). U SCC je exprese tohoto genu spjata s odpovědí na necitimumab. U ACC se pak rutinně stanovují EGFR mutace, které lze rozdělit na tzv. časté (delece na exonu 19 a bodová mutace L858R na exonu 21) a vzácné (ostatní mutace na exonech 18 až 21). Časté mutace jsou prediktivním faktorem pro EGFR-TKI. Jsou častější u Asiatů, nekuřáků a žen. Vzácné

mutace je nutné posuzovat individuálně, stejně tak jako dvě současně se vyskytující mutace. Některé jeví citlivost k EGFR-TKI, jiné jsou naopak rezistentní a mutace T790M je pak prediktorem odpovědi osimertinibu. Prediktivní význam EGFR exprese na EGFR-TKI je nejasný – některé práce poukazují na lepší přežití pacientů se zvýšenou EGFR expresí, jiné toto naopak neprokázaly. Celkově se však zvýšená exprese EGFR nejeví jako dobrý prediktivní marker pro určení nasazení EGFR-TKI. Amplifikace EGFR se v naší práci též neukázala být prediktivním faktorem odpovědi EGFR-TKI. Naopak pro protilátky cílící na EGFR je exprese tohoto proteinu významným prediktivním markerem. Dále byl posuzován i vliv SNPs (jednonukleotidové polymorfismy) na účinek a toxicitu především gefitinibu, které cituje několik malých studií. Tyto výsledky je nutno ověřit většími pracemi [130, 156, 271-277].

ALK (anaplastic lymphoma kinase) translokace se u NSCLC objevuje celosvětově u cca 5% nemocných. Tyto translokace jsou častější u mladších žen, nekuřáček a adenokarcinomů. ALK je tyrozinkináza s proliferčním a antiapoptickým efektem díky působení na další tyrosinkinázové dráhy. Jde zejména o cestu STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) a tzv. MAP (mitogen-activated protein) kinázy (např. KRAS - V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog). Fúzním partnerem u NSCLC je obvykle EML4 (microtubule-associated protein-like 4) s různými varietaми fúze. IHC pozitivita ALK se zdá být spíše pozitivním prediktivním faktorem, zatímco pro FISH pozitivitu nebyl vztah k OS popisován. ALK translokace představuje významný prediktivní marker účinnosti ALK inhibitorů a rutinně se užívá v klinické praxi u pokročilých adenokarcinomů. Diagnostika se provádí z histologických vzorků tumoru, další možnost představují CTCs (cirkulující nádorové buňky). Samotnou diagnostickou metodou volby je IHC, která by u slabě pozitivních případů měla být validována pomocí metody FISH. Jde o řídicí mutaci, která se obvykle nevyskytuje s jinými mutacemi tohoto typu, ale existují i výjimky. Současný výskyt ALK translokace a KRAS mutace je patrně negativním prediktivním markerem pro účinek crizotinibu. Vliv současné EGFR mutace není dobře znám [159, 271, 278-282].

ROS1 (C-ros oncogene 1 receptor tyrosine kinase) představuje tyrozinkinázu z inzulínové rodiny receptorů. Jeho sekvence vykazuje podobnost s ALK, neboť mají stejnou téměř polovinu stavebních aminokyselin a ve vazebném místě až 77%. U zdravých jedinců není známá produkce této tyrozinkinázy v plicích. Jeho nitrobuněčné cesty tvoří mimo méně

známé posly (např. STAT3) i dobře popsané cesty jako PIK3-AKT-mTOR či cesta RAS-RAF-MEK. Souhrnně pak tyto dráhy vedou k buněčné proliferaci, migraci a potlačení apoptózy – role genu ROS1 je tedy onkogenní. V současné době je známo minimálně 6 fúzních partnerů genu ROS1 u NSCLC, kdy však rozsah kódované ROS1 domény je stále stejný. To může mít potencionálně i klinický význam, neboť byla popsána odlišnost některých nitrobuněčných sestupných drah v závislosti na druhu fúzního partnera. Rovněž byla publikována poměrně častá nadměrná exprese ROS1 u NSCLC a je známo i několik mutací u plicních tumorů, jejich význam však zůstává prozatím neobjasněn. Výskyt fúzního genu ROS1 u NSCLC je popisován u velkých prací v necelém 1% případů NSCLC. Větší výskyt byl pozorován u adenokarcinomu, nekuřáků/lehkých kuřáků, žen a spíše nižších stádií. Různý výskyt mezi asijskou a kavkazskou populací nebyl pozorován. Potvrzení tohoto onkogenu je možné z bioptických vzorků, ale i z cytobloku (např. z hrudního výpotku). ROS1 se obvykle neobjevuje s dalšími řídicími onkogeny. Zlatým standardem diagnostiky je metoda FISH, ale je možné užití screeningu za pomoci IHC s následným FISH potvrzením pozitivních nálezů. U bělochů nebyl prokázán prognostický význam ROS1, ale představuje prediktivní faktor pro odpověď na léčbu crizotinibem [170, 271, 273, 282].

RET (rearranged during transfection) se též vyskytuje u NSCLC jako fúzní gen a to u přibližně 1-2% případů NSCLC. Chová se jako onkogen podílející se mimo jiné na řízení buněčné migrace a diferenciaci. Je nadějným prediktivním markerem pro vyvíjené inhibitory, kdy dosud není jasno, zda postačí IHC diagnostika či bude opět nutná FISH konfirmace [271, 282].

HER2 (human epidermal growth factor 2) je tyrozinkynázový receptor kódovaný genem ERBB2. Jeho aktivace vede opět ke spuštění nitrobuněčných cest skrze PIK3 (phosphoinositide 3-kinase) a KRAS. U NSCLC se vyskytují jak HER2 amplifikace (10-20% případů NSCLC), tak i zvýšená exprese (až 1/3 případů NSCLC) a HER2 mutace (především na exonu 20, cca 2-4% případů NSCLC). HER2 mutace je obvykle mutačně se vylučující s dalšími řídicími onkogeny. Častější výskyt je popisován opět u nekuřáček s adenokarcinomy. Stav receptoru HER2 patrně nemá vliv na prognózu pacientů, nicméně může být prediktivním faktorem HER2 inhibitorů [273, 283-285].

FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) kóduje rodinu 4 tyrosinkinázových receptorů (FGFR 1-4). Jejich hlavní nitrobuněčné cesty opět představují dráhy skrze PIK3 a KRAS.

U NSCLC se vyskytují jak FGFR amplifikace (okolo 20% SCC, častější u kuřáků), tak i mutace (až 10% NSCLC bez ohledu na histologii). Zejména u SCC (2-3,5%) se lze setkat i s FGFR translokacemi. Amplifikace neprokázala vliv na OS nemocných, FGFR však může do budoucna být prediktivním markerem vyvíjených inhibitorů [284, 286].

cMET (mesenchymal-epithelial transition factor) je abnormálně stimulován u řady NSCLC. Navázání ligandu HGF (hepatocyte growth factor) způsobí dimerizaci této tyrozinkinázy s její autofosforylací a aktivací následných signálů (cestou KRAS, PIK3-AKT, STAT3 a NF- κ B = nukleární faktor kappa B), které vedou k buněčné motilitě a invazivitě a vaskulogenezi nádorových buněk. Je spojován s rezistencí na EGFR-TKI, ale i některé CHT a RT. Je tedy zřejmé, že by mohl sloužit jako cíl TKI. Otázkou však zůstává, který biomarker je v souvislosti s cMET nejlepším prediktivním faktorem. Původní práce se zabývaly jeho expresí a následně amplifikací. Nově se též zkoumají i mutace této TKI, kdy terapeuticky nejzajímavější se prozatím jeví tzv. skippinig mutace exonu 14. Jde o abnormální sestřih vedoucí k přeskočení exonu 14 ve čtecím rámci, což má za následek zvýšenou expresi tohoto receptoru. Tato genová alterace se nachází přibližně u 4% NSCLC [271, 287, 288].

DDR2 (Discoidin death receptor 2) je tyrosinkináza stimulována hlavně kolagenem. Její funkcí je především modulovat interakce mezi nádorem a extracelulární matrix. U NSCLC byly pospány mutace DDR2 u max. 4% SCC, kde by mohl mít prediktivní význam k vyvíjeným inhibitorům [282, 284].

IGF1R (insulin-like growth factor receptor-1) je součástí tzv. insulin-like growth factor (IGF) cesty, která se významně podílí na buněčném růstu, metabolismu a transformaci. Jeho exprese je uváděna jako negativní prognostický faktor u NSCLC a je spojována s velikostí tumoru a kuřáckým statutem [289].

PTEN (phosphatase and tensin homolog) je tumor supresor hrající významnou roli v buněčné regulaci, proliferaci, diferenciaci a motilitě. Je úzce spjat především s negativní regulací cesty PIK3-AKT-mTOR. Mutace genu PTEN byly nalezeny přibližně u 4-8% NSCLC, především u SCC. Jejich výskyt je dáván do souvislosti s rezistencí na EGFR-TKI [282, 284].

PIK3CA (phosphoinositide-3-kinase catalytic alpha polypeptide) je lipidová kináza kontrolující buněčnou proliferaci a růst skrze cestu PIK3-AKT-mTOR. Mutace PIK3CA se vyskytují u asi 1-3% NSCLC, více u adenokarcinomů. Mutace tohoto genu mohou

představovat negativní prediktivní faktor pro účinnost EGFR-TKI, neboť byly pozorovány u některých pacientů se získanou rezistencí na EGFR-TKI [282, 284].

AKT (serine-threonine protein kinase) je tyrozinkináza hrající důležitou roli v cestě PIK3-AKT – mTOR. Rovněž ovlivňuje další geny včetně EGFR. Její zvýšená exprese je u NSCLC spojována s horší prognózou pacientů [290].

Naopak pro známý onkogen mTOR (mammalian target of rapamycin) neprokázala metaanalýza signifikantní vliv jeho exprese na prognózu nemocných, přestože hraje významnou úlohu v buněčném růstu, proliferaci a motilitě [291].

KRAS (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) mutace patří mezi časté „řídící mutace“ u ACC s celosvětovým zastoupením u cca 20% pacientů. Větší výskyt je pozorován u kuřáků a kavkazské populace. KRAS funguje jako GDP / GTP (guanosindifosfát / guanosintrifosfát) – regulující spouštěč / vypínač. Aktivovaný KRAS pak vede k celé řadě stimulů vedoucích celkově k buněčnému růstu, proliferaci a rovněž k podpoře angiogeneze, zvýšení rezistence k buněčné apoptóze a schopnosti invaze buněk. Nejčastěji je tento gen mutován na kodonu 12, vzácněji pak na kodónech 13 a 61. Na kodonu 12 se typ mutace dosti často odvíjí od kuřáckého statutu – u kuřáků je častější mutace G12C, zatímco u nekuřáků G12D a G12S. Pro svůj značný vliv byl tento gen zkoumán jako možný prognostický i prediktivní faktor a to ve vztahu k EGFR-TKI i CHT (pr1, pr14). Celkově se KRAS nezdá být spolehlivým prediktivním faktorem pro obě skupiny léků, avšak je možný vliv jednotlivých druhů mutací zvláště pro léčbu EGFR-TKI u EGFR-wt. Naopak je řadou autorů (včetně naší práce) popisován prognostický význam mutovaného KRAS, kdy je navíc různá prognóza dle typu KRAS mutace. Vliv vyšetření KRAS mutací z krve (ctDNA – cirkulující nádorová DNA) není zatím příliš znám [292-296].

BRAF (B-Raf proto-oncogene) je tyrozinkináza spojující KRAS s dalšími proteiny na kaskádě této onkogenní cesty. U NSCLC se vyskytuje cca 2% BRAF mutací (prakticky výhradně u ACC), kdy nejčastější typ představuje mutace V600E. Tato mutace je opět nejčastější u žen nekuřáček. Naproti tomu zbylé (tzv. non-V600E) mutace se vyskytují takřka výhradně jen u kuřáků. Prognostický význam BRAF mutací je zatím nejasný, ale mohly by sloužit jako prediktivní marker testovaných inhibitorů [271, 273, 284].

MEK (mitogen activated extracellular signal-regulated kinase) je součástí kaskády tyrozinkináz skrze onkogen KRAS. MEK mutace se vyskytují asi u 1% NSCLC,

především u ACC. Představuje možný prediktor pro nadějně vyvíjené MEK inhibitory, které by mohly řešit zablokování aktivovaného onkogenu KRAS ([284, 297].

Tzv. tekutým biopsiím je v posledních letech věnována velká pozornost, neboť (alespoň u některých) pacientů mohou přinést potřebné genetické vyšetření pouze z krevního odběru bez užití invazivních metod (BFSK apod.). Pozornost se zaměřuje jednak na tzv. cirkulující tumorózní buňky (CTCs) a dále pak na cirkulující volnou nádorovou DNA (ctDNA) případně další nukleové kyseliny (především mikroRNA). CTCs představují poměrně náročnou a nákladnou metodu, která může být využitelná nejen k určení prediktivních mutací (vč. translokací), ale patrně může najít uplatnění i v diagnóze. Navíc je popisován prognostický význam počtu CTCs, které mohou sloužit i pro kontrolu vývoje odpovědi či recidivy onemocnění. ctDNA se uplatňuje již v klinické praxi u diagnostiky EGFR senzitivních a rezistentních mutací, kdy je nutno vzít v úvahu zatím nedostatečnou citlivost těchto metod (negativní výsledek tedy automaticky neznamená absenci dané mutace). Je též známa korelace mezi množstvím ctDNA a celkovým objemem tumoru. Schopnost diagnostiky translokací touto metodou je nejistá – patrně lze uspět pouze s metodou NGS (next generation sequencing). miRNA z krve jsou zatím pouze zkoumány jako možný diagnostický, prognostický i prediktivní marker u NSCLC [298-300].

Mezi geny ovlivňujícími angiogenezi patří VEGF (vascular endothelial growth factor) a jeho receptory, FGF (fibroblast growth factor) se svými receptory, HGF (hepatocyte growth factor), některé interleukiny, PDGF (platelet derived growth factor), TGF β (transforming growth factor β), COX2 (cyklooxygenáza 2) či endothelin [265, 301, 302]. Zvýšená exprese VEGF je spojována s horší prognózou, stejně to platí pro jeho receptory (VEGF 1-3) [265]. Mezi nejvíce zkoumané receptory FGF patří FGF-2 (též známý jako tzv. basicFGF = bFGF), který ovlivňuje především některé matrixové metaloproteinázy (MMP). Dle metaanalýzy Hu et al. je spojován s horší prognózou u resekovaných pacientů s NSCLC, na prognózu pokročilých tumorů neměl v této práci vliv [301]. Obdobný vztah platí i pro PDGF secernovaný z destiček, kdy jeho přítomnost zvyšuje migrační schopnost epitheliálních buněk [234, 265]. COX2, resp. jeho hlavní metabolit prostaglandin E2 (PGE2), jsou zvýšeně exprimovány u řady tumorů vč. NSCLC. Podílí se nejen na angiogenezi, ale též na nádorovém růstu, inavazivitě a snížení protinádorové imunity, čímž působí jako negativní prognostický faktor [303].

Rovněž byly zkoumány markery lymfangiogeneze, která je vnímána jako negativní prognostický faktor sama o sobě [304]. Metaanalýza prokázala jako nejvýznamnější faktory VEGF-C a D (vascular endothelial growth factor C a D) a jejich receptor VEGFR-3 (vascular endothelial growth factor receptor 3) a LVD (lymphatic vascular density), dále je patrný vliv FGF, IGFR1 a COX2 [263, 305].

Vliv na prognózu pacientů mohou hrát i některé parametry u kostních metastáz – jde o např. o molekulu RANKL (inhibovanou denosumabem) či zvýšené hladiny BALP (bone specific alkaline phosphatase) nebo NTX (N-telopeptide of type I collagen) spojené s kostní remodelací, jejichž pokles je spjat s účinkem kyseliny zolendronové [306].

Významnými prognostickými markery jsou i molekuly regulující buněčný cyklus, především cykliny (např. zvýšená exprese cyklinu D1, B1 a E je spojena s horší prognózou) a jejich regulátory – tzv. cyklin dependentní kinázy. Jejich nefunkčnost je spojena s horší prognózou – patří sem např. p21, p27, p57 či známý p53 diskutovaný níže [307]. Existují však i protichůdné práce – např. metaanalýza nepotvrzující vliv cyklinu D na prognózu [308]. Aurora kinasa A je regulátorem DNA poškození spouštějícího apoptózu. Její amplifikace je též dávana do souvislosti s prognózou u NSCLC a též odpovědí na cisplatinu [307, 309].

p53 reguluje odpověď na řadu buněčných stresů zastavením buněčného cyklu či apoptózou. Aktivátorem tohoto tumorsupresoru je poškození DNA. Mutovaný gen p53 se objevuje u cca 50% NSCLC, více u kuřáků (a tedy SCC). Tyto mutace zabraňují normální funkci p53 a jeho ochranné funkci před maligní transformací. Mutace p53 je uváděna jako negativní prognostický faktor, rovněž je spojována s horší odpovědí na terapii cisplatinou [310]. Funkci p53 ovlivňuje další řada genů – pozornost byla věnována například TP53, který je též prognostickým faktorem a některými autory je dáván i do souvislosti k rezistenci na cisplatinu [310]. Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) je lokalizován na vnitřní mitochondriální membráně, kde inhibuje apoptózu pomocí zastavení cyklu v G0/G1 fázi. Jeho zvýšená exprese je spojována s lepší prognózou pacientů [311]. Rb (retinoblastoma gen) je významným kontrolorem buněčného cyklu a u NSCLC je často inaktivován, což však patrně není spojeno s horší prognózou nemocných [312].

Pozornost byla věnována též případnému hormonálnímu vlivu na NSCLC, kdy se pozornost zaměřovala především na estrogen. Samotné studie měli rozporuplné výsledky a byly poměrně heterogenní, jejich metaanalýza tak přináší pouze omezenou informaci, kdy

se zdá možný vliv estrogenového receptoru 1 (ER1) na prognózu pacientů zejména s pokročilými NSCLC. Tuto domněnku je však nutno dále ověřit [313]. Mezi další hormonální vlivy s dopadem na prognózu pacientů by mohly být produkty tukové tkáně – tzv. adiponektiny [314, 315].

Dalším známým molekulárním markerem jsou tzv. nekódující RNA (ncRNA). ncRNA lze rozdělit na dvě velké skupiny – na krátké (do 200 bp), kam z klinického pohledu řadíme především mikroRNA (miRNA), a na tzv. dlouhé nekódující RNA (lncRNA), které jsou delší než 200 bp [316].

lncRNA byly objeveny v 90. letech 20. století a dnes jsou známy již stovky těchto epigenetických faktorů. Jejich exprese je přísně regulována řadou mechanismů, kdy výsledné lncRNA regulují expresi vybraných genů na mnoha úrovních, a tak se mohou podílet mj. na řízení proliferace a diferenciace buněk či lékové rezistenci. U NSCLC byla popsána změněná exprese řady z nich, kdy je některými autory dáván vztah k hladině jejich exprese a kuřáctví či znečištění ovzduší. Potencionálně mohou být též využitelné k diagnostice NSCLC, odlišení SCC od ACC, jako prognostické i prediktivní faktory (popisován možný vztah k cisplatině či gefitinibu). Zatím však jejich role není dostatečně charakterizována a je třeba řady dalších studií k přesnějšímu pochopení jejich funkce [316, 317].

miRNA patří mezi malé nekódující RNA. Jejich funkcí je regulace genové exprese na posttranskripční úrovni. Na své cíle působí buď útlumem přepisu dané mRNA nebo její degradací. Působí takřka na všechny buněčné děje včetně buněčného cyklu a proliferace, apoptózy, angiogeneze, invazivity a metastazování, čímž se stává významným hráčem v onkologii. Podle převahy regulujících molekul (jedna miRNA působí obvykle na desítky mRNA) může vystupovat jako tumorsupresor i onkogen u řady tumorů včetně NSCLC. Samotné miRNA pak podléhají další epigenetické regulaci (např. methylace jejich čtecího rámce) a mohou se u nich objevit též SNPs či mutace v jejich čtecím rámci. Jejich výhodou je stabilita ve tkáni i tělních tekutinách a proto dobrá možnost stanovení jako případného biomarkeru. Jejich potencionální uplatnění je bohaté – od diagnostiky a histopatologického určení NSCLC přes prediktivní (CHT i cílené léčby) a prognostické markery až po možné cíle léčby NSCLC. Mezi nejčastěji zkoumané miRNA patří především tumorsupresorová rodina let-7 (spojená s horší prognózou při negativní regulaci řady onkogenů jako KRAS) a onkogenní miR-21 (s patrně prognostickým významem). Byla zkoumána celá řada

dalších miRNA, z nichž některé z nich jsou blíže popsány v Řešení vlastní studie [318-324].

Dalším epigenetickým faktorem, který se může uplatňovat v prognóze NSCLC jsou tzv. hypermethylace DNA, které vedou ke snížení exprese takto pozměněných genů. Wu et al. ve své metaanalýze například dokládají prognostický vliv hypermethylaci tumor supresoru FHIT (fragile histidine triad protein), který hraje roli v alveolární diferenciaci [325]. Jiná práce poukazuje na prognostický vliv hypermethylace tumorsupresoru p16, který vystupuje jako negativní regulátor buněčného cyklu [326]. Ovšem možných zkoumaných genů, jejichž methylace je spojena patrně s horší prognózou, bylo daleko více [305]. Je třeba též upozornit na provázanost jednotlivých epigenetických faktorů, kdy kódy pro miRNA mohou být též methylovány a naopak miRNA může regulovat methylaci DNA [327].

Mezi významné epigenetické mechanismy patří i stupeň acetylace histonů ovlivňující stupeň transkripce. Za odstranění acetylových skupin z histonů jsou odpovědné HDAC (histon deacetylázy), které se dělí do několika tříd. Exprese řady z nich je deregulovaná (u některých i díky methylaci) u NSCLC. Snížená exprese HDAC 5 a 10 z druhé třídy histonů je pak spojována s negativním prognostickým významem u NSCLC [328].

Stran cytogenetiky je NSCLC obvykle spojen s nebalancovanými abnormalitami chromosomů. Jsou často odlišné nejen mezi dlaždicovým karcinomem a adenokarcinomem, ale i mezi jednotlivými grady a stádii tumorů a dokonce často i mezi jednotlivými nádory samými. Určit jejich prognostický význam tedy není prozatím, při absenci rozsáhlejších prací, možné [312].

Velká pozornost je v současné době věnována prediktivním a prognostickým faktorům imunoterapie. Jako prediktivní markery odpovědi na imunitní vakcíny (cílicí právě na tyto molekuly) bylo zkoumáno několik markerů, ale prozatím všechny neúspěšně. Mezi nejznámější historické cíle patří MAGE-A3 (melanoma-associated antigen A3) na nějž byla zaměřena vakcína zkoušená v rozsáhlé studii fáze III u adjuvantní léčby NSCLC [329]. MUC1 (episialin) byl cílem tecemotidu ve studii fáze III START. Ačkoliv se MUC1 jeví jako prognostický faktor u NSCLC a je abnormálně glykosylovaný u NSCLC, tacedomide neprokázal zlepšení OS v celkové populaci tumorů stádia III [330, 331]. Rovněž byla zkoumána role některých chemokininů, kdy např. pro CD184 je popisován vztah k prognóze [332]. Zatím jediným využívaným prediktivním markerem v imunoterapii je PD-1 resp. PDL-1, který má patrně vliv na stupeň odpovědi nových

checkpoint inhibitorů (nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab) [186]. Jeho nevýhodou je zatím nejednotnost testování, heterogenita v tumoru a jeho možné změny v čase (i např. vlivem podávané kortikoterapie), odlišení PD-L1 exprese nádorových buněk od okolí či patrně falešné zvýšení při zánětu či nadměrné expresi dráhy EGFR [333, 334]. Vyšší exprese PD-L1 je též spojována s horší prognózou nemocných [335]. Upřesnění k prognóze PD-L1 by mohl přinést současně stanovený stupeň somatických mutací v nádoru či stanovení pomocného markeru. Nejvíce se v tomto smyslu pracuje s CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), ale uplatnění možná najdou i další molekuly – např. PD-L2, fractalkine (CX3CL1), Tim3 (T-cell immunoglobulin-3) či LAG-3 (lymphocyte-activation gene) [334]. Rovněž je popisován příznivý vliv vyšší exprese IFN (interferon) γ resp. jeho induktorů – např. gen IDO1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1) [236]. Stupeň mutací v tumoru se zdá být relativně snadno měřitelným parametrem, ale jeho problémem je rozdílný význam mutací jako neoantigenů a ovlivnění imunity některými mutacemi (např. EGFR), které je třeba detailněji prozkoumat před uvedením tohoto parametru do rutinní klinické praxe [336]. sICAM-1 (soluble intercellular adhesion molecule-1) patří mezi rodinu imunoglobulinů. Je důležitý pro transendoteliální transport leukocytů a jeho zvýšená exprese je dávana do souvislosti s horší prognózou nemocných [337]. Mezi zkoumané potencionální prognostické markery patří řada dalších genů podílejících se na imunitních reakcích [253].

Nádorové kmenové buňky jsou teoreticky „jádrem“ tumoru, které produkuje ostatní, již více či méně heterogenní, nádorové populace. Markerem těchto buněk je např. CD133, u kterého byl též prokázán vztah k prognóze NSCLC [338, 339]. Rovněž i další antigeny spjaté s nádorovými kmenovými buňkami (CSCs) – BCRP-1 (=ABCG-2 – viz níže) a ALDH1 – jsou patrně spjaté s prognózou pacientů s plicními karcinomy. CSCs tedy představují důležitý faktor pro OS pacientů [340]. Je též popisována rezistence buněk exprimujících CD133 k cisplatině [309].

Matrixové metaloproteinázy (MMP) a jejich inhibitory (TIMP) hrají významnou úlohu v procesu nádorové invaze a metastazování díky schopnosti rozrušovat (resp. blokovat) extracelulární matrix. Pro některé z nich je též popisován prognostický význam u NSCLC [341-343]. Rovněž RECK (reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs) – inhibitor MMP-2 a 9 – prokázal prognostický význam u NSCLC [344, 345].

Jako další možné prognostické faktory jsou uváděny i v klinice méně známé geny. Jde například o HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor-1 alpha), který v metaanalýze prokázal zvýšenou expresi u NSCLC (zejména v postižených LU a u SCC) se zhoršením OS, kdy jeho hladina korelovala též s VEGF a EGFR [346]. Mezi alterované geny až u 1/3 SCC lze řadit Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-like factor 2). Vyšší exprese tohoto onkogenu je spjata s horší prognózou nemocných díky zvýšenému potenciálu přežití takto postižených buněk a jeho alterací s dalšími onkogenními dráhami (např. KRAS či PIK3-AKT) [347]. Dalším prognostickým markerem může být survivin. Jde o regulátor apoptózy a mitózy, kdy jeho zvýšené exprese u NSCLC jsou spojovány s horší prognózou pacientů [348]. FOXM1 (Forkhead box M1) patří mezi regulátory buněčného cyklu s vlivem na buněčnou proliferaci a metastazování tumorů. Metaanalýza prokázala též jeho prognostický vliv u NSCLC [349]. LIRG (rich repeats and immunoglobulin-like domains) jsou tumorsupresory s vazbou na EGFR, RET či MET. Metaanalýza prokázala jejich prognostický význam u plicního karcinomu [350]. Rodina genů S100 má za úkol intracelulární regulace aktivit spojených především s Ca²⁺. Její člen S100A2 je pak dáván do souvislosti s prognózou zejména u časných stadií NSCLC [351]. STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) představuje jednu z aktivačních drah signálu od EGFR. Aktivací STAT3 jsou v nukleu exprimovány signály vedoucí k angiogenezi, inhibici apoptózy a buněčné proliferaci. STAT3 je negativním prognostickým markerem u NSCLC [352]. Dalším často mutovaným genem u NSCLC je LKB1 (liver kinase B1). LKB1 patří k calcium/calmodulin regulující kinázové rodině a je spojována s horší prognózou při větší tendenci k metastazování tumoru [353]. Mezi důležité proteinové kinázy patří též PKC (protein kináza C), která hraje významnou úlohu v přenosu buněčných signálů do jádra, mimo jiné i na cestě skrze KRAS. PKC vystupuje jako onkogen s negativním prognostickým efektem [354]. Amplifikace onkogenu myc se objevuje u 5-10% pacientů s NSCLC a je spojena s nádorovou proliferací a též zhoršenou prognózou pacientů [312].

Mezi potencionální prediktivní biormakery léčby s nutnou další validací patří řada molekul dále členěná dle korelace k dané CHT. K cisplatině je udáván vztah jednak efluxních pump (především tzv. ABC transportérů), které jsou blíže diskutovány v Řešení vlastní studie a mají vztah též k taxanům či etoposidu. Dále patrně hrají roli molekuly podílející se na influxu cisplatinu, jejichž snížená exprese vede k její nižší intracelulární koncentraci – jedná se především o NA/K-ATPazu a gen CTR-1 (constitutive triple response 1). GSH

(gluthathion) se pak může podílet na nadměrné detoxikaci cisplatinu. V neposlední řadě je důležitý vliv tzv. opravných genů – např. PARP1 (poly adenosine diphosphate-ribose polymerase 1), další z nich jsou diskutovány níže [309, 355, 356]. β -tubulin třídy III (β TubIII) je důležitou součástí mikrotubul. Některé práce poukazují nejen na jeho prognostický efekt, ale i možný prediktivní ukazatel vůči odpovědi na vinorelbin a taxany [357, 358]. Výše popisovaný HIF může mít krom prognostické hodnoty i prediktivní význam při léčbě taxany [356]. Mezi možné prediktivní faktory vinorelbinu lze řadit i PLKs (polo-like kinases), jejichž zvýšené exprese u NSCLC ovlivňuje pozitivně účinnost vinorelbinu díky vlivu na mikrotubuly [356]. Folátový receptor (hrající roli v transportu pemetrexedu) a níže diskutovaná TS (thymidylát syntáza) mají patrně vliv na účinnost pemetrexedu [356, 359]. Jako prediktivní marker gemcitabinu může sloužit RRM (diskutováno níže) či hENT1 (human equilibrative nukleoside transporter 1) podílejí se na absorpci gemcitabinu do buňky [355, 356]. Rovněž byl popsán možný prediktivní vliv snížené exprese deoxycitidine kinázy, která je zodpovědná za přeměnu gemcitabinu v aktivní metabolit. Opačný vliv má 5'-nukleotidáza, která defosforyluje aktivní metabolit gemcitabinu, případně může být deaktivován cytidine deaminázou [360]. Zvýšená exprese TOP2 α (topoisomerase II α), která je cílem etoposidu či duplikace CEP17 (ercentromeric alpha satellite repeat on chromosome 17) jsou jedny ze zvažovaných prediktivních markerů etoposidu [355, 356].

Opravné geny (především ERCC1= excision repair cross-complementation group 1, BRCA1 = breast cancer type 1 susceptibility protein, RRM1 = ribonucleotide reductase M1 a TS) byly zkoumány jako možné prediktory adjuvantní, případně též paliativní, chemoterapie. Funkční význam genů ERCC1, RRM1 a BRCA1 je popsán níže v části Řešení vlastní studie. TS katalyzuje metylaci deoxyuridinmonofosfátu (dUMP) na deoxythymidinmonofosfát (dTMP), který hraje klíčovou roli v replikaci a opravě DNA a proliferaci nádorových buněk. TS je klíčovým cílem pemetrexedu. Stran prognózy je snížená exprese RRM1 spojována s horší prognózou, u ERCC1, BRCA1 i TS existuje řada odporujících si prací, jejichž společná interpretace je pro jejich vzájemnou heterogenitu poměrně obtížná. Obdobná situace panuje i na poli jejich možného prediktivního významu (obecně nižší exprese těchto genů má vést k lepšímu efektu dané léčby), kdy ERCC1 je spojován především s odpovědí na cisplatinu, RRM1 s odpovědí na gemcitabin, BRCA1 s odpovědí na taxany a TS s odpovědí na pemetrexed. Problémy zůstává rozdílná metodika stanovení (IHC vs. RT-PCR) s různými užitými protilátkami, cut-off i vzorky

(FFPE vs. mražená tkáň) a heterogenitou jednotlivých skupin pacientů mezi publikovanými studii. Navíc je otázkou, zda jeden z genů podílejících se na opravných krocích DNA, může obsáhnout celý tento složitý a komplexní děj a zda tedy nebude nutné stanovit a validovat širší molekulární panel [357, 359, 361-366]. U řady opravných genů nemusí hrát roli jen samotná výše jejich exprese, ale též stanovení jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) těchto genů [367-369]. Výsledkem je, že žádný z těchto markerů se zatím neužívá v klinické praxi a je třeba provést precizní prospektivní studie k vyjasnění výše popsaných problémů.

Jiné práce neoperují s pouze jedním genem či miRNA, ale snaží se stanovit genetický panel sloužící k diagnostickým, prediktivním či prognostickým účelům. Problém však zůstává validace těchto výsledků dalšími studii a stanovení přesných postupů uchopitelných v klinické praxi [370-374]. Pozornost byla věnována i hmotnostní spektrometrii při určování panelu peptidů v plasmě resp. séru. U NSCLC byly zkoumány vybrané panely zejména ve vztahu k EGFR-TKIs, kde prokázaly nadějný prediktivní i prognostický efekt. Vzhledem k malým souborům je však nutné tyto výsledky podpořit rozsáhlejší konfirmační prací [375].

Pozornost byla též věnována IHC určení prognostických biomarkerů, kdy byla určena řada kandidátních molekul, avšak žádná z nich zatím neprošla do klinické praxe [376].

Z užívaných markerů popisuje metaanalýza Qiana et al. prognostický vliv TTF-1, avšak tato práce se nezakládá pouze na IHC vyšetřeních [377]. Vliv dalšího známého indexu Ki-67 (marker proliferace) na prognózu zůstává nejasný [378].

Slibně se rozvíjejícím oborem je proteomika, která zkoumá funkci proteinů. U NSCLC lze takto vyšetřovat řadu vzorků – nádorovou tkáň, plicní výpotek, krev, moč či sputum. Její využití může být v diagnostice plicních tumorů. Ale též může sloužit k určení prognostických (např. rodina S100, annexiny) i prediktivní markerů – např. H-FABP (heart fattyacid-binding protein) je spojován s odpovědí na EGFR-TKI [379].

Zajímavou možností představuje též měření markerů neinvazivní cestou pomocí zachycení v kondenzátu vydechovaného vzduchu, kde se ohledně diagnostiky NSCLC pracuje nejčastěji s markery oxidativního stresu a prozánětlivými proteiny rodiny S100, které by navíc mohly být markery i pro CHOPN [380].

4 Řešení vlastní studie

Souborem řešení jsou tři samostatné práce, jejichž problematika je uvedena níže [41, 381, 382].

4.1 Vliv exprese vybraných protein kódujících genů a mikroRNA na riziko relapsu plicních adenokarcinomů stadia 1

[381]

Úvod

Plicní karcinom patří mezi nejčastější příčiny úmrtí na nádorová onemocnění na světě, kdy dominantní roli zaujímá nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC). Chirurgická resekce je zlatý standard léčby pacientů stadia 1A a 1B (dle 6. TNM klasifikace), kdy následné pětileté přežití je uváděno v rozmezí 60 až 90%, část nemocných umírá v důsledku recidivy tumoru. Adjuvantní léčba se v současné době řídí stádiem nemoci. Pro pacienty stadií 2-2A je doporučována adjuvantní chemoterapie (CHT) platinovým doubletem (obvykle 4 cykly cisplatinu a vinorelbinu), pro pacienty s pozitivními N2 uzlinami je možné též doplnění o postoperační radioterapii (PORT) s cílem snížit riziko lokální recidivy tumoru. Adjuvantní CHT u těchto nemocných vedla dle dat z velkých randomizovaných studií (IALT, JBR10, ANITA, BLT) k prodloužení pětiletého přežití o 4-15%, metaanalýza (LACE) uvádí prodloužení pětiletého přežití 5,4%. Ačkoliv existují práce dokládající přínos adjuvantní CHT i u pacientů stadia 1B (někteří autoři doporučují navýšit léčbu na 6 cyklů), v nejrespektovanější studii CALGB nebyl obecný benefit pro tyto nemocné prokázán. Post-hoc analýza prokázala význam pouze u nemocných s tumorem větším než 4 cm. Další snahy se proto logicky upíraly k nalezení dalších klinických (udáván vliv pohlaví, buněčné diferenciaci, vaskularizace nádoru nebo výkonnostního stavu) či biologických (stanovení exprese samostatných genů nebo vybraného panelu genů) parametrů, které by pomohly lépe definovat prospěch adjuvantní chemoterapie a případně ji tak nabídnout i některým nemocným stadia 1. Jiné práce posuzují použití cílené léčby u vybraných nemocných místo standardní CHT - např. nadějná studie ALCHEMIST zkoumající cílené užití tyrozinkinázových inhibitorů u pacientů s prokázanými senzitivními mutacemi genu EGFR či ALK translokacemi. Dosud však žádný z těchto postupů nevedl k užití v klinické praxi. Naším cílem bylo zjistit možný vztah exprese některých DNA opravných genů, ABC

transportérů a vybraných mikroRNA k období bez recidivy onemocnění (DFI) a celkovému přežití (OS) u pacientů s radikálně resekovánými adenokarcinomy stádia 1 bez následně podávané adjuvantní chemoterapie a tím najít kandidátní biomarker, který nám umožní určit skupinu pacientů, pro které může být podání adjuvantní CHT přínosné.

Pacienti a metody

Design studie

Retrospektivní studie zahrnovala 42 pacientů stádia 1A a 1B s histologicky ověřeným plicním adenokarcinomem s radikálním operačním řešením bez adjuvantně podávané chemoterapie léčených na Klinice pneumologie a ftiziologie FN Plzeň. Pacienti podstoupili operační výkon v letech 2003-2011, stádium bylo potvrzené histologickým vyšetřením plicního resektátu (včetně disekovaných lymfatických uzlin hilu a mediastina). Naším cílem bylo stanovení exprese vybraných mRNA a mikroRNA, zjištění jejich vztahu k DFI a OS, a tak se pokusit najít možný marker rizika recidivy onemocnění, který by umožnil identifikovat pacienty s horší prognózou nemoci, kteří by mohli mít prospěch z podání adjuvantní chemoterapie.

Pacienti byli pooperačně standardně sledováni, první rok byl prováděn kontrolní skiagram plic každé 3 měsíce, 2. rok každých půl roku, každý rok až do 5 let od výkonu pak standardně probíhalo CT plic + mediastina jedenkrát ročně, po 5. roce od doby resekce byl prováděn pouze skiagram plic 1x ročně, v prvních 5 letech pak u většiny nemocných (pokud nevyjádřili svůj nesouhlas) probíhala bronchoskopická kontrola s cílem vyloučit recidivu v místě pahýlu operační rány. OS bylo stanoveno jako doba přežití od operačního výkonu do úmrtí/konce sledování. DFI bylo definováno jako doba od operačního výkonu do recidivy, resp. konce sledovaného období.

Soubor pacientů

Náš soubor zahrnoval celkem 42 pacientů s mediánem věku 65 let (rozmezí 48-77 let). 31 (74%) pacientů představovali muži, 11 (26%) pak ženy; kuřáků bylo 18 (42,9%), exkuřáků 20 (47,6%) a nekuřáci 4 (9,5%); 27 nemocných mělo stádium 1A (64%), 15 (36%) stádium 1B (shrnuje Tabulka 3). Recidiva se objevila u 19 nemocných, 23 pacientů v době sledování recidivu nemělo. V době vyhodnocování (únor 2016) přežívalo celkem 20 pacientů (5 s recidivou a 15 bez recidivy), přičemž 8 pacientů bez recidivy zemřelo z jiného důvodu než plicního karcinomu, ve skupině s recidivou zemřelo všech 14 nemocných v souvislosti s plicním karcinomem.

Vzorky tkáně a izolace RNA

Bioptické vzorky byly odebrány během chirurgické resekce tumoru (lobektomie) a zpracovány standardními laboratorními metodami na Šiklově ústavu patologie Fakultní nemocnice Plzeň s cílem diagnostiky tumorů - barvení hematoxylinem a eosinem (HE) a imunohistochemické vyšetření (pomocí p63 a TTF1). FFPE (formalinem fixované parafinové bločky) tkáňových vzorků byly skladovány při pokojové teplotě do doby analýzy. Parafinové řezy užívané pro další zpracování byly opět barveny HE s cílem mikroskopicky verifikovat nádorové buňky, kdy jejich okrsky byly patologem vyznačeny pro následnou makrodisekci pro získání RNA. Celková RNA (včetně mikroRNA) byla extrahována soupravou miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) z 15 µm širokých FFPE řezů získaných makrodisekcí dle korespondujících HE barvených sklíček, na kterých patolog vyznačil nádorovou tkáň.

Stanovení exprese vybraných protein kódujících genů

Kvantitativní stanovení mRNA vybraných genů (ABCC1, ABCC10, ABCG2, ATP7B, SLC22A1, SLC29A1, ERCC1, BRCA1) byla uskutečněna pomocí real-time RT-PCR s užitím Universal Probe Library (UPL) sond (Roche, Mannheim, Germany) v technických duplikátech na přístroji Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), jak bylo publikováno dříve.

Stanovení exprese vybraných mikroRNA

Kvantitativní stanovení vybraných 17 mikroRNA (miR-15b, miR-21, miR-27a, miR34a, miR-99a, miR-106a, miR-107, miR-143, miR-150, miR-192, miR-211, miR-218, miR-221, miR-224, miR-342 a miR-375) bylo provedeno pomocí real-time RT-PCR metody za užití TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) v technických duplikátech na přístroji Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) podle instrukcí výrobce sond. Expese RNU6B (U6snRNA) byla užitá jako normalizátor za užití tzv. ΔCt přístupu ($2^{-\Delta\text{Ct}}$ algoritmus).

Statistická analýza

Statistický software SAS verze 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) byl užit pro všechny statistické výpočty. Zhodnocení prognostické signifikance (vztah markerů k DFI a OS) bylo provedeno analýzou maximální věrohodnosti (Coxův regresní model), Kaplan-Meierovi distribuční funkce byly generovány pro signifikantní markery z Coxova modelu. Výsledky s hodnotou $p < 0.05$ byly považovány za statisticky významné.

Tabulka 3 – Klinické vlastnosti 1. souboru pacientů

Pohlaví	muži	ženy
	31 (74%)	11 (26%)
Kuřácký statut	Ex/kuřáci	nekuřáci
	38 (90%)	4 (10%)
Stadium	1A	1B
	27 (64%)	15(36%)
Recidiva	Ano	Ne
	19 (45%)	23 (55%)
Přežívání 2/2016	Ano	Ne
	20 (48%)	22 (52%)

Výsledky

Z celkového panelu protein kódujících genů a mikroRNA, které jsme stanovovali, jsme neprokázali žádný statisticky významný vztah mezi jejich expresí a DFI/OS v celkovém souboru. Pouze u podskupiny kuřáků/exkuřáků byl prokázán signifikantní vztah mezi hladinou mRNA BRCA1 a OS ($p = 0,0415$, HR = 2,23).

Diskuze

Znalost individuálního průběhu karcinogeneze, kterou můžeme hodnotit dle konkrétních de novo mutací nebo dle změn expresního profilu vybraných genů, by měla pomoci nejen cílit moderní léčbu, ale dle již publikovaných výsledků je nadějná i pro nádorovou diagnostiku a výběr chemoterapie.

Naším cílem bylo posoudit vztah exprese některých DNA opravných genů, ABC transportérů a vybraných mikroRNA k DFI a OS a pomocí nich identifikovat nemocné, kteří by mohli mít na základě tohoto vyšetření prospěch z adjuvantní chemoterapie i ve stádiu 1.

Lidský genom obsahuje geny pro 48 ABC (ATB binding cassette) transportérů, které se dělí do 7 rodin (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG). Přestože se jedná o různorodou skupinu proteinů, jejich společnou vlastností je schopnost aktivně přenášet různé látky přes membránu za spotřeby ATP. Z hlediska protinádorové léčby je významné, že některé z těchto proteinů mají schopnost exkrece toxických látek z buňky. Na základě rešerše literatury jsme vybrali 6 genů z této skupiny ve vztahu k nádorům plic (ABCC1, ABCC10, ABCG2, ATP7B, Slc22a1, Slc29a).

ABCC1 (190 kDa) je efluxní pumpou, která patří do skupiny C transmembránových genů ABC. U NSCLC byl zkoumán její vliv na rezistenci na léčbu taxany či etoposidem. Její zvýšená exprese byla popsána na hematoencefalické bariéře, ve střevě a sliznici úst. Byla pozorována její zvýšená exprese v plicích, což zřejmě souvisí s její úlohou protektivního faktoru před znečištěním ovzduší a inhalačními toxiny. Její zvýšená exprese je popisována některými autory jako negativní faktor pro OS i PFS u některých druhů CHT a dokonce i u TKI. Roli mohou hrát i "varianty" tohoto proteinu způsobené polymorfismy, např. SNP (single nucleotide polymorfisms). Její exprese se zdá být vyšší u dlaždicových karcinomů a stádia 1. V naší studii jsme žádný vztah k DFI či OS nezaznamenali.

ABCC10 (171 kDa) je dalším transmembránovým transportérem z rodiny C skupiny ABC efluxních pump. Normálně je exprimována v řadě tkání, zejména v kůži, tlustém střevě a varlatech. U NSCLC je pak popisována větší exprese ve srovnání s normální plicní tkání, což může mít vliv na rezistenci např. k taxanům, vinca alkaloidům či TKI. Je tedy možným prognostickým/prediktivním faktorem u NSCLC. V naší studii jsme však toto neprokázali.

ABCG2 je další z rodiny ABC transportérů, který vytváří transmembránové homodimery či tetramery. Tento gen, nalézající se na 4. chromozomu, je exprimován v řadě tkání, např. placentě, tenkém střevě, játrech, ledvinách, mozku či hematopoetických kmenových buňkách. Jeho zvýšená exprese, popř. některé z polymorfismů, se dávají do souvislosti nejen s rezistencí na topotecan či platinu, ale též byl popsán vztah k EGFR-TKI i ALK inhibitorům. Jinde je naopak udáván vliv gefitinibu na jeho inhibici. Navíc je popisován i jeho vztah k některým nežádoucím účinkům CHT či TKI. ABCG2 protein je považován za marker kmenových buněk, které se podílejí na proliferační aktivitě tumoru. Proto nepřekvapí, že řada prací udává jeho vztah k prognóze pacientů s NSCLC. U raných stádií je jeho vztah k OS sporný, možná v důsledku spolupůsobení dalších faktorů – udáván např. vliv CD133. Naše práce žádný vliv mezi expresí mRNA tohoto genu a DFI či OS neprokázala.

ATP7B patří do rodiny ATPáz transportujících těžké kovy – mimo jiné i měď. Gen je exprimovaný především v ledvinách a játrech, kde má za úkol odstraňovat přílišné množství mědi z buněk – v játrech tak jeho mutace může vést ke vzniku Wilsonovy choroby. Jeho zvýšená exprese je dávana do souvislosti s rezistencí k cisplatině u řady nádorů včetně NSCLC, tyto vztahy jsou ale možná komplexní a nezávislé na samotné expresi ATP7B. U NSCLC byla popsána zvýšená exprese tohoto genu, která byla spojena se sníženou diferenciací nádorových buněk a horší prognózou nemocných. Naše práce tuto asociaci

neprokázala, což mohlo být způsobeno i nízkým stádiem onemocnění (publikované práce se zaměřovaly na pokročilá stádia).

Slc22a1 je transmembránový transportér exprimovaný především v játrech, ledvinách a střevě. Je spojen s efluxem řady léků a toxinů. Je exprimován u řady nádorů včetně NSCLC, kdy může souviset s chemorezistencí na některé druhy CHT a nepříznivou prognózou. Vliv tohoto genu je u NSCLC prozatím málo prozkoumán – v jedné práci byly dávány do souvislosti jeho SNP se stupněm vyrážky u pacientů léčených EGFR-TKI. V naší práci jsme pak nezaznamenali jeho vztah k prognóze.

Slc29a1 je transmembránový transportér nukleosidů a nukleosidových analog lokalizovaný na 6. chromozomu. U NSCLC byla popsána jeho deregulovaná exprese, která se může měnit i v závislosti na některých SNP. Jeho zvýšená exprese je spojována s horší léčebnou odpovědí na gemcitabin. Nebyl prokázán rozdíl mezi expresí u adenokarcinomu a dlaždicového karcinomu. U pacientů léčených gemcitabinem je popisován jeho vliv na OS, nikoliv na PFS (čas do progresu). U naší skupiny pacientů nebyl žádný vztah k prognóze prokázán.

Funkcí genů ERCC1 a BRCA1, stejně jako jejich možným prognostickým/prediktivním významem u pokročilých tumorů, se zabývá náš předchozí článek. Řada autorů se pak zabývala i vztahem k možné predikci odpovědi na adjuvantní chemoterapii, resp. prognóze radikálně operovaných pacientů s NSCLC, kdy některé práce naznačují možný prognostický a prediktivní potenciál, ale definitivní závěr prozatím nebyl stanoven. V naší práci jsme vztah ERCC1 a BRCA1 k DFI či OS u celkového souboru nezaznamenali, ovšem v podskupině kuřáků/exkuřáků jsme prokázali signifikantní vztah exprese BRCA1 k OS. Je tedy možné, že expresi BRCA1 v nádorové tkáni ovlivňuje i kuřácký statut. Toto tvrzení je ale nutné potvrdit dalšími studii. BRCA1 přispívá k opravě dvojíých zlomů DNA a dále funguje jako regulátor chemoterapií indukované apoptózy – především u antimikrotubulózních látek (taxany, vinca alkaloidy). Na toto téma vzniklo několik prací, kdy část publikací se zabývala pacienty s adjuvantní či neoadjuvantní léčbou a některé pak, stejně jako naše práce, i pacienty bez adjuvantní léčby. Taron et al. prokázali lepší efekt neoadjuvantní CHT (cisplatina + gemcitabin) u 55 pacientů s nízkou expresí BRCA1. V naší práci jsme obdobný vztah nezaznamenali, BRCA1 měla vztah pouze k OS u dlaždicových karcinomů. Studie fáze III SCAT pak u 500 pacientů adjuvantně léčených v jednom rameni cisplatinou s docetaxelem a v druhém dle exprese BRCA1, buď cisplatinou + gemcitabinem (při nízké expresi BRCA1) nebo cisplatinou + docetaxelem (při střední expresi BRCA1) případně jen docetaxelem (při vysoké expresi BRCA1), nezaznamenala rozdíl v OS mezi oběma rameny. Rossel et al. pak

prokázali u 126 pacientů bez adjuvantní léčby (stádia 1-3) horší přežití u 40 pacientů s vyšší expresí BRCA1 (medián OS 29 měsíců) oproti 83 nemocným s nízkou expresí BRCA1 (medián OS v době vydání studie nedosažen). Další studie potvrzovala tyto závěry u pacientů se stádiem 1B-2B. Sanchis et al. se pak věnovali výlučně stádiu 1, kde u 64 pacientů též neprokázali vliv exprese BRCA1 na OS, avšak vyšší exprese BRCA1 měla vztah k nižšímu DFI.

MikroRNA (miRNA) jsou krátké (22-24 nukleotidů), jednovláknové, nekódující RNA molekuly, které negativně regulují genovou expresi na posttranskripční úrovni prostřednictvím inhibice translace a/nebo snížením stability cílové mRNA. Tento základní biologický proces byl objeven teprve nedávno a je intenzivně studován (Andrew Fire, Craig Mello – Nobelova cena za rok 2006). Odhaduje se, že exprese až 50 % genů je ovlivněna touto cestou. Bylo identifikováno už více než 2500 lidských miRNA (databáze miRBase). Konkrétní mikroRNA se označuje předponou miR- následovanou číslem. Jedna konkrétní miRNA může cílit stovky různých RNA transkriptů, ale i obráceně, jedna konkrétní mRNA může být cílem pro mnoho různých miRNA. Z uvedeného je tedy zřejmé, o jak komplexní regulační síť se jedná. Řada miRNA se účastní karcinogeneze, a to ovlivněním exprese tumorsupresorových genů nebo onkogenů. Tzn. některé miRNA vykazují tumorsupresorový nebo onkogenní efekt a jsou typické pro nádorové buňky. V současnosti je pro většinu onkologických onemocnění, resp. typů nádorové tkáně, znám charakteristický profil exprese molekul miRNA a je vkládána naděje, že některé najdou využití jako nádorové markery. V našem případě jsme se zajímali o mikroRNA, které hrají roli v patogenezi nádorů.

miR-15b byla v souvislosti s NSCLC zkoumána především jako součást možného diagnostického molekulárního panelu. U NSCLC je popsána její zvýšená exprese a korelace se stupněm diferenciací (grade) nádoru. Proto by její exprese mohla mít souvislost i s prognózou nemocných. To se však u našeho souboru pacientů nepotvrdilo.

Mezi mikroRNA s onkogenním efektem patří u řady nádorů (včetně NSCLC) intenzivně studovaná miR-21, jejíž gen se nachází na 17. chromozomu. Podílí se na řízení proliferace, angiogeneze, invazivity a migrace nádorových buněk, kdy je mimo jiné dávana do souvislosti s regulací EGFR, PTEN, BCL-2 či KRAS. Byl popsán vztah miR-21 k odpovědi na chemoterapii jak platinovými deriváty, tak i na radioterapii. U NSCLC je popisována její zvýšená exprese v tkáni, plazmě i séru a to zejména u adenokarcinomů, vyšších TNM stádií a při nižším stupni diferenciací (vyšší grade) tumoru. Uplatňuje se i jako součást diagnostických panelů NSCLC včetně raných stádií. Rovněž je poukazováno na její

prognostický význam v jednotlivých studiích i v metaanalýze. Prognostický význam (signifikantní vztah k DFI i OS) byl popsán i u stádia 1. Naše práce pro tyto nemocné žádný vztah k prognóze nezaznamenala.

miR-27a se podílí na regulaci proliferace a apoptózy u řady nádorů. U NSCLC je udávána její snížená koncentrace v séru a v plasmě. V pre-miRNA i samotné miRNA bylo nalezeno několik polymorfismů, u kterých někteří autoři uvádějí vliv na OS, některé práce tento vztah neprokázaly. V souvislosti s miR-27a je u NSCLC věnován zájem především možnému vlivu na rezistenci k EGFR-TKI cestou MET (snížená exprese miR vede ke zvýšené expresi MET) a případně SPROUTY7 (ovlivňujícího též MET). Ale byl zkoumán i možný vliv miR-27a na angiogenezi a rezistenci k platinovým derivátům. V naší práci jsme však žádný vliv na prognózu nemocných neprokázali.

miR-34a je tumor supresorová mikroRNA lokalizovaná na 1. chromozomu. Je deregulovaná u řady tumorů – karcinomu prsu, prostaty, osteosarkomu i NSCLC. K jejímu snížení může docházet jednak vlivem některých mutací, ale zejména pak epigeneticky pomocí metylace jejího promotoru. Ovlivněním procesu reparace DNA se miR-34a podílí na citlivosti nádorové tkáně k radioterapii, dále je uváděn její vliv na účinnost EGFR-TKI díky ovlivňování drah MET a KRAS onkogenů, ale vztah je popisován i k imunitě skrze působení na NK buňky či TGFβ. Rovněž se podílí na řízení apoptózy – cestou bcl2 a p53 – a proliferace nádorových buněk – cestou Rb, TGF či PDGFR. Jedna práce pak, v kontrastu k předchozím publikacím, uvádí zvýšenou expresi u NSCLC. U tumorů nízkých stádií je popisováno snížení u dlaždicových forem (SCC) a naopak zvýšení u adenokarcinomů. Odlišné složení souboru pacientů tak může být vysvětlením pro zvýšenou expresi miR-34a u výše zmíněné práce. U NSCLC nízkých stádií byl též zmiňován vliv na prognózu pacientů. My jsme však, podobně jako Wang et al. takovýto vztah neprokázali.

miR-99a je mikroRNA s tumorsupresorovým efektem, jejíž gen je lokalizován na 22. chromozomu. Je uváděna její snížená exprese ve tkáni NSCLC (ACC i SCC). Díky cílení na mTOR a řadu genů podílejících se na epiteliálně mesenchymální přeměně (EMT) inhibuje proliferaci, migraci a invazivitu NSCLC. Lze tedy předpokládat působení této miRNA na prognózu nemocných. Takovýto závěr jsme ale v naší práci nepotvrdili.

miR-106a byla původně považována za onkogenní se zvýšenou expresí u NSCLC s vlivem na proliferaci, invazivitu a migraci nádorových buněk. Rovněž byla její zvýšená exprese dávána do souvislosti s rezistencí na cisplatinu díky vlivu na efluxní pumpu ABCA1. Novější práce pak ukazuje i na její možný tumorsupresorový potenciál díky vlivu na autofagii tumorózních

buněk. Dle našich znalostí vliv na prognózu u pacientů ve stádiu 1 nebyl dosud zkoumán, kdy naše práce tuto možnou korelaci nepotvrdila.

miR-107 má tumor supresorový efekt u řady nádorů (např. karcinom žaludku, nádory hlavy a krku), kdy se podílí na řízení buněčné proliferace a apoptózy. U NSCLC byla popsána též snížená exprese této mikroRNA s vlivem na buněčný cyklus a možným navozením rezistence k cisplatině. Snížená exprese byla v práci Zhonga et al. ve vztahu ke kratšímu OS. V naší práci jsme tento vztah na našem souboru pacientů stádia 1 nepotvrdili, což může být způsobeno odlišným vlivem této mikroRNA u různých TNM stádií NSCLC.

miR-143 je mikroRNA s tumor supresorovým působením, jejíž gen je lokalizován na 5. chromozomu. Hraje významnou úlohu u řady karcinomů včetně NSCLC. Díky působení na některé onkogeny (např. KRAS, MMP-13) se podílí na regulaci buněčné proliferace, apoptózy, migrace a metastazování u NSCLC. Dále je dáván vztah miR-143 do souvislosti s řízením autofagie a glykolýzy. miR-143 byla rovněž zkoumána jako potenciální diagnostický marker pro NSCLC. Její snížená exprese u NSCLC byla spojena s kuřáckým statutem, což podobně jako u našeho výsledku u BRCA1, podporuje vliv kuřáckého návyku na některé molekuly spjaté s rozvojem NSCLC. I přes značný zásah miR-143 do onkogeneze NSCLC a převahu kuřáků v našem souboru, jsme nezaznamenali vztah této mikroRNA k prognóze.

Gen pro onkogenní miR-150 se nalézá na chromozomu 19. Tato mikroRNA je zvýšeně exprimována u řady nádorů včetně NSCLC (ačkoliv lze najít i práci dokládající snížení její exprese u NSCLC). Toho lze potenciálně využít též při diagnostice nízkých stádií NSCLC. Nicméně exprese miR-150 se zvyšuje se stoupajícím stádiem. Mezi funkce miR-150 patří regulace apoptózy (spjat s p53) a buněčné proliferace. Rovněž je dávána do souvislosti s toxicitou radioterapie díky ovlivňování zánětlivých cest. Ačkoliv byl popsán její vztah k prognóze NSCLC, v našem souboru pacientů jsme tento vztah neprokázali.

Onkogenní miR-192 je zvýšeně exprimována v NSCLC. Podílí se na řízení proliferace (cestou PIK3-AKT-mTOR) a apoptózy (ovlivňuje bcl-2 a p53). Její zvýšená exprese je uváděna jako jedna z cest rezistence k chemoterapii (zkoumán režim cisplatina-gemcitabin). V našem souboru jsme neprokázali její vztah k prognóze pacientů.

Další onkogenní mikroRNA se zvýšenou expresí u NSCLC je miR-211. Tato mikroRNA ovlivňuje buněčnou proliferaci a invazivitu nádorových buněk. Je uváděna jako jeden z

možných biomarkerů dlaždicového karcinomu, obdobný vztah u adenokarcinomu nebyl dosud zkoumán. V našem souboru jsme neprokázali její vztah k prognóze pacientů.

Tumor supresorová miR-218 vykazuje sníženou expresi ve tkáni NSCLC. Její snížení může být způsobeno jednak polymorfismy genu (SNP) nebo hypermetylací jejího promotoru. Tato hypermetylace může mít souvislost s kouřením. Funkčně se tato mikroRNA podílí na buněčné migraci a invazivitě. Je udávaná souvislost mezi její sníženou expresí a rezistencí na léčbu EGFR-TKI a díky regulaci apoptózy i platinovým derivátům. Tento tumorsupresor je dáván do souvislosti s horší prognózou pacientů s NSCLC. Tento vztah však naše studie u souboru pacientů stádia 1 nepotvrdila.

miR-221 byla původně považována za onkogen aktivovaný pomocí MET. Její zvýšená exprese u NSCLC negativně ovlivňuje inhibitory proliferace a migrace (PTEN, TIMP-3, MMP, AKT). Následně byl popsán i tumorsupresorový efekt této mikroRNA, přesný vliv na NSCLC tedy není dostatečně znám a patrně závisí na místním kontextu. V naší studii jsme neprokázali vliv miR-221 na prognózu našeho souboru pacientů.

miR-224 byla popisována u různých tumorů jako tumorsupresor i onkogen. U NSCLC je dávána do souvislosti spíše s tumorsupresorovým efektem, tzn. její snížená exprese je spojena s horší prognózou pacientů v pokročilých stádiích. Jiná práce pak dokládá vliv na OS jen u nemocných s mutací p53/KRAS. Funkčně se podílí na ovlivňování proliferace, apoptózy, invazivity a migrace nádorových buněk. Naše práce vztah miR-224 k prognóze u časných stádií tumorů neprokázala.

miR-342 vykazuje sníženou expresi v tkáni NSCLC s vlivem na proliferaci a invazivitu tumoru patrně díky ovlivnění exprese RAP2B. V naší studii jsme neprokázali vliv této mikroRNA na prognózu nemocných.

miR-375 se podílí na řízení proliferace, migrace a invazivity u řady karcinomů, vykazuje tumorsupresorový efekt. Snížení exprese miR-375 může být navozeno metylací jejího promotoru. U NSCLC je uváděn podíl miR-375 na rezistenci vůči CHT (cisplatina-vinorelbin), což může být způsobeno vlivem na DNA opravný gen ERCC1. U NSCLC je popisována snížená exprese miR-375 u ACC ve srovnání s SCC, což může být potencionálně i diagnosticky využitelné. Její snížená exprese je spojena s kratším OS v několika studiích i jedné metaanalýze, jedna studie naopak uvádí opačnou souvislost. Naše studie žádný vztah k prognóze neprokázala.

Rozdílné výsledky mezi různými studii mohou záviset jednak na rozdílné metodice stanovení a použitých cut-off pro dané markery a dále zejména na rozdílném zastoupení klinických skupin (stádium, pohlaví, věk, kuřácký status, PS, etnikum) pacientů v jednotlivých studiích. Proto jsme se snažili v naší pilotní studii provést měření na homogenním souboru pacientů odrážejícím reálné klinické podmínky. To však mělo za následek výrazné snížení velikosti souboru nemocných, kdy jsme nemuseli mít dostatečně velký soubor pro prokázání menších odchylek. Byla by tedy vhodná validace našich výsledků na větší multicentrické studii.

Závěr

Naším cílem bylo pokusit se najít možný marker rizika recidivy onemocnění u pacientů s plicními adenokarcinomy nízkých stádií, kteří podstoupili pouze radikální chirurgickou léčbu. Tento marker by mohl být následně využitelný pro identifikaci pacientů s nepříznivou prognózou, tzn. těch, kteří by mohli mít prospěch z podání adjuvantní chemoterapie.

V rutinních FFPE nádorových vzorcích jsme prokázali vztah mezi kratším OS a hladinou BRCA1 u podskupiny kuřáků/exkuřáků. Tento výsledek je však vzhledem k malé skupině souboru nutné potvrdit dalšími studii. V celkové skupině pacientů jsme vztah mezi expresí námi vybraných genů a DFI/OS neprokázali. V tomto kontextu tedy, dle výsledků naší studie, nelze žádný ze zkoumaných markerů považovat za vhodný indikátor podání či nepodání adjuvantní chemoterapie u resektovaných nemocných s adenokarcinomem stádia 1.

4.2 Prognostický význam ERCC1, RRM1 a BRCA1 u chirurgicky léčených pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem

[41]

Úvod

Chemoterapie (CHT) je nepostradatelná při léčbě nemalobuněčného plicního karcinomu (non-small-cell lung cancer, NSCLC). Poslední studie poukazují na možné využití molekulárních markerů pro předpověď léčebného efektu podané CHT. U pacientů s časnými stádii NSCLC představuje chirurgická resekce možnou kurativní léčbu. Kromě pacientů stádia I je chirurgická resekce obvykle následována adjuvantní CHT. Cílem naší studie bylo nalézt prediktory efektu chemoterapie u pacientů, kteří podstoupili resekci nádorové tkáně s následnou adjuvantní CHT. Stanovili jsme hladiny mRNA genů ERCC1 (excision repair cross-complementary group 1), RRM1 (ribonucleotide reductase subunit M1) a BRCA1 (breast

cancer 1) účastnících se oprav poškozené DNA a určili jejich vztah k bezpříznakovému období (disease-free interval, DFI) a celkovému přežití (overall survival, OS). Také nás zajímalo, zda potenciální reziduální nádorové buňky po chirurgické resekci odrážejí vlastnosti primárního tumoru, na což bychom usuzovali dle léčebné odpovědi.

Součástí hledání nových léčiv a jejich zavádění do klinické praxe je snaha uplatnit prediktory efektu léčby a to nejen u nových cílených léčiv, ale také u chemoterapeutik. Léčebný efekt CHT je limitován schopností nádorových buněk překonat účinky chemoterapie pomocí exprese DNA opravných genů a enzymů podílejících se na metabolismu nukleových kyselin.

Eukaryotické buňky reagují na poškození své genetické informace aktivací opravných mechanismů, kde hrají klíčovou roli: detekce poškození DNA, zabránění replikace poškozené DNA, možnosti opravy poškození a při její neopravitelnosti vyvolání apoptózy buňky.

K opravě poškozené DNA využívá náš genom řadu mechanismů lišících se efektivitou. Mezi nejdůležitější mechanismy patří: NER (nucleotide excision repair), o kterém bude blíže pojednáno dále; BER (base excision repair), který se uplatňuje při opravě jedné poškozené báze (tj. redukované/oxidované/methylované báze); MMR (mismatch repair) podílející se na opravách DNA při replikaci; HRR (homologous recombination repair), o kterém bude též pojednáno níže; a konečně OSR (one step repair), kdy dochází k přímé jedнокrokové opravě vlákna DNA. Všechny tyto opravné mechanismy brání poškození genomu jak exogenními (chemikálie, UV záření, radiace) tak endogenními vlivy (volné radikály buněčného metabolismu, chyby při replikaci). Pokud je však překročena jejich kapacita (tzv. DRC = DNA repair capacity) nebo pokud buňka není schopna DNA opravit z jiného důvodu, je aktivována apoptóza (tj. programovaná buněčná smrt). Jsou-li však poškozeny samy opravné mechanismy (např. hereditární mutace v MMR genech) nebo aktivace apoptózy, dochází k přenosu mutací DNA do další buněčné generace. Nedostatečná aktivita opravných mechanismů se proto dává do souvislosti jednak s procesem stárnutí a jednak s karcinogenezí. Naopak léčbu může komplikovat zvýšená aktivita těchto mechanismů bránící účinku některých chemoterapeutik, jelikož opravné geny brání efektivnímu poškození DNA a tím aktivaci apoptózy dělících se nádorových buněk.

Gen ERCC1, kódující 5'-endonukleázu o 297 aminokyselinách (AK), je lokalizován na 19. chromozomu. Je tvořen 10 exony o celkové délce 15kb. Je klasifikován jako tumorsupresor. Protein ercc1 je důležitou součástí NER komplexu skládajícího se z více než 30 proteinů. Jednou z hlavních funkcí NER komplexu je oprava tzv. DNA aduktů, které vznikají například vlivem UV-záření či některých látek cigaretového kouře, ale i při terapeutickém využití

platinových derivátů. Bez opravy těchto aduktů dochází k ireverzibilnímu poškození DNA (především guaninu). Aduktů představují kovalentní vazbu molekuly alterující látky (např. cisplatinu) na vlákno DNA (především na dusík na 7. pozici guaninu). Pro jejich účinnou opravu musí být adukty nejprve rozpoznány NER komplexem. To se děje dvěma způsoby, v závislosti na typu NER komplexu. Tzv. GG-NER (global genome NER) rozeznává adukty v celém genomu, zatímco tzv. TC-NER (transcription coupled NER), se aktivuje pouze při poškození transkribovaných sekvencí. V tomto počátečním kroku se u GG-NER uplatňují především geny mající vliv k UV záření (např. UV-DDB, XPC = xeroderma pigmentosum C), zatímco v TC-NER především RNA polymeráza II (RNAPII). Další cesta je již pro oba systémy společná. Jde nejprve o rozvinutí dvouvláknové DNA vlivem helikáz XPD (směr 3'-5') a XPB (XPB (směr 5'-3') a její stabilizaci pro následné kroky. Poté endonukleáza XPG spolu s helikázou XPA ověří DNA poškození a štěpí DNA při 3' jeho konci. Další krok je realizován námi stanovovaným ERCC1, který po vytvoření heterodimeru s XPF vystříhne poškozený fragment 24 až 32 nukleotidů ve směru 5'-3' (za pomoci dalších proteinů – především rodiny XP – xeroderma pigmentosum). Z opačné strany pak provádí excizi gen XPG [44]. Vystřížené vlákno je následně doplněno pomocí polymerázové aktivity DNA polymerázy δ, ϵ či κ a nakonec je oprava dokončena spojením řetězců ligázou. Jak již bylo vidět na četném zastoupení genů XP, má tento systém úzký vztah ke karcinomům kůže, avšak aktivita tohoto komplexu byla prokázána i u řady dalších nádorů - např. NSCLC. Cisplatin působí cytotoxicky vytvářením aduktů, které vedou ke crosslinkingu DNA a následné aktivaci programované buněčné smrti. Snížení množství poškození DNA, ať už nižším vytvářením aduktů (např. menší dávka léku) či jejich opravou, může vést k nižší účinnosti tohoto chemoterapeutika. Jak bylo zmíněno výše, NER komplex rozpoznává a odstraňuje zmíněné adukty a tím pádem může způsobovat rezistenci k platinovým cytostatikům, a to i bez ohledu na kuřácký status či rasu (studie měly obdobné výsledky v asijské i kavkazské skupině). Tuto myšlenku dokládá signifikantní vztah mezi paliativní CHT s použitím cisplatinu a expresí genu ERCC1. Některé práce však žádný vztah mezi paliativní CHT s platinovým dubletem a expresí ERCC1 u pokročilého NSCLC neprokázaly. To však bylo dávano do souvislosti s konkrétními polymorfismy, měnícími funkci tohoto genu. Jako překážka zavedení stanovení exprese ERCC1 do klinické praxe je namítána problematická standardizace tohoto vyšetření.

Gen RRM1 (délky 55,85kb) je lokalizovaný na 11. chromozomu, kde se u NSCLC nachází oblast s častou ztrátou heterozygoty. Jeho produktem je první podjednotka enzymu

ribonukleotid reduktázy (druhou podjednotku pak kóduje gen RRM2). Na obecné úrovni bylo zjištěno, že tento tumor supresor brání proliferaci, invazivitě i metastazování nádorů. Dobře byl popsán vztah mezi genem RRM1 a tumorsupresorem PTEN. Zvýšení exprese RRM1 vede k vyšší expresi genu PTEN, který inhibuje signální dráhu PI3K/Akt/mTOR a tím inhibuje proliferaci a migraci buněk. RRM1 se rovněž podílí jako opravný gen procesu homologní reparace v NER komplexu. Účastní se fáze opravy poškozených ribonukleotidů.

Ribonukleotid reduktáza představuje jediný enzym umožňující přeměnu nukleotidů na deoxynukleotidy. Vysoké hladiny RRM1 jsou spojovány s rezistencí na nukleotidový analog gemcitabin, který indukuje apoptózu. Gemcitabin funguje jako prolečivo, které pomocí kináz vytváří samotný účinný gemcitabin-di/tri-fosfát. Ten poté následně inhibuje DNA polymerázu a též ribonukleotid reduktázu, právě spjatou s RRM1, a tím i syntézu DNA. RRM1 je však též popisován jako prediktor účinku paliativní CHT v kombinaci cisplatina-vinorebin.

Tumor supresor BRCA1 o délce 81kb se nachází na 17. chromozomu. Kóduje protein o 1862 aminokyselinách. BRCA1 má několik domén, na které se váže řada proteinů se širokým spektrem funkcí jako je aktivace kontrolního bodu v buněčném dělení, regulace transkripce a DNA opravy. Na N-konci můžeme nalézt tzv. RING (really interesting new gene) doménu, která asociuje (pomocí proteinu BARD1) s ubiquitin ligázou, která je též klíčová v opravě DNA. C-doména se podílí na aktivaci transkripce řady proteinů a centrální část se účastní oprav DNA. Konkrétně jde o mechanismus opravy zlomů v dvouvláknové DNA. Toto se děje jednak za pomoci systému homologní opravy (HRR), kdy DNA na sesterské chromatidě slouží jako templát pro opravu poškozeného vlákna, oprava je tudíž nejpřesnější. HRR se však uplatňuje pouze v S a G2 fázi buněčného cyklu, mimo tyto fáze oprava probíhá pomocí méně přesného systému NHET (non-homologous end joining), protože dochází k přímé ligaci zlomů bez užití templátu. U linie nádorových buněk s deficitem BRCA1 byla pozorována rezistence na taxany. Rovněž exprese genu BRCA1 je uváděna jako prediktivní faktor ve vztahu k cisplatině aplikované při paliativní CHT.

Pacienti a metody

Studovaná skupina zahrnovala 90 pacientů s NSCLC (průměrný věk 69,5 let s rozpětím 49 až 83 let v době chirurgického výkonu), kteří podstoupili radikální chirurgickou resekci NSCLC. 59 z nich bylo následně léčeno adjuvantní chemoterapií v letech 2005 až 2007. Rozložení nemocných podle TNM klasifikace včetně stadia a histologického typu nádoru ukazuje tabulka 1 (Tabulka 4). Informovaný souhlas byl získán od všech pacientů a výzkum schválen

místní etickou komisí. Vylučovací kritéria představoval věk nad 85 let, duplicitní malignita a vysoké kardiopulmonální riziko neumožňující bezpečně podstoupit léčebný program. Adjuvantní CHT byla podávána podle doporučení ASCO (American Society of Clinical Oncology) z let 2005 až 2007, tzn. platných v době studie [12]. Tato léčba spočívala v podávání dvojkombinace cytostatik - mitotického inhibitoru a platinového derivátu (tj. vinorelbin plus cisplatina či paclitaxel plus carboplatina). Z 59 pacientů léčených adjuvantní CHT jich 41 obdrželo všechny 4 doporučené cykly CHT, 18 pacientů obdrželo méně cyklů pro závažné nežádoucí účinky terapie či z důvodů odmítnutí další léčby pacientem. Z důvodu progresu během sledovaného období muselo být 15 nemocných léčeno 2. linií CHT a 9 pacientů bylo léčeno pomocí EGFR-TKI (erlotinib či gefitinib). Radioterapie nebyla užitá. Medián doby sledování byl 17,2 měsíce. Parametry DFI a OS byly počítány pouze u 59 pacientů, kteří podstoupili adjuvantní CHT (průměrný věk 67 let v rozpětí 49-81 let v době operace). Distribuci nemocných podle TNM klasifikace, stádií a histologie ukazuje tabulka 2 (Tabulka 5).

Metody. 90 párových vzorků nádorové a normální plicní tkáně NSCLC bylo získáno peroperačně a následně zmraženo na -70°C . Všechny vzorky byly histologicky verifikovány. Následně byla komerčním kitem získána mRNA (FastRNAPro Green Kit, QBIogene) a poté proběhlo kvantitativní stanovení mRNA vybraných genů pomocí real-time RT PCR za užití UPL sond (Universal Probe Library, Roche). UPL sondy byly generovány pomocí ProbeFinder softwaru firmy Roche. Primery pro PCR byly syntetizovány firmou GeneriBiotech (ČR). Sekvence primerů a příslušných UPL sond ukazuje tabulka 3 (Tab. 3). U všech vzorků byla též hodnocena exprese housekeeping genu GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza). Výsledky jsou prezentovány jako normalizované hladiny, tj. jako poměr počtu kopií daného genu ke GAPDH.

Statistická analýza. Výsledky porovnání skupin byly vypočteny Wilcoxonovým testem. Hladina významnosti byla stanovena na obvyklou hladinu 0,05. Pro výpočet prognostických údajů byl užit Coxův model. Kaplan-Meierovy křivky přežití byly sestaveny na základě optimálních hladin cut-off.

Tabulka 4 – Popis celé skupiny pacientů dle TNM klasifikace (včetně stádia tumoru) a histologie

Skupina		T				N		M		Stádium				Histologie		
		1	2	3	4	0	≥1	0	1	I	II	III	IV	ACC	SCC	Ostatní
Muži	n=65	15	38	8	4	43	22	64	1	35	14	15	1	21	41	3
Ženy	n=25	9	13	2	1	16	9	23	2	15	3	4	3	15	7	3
Celkově	n=90	24	51	10	5	59	31	87	3	50	17	19	4	36	48	6
	%	27%	57%	11%	5%	66%	34%	97%	3%	55%	19%	21%	5%	40%	53%	7%

Tabulka 5 – Popis podskupiny pacientů, kteří obdrželi adjuvantní CHT – popis dle TNM klasifikace (včetně stádia tumoru) a histologie

Skupina		T				N		M		Stádium				Histologie		
		1	2	3	4	0	≥1	0	1	I	II	III	IV	ACC	SCC	Ostatní
Muži	n=42	5	25	8	4	24	18	41	1	16	12	13	1	12	28	2
Ženy	n=17	4	11	1	1	9	8	15	2	8	3	3	3	11	5	1
Celkově	n=59	9	36	9	5	33	26	56	3	24	15	16	4	23	33	3

Výsledky

Zaznamenali jsme statisticky významně nižší hladinu exprese mRNA ERCC1 a RRM1 u NSCLC nádorové tkáně v porovnání s normální plicní tkání ($p < 0,001$ resp. $p = 0,023$). U histologických subtypů, jsme zaznamenali signifikantně nižší expresi mRNA ERCC1 a RRM1 u SCC v porovnání s normální tkání ($p < 0,001$ resp. $p = 0,040$). Navíc jsme zaznamenali signifikantně nižší hladinu exprese mRNA i ERCC1 u adenokarcinomu v porovnání s normální plicní tkání ($p = 0,007$). Porovnávali jsme také expresi vybraných genů ve vztahu k nádorovým stádiím (I, II, III). Ve stádiu I jsme zaznamenali nižší hladinu exprese mRNA ERCC1 ve srovnání s normální plicní tkání ($p < 0,001$). Ve stádiu II jsme pak tuto závislost prokázali pro geny RRM1 a BRCA1 ($p = 0,005$ resp. $p = 0,045$). Ve stádiu III jsme žádné rozdíly neprokázali. Při porovnání skupin SCC a adenokarcinomu se nám podařilo prokázat signifikantní rozdíl v expresi mRNA ERCC1 a RRM1 i BRCA1, kdy hladiny exprese byly nižší u adenokarcinomu ($p = 0,021$, $p = 0,011$, $p = 0,011$). Rovněž jsme se zabývali celkovým vztahem exprese mRNA těchto genů a cytotoxicitou chemoterapie. Zde jsme však nepozorovali žádný vztah. Pro pacienty, kteří obdrželi adjuvantní CHT, jsme počítali vztah k OS a DFI. Vyšší hladina exprese mRNA RRM1 u pacientů s adenokarcinodem byla ve spojitosti s delším OS ($p = 0,002$). Vyšší exprese genu BRCA1 u pacientů se SCC byla ve vztahu s delším OS ($p = 0,041$). Dále jsme prokázali, že u stádia III NSCLC je vyšší exprese RRM1 a ERCC1 ($p = 0,040$ resp. $p = 0,038$) ve vztahu s delším DFI. U skupiny SCC stádia I byla vyšší hladina exprese mRNA BRCA1 a ERCC1 spojena s delším OS ($p = 0,033$ resp. $p = 0,028$) a dále u stádia III byla prokázána souvislost mezi vyšší hladinou exprese ERCC1 a

RRM1 ($p=0,040$ resp. $p=0,036$) a delším DFI. Vyšší exprese mRNA RRM1 u stádia III byla ve vztahu s delším OS ($p=0,044$). Na základě optimální cut-off byly následně sestaveny Kaplan-Meierovy křivky pro DFI a OS.

Dále jsme se rovněž zabývali analýzou více proměnných, kde jsme se zabývali otázkou, zda existují posilující/zeslabující kombinace námi vybraných genů vzhledem k prognóze. Zde jsme však žádný signifikantně významný vztah nezaznamenali, avšak je třeba poznamenat, že jsme porovnávali malé soubory pacientů.

Diskuze

V řadě studií již bylo potvrzeno spojení nízkých hladin exprese opravných genů ERCC1, RRM1 a BRCA1 s lepší léčebnou odpovědí paliativní chemoterapie pacientů s NSCLC. Naproti tomu výsledky studií zabývajících se prediktivní a prognostickou hodnotou hladin mRNA těchto genů u pacientů s adjuvantní CHT, tedy pacientů po radikálním chirurgickém výkonu (skupinou pacientů, kterou jsme se zabývali my) jsou nejednoznačné. Nedávno publikovaná metaanalýza neprokázala souvislost mezi přežitím a hladinou ERCC1 u pacientů s adjuvantní CHT po provedené chirurgické resekci tumoru. Rozdílné výsledky rovněž existují v případě srovnání exprese DNA reparačních genů v nádorové a normální plicní tkáni. V naší skupině pacientů jsme zaznamenali snížené hladiny mRNA ERCC1, RRM1 v nádorové tkáni. Simon et al. naopak neprokázali signifikantně nižší hladinu ERCC1 v nádorové tkáni. Jung et al. dokonce zaznamenali zvýšenou hladinu ERCC1 v nádorové tkáni, i když daný výsledek nebyl statisticky signifikantní. Publikovaná práce Lenze rovněž nepotvrdila významný rozdíl v expresi ERCC1 mRNA v nádorové tkáni ve srovnání s normální plicní tkání. Ma et al. pak prokázali signifikantně vyšší expresi ERCC1 v nádorové tkáni, která byla spojena s horší prognózou. Zajímavou skutečností je rozdíl expresí opravných genů mezi SCC a adenokarcinomem. V naší práci jsme zaznamenali vyšší expresi ERCC1, RRM1 i BRCA1 u adenokarcinomu. Rozdílným hladinám opravných genů podle histologie či stádia tumoru se věnuje i řada dalších prací, kdy je obecně dokládáno odlišné chování adenokarcinomu a SCC.

Adjuvantní CHT je důležitou součástí léčby pacientů po chirurgické resekci NSCLC. Otázkou však zůstává, jak nalézt pacienty pro které je adjuvantní terapie vhodná a jaký léčebný režim je pro konkrétního nemocného nejlepší. V naší práci jsme se zabývali souvislostí hladin mRNA těchto genů s léčebnou odpovědí pacientů s podanou adjuvantní CHT a tím potenciálním použitím stanovení exprese těchto genů jako prediktorů léčby. Mohli jsme očekávat, na základě výsledků publikovaných analýz provedených u skupiny pacientů bez

chirurgické léčby, že u pacientů s nižší hladinou exprese opravných genů DNA bude po podání CHT zaznamenána lepší léčebná odpověď a tudíž i delší DFI a OS. My jsme však vztah mezi nižší expresí mRNA genů ERCC1, RRM1 a BRCA1 k DFI a OS, u pacientů léčených adjuvantní CHT, neprokázali. Naopak jsme zjistili, že pacienti s dlaždicovým karcinomem a pacienti se stádiem III s vyššími hladinami opravných genů měli lepší prognózu. Pozorovali jsme tedy opačný vztah.

Tudíž hladiny opravných genů měly prognostický význam, avšak nebyly ve vztahu k predikci účinnosti adjuvantní CHT. Simon et al. učinili podobné závěry pro ERCC1. Autoři tohoto článku uvádějí, že neporušený opravný mechanismus DNA může redukovat hromadění genetických aberací, které souvisejí s maligním potenciálem daného tumoru. Mohou být tedy spojeny s méně agresivní formou, a redukovat tak riziko návratu onemocnění po léčbě. Na druhou stranu je třeba přiznat, že u adjuvantně léčených pacientů byla učiněna i opačná pozorování. Bepler et al. publikovali, že pacienti s nižšími hladinami ERCC1 měly lepší benefit z adjuvantní CHT, ačkoliv neprokázali žádnou statistickou souvislost ve vztahu k prognóze. Další práce pak poukazuje na fakt, že adjuvantní CHT prodloužila přežití pacientů s nízkou hladinou ERCC1, avšak ne těch s vyššími hladinami.

My jsme zjistili, že pacienti s dlaždicovým karcinomem a pacienti se stádiem III s vyššími hladinami opravných genů měli lepší prognózu. Na základě těchto výsledků a studií publikovaných dalšími autory se domníváme, že v naší skupině pacientů měli nemocní s vyššími hladinami opravných genů lepší prognózu pravděpodobně ze dvou různých důvodů. Pacienti s nepokročilým onemocněním mají po chirurgické léčbě dobrou prognózu (vysoká hladina opravných genů) nikoliv v důsledku efektu adjuvantní CHT, ale pro absenci reziduálních nádorových buněk po chirurgickém výkonu (méně agresivní nádorové buňky). Dalším vysvětlením však může být to, že fenotyp reziduálních nádorových buněk nekorespondoval s fenotypem primárního nádoru (hladiny exprese, které jsme stanovili, právě odrážejí majoritní fenotyp primárního nádoru).

Pacienti s nepokročilým onemocněním s vysokou expresí opravných genů DNA mají po chirurgické léčbě dobrou prognózu, pro nízké riziko reziduální choroby, a proto adjuvantní CHT může být zbytečná. Nalezení prediktorů pro podání CHT by pak pomohlo s rozhodnutím prospěšnosti konkrétní adjuvantní CHT pro daného konkrétního pacienta s horší prognózou. Nicméně naše práce v tomto kontextu nepotvrdila prediktivní význam námi zkoumaných genů u NSCLC.

Jelikož je známo, že opravné geny ve složitých molekulárních drahách mají i společné cesty (viz výše), zabývali jsme se též analýzou posilujících/zeslabujících kombinací námi vybraných genů, kde jsme v našem souboru nezaznamenali signifikantní vztah. A ačkoliv není mnoho srovnatelných prací, lze konstatovat, že další autoři dospěli k podobným závěrům. Leng et al., kteří takto kombinovali větší skupinu opraných genů (ERCC1, BRCA1, RRM1, BAG-1 a TUBB-3) mezi kombinací námi stanovovaných genů rovněž žádný vztah k prognóze neprokázali. Su et al. pak poukázali pouze na signifikantní vztah k času do progresu mezi kombinací exprese genů ERCC1 a BRCA1, ve vztahu k OS byla i jejich práce negativní. Na závěr je však nutné konstatovat, že naše i další zmiňované práce pracují s relativně nízkými skupinami pacientů. Dále je třeba upozornit, že se práce často lišily svým designem, a proto je poměrně složité provést sjednocující interpretaci.

Závěr

Opravné geny jsou v současné době zkoumány jako nadějný prediktivní marker pro individualizaci CHT konkrétním pacientům v počínající éře personalizované medicíny. Nicméně v naší skupině pacientů s adjuvantní CHT po resekci NSCLC jsme prediktivní význam nezaznamenali. Potvrdili jsme však jejich význam ve vztahu k prognóze tohoto onemocnění.

4.3. Prognostický význam miR-34a, miR-224 a miR-342 u pacientů léčených paliativní chemoetapií pro pokročilé dlaždicové plicní karcinomy

[382]

Úvod

Plicní karcinom patří celosvětově mezi nejčastější karcinomy s vysokou mírou úmrtnosti. Incidence v České republice dosáhla hodnoty 86,9 na 100 000 obyvatel u mužů a 38 na 100 000 obyvatel u žen v roce 2011. Přibližně 85% všech nádorů plic tvoří NSCLC s dvěma hlavními histologickými typy – SCC a ACC. SCC představuje přibližně 25-30% NSCLC celosvětově. Prognóza těchto pokročilých tumorů je horší ve srovnání s pacienty s ACC.

CHT tvoří základní léčebnou modalitu paliativní léčby pacientů s inoperabilními pokročilými SCC. Odpověď na CHT se liší pacient od pacienta, proto je snaha nalézt biomarkery předpovídající odpověď na tuto cytostatika. Rezistence nádorových buněk na CHT může být

způsobena zvýšeným exportem protinádorového léčiva z buňky, lepší schopností nádoru opravit poškozenou DNA či překonat apoptózu. Exprese genů podílejících se na těchto procesech je regulována sítí mikroRNA. MikroRNA jsou malé nekódující RNA molekuly o délce okolo 22 nukleotidů, které se podílejí na posttranskripční regulaci genové exprese. Lidský genom může kódovat přes 2500 těchto miRNA, které mohou cílit na přibližně 60% lidských genů a jsou hojné v řadě lidských buněčných typů (blíže online miRNA databáze dostupná na www.mirbase.org).

Cílem naší studie bylo stanovit vztah mezi expresí miRNA, které se podílejí na procesu vzniku rezistence k CHT, a OS paliativně léčených pacientů s pokročilými stádii SCC. Všichni naši pacienti podstoupili paliativní CHT založenou na platinovém derivátu (cisplatina nebo carboplatina) v kombinaci s paclitaxelem či gemcitabinem.

Zaměřili jsme se na miRNA, u nichž jsme očekávali efekt na procesu vzniku rezistence k CHT (miR-15b, miR-21, miR-27a, miR-34a, miR-99a, miR-106a, miR-107, miR-143, miR-150, miR-192, miR-211, miR-218, miR-221, miR-224, miR-342 a miR-375). Přehled hlavních charakteristik vybraných miRNA je obsažen v diskuzi Kapitoly 4.1. Je též znám jejich vztah k chemorezistenci u dalších typů tumorů.

Pacienti a metody

Pacienti

Jednalo se o retrospektivní studii čítající celkem 81 pacientů s pokročilými dlaždicovými NSCLC (stádia 3B a 4) se stavem výkonnosti ECOG PS 0-2 léčených mezi lednem 2000 a červnem 2014 na Klinice pneumologie a ftizeologie v Plzni. Medián věku pacientů byl 62,4 let (s rozmezím 32,7 až 79,3 roku). Všichni pacienti podstoupili paliativní CHT založenou na platinovém derivátu (cisplatina nebo karboplatina) v kombinaci s paclitaxelem či gemcitabinem. Sekvenční RT byla povolena u pacientů se stadiem 3B, pacienti léčení konkomitantní CHT-RT byli ze studie vyřazeni. Někteří pacienti se stadiem 3B nebyli k RT indikováni, především z důvodu horšího stavu výkonnosti a komorbiditám. Klinická data o nemocných jsou shrnuta v Tabulce 6.

Tabulka 6 – Klinicko-patologické charakteristiky souboru pacientů (n=81)

Charakteristika	Počet pacientů	%
Pohlaví		
Muži	74	91.4
Ženy	7	8.6
Věk (let)		
<55	11	13.6
55-65	41	50.6
>65	29	35.8
Kuřácký status		
Nekuřák	0	0
Bývalý kuřák	42	51.9
Kuřák	39	48.1
Stádium onemocnění		
3B	42	51.9
4	39	48.1
Stav výkonnosti (ECOG)		
0	2	2.5
1	58	71.6
2	18	22.2
3	3	3.7
Radioterapie		
Ano	25	30.9
Ne	56	69.1
Chemoterapie		
Paclitaxel	35	43.2
Gemcitabin	46	56.8

Tkáňové vzorky a izolace RNA

Bioptické vzorky byly odebrány zejména bronchoskopicky před podávanou paliativní CHT a zpracovány standardními laboratorními metodami na Šiklově ústavu patologie Fakultní nemocnice v Plzni. FFPE tkáňových vzorků byly skladovány při pokojové teplotě do doby analýzy. Parafinové řezy užitě pro další zpracování byly opět barveny HE s cílem mikroskopicky verifikovat nádorové buňky, kdy jejich okrsky byly patologem vyznačeny pro následnou makrodisekci. Celková RNA (včetně mikroRNA) byla extrahována soupravou miRNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany), jak bylo naším týmem popsáno dříve.

Stanovení exprese vybraných mikroRNA

Kvantitativní stanovení vybraných mikroRNA (miR-15b, miR-21, miR-27a, miR34a, miR-99a, miR-106a, miR-107, miR-143, miR-150, miR-192, miR-211, miR-218, miR-221, miR-224, miR-342 a miR-375) bylo provedeno pomocí real-time RT-PCR metody za užití TaqMan® MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) v technických duplikátech na přístroji Stratagene Mx3005P (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) podle instrukcí výrobce sond. Dvoukrokový protokol vyžadoval reverzní transkripci se specifickým miRNA primerem následovanou real-time PCR s TaqMan® sondami. Ve stručnosti, 5ng RNA bylo reverzně transkribováno v 20 ul reakci obsahující 2,5 ul primeru specifického k dané miRNA. 20 ul PCR reakce obsahovaly 1,0 ul RT produktu, FastStart TaqMan Probe Master (Roche, Mannheim, Germany), 2,5 ul každého primeru a 2,5 ul UPL sondy. Reakce byly inkubovány v 96-ti jamkových destičkách při 95°C po 10 minut a poté následovalo 48 cyklů při 95°C po 10 sec a 60°C po 30 sec. Expres RNU6B (U6snRNA) byla užitá jako normalizátor za užití tzv. ΔCt přístupu ($2^{-\Delta\text{Ct}}$ algoritmus) – jak bylo popsáno dříve.

Statistická analýza

Statistický software SAS verze 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) byl užit pro všechny statistické výpočty. Zhodnocení prognostické signifikance (vztah markerů k OS) bylo provedeno analýzou maximální věrohodnosti (Coxův regresní model), Kaplan-Meierovi distribuční funkce byly generovány pro signifikantní markery z Coxova modelu. Výsledky s hodnotou $p < 0.05$ byly považovány za statisticky významné. Bioinformatické nástroje DIANA-TarBase v7.0 a DIANA-miRPath v3.0 byly užitý k identifikování překryvných cílových genů miRNA našeho zájmu.

Výsledky

Před naší analýzou vztahu mezi expresí miRNA a PFS a OS jsme srovnávali výsledky pro podskupiny pacientů dle jednotlivých druhů léčby. Prokázali jsme signifikantní prodloužení OS u pacientů léčených radioterapií spolu s chemoterapií ve srovnání s nemocnými léčenými pouze samotnou CHT (Obraz 23A). Naopak jsme neprokázali signifikantní vztah mezi druhem chemoterapie a OS (Obraz 23B).

Coxův regresní model byl užit ke stanovení vztahu hodnot hladin markerů k OS a PFS. Z celkové skupiny 17 miRNA jsme prokázali u skupiny kuřáků vztah nízké exprese miR-342-3-p ($p=0,0500$) a vysoké exprese miR-34a a miR-224 ($p=0,0338$ resp. $p=0,0400$) ke kratšímu OS. Dále jsme prokázali vztah vysoké exprese miR-34 ke kratšímu OS ve skupině pacientů léčených platinovým derivátem a gemcitabinem ($p=0,0364$) a též vztah vysoké exprese miR-224 ke kratšímu OS ve skupině pacientů, kteří podstoupili CHT spolu s RT ($p=0,0250$). Vztah vybraných miRNA k PFS jsme neprokázali.

Pro markery se statisticky významnými výsledky byly vybrány optimální cut-off a generovány Kaplan-Meierovi distribuční křivky přežití pro OS. Statisticky významné rozdíly v OS mezi podskupinami s hladinou markeru pod a nad hladinou cut-off byly získány pro miR-342-3p ve skupině kuřáků ($p=0,0243$, Obraz 24A), miR-34a ve skupině pacientů léčených CHT s gemcitabinem ($p=0,0239$, Obraz 24B) a miR-224 ve skupině pacientů léčených CHT a RT ($p=0,0093$, Obraz 24C). Statistické hodnoty vztahující se ke Kaplan-Meierově analýze jsou shrnuty v Tabulce 7.

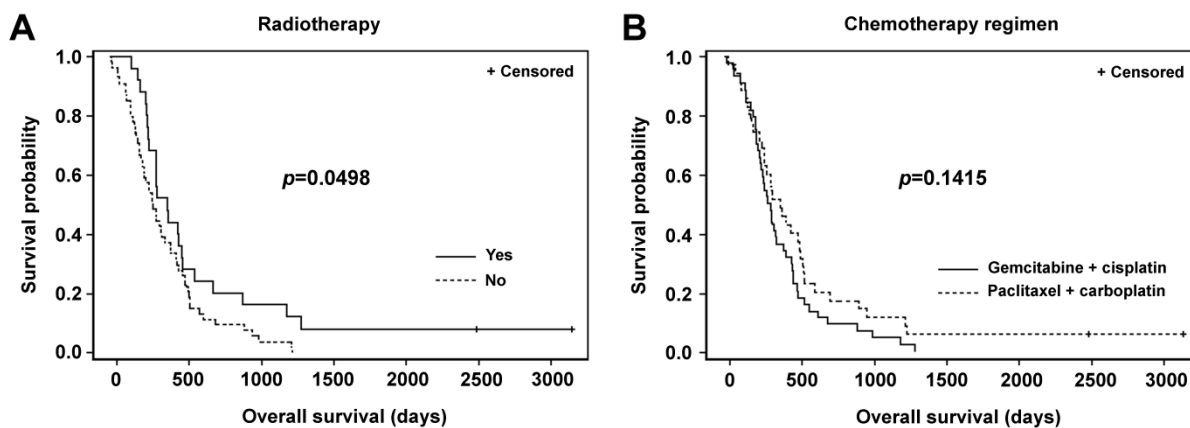
MiRNAs s prokázaným vztahem k OS (miR-34a, miR-224, miR-342) byly následně podrobeny multivarietní analýze. Analyzovali jsme páry těchto miRNA (miR-34a a miR-224, miR-34a a miR-342, miR-224 a miR-342) ve vztahu k OS. Pro každý pár miRNA byli pacienti stratifikováni na skupiny podle hodnoty miRNA exprese nad (vysoká) a pod (nízká) hodnotou cut-off, tedy na skupinu A (vysoká miR-224 a vysoká miR-342), skupinu B (vysoká miR-224 a nízká miR-342), skupinu C (nízká miR-224 a vysoká miR-342), skupinu D (nízká miR-224 a nízká miR-342). Nejprve bylo užito cut-off z jednorozměrné analýzy, které však vedlo k vysoké disproporcionální distribuci pacientů mezi skupinami. Proto jsme užili medián jak hodnotu cut-off. Obraz 25 ukazuje Kaplan-Meierovi distribuční křivky přežití pro OS pacientů stratifikovaných na 4 skupiny podle párů miR-224 a miR-342, jak je popsáno výše.

Je zde patrné, že se zde nacházejí dvě a dvě skupiny s podobnou distribucí přežití. Obraz 26 ukazuje srovnání přežití dvou skupin pacientů vytvořených uvedením skupin s podobným přežitím z Obrazu 25 dohromady (skupina A + skupina D vs. skupina B + skupina C). Byl zde prokázán statisticky významný rozdíl v přežití ($p=0.0018$, 267 vs. 432 dní). Stejný přístup jsme užili pro analýzu ostatních párů miRNA, ale zde jsme již žádný statistický významný výsledek neprokázaly. Stejným způsobem jsme analyzovali tři miRNA současně (miR-34a, miR-224, miR-342). Identifikovali jsme expresní vzorec (\uparrow miR-224 + \uparrow miR-342 + \uparrow miR-34a nebo \downarrow miR-224 + \downarrow miR-342 + \downarrow miR-34a vs. ostatní expresní vzorce těchto miRNA) spjatý s kratším přežitím ($p < 0.001$, 250 vs. 451 dní). Kaplan-Meierovi distribuční křivku přežití pro OS těchto skupin ukazuje Obraz 27.

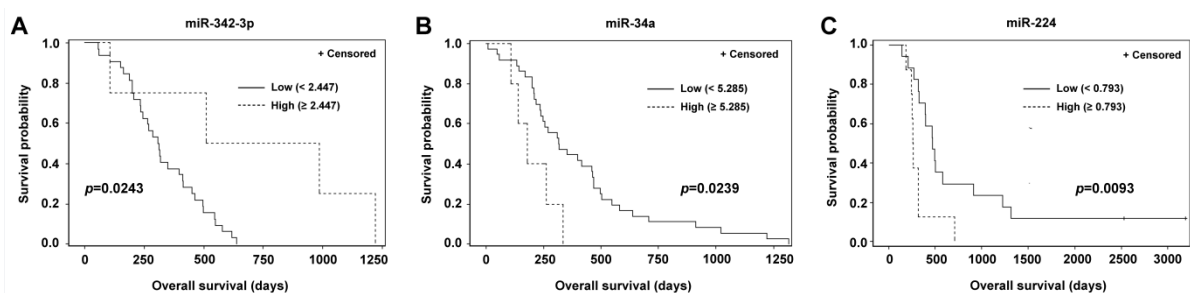
Užitím bioinformačních nástrojů DIANA-TarBase v7.0 a DIANA-miRPath v3.0 jsme objevili 6 překrývajících se cílových genů při prahu p hodnoty 0,05 pro miR-34a, miR-224 a miR-342. Jsou to geny zapojené do regulace buněčného cyklu, signalizace p53 a opravy DNA, jmenovitě GNAS (guanine nucleotide binding protein alpha stimulating), IGF1R (insulin like growth factor 1 receptor), CCND1 (cyclin D1), CCNG2 (cyclin G2), SERPINE1 (serpin family E member 1) a RRM2 (ribonucleotide reductase subunit M2).

Tabulka 7 – Vztah mezi hladinou daného markeru a OS

Skupina pacientů	Léčba	Marker	Počet pacientů	Medián OS pod cut-off (dny)	Medián OS nad cut-off (dny)	p-hodnota
Kuřáci	CHT	miR-342-3p	36	311	514	0.0243
Ex/kuřáci	Cis+gem	miR-34a	41	315	182	0.0239
Ex/kuřáci	CHT+RT	miR-224	25	462	262	0.0093

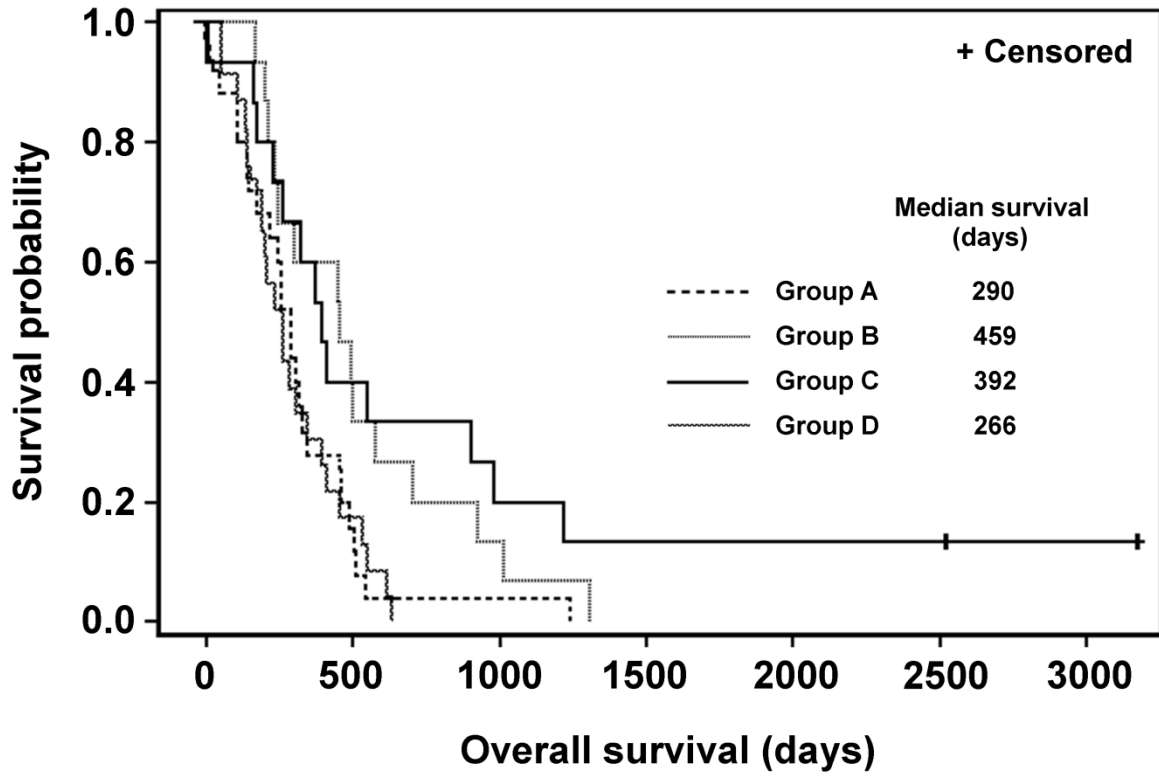


Obraz 23A+B – A) OS CHT vs. CHT + sekvenční RT; B) OS dle režimu CHT

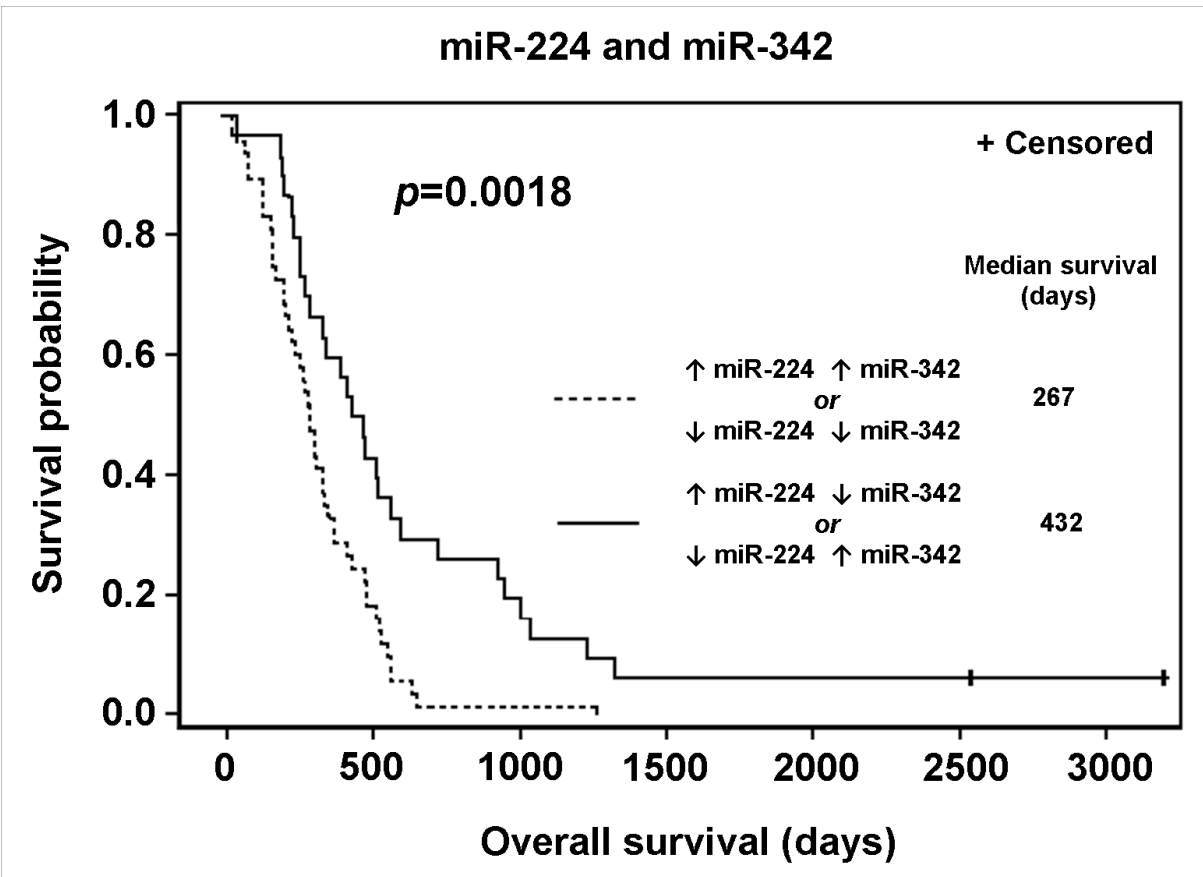


Obraz 24 A+B+C – A) OS dle hladiny miR-342-3p ve skupině kuřáků; B) OS dle hladiny miR-34a ve skupině pacientů léčených CHT s gemcitabinem; C) OS dle hladiny miR-224 ve skupině pacientů léčených CHT a RT

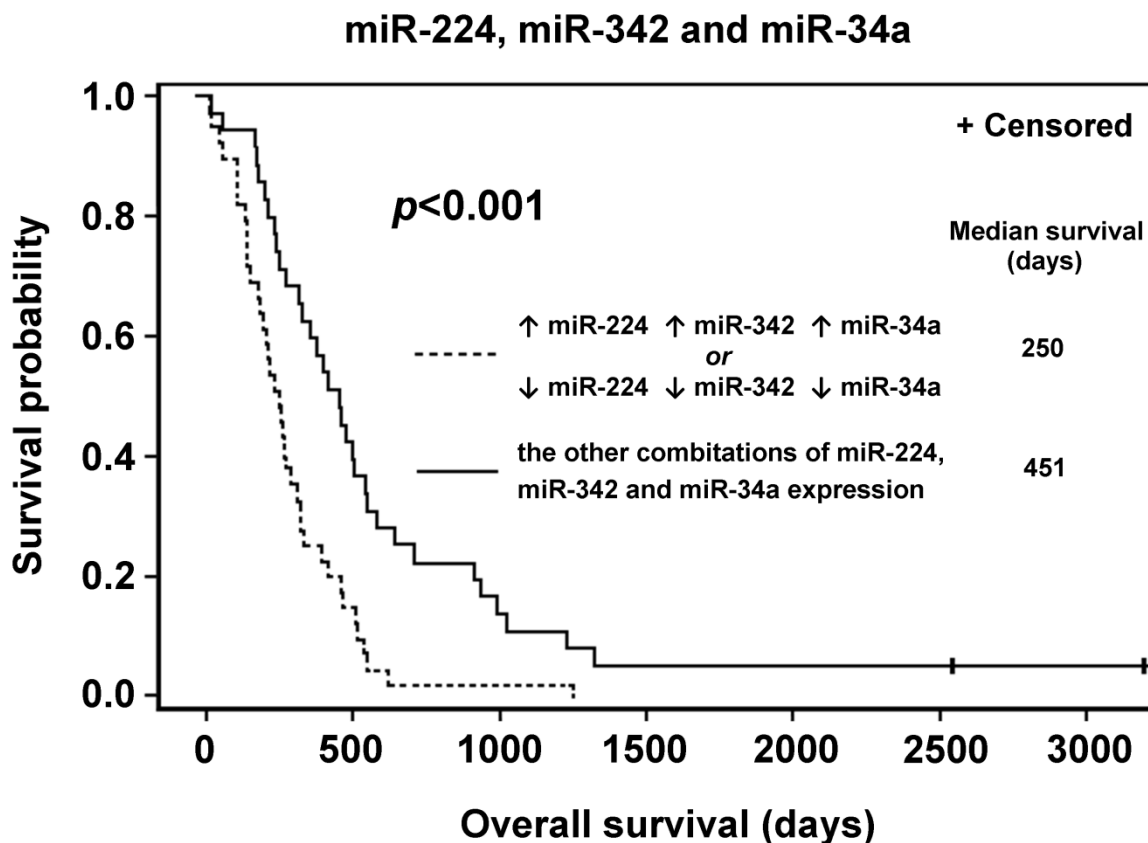
miR-224 and miR-342



Obraz 25 OS v jednotlivých skupinách pacientů dle exprese miR-224 a miR-342



Obraz 26 OS ve skupinách A + D vs. B + C



Obraz 27 OS u skupiny se zvýšenou či sníženou expresí miR-224, miR-342 a miR-34a vs. ostatní kombinace exprese těchto miRNA

Diskuze

MiRNA mají potenciál stát se přesnými, snadno měřitelnými biomarkery s příhodnými vlastnostmi pro diagnostické metody jako je stabilita v FFPE tkáni, krvi a snad i ostatních tělních tekutinách. Naše studie se zaměřila na pacienty s pokročilými dlaždicovými NSCLC. Tito pacienti nemohou podstoupit radikální resekci tumoru a jejich léčba je zaměřena pouze paliativně. Existuje několik léčebných modalit, které lze podávat těmto nemocným. Hlavním klinickým zájmem je tedy vybrat vhodné léčebné schéma. V naší práci jsme se pak zaměřili pouze na pacienty léčené platinovým derivátem spolu s paclitaxelem či gemcitabinem (s případnou RT u nemocných stadia 3B).

Nejprve jsme se zaměřili na jednorozměrnou analýzu vztahu exprese miRNA k OS. Poté jsme provedli multivariační analýzu zahrnující ty miRNA s odhaleným vztahem k OS. Na základě

našich výsledků ukazujeme, že účinek jediné miRNA může velmi záviset na úrovni exprese ostatních členů sítě miRNA, jak to diskutujeme později.

Prokázali jsme vyšší hladiny miRNA-224 indikující kratší OS u pacientů léčených kombinací CHT a RT. Cui et al. publikovali významné zvýšení hladin této miRNA u NSCLC a poukazovali na její onkogenní potenciál u plicních karcinomů díky cílení na kaspázu 3 a 7. Wang et al. publikovali analýzu ukazující na zvýšenou hladinu miR-224 u buněčných linií rezistentních na cisplatinu a demonstrovali, že miR-224 může způsobit rezistenci k cisplatině pomocí regulace apoptózy a přechodu G1/S fáze buněčného cyklu díky cílení na p21. To ukazuje na vliv této miRNA na efekt CHT založené na poškození DNA a její potencionální prediktivní užití k určení odpovědi na tuto CHT. Nicméně studie Zhu et al. publikovala snížené hladiny miR-224 u NSCLC ve srovnání s nenádorovou tkání. Tito autoři také pozorovali, že významné snížení exprese miR-224 bylo spojené se šířením do lymfatických uzlin, pokročilými TNM stadii a kratším OS.

Nízké hladiny miR-342-3p byly v naší studii spojeny s horším OS u kuřáků bez vztahu k léčebným modalitám. Xie et al. popisují snížení miR-342-3p u NSCLC, kdy díky působení na RAP2B by se mohlo jednat o tumorsupresor. Ve stejném duchu Tai et al. poukazují na schopnost miR-342-3p nepřímo regulovat aktivitu MYC skrze přímý vlivu na E2F1. Takahasi et al. pak zkoumali, jak kouření cigaret může ovlivnit profil miRNA v plasmě. Jejich práce přináší poznatek o snížení plasmatických hladin miR-342-3p u lehkých kuřáků oproti těžkým kuřákům.

MiR34a je člen rodiny miR-34, která má vliv na cestu p53 v signalizaci buněčné smrti. Rodina miR-34 je transkripčně aktivována skrze p53. Naopak p53 je přímým cílem miR-34a. Nicméně efekt miR-34a na p53 závisí na buněčném kontextu. Může vykazovat i pozitivní efekt na transkripční aktivitu a proteinovou stabilitu p53 díky působení na řadu inhibitorů p53 (MDM4, SIRT1, MTA2, HDAC1, YY1). Publikované studie prokázaly inhibování buněčné proliferace působením miR34a. Rodina miR-34 je spjata s deregulací v tumoru ve srovnání s normální tkání a nízké hladiny miR-34a byly dávány do souvislosti s vysokým rizikem relapsu resektovaných NSCLC. Na druhou stranu byly pozorovány vysoké hladiny cirkulující miR-34a u pacientů s NSCLC ve srovnání se zdravými kontrolami. V naší práci jsme prokázali vztah vysokých hladin miR-34a ve vztahu ke kratšímu OS u pacientů léčených palitivní CHT obsahující gemcitabin.

Následně jsme provedli multivariační analýzu, která zahrnovala ty miRNA (miR-34a, miR-224, miR-342), u kterých byl prokázán vztah k OS. Nejpozoruhodnějším zjištěním je to, že

pacienti s vysokou expresí jak miR-224, tak i miR-342 mají podobné přežití jako pacienti s nízkou expresí obou těchto miRNA, které je však signifikantně kratší než u pacientů s vysokou expresí jedné a nízkou expresí druhé z těchto miRNA.

Poukazujeme tak na fakt, že efekt jedné miRNA je závislý na expresi ostatních členů sítě miRNA. Je dobře známo, že jedna miRNA může mít predominantně onkogenní roli v jednom typu nádoru a tumorsupresivní v jiném. Například miR-224 byla identifikována jako tumor supresor v karcinomu prostaty. Naproti tomu v karcinomu žaludku či kolorektálním karcinomu se chová jako onkogen. My jsme navíc pozorovali tuto dvojsmyslnou úlohu miR-224 u jednoho typu tumoru – SCC podtypu NSCLC. Nádorová progresse je výsledek deregulace mnoha protein kódujících genů a epigenetických procesů zahrnujících též deregulaci mnoha miRNA. Proto předpokládáme, že pro pochopení role jedné konkrétní miRNA je nutné znát hladinu ostatních “spoluhráčů”. Pozorovali jsme, že OS je ovlivněno vzájemným vztahem miR-224 a miR-342. Vysoká hladina miR-224 může být spojena s lepším i horším přežitím v závislosti na simultánní hladině miR-342. Tyto nálezy mohou vysvětlovat předchozí rozporné výsledky předchozích publikovaných studií týkajících se exprese miR-224 u NSCLC. V roce 2014 Zhu et al. poukázali na významně nižší expresi miR-224 u NSCLC, které bylo spjaté s významně kratším OS. Naopak Cui et al. identifikovali, že miR-224 je významně více exprimovaná u NSCLC a její zvýšené hladiny jsou spjaté s buněčnou migrací, invazivitou a proliferací. Jak jsme již zmínily výše, v naší práci jsme prokázali, že vyšší exprese miR-224 je spojena s kratším přežitím u nemocných se sekvenční chemoradioterapií.

Za užití bioinformačních nástrojů jsme odhalili překryv v cílových genech pro miR-34a, miR-224 a miR-342. Všechny odhalené geny (GNAS, IGF1R, CCND1, CCNG2, SERPINE1 a RRM2) jsou součástí mechanismů regulující buněčný cyklus, signalizaci p53 a opravu DNA, což může vysvětlovat složitou vzájemnou závislost těchto miRNA na vztah k nádorové progresi a účinnosti podávané léčby.

Závěr

Pro pochopení všech aspektů efektu miRNA na regulaci genové exprese v nádoru a jejich vztahu k pacientovu přežití a účinnosti léčby bude patrně nutné hlubokých bioinformačních analýz. Domníváme se, že tento přístup může otevřít cestu pro budoucí užití miRNA v klinické praxi. MiRNA mohou být obecně posuzovány s větší přesností a snadněji než mRNA kódujících genů. To je v zásadě dáno tím, že, že analýza miRNA je méně náročná na jakost i množství izolované RNA, tedy problematických vlastnostech v FFPE vzorcích. Tyto vzorky

tkání se rutinně odebírají a analyzují při standardním managementu NSCLC, a proto se domníváme, že miRNA by se mohly stát klinicky použitelnými prediktory účinnosti paliativní léčby u pacientů s NSCLC. Nicméně naše zjištění ukazují, že vzhledem ke komplexní síti interakcí lze tento cíl dosáhnout spíše kombinací více markerů než pomocí jednotlivých miRNA. Na základě našich výsledků mohou být miR-224, miR-342 a miR-34a členy tohoto panelu.

5 Závěry

Dle našich zkušeností mohou být miRNA určeny snáze a přesněji ve srovnání s mRNA kódujících genů. To vychází především z nižších požadavků na kvalitu a kvantitu izolované RNA, což jsou obvykle problematické charakteristiky u RNA extrahované z FFPE tkáňových vzorků. Tyto vzorky jsou rutinně odebírány a analyzovány během diagnostiky NSCLC, a proto se domníváme, že miRNA by se mohly stát klinicky vhodnými prediktory efektivity paliativní léčby u pacientů s NSCLC.

U pacientů s plicními adenokarcinomy stadia 1 se nám nepodařilo nalézt ve vybraném panelu marker, který by byl vhodným prediktorem podání či nepodání adjuvantní chemoterapie. Prokázali jsme pouze vztah mezi kratším OS a hladinou BRCA1 u podskupiny kuřáků/exkuřáků. Tento výsledek je však vzhledem k malé skupině souboru nutné potvrdit dalšími studiemi.

Pacienti s nepokročilým onemocněním s vysokou expresí opravných genů DNA mají po chirurgické léčbě dobrou prognózu, pro nízké riziko reziduální choroby, a proto adjuvantní CHT může být zbytečná. Nalezení prediktorů pro podání CHT by pak pomohlo s rozhodnutím prospěšnosti konkrétní adjuvantní CHT pro daného konkrétního pacienta s horší prognózou. Nicméně naše práce v tomto kontextu nepotvrdila prediktivní význam námi zkoumaných genů u NSCLC. Potvrdili jsme však jejich význam ve vztahu k prognóze tohoto onemocnění.

U skupiny paliativně léčených nemocných se skvamozními NSCLC stadií 3B a 4 je na základě našich výsledků exprese miRNA spojené s OS a jejich doplněním o výsledky dalších autorů, kteří se soustředili na cíle těchto miRNA, mohou miR-224 a miR342-3p sloužit jako potenciální prognostické markery v daných skupinách nemocných, zatímco naše zjištění ohledně miR-34a vyžadují další výzkum k získání závěrů. Je však nutné vzít v úvahu, že vzhledem ke komplexní síti interakcí lze tento cíl dosáhnout spíše kombinací více markerů než pomocí jednotlivých miRNA. Toto dokládají i námi doložené interakce mezi miR-224, miR-342 a miR-34a.

6 Seznam literatury

1. Statistiky ČSÚ – dostupné z https://www.czso.cz/csu/czso/obyvatelstvo_lide; 2016.
2. Skříčková J, Kolek V. Základy moderní pneumoonkologie. Praha: Maxdorf, 2012. Jessenius. ISBN 978-80-7345-298-8.
3. Analýzy SVOD – dostupné z <http://www.svod.cz/?sec=analyzy>; 2016
4. Fiala O, Šatánková M, Kultán J et al. Výskyt mutací genu EGFR u pacientů s NSCLC v České republice. *Onkologie* 2014; 8(4): 156–159.
5. Modrá kniha – dostupné z <http://www.linkos.cz/informace-pro-praxi/modra-kniha>; 2016.
6. Novotný J, Vitek P a Kleibl Z. *Onkologie v klinické praxi: standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů*. 2. vydání. Praha: Mladá fronta, 2016. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3944-4.
7. Kolek V. *Doporučené postupy v pneumologii*. 2. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, 2016. Jessenius. ISBN 978-80-7345-507-1.
8. Pallis AG, Syrigos KN. Lung cancer in never smokers: disease characteristics and risk factors. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013; 88(3): 494-503.
9. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 2015; 10(9): 1243-60.
10. Patologická doporučení k NSCLC – dostupné z http://www.patologie.info/soubor/standardy/21-NSCLC_guideline_web.pdf; 2016.
11. Buccheri G, Ferrigno D. Lung cancer: clinical presentation and specialist referral time. *Eur Respir J* 2004; 24(6): 898-904.
12. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. *Chest* 2003; 123(1 Suppl): 97S-104S.
13. National Lung Screening Trial Research Team, Church TR, Black WC et al. Results of initial low-dose computed tomographic screening for lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(21) :1980-91.
14. Horeweg N, Scholten ET, de Jong PA et al. Detection of lung cancer through low-dose CT screening (NELSON): a prespecified analysis of screening test performance and interval cancers. *Lancet Oncol* 2014; 15(12): 1342-50.

15. Dajac J, Kamdar J, Moats A, Nguyen B. To Screen or not to Screen: Low Dose Computed Tomography in Comparison to Chest Radiography or Usual Care in Reducing Morbidity and Mortality from Lung Cancer. *Cureus* 2016; 8(4): e589.
16. NCCN guidelines, dostupné na www.nccn.org; 2016.
17. Kauczor HU, Bonomo L, Gaga M et al. ESR/ERS white paper on lung cancer screening. *Eur Respir J* 2015; 46(1): 28-39.
18. Goldstraw P, Chansky K, Crowley J et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2016; 11(1): 39-51.
19. Ramon Rami-Porta, *Iaslc Staging Manual in Thoracic Oncology, 2nd Edition*. North Fort Myers: Editorial Rx Press, 2016. ISBN 978-0-9832958-4-6.
20. Manegold Ch. *Non-small cell lung cancer treatment, 3rd edition*. Bremen: UNI-MED-Verl, 2013. ISBN 978-1-84815-201-4.
21. NICE guidelines – dostupné z <https://www.nice.org.uk/guidance/cg121/resources/lung-cancer-diagnosis-and-management-35109444863941>; 2016.
22. Novello S, Barlesi F, Califano R et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2016; 27 (suppl 5): v1-v27.
23. Felip E, Gridelli C, Baas P et al. Metastatic non-small-cell lung cancer: consensus on pathology and molecular tests, first-line, second-line, and third-line therapy: 1st ESMO Consensus Conference in Lung Cancer; Lugano 2010. *Ann Oncol* 2011; 22(7): 1507-19.
24. Vansteenkiste J, De Ruysscher D, Eberhardt WE et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2013; 24 Suppl 6: vi89-98.
25. Vansteenkiste J, Crinò L, Doms C et al. 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2014; 25(8): 1462-74.
26. Eberhardt WE, De Ruysscher D, Weder W et al. 2nd ESMO Consensus Conference in Lung Cancer: locally advanced stage III non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2015; 26(8): 1573-88.
27. Vilman P, Clementsen PF, Colella S et al. Combined endobronchial and oesophageal endosonography for the diagnosis and staging of lung cancer. European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) Guideline, in cooperation with the European Respiratory

- Society (ERS) and the European Society of Thoracic Surgeons (ESTS). *Eur Respir J* 2015; 46(1): 40-60.
28. Kerr KM, Bubendorf L, Edelman MJ et al. Second ESMO consensus conference on lung cancer: pathology and molecular biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014; 25(9): 1681-90.
29. Harris K, Puchalski J, Sterman D. Recent Advances in Bronchoscopic Treatment of Peripheral Lung Cancers. *Chest* 2016. pii: S0012-3692(16)49258-5.
30. De Leyn P, Dooms C, Kuzdzal J et al. Revised ESTS guidelines for preoperative mediastinal lymph node staging for non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2014; 45(5): 787-98.
31. Brunelli A, Charloux A, Bolliger CT et al. ERS/ESTS clinical guidelines on fitness for radical therapy in lung cancer patients (surgery and chemo-radiotherapy). *Eur Respir J* 2009; 34(1): 17-41.
32. Lim E, Baldwin D, Beckles M et al. Guidelines on the radical management of patients with lung cancer. *Thorax* 2010; 65 Suppl 3: iii1-27.
33. Gillespie EF, Atwood TF, Sandhu AP. Lung stereotactic body radiotherapy (SBRT): a single institution's outcomes and methodology in the context of a literature review. *Transl Cancer Res* 2015; 4(4): 372-380.
34. Kapoor R, Simha V. Advances in palliative radiotherapy of metastatic non-small cell lung cancer. *Transl Cancer Res* 2015; 4(4): 397-402.
35. 7. TNM klasifikace plicních tumorů – dostupné z www.uzis.cz/system/files/tnm-7.pdf; 2016.
36. Bernard ME, Clump DA, LaLonde R, Beriwal S. Radiation therapy for locally advanced lung cancer. *Transl Cancer Res* 2015; 4(4): 356-371.
37. Aupérin A, Le Péchoux C, Rolland E et al. Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(13): 2181-90.
38. Giap H, Roda D, Giap F. Can proton beam therapy be clinically relevant for the management of lung cancer? *Transl Cancer Res* 2015; 4(4): E3-E15.
39. Simone CHB, Burri SH, Heinzerling JH. Novel radiotherapy approaches for lung cancer: combining radiation therapy with targeted and immunotherapies. *Transl Lung Cancer Res* 2015; 4(5): 545-552.
40. Apps MG, Choi EH, Wheate NJ. The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocr Relat Cancer* 2015; 22(4): R219-33.

41. Svaton M, Pesek M, Krakorova G et al. Prognostický význam ERCC1, RRM1 a BRCA1 u chirurgicky léčených pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2014; 74(3): 85-92
42. Johnson DH. Evolution of cisplatin-based chemotherapy in non-small cell lung cancer: a historical perspective and the eastern cooperative oncology group experience. *Chest* 2000; 117(4 Suppl 1): 133S-137S.
43. Depierre A, Chastang C, Quoix E et al. Vinorelbine versus vinorelbine plus cisplatin in advanced non-small cell lung cancer: a randomized trial. *Ann Oncol* 1994; 5(1): 37-42.
44. Klastersky J, Sculier JP, Bureau G et al. Cisplatin versus cisplatin plus etoposide in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. Lung Cancer Working Party, Belgium. *J Clin Oncol* 1989; 7(8): 1087-92.
45. Rosso R, Salvati F, Ardizzoni A et al. Etoposide versus etoposide plus high-dose cisplatin in the management of advanced non-small cell lung cancer. Results of a prospective randomized FONICAP trial. Italian Lung Cancer Task Force. *Cancer* 1990; 66(1): 130-4.
46. Crino L, Tonato M, Darwish S et al. A randomized trial fo three cisplatin-containing regimens in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): a study of the Umbrian Lung Cancer Group. *Cancer Chemother Pharmacol* 1990; 26(1): 52-6.
47. Einhorn LH, Loehrer PJ, Williams SD et al. Random prospective study of vindesine versus vindesine plus high-dose cisplatin versus vindesine plus cisplatin plus mitomycin C in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1986; 4(7): 1037-43.
48. Elliott JA, Ahmedzai S, Hole D et al. Vindesine and cisplatin combination chemotherapy compared with vindesine as a single agent in the management of non-small cell lung cancer: a randomized study. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984; 20(8): 1025-32.
49. Sørensen JB, Hansen HH, Dombernowsky P et al. Chemotherapy for adenocarcinoma of the lung (WHO III): A randomized study of vindesine versus lomustine, cyclophosphamide, and methotrexate versus all four drugs. *J Clin Oncol* 1987; 5(8): 1169-77.
50. Bonomi PD, Finkelstein DM, Ruckdeschel JC et al. Combination chemotherapy versus single agents followed by combination chemotherapy in stage IV non-small-cell lung cancer: a study of the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 1989; 7(11): 1602-13.
51. Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. *BMJ* 1995; 311: 899–909.
52. NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group. Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-

- analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. *J Clin Oncol* 2008; 26(28): 4617-25.
53. Pujol JL, Barlesi F, Daures JP. Should chemotherapy combinations for advanced non-small cell lung cancer be platinum-based? A meta-analysis of phase III randomized trials. *Lung Cancer* 2006; 51(3): 335-45.
54. Delbaldo C, Michiels S, Syz N et al. Benefits of Adding a Drug to a Single-Agent or a 2-Agent Chemotherapy Regimen in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. A Meta-analysis. *JAMA* 2004; 292(4): 470-484.
55. Park JO, Kim SW, Ahn JS et al. Phase III trial of two versus four additional cycles in patients who are nonprogressive after two cycles of platinum-based chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25(33): 5233-9.
56. Rossi A, Chiodini P, Sun JM et al. Six versus fewer planned cycles of first-line platinum-based chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* 2014; 15(11): 1254-62.
57. Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M et al. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2002; 20(21): 4285-91.
58. Schiller JH, Harrington D, Belani CP et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2002; 346(2): 92-8.
59. SUKL – dostupné na: <http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php>; 2016.
60. Roila F, Herrstedt J, Aapro M et al. Guideline update for MASCC and ESMO in the prevention of chemotherapy- and radiotherapy-induced nausea and vomiting: results of the Perugia consensus conference. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 5: v232-43.
61. Klastersky J, de Naurois J, Rolston K et al. Management of febrile neutropaenia: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* 2016; 27(suppl 5): v111-v118.
62. Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(11): 847-57.
63. Gralla R, Harper P, Johnson S, Delgado FM. Vinorelbine (Navelbine) in the treatment of non-small-cell lung cancer: studies with single-agent therapy and in combination with cisplatin. *Ann Oncol* 1999; 10 Suppl 5: S41-5.
64. Bunn PA Jr, Kelly K. New chemotherapeutic agents prolong survival and improve quality of life in non-small cell lung cancer: a review of the literature and future directions. *Clin Cancer Res* 1998; 4(5): 1087-100.

65. Crawford J, O'Rourke M, Schiller JH et al. Randomized trial of vinorelbine compared with fluorouracil plus leucovorin in patients with stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14(10): 2774-84.
66. Wozniak AJ, Crowley JJ, Balcerzak SP et al. Randomized trial comparing cisplatin with cisplatin plus vinorelbine in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1998; 16(7): 2459-65.
67. Le Chevalier T, Pujol JL, Douillard JY et al. A three-arm trial of vinorelbine (Navelbine) plus cisplatin, vindesine plus cisplatin, and single-agent vinorelbine in the treatment of non-small cell lung cancer: an expanded analysis. *Semin Oncol* 1994; 21(5 Suppl 10): 28-33; discussion 33-4.
68. Piccirillo MC, Daniele G, Di Maio M et al. Vinorelbine for non-small cell lung cancer. *Expert Opin Drug Saf* 2010; 9(3): 493-510.
69. Barletta G, Genova C, Rijavec E et al. Oral vinorelbine in the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2014; 15(11): 1585-99.
70. Natale R. A ten-year review of progress in the treatment of non-small-cell lung cancer with gemcitabine. *Lung Cancer* 2005; 50 Suppl 1: S2-4.
71. Sederholm C, Hillerdal G, Lamberg K et al. Phase III trial of gemcitabine plus carboplatin versus single-agent gemcitabine in the treatment of locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: the Swedish Lung Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2005; 23(33): 8380-8.
72. Sandler AB, Nemunaitis J, Denham C et al. Phase III trial of gemcitabine plus cisplatin versus cisplatin alone in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18(1): 122-30.
73. Cardenal F, López-Cabrerizo MP, Antón A et al. Randomized phase III study of gemcitabine-cisplatin versus etoposide-cisplatin in the treatment of locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17(1): 12-8.
74. Crinò L, Scagliotti GV, Ricci S et al. Gemcitabine and cisplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: A randomized phase III study of the Italian Lung Cancer Project. *J Clin Oncol* 1999; 17(11): 3522-30.
75. Le Chevalier T, Scagliotti G, Natale R et al. Efficacy of gemcitabine plus platinum chemotherapy compared with other platinum containing regimens in advanced non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of survival outcomes. *Lung Cancer* 2005; 47(1): 69-80.
76. Rudd RM, Gower NH, Spiro SG et al. Gemcitabine plus carboplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in patients with stage IIIB or IV non-small-cell lung cancer: a phase III randomized study of the London Lung Cancer Group. *J Clin Oncol* 2005; 23(1): 142-53.

77. Danson S, Middleton MR, O'Byrne KJ et al. Phase III trial of gemcitabine and carboplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin or mitomycin, vinblastine, and cisplatin in patients with advanced nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2003; 98(3): 542-53.
78. Grigorescu AC, Draghici IN, Nitipir C et al. Gemcitabine (GEM) and carboplatin (CBDCA) versus cisplatin (CDDP) and vinblastine (VLB) in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) stages III and IV: a phase III randomised trial. *Lung Cancer* 2002; 37(1): 9-14.
79. Zatloukal P, Petruzella L, Zemanová M et al. Gemcitabine plus cisplatin vs. gemcitabine plus carboplatin in stage IIIb and IV non-small cell lung cancer: a phase III randomized trial. *Lung Cancer* 2003; 41(3): 321-31.
80. Nagel S, Califano R, Thatcher N, Blackhall F. Gemcitabine and carboplatin in combination for the treatment of advanced, metastatic, non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2007; 8(18): 3265-75.
81. Yu Y, Xu X, Du Z, Shi M. Non-platinum regimens of gemcitabine plus docetaxel versus platinum-based regimens in first-line treatment of advanced non-small cell lung cancer: a meta-analysis on 9 randomized controlled trials. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69(5): 1265-75.
82. Li C, Sun Y, Pan Y et al. Gemcitabine plus paclitaxel versus carboplatin plus either gemcitabine or paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer: a literature-based meta-analysis. *Lung* 2010; 188(5): 359-64.
83. Gridelli C, Gallo C, Shepherd FA et al. Gemcitabine plus vinorelbine compared with cisplatin plus vinorelbine or cisplatin plus gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the Italian GEMVIN Investigators and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2003; 21(16): 3025-34.
84. Ngeow J, Toh CK. The role of pemetrexed combined with gemcitabine for non-small-cell lung cancer. *Curr Drug Targets* 2010; 11(1): 61-6.
85. Kubota K, Kawahara M, Ogawara M et al. Vinorelbine plus gemcitabine followed by docetaxel versus carboplatin plus paclitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol* 2008; 9(12): 1135-42.
86. Weissman CH, Reynolds CH, Neubauer MA et al. A phase III randomized trial of gemcitabine-oxaliplatin versus carboplatin-paclitaxel as first-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2011; 6(2): 358-64.
87. Kumar A, Wakelee H. Second- and third-line treatments in non-small cell lung cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2006; 7(1): 37-49.

88. Brodowicz T, Krzakowski M, Zwitter M et al. Cisplatin and gemcitabine first-line chemotherapy followed by maintenance gemcitabine or best supportive care in advanced non-small cell lung cancer: a phase III trial. *Lung Cancer* 2006; 52(2): 155-63.
89. Pérol M, Chouaid C, Pérol D et al. Randomized, phase III study of gemcitabine or erlotinib maintenance therapy versus observation, with predefined second-line treatment, after cisplatin-gemcitabine induction chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30(28): 3516-24.
90. Zhang X, Zang J, Xu J et al. Maintenance therapy with continuous or switch strategy in advanced non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Chest* 2011; 140(1): 117-26.
91. Saloustros E, Georgoulas V. Docetaxel in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008; 8(8): 1207-22.
92. Roszkowski K, Pluzanska A, Krzakowski M et al. A multicenter, randomized, phase III study of docetaxel plus best supportive care versus best supportive care in chemotherapy-naive patients with metastatic or non-resectable localized non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer* 2000; 27(3): 145-57.
93. Kubota K, Watanabe K, Kunitoh H et al. Phase III randomized trial of docetaxel plus cisplatin versus vindesine plus cisplatin in patients with stage IV non-small-cell lung cancer: the Japanese Taxotere Lung Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2004; 22(2): 254-61.
94. Booton R, Lorigan P, Anderson H et al. A phase III trial of docetaxel/carboplatin versus mitomycin C/ifosfamide/cisplatin (MIC) or mitomycin C/vinblastine/cisplatin (MVP) in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial of the British Thoracic Oncology Group (BTOG). *Ann Oncol* 2006; 17(7): 1111-9.
95. Fossella F, Pereira JR, von Pawel J et al. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. *J Clin Oncol* 2003; 21(16):3016-24.
96. Georgoulas V, Androulakis N, Kotsakis A et al. Docetaxel versus docetaxel plus gemcitabine as front-line treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer: a randomized, multicenter phase III trial. *Lung Cancer* 2008; 59(1): 57-63.
97. Pallis AG, Agelaki S, Agelidou A et al. A randomized phase III study of the docetaxel/carboplatin combination versus docetaxel single-agent as second line treatment for patients with advanced/metastatic non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 633.

98. Georgoulas V, Ardavanis A, Agelidou A et al. Docetaxel versus docetaxel plus cisplatin as front-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomized, multicenter phase III trial. *J Clin Oncol* 2004; 22(13): 2602-9.
99. Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2000; 18(10): 2095-103.
100. Fossella FV, DeVore R, Kerr RN et al. Randomized phase III trial of docetaxel versus vinorelbine or ifosfamide in patients with advanced non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-containing chemotherapy regimens. The TAX 320 Non-Small Cell Lung Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 2000; 18(12): 2354-62.
101. Takeda K, Negoro S, Tamura T et al. Phase III trial of docetaxel plus gemcitabine versus docetaxel in second-line treatment for non-small-cell lung cancer: results of a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG0104). *Ann Oncol* 2009; 20(5): 835-41.
102. Schuette W, Nagel S, Blankenburg T et al. Phase III study of second-line chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer with weekly compared with 3-weekly docetaxel. *J Clin Oncol* 2005; 23(33): 8389-95.
103. Camps C, Massuti B, Jiménez A et al. Randomized phase III study of 3-weekly versus weekly docetaxel in pretreated advanced non-small-cell lung cancer: a Spanish Lung Cancer Group trial. *Ann Oncol* 2006; 17(3): 467-72.
104. Gridelli C, Gallo C, Di Maio M et al. A randomised clinical trial of two docetaxel regimens (weekly vs 3 week) in the second-line treatment of non-small-cell lung cancer. The DISTAL 01 study. *Br J Cancer* 2004; 91(12): 1996-2004.
105. Fidiás PM, Dakhil SR, Lyss AP et al. Phase III study of immediate compared with delayed docetaxel after front-line therapy with gemcitabine plus carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(4): 591-8.
106. Ramalingam S, Belani CP. Paclitaxel for non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2004; 5(8): 1771-80.
107. Ranson M, Davidson N, Nicolson M et al. Randomized trial of paclitaxel plus supportive care versus supportive care for patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(13): 1074-80.
108. Gatzemeier U, von Pawel J, Gottfried M et al. Phase III comparative study of high-dose cisplatin versus a combination of paclitaxel and cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18(19): 3390-9.

109. Bonomi P, Kim K, Fairclough D et al. Comparison of survival and quality of life in advanced non-small-cell lung cancer patients treated with two dose levels of paclitaxel combined with cisplatin versus etoposide with cisplatin: results of an Eastern Cooperative Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 2000; 18(3): 623-31.
110. Giaccone G, Splinter TA, Debruyne C et al. Randomized study of paclitaxel-cisplatin versus cisplatin-teniposide in patients with advanced non-small-cell lung cancer. The European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 1998; 16(6): 2133-41.
111. Lilenbaum RC, Herndon JE, List MA et al. Single-agent versus combination chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: the cancer and leukemia group B (study 9730). *J Clin Oncol* 2005; 23(1): 190-6.
112. Belani CP, Lee JS, Socinski MA et al. Randomized phase III trial comparing cisplatin-etoposide to carboplatin-paclitaxel in advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 2005; 16(7): 1069-75.
113. Kelly K, Crowley J, Bunn PA Jr et al. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol* 2001; 19(13): 3210-8.
114. Treat JA, Gonin R, Socinski MA et al. A randomized, phase III multicenter trial of gemcitabine in combination with carboplatin or paclitaxel versus paclitaxel plus carboplatin in patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2010; 21(3): 540-7.
115. Rosell R, Gatzemeier U, Betticher DC et al. Phase III randomised trial comparing paclitaxel/carboplatin with paclitaxel/cisplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a cooperative multinational trial. *Ann Oncol* 2002; 13(10): 1539-49.
116. Smit EF, van Meerbeeck JP, Lianes P et al. Three-arm randomized study of two cisplatin-based regimens and paclitaxel plus gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group-EORTC 08975. *J Clin Oncol* 2003; 21(21): 3909-17.
117. Kosmidis P, Mylonakis N, Nicolaidis C et al. Paclitaxel plus carboplatin versus gemcitabine plus paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 2002; 20(17): 3578-85.
118. Belani CP, Ramalingam S, Perry MC et al. Randomized, phase III study of weekly paclitaxel in combination with carboplatin versus standard every-3-weeks administration of

carboplatin and paclitaxel for patients with previously untreated advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(3): 468-73.

119. Blair HA, Deeks ED. Albumin-Bound Paclitaxel: A Review in Non-Small Cell Lung Cancer. *Drugs* 2015; 75(17): 2017-24.

120. Socinski MA, Bondarenko I, Karaseva NA et al. Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 2012; 30(17): 2055-62.

121. Tomasini P, Barlesi F, Mascoux C, Greillier L. Pemetrexed for advanced stage nonsquamous non-small cell lung cancer: latest evidence about its extended use and outcomes. *Ther Adv Med Oncol* 2016; 8(3): 198-208.

122. Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(21): 3543-51.

123. Grønberg BH, Bremnes RM, Fløtten O et al. Phase III study by the Norwegian lung cancer study group: pemetrexed plus carboplatin compared with gemcitabine plus carboplatin as first-line chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(19): 3217-24.

124. Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* 2004; 22(9): 1589-97.

125. Weiss JM, Stinchcombe TE. Second-Line Therapy for Advanced NSCLC. *Oncologist* 2013; 18(8): 947-53.

126. Cullen MH, Zatloukal P, Sörenson S et al. A randomized phase III trial comparing standard and high-dose pemetrexed as second-line treatment in patients with locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2008; 19(5): 939-45.

127. Ciuleanu T, Brodowicz T, Zielinski C et al. Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet* 2009; 374(9699): 1432-40.

128. Paz-Ares L, de Marinis F, Dediu M et al. Maintenance therapy with pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care after induction therapy with pemetrexed plus cisplatin for advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (PARAMOUNT): a double-blind, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(3): 247-55.

129. Paz-Ares LG, de Marinis F, Dediu M et al. PARAMOUNT: Final overall survival results of the phase III study of maintenance pemetrexed versus placebo immediately after induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2013; 31(23): 2895-902.
130. Thatcher N, Hirsch FR, Luft AV et al. Necitumumab plus gemcitabine and cisplatin versus gemcitabine and cisplatin alone as first-line therapy in patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer (SQUIRE): an open-label, randomised, controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16(7): 763-74.
131. Paz-Ares L, Socinski MA, Shahidi J et al. Correlation of EGFR-expression with safety and efficacy outcomes in SQUIRE: a randomized, multicenter, open-label, phase III study of gemcitabine-cisplatin plus necitumumab versus gemcitabine-cisplatin alone in the first-line treatment of patients with stage IV squamous non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2016; 27(8): 1573-9.
132. Svaton M. Současný stav a vyhlídky cílené léčby nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC). *Onkologie* 2016; 10(1): 15-18.
133. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(10): 947-57.
134. Savas P, Hughes B, Solomon B. Targeted therapy in lung cancer: IPASS and beyond, keeping abreast of the explosion of targeted therapies for lung cancer. *J Thorac Dis* 2013; 5(Suppl 5): S579–S592.
135. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y et al. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG3405): an open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010; 11(2): 121-8.
136. Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K et al. Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 2010; 362(25): 2380-8.
137. Douillard JY, Ostoros G, Cobo M et al. First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study. *Br J Cancer* 2014; 110(1): 55-62.
138. Kim ES, Hirsh V, Mok T et al. Gefitinib versus docetaxel in previously treated non-small-cell lung cancer (INTEREST): a randomised phase III trial. *Lancet* 2008; 372(9652): 1809-18.

139. Maruyama R, Nishiwaki Y, Tamura T et al. Phase III study, V-15-32, of gefitinib versus docetaxel in previously treated Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(26): 4244-52.
140. Thatcher N, Chang A, Parikh P et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet* 2005; 366(9496): 1527-37.
141. Rosell R, Carcereny E, Gervais R et al. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFRmutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012; 13(3): 239-46.
142. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(2): 123-32.
143. Ciuleanu T, Stelmakh L, Cicens S et al. Efficacy and safety of erlotinib versus chemotherapy in second-line treatment of patients with advanced, non-small-cell lung cancer with poor prognosis (TITAN): a randomised multicentre, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol* 2012; 13(3): 300-8.
144. Karampeazis A, Voutsina A, Souglakos J et al. Pemetrexed versus erlotinib in pretreated patients with advanced non-small cell lung cancer: a Hellenic Oncology Research Group (HORG) randomized phase 3 study. *Cancer* 2013; 119(15): 2754-64.
145. Kawaguchi T, Ando M, Asami K et al. Randomized phase III trial of erlotinib versus docetaxel as second- or third-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: Docetaxel and Erlotinib Lung Cancer Trial (DELTA). *J Clin Oncol* 2014; 32(18): 1902-8.
146. Garassino MC, Martelli O, Brogгинi M et al. Erlotinib versus docetaxel as second-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer and wild-type EGFR tumours (TAILOR): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2013; 14(10): 981-8.
147. Cappuzzo F, Ciuleanu T, Stelmakh L et al. Erlotinib as maintenance treatment in advanced non-small-cell lung cancer: a multicentre, randomised, placebo-controlled phase 3 study. *Lancet Oncol* 2010; 11(6): 521-9.
148. Coudert B, Ciuleanu T, Park K et al. Survival benefit with erlotinib maintenance therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) according to response to first-line chemotherapy. *Ann Oncol* 2012; 23(2): 388-94.

149. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 2013; 31(27): 3327-34.
150. Wu YL, Zhou C, Hu CP et al. Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring EGFR mutations (LUX-Lung 6): an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(2): 213-22.
151. Yang JC, Wu YL, Schuler M et al. Afatinib versus cisplatin-based chemotherapy for EGFR mutation-positive lung adenocarcinoma (LUX-Lung 3 and LUX-Lung 6): analysis of overall survival data from two randomised, phase 3 trials. *Lancet Oncol* 2015; 16(2): 141-51.
152. Svaton M, Pesek M. LUX-LUNG 7 – nový pohled na první linii u pacientů s častými EGFR mutacemi? *Akutální témata v onkologii očima českých lékařů* 2016; 1(4): 64-69.
153. Park K, Tan EH, O'Byrne K et al. Afatinib versus gefitinib as first-line treatment of patients with EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (LUX-Lung 7): a phase 2B, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17(5): 577-89.
154. Wang S, Song Y, Liu D. EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance. *Cancer Lett* 2016; 385: 51-54.
155. Skoulidis F, Papadimitrakopoulou VA. Targeting the Gatekeeper: Osimertinib in EGFR T790M Mutation-Positive Non-small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2017; 23(3): 618-622.
156. Jänne PA, Yang JC, Kim DW et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372(18): 1689-99.
157. Yang J, Ramalingam SS, Jänne PA et al. LBA2_PR: Osimertinib (AZD9291) in pre-treated pts with T790M-positive advanced NSCLC: updated Phase 1 (P1) and pooled Phase 2 (P2) results. *J Thorac Oncol* 2016; 11(4 Suppl): S152-3.
158. Mok TS, Wu YL, Ahn MJ et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376(7): 629-640.
159. Svaton M, Pesek M, Chudacek Z. Pokročilý karcinom plic jako chronické onemocnění. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL* 2015; 12(2): 4-7.
160. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2013; 368(25): 2385-94.
161. Solomon BJ, Mok T, Kim DW et al. First-line crizotinib versus chemotherapy in ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371(23): 2167-77.

162. Shaw AT, Kim DW, Mehra R et al. Ceritinib in ALK-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 370(13): 1189-97.
163. Kim DW, Mehra R, Tan DS et al. Activity and safety of ceritinib in patients with ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-1): updated results from the multicentre, open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(4): 452-63.
164. Crinò L, Ahn MJ, De Marinis F et al. Multicenter Phase II Study of Whole-Body and Intracranial Activity With Ceritinib in Patients With ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer Previously Treated With Chemotherapy and Crizotinib: Results From ASCEND-2. *J Clin Onco* 2016; 34(24): 2866-73.
165. Soria JC, Tan DS, Chiari R et al. First-line ceritinib versus platinum-based chemotherapy in advanced ALK-rearranged non-small-cell lung cancer (ASCEND-4): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet* 2017; 389(10072): 917-929.
166. Avrillon V, Pérol M. Alectinib for treatment of ALK-positive non-small-cell lung cancer. *Future Oncol* 2016. [Epub ahead of print]
167. Larkins E, Blumenthal GM, Chen H et al. FDA Approval: Alectinib for the Treatment of Metastatic, ALK-Positive Non-Small Cell Lung Cancer Following Crizotinib. *Clin Cancer Res* 2016; 22(21): 5171-5176.
168. Ou SH, Ahn JS, De Petris L et al. Alectinib in Crizotinib-Refractory ALK-Rearranged Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase II Global Study. *J Clin Oncol* 2016; 34(7): 661-8.
169. Shaw AT, Gandhi L, Gadgeel S et al. Alectinib in ALK-positive, crizotinib-resistant, non-small-cell lung cancer: a single-group, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(2): 234-42.
170. Svaton M, Pesek M, Grossmann P, Ferda J. ROS1 – další potencionální cíl našich pacientů. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2014; 74(6): 216-219.
171. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ et al. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2014; 371(21): 1963-71.
172. Sandler A, Gray R, Perry MC et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2006; 355(24): 2542-50.
173. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P et al. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAiL. *J Clin Oncol* 2009; 27(8): 1227-34.
174. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P et al. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAiL). *Ann Oncol* 2010; 21(9): 1804-9.

175. Raphael J, Chan K, Karim S et al. Antiangiogenic Therapy in Advanced Non-small-cell Lung Cancer: A Meta-analysis of Phase III Randomized Trials. *Clin Lung Cancer* 2017. pii: S1525-7304(17)30004-9.
176. Crinò L, Dansin E, Garrido P et al. Safety and efficacy of first-line bevacizumab-based therapy in advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (SAiL, MO19390): a phase 4 study. *Lancet Oncol* 2010; 11(8): 733-40.
177. Soria JC, Mauguén A, Reck M et al. Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2013; 24(1): 20-30.
178. Lopez-Chavez A, Young T, Fages S et al. Bevacizumab maintenance in patients with advanced non-small-cell lung cancer, clinical patterns, and outcomes in the Eastern Cooperative Oncology Group 4599 Study: results of an exploratory analysis. *J Thorac Oncol* 2012; 7(11): 1707-12.
179. Lynch TJ, Jahanzeb M, Spige DR et al. Cumulative exposure to bevacizumab (BV) after disease progression (PD) correlates with survival in non-small cell lung cancer (NSCLC): a time-dependent analysis the ARIES observational cohort study. *Ann Oncol* 2012; 23 (suppl 9): ix400-ix446.
180. Barlesi F, de Castro J, Dvornichenko V et al. AVAPERL (MO22089): Final Efficacy Outcomes for Patients (pts) With Advanced Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer (nsNSCLC) Randomised to Continuation Maintenance (mtc) with Bevacizumab (bev) or Bev + Pemetrexed (pern) After First-line (1L) Bev-cisplatin (cis)-pem Treatment (Tx). *European Journal of Cancer* 2011; 47, Supplement 2: 16.
181. Karayama M, Inui N, Fujisawa T et al. Maintenance therapy with pemetrexed and bevacizumab versus pemetrexed monotherapy after induction therapy with carboplatin, pemetrexed, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2016; 58: 30-7.
182. Bevacizumab or Pemetrexed Disodium Alone or In Combination After Induction Therapy in Treating Patients With Advanced Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer – dostupné na: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01107626>; 2016.
183. Zinner RG, Saxman SB, Peng G et al. Treatment rationale and study design for a randomized trial of pemetrexed/carboplatin followed by maintenance pemetrexed versus paclitaxel/carboplatin/bevacizumab followed by maintenance bevacizumab in patients with

- advanced non-small-cell lung cancer of nonsquamous histology. *Clin Lung Cancer* 2010; 11(5): 352-7.
184. Dhillon S. Nintedanib: A Review of Its Use as Second-Line Treatment in Adults with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer of Adenocarcinoma Histology. *Target Oncol* 2015; 10(2): 303-10.
185. Reck M, Kaiser R, Mellemaard A et al. Docetaxel plus nintedanib versus docetaxel plus placebo in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (LUME-Lung 1): a phase 3, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 2014; 15(2): 143-55.
186. Leventakos K, Mansfield AS. Advances in the Treatment of Non-small Cell Lung Cancer: Focus on Nivolumab, Pembrolizumab, and Atezolizumab. *BioDrugs* 2016; 30(5): 397-405.
187. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373(2): 123-35.
188. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373(17): 1627-39.
189. Herbst RS, Baas P, Kim DW et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10027): 1540-50.
190. Sul J, Blumenthal GM, Jiang X et al. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Patients With Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer Whose Tumors Express Programmed Death-Ligand 1. *Oncologist* 2016; 21(5): 643-50.
191. Langer CJ, Gadgeel SM, Borghaei H et al. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. *Lancet Oncol* 2016; 17(11): 1497-1508.
192. Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2016. [Epub ahead of print]
193. De Lima Lopes G, Wu YL, Sadowski S et al. P2.43: Pembrolizumab vs Platinum-Based Chemotherapy for PD-L1+ NSCLC: Phase 3, Randomized, Open-Label KEYNOTE-042 (NCT02220894): Track: Immunotherapy. *J Thorac Oncol* 2016; 11(10S): S244-S245.
194. FDA seznam schválených léků – dostupné na:
<http://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs>; 2016
195. Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* 2016; 387(10030): 1837-46.

196. Barlesi F, Park K, Ciardiello F et al. Primary analysis from OAK, a randomized phase III study comparing atezolizumab with docetaxel in 2L/3L NSCLC. *Ann Oncol* 2016; 27 (suppl_6): LBA44_PR.
197. Cortes AA, Urquizu LC, Hernando Cubero JH. Adjuvant chemotherapy in non-small cell lung cancer: state-of-the-art. *Transl Lung Cancer Res* 2015; 4(2): 191-7.
198. Pirker R. Adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2014; 3(5): 305-10.
199. He J, Shen J, Yang C et al. Adjuvant Chemotherapy for the Completely Resected Stage IB Nonsmall Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(22): e903.
200. Chuang JC, Neal JW, Niu XM, Wakelee HA. Adjuvant therapy for EGFR mutant and ALK positive NSCLC: Current data and future prospects. *Lung Cancer* 2015; 90(1): 1-7.
201. Salvà F, Felip E. Neoadjuvant chemotherapy in early-stage non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2013; 2(5): 398-402.
202. McElnay P, Lim E. Adjuvant or neoadjuvant chemotherapy for NSCLC. *J Thorac Dis* 2014; 6 Suppl 2: S224-7.
203. Kašák V a Koblížek V. *Naléhavé stavy v pneumologii. 2., rozš. vyd.* Praha: Maxdorf, 2009. Jessenius. ISBN 978-80-7345-185-1.
204. Guimaraes MD, Bitencourt AG, Marchiori E et al. Imaging acute complications in cancer patients: what should be evaluated in the emergency setting? *Cancer Imaging* 2014; 14: 18.
205. Macha HN, Becker KO, Kemmer HP. Pattern of failure and survival in endobronchial laser resection. A matched pair study. *Chest* 1994; 105(6): 1668-72.
206. Stratakos G, Gerovasili V, Dimitropoulos C et al. Survival and Quality of Life Benefit after Endoscopic Management of Malignant Central Airway Obstruction. *J Cancer* 2016; 7(7): 794-802.
207. Schumann C, Hetzel M, Babiak AJ et al. Endobronchial tumor debulking with a flexible cryoprobe for immediate treatment of malignant stenosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010; 139(4): 997-1000.
208. Lee SH, Choi WJ, Sung SW et al. Endoscopic cryotherapy of lung and bronchial tumors: a systematic review. *Korean J Intern Med* 2011; 26(2): 137-44.
209. Khemasuwan D, Mehta AC, Wang KP. Past, present, and future of endobronchial laser photoresection. *J Thorac Dis* 2015; 7(Suppl 4): S380-8.

210. Sachdeva A, Pickering EM, Lee HJ. From electrocautery, balloon dilatation, neodymium-doped:yttrium-aluminum-garnet (Nd:YAG) laser to argon plasma coagulation and cryotherapy. *J Thorac Dis* 2015; 7(Suppl 4): S363-79.
211. Herth FJ, Eberhardt R. Airway stent: what is new and what should be discarded. *Curr Opin Pulm Med* 2016; 22(3): 252-6.
212. Ranu H, Madden BP. Endobronchial stenting in the management of large airway pathology. *Postgrad Med J* 2009; 85(1010): 682-7.
213. American Thoracic Society. Management of malignant pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(5): 1987-2001.
214. Wilkes JD, Fidias P, Vaickus L, Perez RP. Malignancy-related pericardial effusion. 127 cases from the Roswell Park Cancer Institute. *Cancer* 1995; 76(8): 1377-87.
215. Macbeth F, Carter B, Noble S, Hood K. Further results of the FRAGMATIC trial of thromboprophylaxis in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5(3): 347-9.
216. Grohé C, Berardi R, Burst V. Hyponatraemia--SIADH in lung cancer diagnostic and treatment algorithms. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; 96(1): 1-8.
217. Svaton M, Fiala O, Pesek M et al. Predictive and Prognostic Significance of Sodium Levels in Patients with NSCLC Treated by Erlotinib. *Anticancer Res* 2014; 34(12): 7461-5.
218. Mirrakhimov AE. Hypercalcemia of Malignancy: An Update on Pathogenesis and Management. *N Am J Med Sci* 2015; 7(11): 483-93.
219. Scagliotti GV, Hirsh V, Siena S et al. Overall survival improvement in patients with lung cancer and bone metastases treated with denosumab versus zoledronic acid: subgroup analysis from a randomized phase 3 study. *J Thorac Oncol* 2012; 7(12): 1823-9.
220. Yamamoto M, Serizawa T, Shuto T et al. Stereotactic radiosurgery for patients with multiple brain metastases (JLGK0901): a multi-institutional prospective observational study. *Lancet Oncol* 2014; 15(4): 387-95.
221. Mulvenna P, Nankivell M, Barton R et al. Dexamethasone and supportive care with or without whole brain radiotherapy in treating patients with non-small cell lung cancer with brain metastases unsuitable for resection or stereotactic radiotherapy (QUARTZ): results from a phase 3, non-inferiority, randomised trial. *Lancet* 2016; 388(10055): 2004-2014.
222. Langlely RE, Stephens RJ, Nankivell M et al. Interim data from the Medical Research Council QUARTZ Trial: does whole brain radiotherapy affect the survival and quality of life of patients with brain metastases from non-small cell lung cancer? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2013; 25(3): e23-30.
223. Zhu CQ, Tsao MS. Prognostic markers in lung cancer: is it ready for prime time? *Transl*

Lung Cancer Res 2014; 3(3): 149-58.

224. Oldenhuis CN, Oosting SF, Gietema JA, de Vries EG. Prognostic versus predictive value of biomarkers in oncology. *Eur J Cancer* 2008; 44(7): 946-53.

225. Malottki K, Popat S, Deeks JJ et al. Problems of variable biomarker evaluation in stratified medicine research. A case study of ERCC1 in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2016; 92: 1-7.

226. Carter GC, Barrett AM, Kaye JA et al. A comprehensive review of nongenetic prognostic and predictive factors influencing the heterogeneity of outcomes in advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Manag Res* 2014; 6: 437-49.

227. van Meerbeeck JP, Janssens A. The seventh tumour-node-metastasis staging system for lung cancer: Sequel or prequel? *EJC Suppl* 2013; 11(2): 150-8.

228. Nakamura H, Ando K, Shinmyo T et al. Female gender is an independent prognostic factor in non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 2011; 17(5): 469-80.

229. Zhou W, Christiani DC. East meets West: ethnic differences in epidemiology and clinical behaviors of lung cancer between East Asians and Caucasians. *Chin J Cancer* 2011; 30(5): 287-92.

230. Pallis AG, Gridelli C. Is age a negative prognostic factor for the treatment of advanced/metastatic non-small-cell lung cancer? *Cancer Treat Rev* 2010; 36(5): 436-41.

231. Hirsch FR, Spreafico A, Novello S et al. The prognostic and predictive role of histology in advanced non-small cell lung cancer: a literature review. *J Thorac Oncol* 2008; 3(12): 1468-81.

232. Sarkaria IS, Pham D, Ghossein RA et al. SCCRO expression correlates with invasive progression in bronchioloalveolar carcinoma. *Ann Thorac Surg* 2004; 78(5): 1734-41.

233. Okada M. Subtyping lung adenocarcinoma according to the novel 2011 IASLC/ATS/ERS classification: correlation with patient prognosis. *Thorac Surg Clin* 2013; 23(2): 179-86.

234. Mountzios G, Dimopoulos MA, Soria JC et al. Histopathologic and genetic alterations as predictors of response to treatment and survival in lung cancer: a review of published data. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; 75(2): 94-109.

235. Birim O, Kappetein AP, van Klaveren RJ et al. Prognostic factors in non-small cell lung cancer surgery. *Eur J Surg Oncol* 2006; 32(1): 12-23.

236. Shien K, Papadimitrakopoulou VA, Wistuba II. Predictive biomarkers of response to PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2016; 99:

79-87.

237. Mitchell P, Mok T, Barraclough H et al. Smoking history as a predictive factor of treatment response in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review. *Clin Lung Cancer* 2012; 13(4): 239-51.
238. Patel AN, Simone CB 2nd, Jabbour SK. Risk factors and management of oligometastatic non-small cell lung cancer. *Ther Adv Respir Dis* 2016; 10(4): 338-48.
239. Ashworth AB, Senan S, Palma DA et al. An individual patient data metaanalysis of outcomes and prognostic factors after treatment of oligometastatic non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2014; 15(5): 346-55.
240. Deng XF, Liu QX, Zhou D et al. Bone marrow micrometastasis is associated with both disease recurrence and poor survival in surgical patients with node-negative non-small-cell lung cancer: a meta-analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015; 21(1): 21-7.
241. Coello MC, Luketich JD, Litle VR, Godfrey TE. Prognostic significance of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer* 2004; 5(4): 214-25.
242. Jakobsen KR, Demuth C, Sorensen BS, Nielsen AL. The role of epithelial to mesenchymal transition in resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5(2): 172-82.
243. Gkogkou C, Frangia K, Saif MW et al. Necrosis and apoptotic index as prognostic factors in non-small cell lung carcinoma: a review. *Springerplus* 2014; 3: 120.
244. Fleitas T, Martínez-Sales V, Gómez-Codina J et al. Circulating endothelial and endothelial progenitor cells in non-small-cell lung cancer. *Clin Transl Oncol* 2010; 12(8): 521-5.
245. Liu J, Dong M, Sun X et al. Prognostic Value of 18F-FDG PET/CT in Surgical Non-Small Cell Lung Cancer: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11(1): e0146195.
246. Novello S, Giaj Levra M, Vavalà T. Functional imaging in predicting response to antineoplastic agents and molecular targeted therapies in lung cancer: a review of existing evidence. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012; 83(2): 208-15.
247. Kumar V, Gu Y, Basu S et al. Radiomics: the process and the challenges. *Magn Reson Imaging* 2012; 30(9): 1234-48.
248. Brustugun OT. Hypoxia as a cause of treatment failure in non-small cell carcinoma of the lung. *Semin Radiat Oncol* 2015; 25(2): 87-92.
249. Remark R, Becker C, Gomez JE et al. The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(4): 377-90.

250. Sautès-Fridman C, Cherfils-Vicini J, Damotte D et al. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30(1): 13-25.
251. Yin Y, Wang J, Wang X et al. Prognostic value of the neutrophil to lymphocyte ratio in lung cancer: A meta-analysis. *Clinics (Sao Paulo)* 2015; 70(7): 524-30.
252. Jafri SH, Shi R, Mills G. Advance lung cancer inflammation index (ALI) at diagnosis is a prognostic marker in patients with metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC): a retrospective review. *BMC Cancer* 2013; 13: 158.
253. Suzuki K, Kachala SS, Kadota K et al. Prognostic immune markers in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2011; 17(16): 5247-56.
254. Fiala O, Pesek M, Finek J et al. High serum level of C-reactive protein is associated with worse outcome of patients with advanced-stage NSCLC treated with erlotinib. *Tumour Biol.* 2015; 36(12): 9215-22.
255. Watine J. Prognostic evaluation of primary non-small cell lung carcinoma patients using biological fluid variables. A systematic review. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60(4): 259-73.
256. Kanters SD, Lammers JW, Voest EE. Molecular and biological factors in the prognosis of non-small cell lung cancer. *Eur Respir J* 1995; 8(8): 1389-97.
257. Vitale C, D'Amato M, Calabrò P et al. Venous thromboembolism and lung cancer: a review. *Multidiscip Respir Med* 2015; 10(1): 28.
258. Crosbie PA, Shah R, Summers Y et al. Prognostic and predictive biomarkers in early stage NSCLC: CTCs and serum/plasma markers. *Transl Lung Cancer Res* 2013; 2(5): 382-97.
259. Grunnet M, Sorensen JB. Carcinoembryonic antigen (CEA) as tumor marker in lung cancer. *Lung Cancer* 2012; 76(2): 138-43.
260. Fiala O, Pesek M, Finek J et al. The role of neuron-specific enolase (NSE) and thymidine kinase (TK) levels in prediction of efficacy of EGFR-TKIs in patients with advanced-stage NSCLC [corrected]. *Anticancer Res* 2014; 34(9): 5193-8.
261. Fiala O, Pesek M, Finek J et al. Predictive role of CEA and CYFRA 21-1 in patients with advanced-stage NSCLC treated with erlotinib. *Anticancer Res* 2014; 34(6): 3205-10.
262. Frydrychowicz M, Kolecka-Bednarczyk A, Madejczyk M et al. Exosomes - structure, biogenesis and biological role in non-small-cell lung cancer. *Scand J Immunol* 2015; 81(1): 2-10.
263. Mollberg NM, Bennette C, Howell E et al. Lymphovascular invasion as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann Thorac Surg* 2014; 97(3): 965-71.
264. Wang J, Chen J, Chen X et al. Blood vessel invasion as a strong independent prognostic

- indicator in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6(12): e28844.
265. Salgia R. Prognostic significance of angiogenesis and angiogenic growth factors in nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2011; 117(17): 3889-99.
266. Liu HB, Wu Y, Lv TF et al. Skin rash could predict the response to EGFR tyrosine kinase inhibitor and the prognosis for patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(1): e55128.
267. Evans T. Utility of hypertension as a surrogate marker for efficacy of antiangiogenic therapy in NSCLC. *Anticancer Res* 2012; 32(11): 4629-38.
268. Reck M, Barlesi F, Crinò L et al. Predicting and managing the risk of pulmonary haemorrhage in patients with NSCLC treated with bevacizumab: a consensus report from a panel of experts. *Ann Oncol* 2012; 23(5): 1111-20.
269. Saunders MI. Predictive testing of radiosensitivity in non-small cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 1994; 10 Suppl 1: S83-90.
270. Palma DA, Senan S, Tsujino K et al. Predicting radiation pneumonitis after chemoradiation therapy for lung cancer: an international individual patient data meta-analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2013; 85(2): 444-50.
271. Sholl LM. Protein correlates of molecular alterations in lung adenocarcinoma: Immunohistochemistry as a surrogate for molecular analysis. *Semin Diagn Pathol* 2015; 32(5): 325-33.
272. Lopes GL, Vattimo EF, Castro Junior Gd. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *J Bras Pneumol* 2015; 41(4): 365-75.
273. Passiglia F, Bronte G, Castiglia M et al. Prognostic and predictive biomarkers for targeted therapy in NSCLC: for whom the bell tolls? *Expert Opin Biol Ther* 2015; 15(11): 1553-66.
274. Svaton M, Pesek M, Chudacek Z, Vosmiková H. Current two EGFR mutations in lung adenocarcinoma - case report. *Klin Onkol* 2015; 28(2): 134-7.
275. Fiala O, Pesek M, Finek J et al. Epidermal Growth Factor Receptor Gene Amplification in Patients with Advanced-stage NSCLC. *Anticancer Res* 2016; 36(1): 455-60.
276. Pirker R. EGFR-directed monoclonal antibodies in non-small cell lung cancer. *Target Oncol* 2013; 8(1): 47-53.
277. Galvani E, Peters GJ, Giovannetti E. EGF receptor-targeted therapy in non-small-cell lung cancer: role of germline polymorphisms in outcome and toxicity. *Future Oncol* 2012;

8(8): 1015-29.

278. Mengoli MC, Barbieri F, Bertolini F et al. K-RAS mutations indicating primary resistance to crizotinib in ALK-rearranged adenocarcinomas of the lung: Report of two cases and review of the literature. *Lung Cancer* 2016; 93: 55-8.

279. Faugeroux V, Pailler E, Auger N et al. Clinical Utility of Circulating Tumor Cells in ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol* 2014; 4: 281.

280. D'Arcangelo M, Wynes MW, Hirsch FR. The role of anaplastic lymphoma kinase inhibitors in the treatment of advanced nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2013; 25(2): 121-9.

281. Jiang L, Yang H, He P et al. Improving Selection Criteria for ALK Inhibitor Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer: A Pooled-Data Analysis on Diagnostic Operating Characteristics of Immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2016; 40(5): 697-703.

282. Li CM, Chu WY, Wong DL et al. Current and future molecular diagnostics in non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2015; 15(8): 1061-74.

283. D'Arcangelo M, D'Incecco A, Cappuzzo F. Rare mutations in non-small-cell lung cancer. *Future Oncol* 2013; 9(5): 699-711.

284. Rose-James A, Tt S. Molecular Markers with Predictive and Prognostic Relevance in Lung Cancer. *Lung Cancer Int* 2012; 2012: 729532.

285. Mar N, Vredenburg JJ, Wasser JS. Targeting HER2 in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2015; 87(3): 220-5.

286. Tiseo M, Gelsomino F, Alfieri R et al. FGFR as potential target in the treatment of squamous non small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* 2015; 41(6): 527-39.

287. Van Der Steen N, Giovannetti E, Pauwels P et al. cMET Exon 14 Skipping: From the Structure to the Clinic. *J Thorac Oncol* 2016; 11(9): 1423-32.

288. Finocchiaro G, Toschi L, Gianoncelli L et al. Prognostic and predictive value of MET deregulation in non-small cell lung cancer. *Ann Transl Med* 2015; 3(6): 83.

289. Zhao S, Qiu Z, He J et al. Insulin-like growth factor receptor 1 (IGF1R) expression and survival in non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(10): 6694-6704.

290. Yang Y, Luo J, Zhai X et al. Prognostic value of phospho-Akt in patients with non-small cell lung carcinoma: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2014; 135(6): 1417-24.

291. Li L, Liu D, Qiu ZX et al. The prognostic role of mTOR and p-mTOR for survival in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10(2): e0116771.

292. Garzón M, Villatoro S, Teixidó C et al. KRAS mutations in the circulating free DNA (cfDNA) of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5(5): 511-516.
293. Ricciuti B, Leonardi GC, Metro G et al. Targeting the KRAS variant for treatment of non-small cell lung cancer: potential therapeutic applications. *Expert Rev Respir Med* 2016; 10(1): 53-68.
294. Svaton M, Pesek M, Chudacek Z, Ferda J. Současné dvě řídící mutace u adenokarcinomu plic – kazuistika. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2013; 73(6): 230-235.
295. Svaton M, Fiala O, Pesek M et al. The Prognostic Role of KRAS Mutation in Patients with Advanced NSCLC Treated with Second- or Third-line Chemotherapy. *Anticancer Res* 2016; 36(3): 1077-82.
296. Fiala O, Pesek M, Finek J et al. The dominant role of G12C over other KRAS mutation types in the negative prediction of efficacy of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Genet* 2013; 206(1-2): 26-31.
297. Neuzillet C, Tijeras-Raballand A, de Mestier L et al. MEK in cancer and cancer therapy. *Pharmacol Ther* 2014; 141(2): 160-71.
298. Matikas A, Syrigos KN, Agelaki S. Circulating Biomarkers in Non-Small-Cell Lung Cancer: Current Status and Future Challenges. *Clin Lung Cancer* 2016; 17(6): 507-516.
299. Lianidou ES, Markou A, Strati A. The Role of CTCs as Tumor Biomarkers. *Adv Exp Med Biol* 2015; 867: 341-67.
300. Tognela A, Spring KJ, Becker T et al. Predictive and prognostic value of circulating tumor cell detection in lung cancer: a clinician's perspective. *Crit Rev Oncol Hematol* 2015; 93(2): 90-102.
301. Hu M, Hu Y, He J, Li B. Prognostic Value of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) in Lung Cancer: A Systematic Review with Meta-Analysis. *PLoS One* 2016; 11(1): e0147374.
302. Jiang H, Shao W, Zhao W. VEGF-C in non-small cell lung cancer: meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2014; 427: 94-9.
303. Krysan K, Reckamp KL, Sharma S, Dubinett SM. The potential and rationale for COX-2 inhibitors in lung cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2006; 6(3): 209-20.
304. Kilvaer TK, Paulsen EE, Hald SM et al. Lymphangiogenic Markers and Their Impact on Nodal Metastasis and Survival in Non-Small Cell Lung Cancer--A Structured Review with Meta-Analysis. *PLoS One* 2015; 10(8): e0132481.
305. Werynska B, Dziegiel P, Jankowska R. Role of lymphangiogenesis in lung cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 2009; 47(3): 333-42.

306. Hirsh V. Targeted treatments of bone metastases in patients with lung cancer. *Front Oncol* 2014; 4: 146.
307. Sterlacci W, Fiegl M, Tzankov A. Prognostic and predictive value of cell cycle deregulation in non-small-cell lung cancer. *Pathobiology* 2012; 79(4): 175-94.
308. Zhang LQ, Jiang F, Xu L et al. The role of cyclin D1 expression and patient's survival in non-small-cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Clin Lung Cancer* 2012; 13(3): 188-95.
309. Fennell DA, Summers Y, Cadranel J. Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Treat Rev* 2016; 44: 42-50.
310. Deben C, Deschoolmeester V, Lardon F et al. TP53 and MDM2 genetic alterations in non-small cell lung cancer: Evaluating their prognostic and predictive value. *Crit Rev Oncol Hematol* 2016; 99: 63-73.
311. Zhao XD, He YY, Gao J et al. High expression of Bcl-2 protein predicts favorable outcome in non-small cell lung cancer: evidence from a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(20): 8861-9.
312. Panani AD, Roussos C. Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Lett* 2006; 239(1): 1-9.
313. Li W, Tse LA, Wang F. Prognostic value of estrogen receptors mRNA expression in non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Steroids* 2015; 104: 129-36.
314. Boura P, Loukides S, Grapsa D et al. The diverse roles of adiponectin in non-small-cell lung cancer: current data and future perspectives. *Future Oncol* 2015; 11(15): 2193-203.
315. Ntikoudi E, Kiagia M, Boura P et al. Hormones of adipose tissue and their biologic role in lung cancer. *Cancer Treat Rev* 2014; 40(1): 22-30.
316. Wei MM, Zhou GB. Long Non-coding RNAs and Their Roles in Non-small-cell Lung Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2016; 14(5): 280-288.
317. Ricciuti B, Mencaroni C, Paglialunga L et al. Long noncoding RNAs: new insights into non-small cell lung cancer biology, diagnosis and therapy. *Med Oncol* 2016; 33(2): 18.
318. Wang Y, Zhang X, Liu L et al. Clinical implication of microRNA for lung cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2013; 28(4): 261-7.
319. Zandberga E, Kozirovskis V, Ābols A et al. Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2013; 52(4): 356-69.
320. Boeri M, Pastorino U, Sozzi G. Role of microRNAs in lung cancer: microRNA signatures in cancer prognosis. *Cancer J* 2012; 18(3): 268-74.

321. Markou A, Liang Y, Lianidou E. Prognostic, therapeutic and diagnostic potential of microRNAs in non-small cell lung cancer. *Clin Chem Lab Med* 2011; 49(10): 1591-603.
322. Skrzypski M, Dziadziuszko R, Jassem J. MicroRNA in lung cancer diagnostics and treatment. *Mutat Res* 2011; 717(1-2): 25-31.
323. Gao W, Xu J, Shu YQ. miRNA expression and its clinical implications for the prevention and diagnosis of non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Respir Med* 2011; 5(5): 699-709.
324. Slabý O a Svoboda M. MikroRNA v onkologii. Praha: Galén, 2012. ISBN 978-80-7262-587-1.
325. Wu X, Wu G, Yao X et al. The clinicopathological significance and ethnic difference of FHIT hypermethylation in non-small-cell lung carcinoma: a meta-analysis and literature review. *Drug Des Devel Ther* 2016; 10: 699-709.
326. Lou-Qian Z, Rong Y, Ming L et al. The prognostic value of epigenetic silencing of p16 gene in NSCLC patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(1): e54970.
327. Heller G, Zielinski CC, Zöchbauer-Müller S. Lung cancer: from single-gene methylation to methylome profiling. *Cancer Metastasis Rev* 2010; 29(1): 95-107.
328. Vendetti FP, Rudin CM. Epigenetic therapy in non-small-cell lung cancer: targeting DNA methyltransferases and histone deacetylases. *Expert Opin Biol Ther* 2013; 13(9): 1273-85.
329. Cuppens K, Vansteenkiste J. Vaccination therapy for non-small-cell lung cancer. *Curr Opin Oncol* 2014; 26(2): 165-70.
330. Xu F, Liu F, Zhao H et al. Prognostic Significance of Mucin Antigen MUC1 in Various Human Epithelial Cancers: A Meta-Analysis. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(50): e2286.
331. Berman AT, Simone CB. Immunotherapy in locally-advanced non-small cell lung cancer: releasing the brakes on consolidation? *Transl Lung Cancer Res* 2016; 5(1): 138-42.
332. Zhang C, Li J, Han Y, Jiang J. A meta-analysis for CXCR4 as a prognostic marker and potential drug target in non-small cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9: 3267-78.
333. Kerr KM, Tsao MS, Nicholson AG et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry in Lung Cancer: In what state is this art? *J Thorac Oncol* 2015; 10(7): 985-9.
334. Chae YK, Pan A, Davis AA et al. Biomarkers for PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer: Is PD-L1 Expression a Good Marker for Patient Selection? *Clin Lung Cancer* 2016; 17(5): 350-361.
335. Wang A, Wang HY, Liu Y et al. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol* 2015; 41(4): 450-6.

336. Pilotto S, Molina-Vila MA, Karachaliou N et al. Integrating the molecular background of targeted therapy and immunotherapy in lung cancer: a way to explore the impact of mutational landscape on tumor immunogenicity. *Transl Lung Cancer Res* 2015; 4(6): 721-7.
337. Gu X, Ma C, Yuan D, Song Y. *Transl Lung Cancer Res* 2012; 1(1): 36-44.
338. Wu H, Qi XW, Yan GN et al. Is CD133 expression a prognostic biomarker of non-small-cell lung cancer? A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9(6): e100168.
339. Qu H, Li R, Liu Z et al. Prognostic value of cancer stem cell marker CD133 expression in non-small cell lung cancer: a systematic review. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(11): 2644-50.
340. Gottschling S, Schnabel PA, Herth FJ, Herpel E. Are we missing the target? Cancer stem cells and drug resistance in non-small cell lung cancer. *Cancer Genomics Proteomics* 2012; 9(5): 275-86.
341. Zhu L, Yu H, Liu SY et al. Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2015; 10(4): e0124230.
342. Safranek J, Pesta M, Holubec L et al. Expression of MMP-7, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA in lung tissue of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and benign pulmonary disease. *Anticancer Res* 2009; 29(7): 2513-7.
343. Qian Q, Wang Q, Zhan P et al. The role of matrix metalloproteinase 2 on the survival of patients with non-small cell lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Cancer Invest* 2010; 28(6): 661-9.
344. Clark JC, Thomas DM, Choong PF et al. RECK--a newly discovered inhibitor of metastasis with prognostic significance in multiple forms of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2007; 26(3-4): 675-83.
345. Pesta M, Kulda V, Topolcan O et al. Significance of methylation status and the expression of RECK mRNA in lung tissue of patients with NSCLC. *Anticancer Res* 2009; 29(11): 4535-9.
346. Yang SL, Ren QG, Wen L, Hu JL. Clinicopathological and prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2016; 36(3): 321-7.
347. Tian Y, Liu Q, He X et al. Emerging roles of Nrf2 signal in non-small cell lung cancer. *J Hematol Oncol* 2016; 9: 14.
348. Cho HJ, Kim HR, Park YS et al. Prognostic value of survivin expression in stage III non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based therapy. *Surg Oncol* 2015; 24(4):

329-34.

349. Dai J, Yang L, Wang J et al. Prognostic Value of FOXM1 in Patients with Malignant Solid Tumor: A Meta-Analysis and System Review. *Dis Markers* 2015; 2015: 352478.
350. Lindquist D, Kvarnbrink S, Henriksson R, Hedman H. LRIG and cancer prognosis. *Acta Oncol* 2014; 53(9): 1135-42.
351. Hountis P, Matthaïos D, Froudarakis M et al. S100A2 protein and non-small cell lung cancer. The dual role concept. *Tumour Biol* 2014; 35(8): 7327-33.
352. Xu YH, Lu S. A meta-analysis of STAT3 and phospho-STAT3 expression and survival of patients with non-small-cell lung cancer. *Eur J Surg Oncol* 2014; 40(3): 311-7.
353. Gao Y, Ge G, Ji H. LKB1 in lung cancerigenesis: a serine/threonine kinase as tumor suppressor. *Protein Cell* 2011; 2(2): 99-107.
354. Fields AP, Regala RP. Protein kinase C iota: human oncogene, prognostic marker and therapeutic target. *Pharmacol Res* 2007; 55(6): 487-97.
355. Olaussen KA, Postel-Vinay S. Predictors of chemotherapy efficacy in non-small-cell lung cancer: a challenging landscape. *Ann Oncol* 2016; 27(11): 2004-2016.
356. Kim ES. Chemotherapy Resistance in Lung Cancer. *Adv Exp Med Biol* 2016; 893: 189-209.
357. Carnio S, Novello S, Papotti M et al. Prognostic and predictive biomarkers in early stage non-small cell lung cancer: tumor based approaches including gene signatures. *Transl Lung Cancer Res* 2013; 2(5): 372-81.
358. Sève P, Reiman T, Dumontet C. The role of betaIII tubulin in predicting chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010; 67(2): 136-43.
359. Liu Q, Yu Z, Xiang Y et al. Prognostic and predictive significance of thymidylate synthase protein expression in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Biomark* 2015; 15(1): 65-78.
360. Danesi R, Altavilla G, Giovannetti E, Rosell R. Pharmacogenomics of gemcitabine in non-small-cell lung cancer and other solid tumors. *Pharmacogenomics* 2009; 10(1): 69-80.
361. Wallerek S, Sørensen JB. Biomarkers for efficacy of adjuvant chemotherapy following complete resection in NSCLC stages I-IIIa. *Eur Respir Rev* 2015; 24(136): 340-55.
362. Deng Q, Yang H, Lin Y et al. Prognostic value of ERCC1 mRNA expression in non-small cell lung cancer, breast cancer, and gastric cancer in patients from Southern China. *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(12): 8312-21.
363. Besse B, Olaussen KA, Soria JC. ERCC1 and RRM1: ready for prime time? *J Clin Oncol* 2013; 31(8): 1050-60.

364. Gachechiladze M, Skarda J. The role of BRCA1 in non-small cell lung cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2012; 156(3): 200-3.
365. Chae YK, Pan A, Davis AA et al. Biomarkers for PD-1/PD-L1 Blockade Therapy in Non-Small-cell Lung Cancer: Is PD-L1 Expression a Good Marker for Patient Selection? *Clin Lung Cancer* 2016; 17(5): 350-361.
366. Liu Y, Yin TJ, Zhou R et al. Expression of thymidylate synthase predicts clinical outcomes of pemetrexed-containing chemotherapy for non-small-cell lung cancer: a systemic review and meta-analysis. *Cancer Chemother Pharmacol* 2013; 72(5): 1125-32.
367. Han Y, Liu J, Sun M et al. A Significant Statistical Advancement on the Predictive Values of ERCC1 Polymorphisms for Clinical Outcomes of Platinum-Based Chemotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer: An Updated Meta-Analysis. *Dis Markers* 2016; 2016: 7643981.
368. Qiu M, Yang X, Hu J et al. Predictive value of XPD polymorphisms on platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(8): e72251.
369. Shen XY, Lu FZ, Wu Y et al. XRCC3 Thr241Met polymorphism and clinical outcomes of NSCLC patients receiving platinum-based chemotherapy: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013; 8(8): e69553.
370. Burotto M, Thomas A, Subramaniam D et al. Biomarkers in early-stage non-small-cell lung cancer: current concepts and future directions. *J Thorac Oncol* 2014; 9(11): 1609-17.
371. Yu Y, He J. Molecular classification of non-small-cell lung cancer: diagnosis, individualized treatment, and prognosis. *Front Med* 2013; 7(2): 157-71.
372. Petrosyan F, Daw H, Haddad A et al. Gene expression profiling for early-stage NSCLC. *Am J Clin Oncol* 2015; 38(1): 103-7.
373. Kuner R. Lung Cancer Gene Signatures and Clinical Perspectives. *Microarrays (Basel)* 2013; 2(4): 318-39.
374. Subramaniam J, Simon R. What should physicians look for in evaluating prognostic gene-expression signatures? *Nat Rev Clin Oncol* 2010; 7(6): 327-34.
375. Labots M, Schütte LM, van der Mijn JC et al. Mass spectrometry-based serum and plasma peptidome profiling for prediction of treatment outcome in patients with solid malignancies. *Oncologist* 2014; 19(10): 1028-39.
376. Qian HH, Xu TS, Cai XQ et al. Prognostic value of TTF-1 expression in patients with non-small cell lung cancer: A meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2015; 451(Pt B): 208-14.
377. Lindskog C, Edlund K, Mattsson JS, Micke P. Immunohistochemistry-based prognostic biomarkers in NSCLC: novel findings on the road to clinical use? *Expert Rev Mol Diagn*

2015; 15(4): 471-90.

378. Jakobsen JN, Sørensen JB. Clinical impact of ki-67 labeling index in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2013; 79(1): 1-7.

379. Lindquist D, Kvarnbrink S, Henriksson R, Hedman H. LRIG and cancer prognosis. *Acta Oncol* 2014; 53(9): 1135-42.

380. Lim MY, Thomas PS. Biomarkers in Exhaled Breath Condensate and Serum of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Non-Small-Cell Lung Cancer. *Int J Chronic Dis* 2013; 2013: 578613.

381. Svaton M, Kulda V, Mukensnabl P et al. Vliv exprese vybraných protein kódujících genů a mikroRNA na riziko relapsu plicních adenokarcinomů stadia I. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2017; 77(3): 93-103.

382. Kulda V, Svaton M, Mukensnabl P et al. Predictive significance of miR-34a, miR-224 and miR-342 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung undergoing palliative chemotherapy. *Oncology Letters* 2017 – v tisku.

383. Evropská léková agentura (EMA) – dostupné z:

http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/004164/human_med_002068.jsp&mid=WC0b01ac058001d124; 3/3017.

384. Interdisciplinární konsenzus prediktivního molekulárně genetického vyšetřování u NSCLC 2016 – dostupné z: www.pneumologie.cz/upload/1481623430.pdf; 2016.

385. Harmonizace IHC vyšetřování exprese PD-L1 u nádorů plic v referenčních laboratořích v České republice – dostupné z: www.patologie.info/soubor/.../28-Konsenzus_RL_k_metodice_testovani_PD-L1.pdf; 2016.

386. Svaton M. Afatinib – cílená léčba nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC) druhé generace. *Postgraduální medicína* 2014; 16(2): 219-224.

387. Svaton M. Systémová léčba adenokarcinomu plic. *Onkologie* 2016; 10(suppl. B): B21-B24.

388. Garon EB, Ciuleanu TE, Arrieta O et al. Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet* 2014; 384(9944): 665-73.

7 Seznam obrazů, tabulek a schémat

Obrazy

Číslo 1 – CHT vs. BSC v 1. linii léčby NSCLC

Číslo 2 – Přežití při podání 3 či 4 cyklů léčby platinovým doubletem vůči 6 cyklům

Číslo 3 – Porovnání přežití u režimů kombinujících platinový derivát s cytostatikem 3. generace

Číslo 4 – Přežití u pacientů léčených platinovým doublety – porovnání cisplatinu a carboplatinu v jednotlivých podskupinách

Číslo 5 – Docetaxel vs. BSC ve 2. linii léčby NSCLC

Číslo 6 – OS pacientů s pokročilými nedlaždicovými NSCLC léčených pamatrexedem + cisplatinou vs. gemcitabinem + cisplatinou

Číslo 7 – Výsledky OS ze studie PARAMOUNT – kontinuální udržovací léčba pemetrexedem vs. placebem

Číslo 8 – OS pro režim cisplatinu + gemcitabin +/- necitimumab u pacientů s SCC s EGFR expresí v 1. linii léčby

Číslo 9 – PFS pro EGFR mutované pacienty ve studii IPASS (paclitaxel + carboplatina vs. gefitinib)

Číslo 10 – PFS u 1. linie léčby erlotinibem vs. platinovým-doubletem u EGFR + pacientů ve studii EURTAC

Číslo 11 – OS v 2. a 3. linii léčby ve studii BR.21 srovnávají erlotinib s BSC

Číslo 12 – Srovnání PFS afatinibu vs. cisplatinu + pemetrexedu v 1. linii léčby u EGFR + (tzv. časté mutace) pacientů ve studii LUX-LUNG 3

Číslo 13 – PFS pro 1. linii léčby crizotinibem vs. cisplatinou/carboplatinou + pemetrexedem u ALK + pacientů

Číslo 14 – PFS pro 2. linii léčby crizotinibem vs. pemetrexedem/docetaxelem u ALK + pacientů

Číslo 15 – Výsledky OS v režimu paclitaxel + carboplatina +/- bevacizumab ve studii ECOG 4599

Číslo 16 – OS ve 2. linii léčby NSCLC studie REVEL – ramucirumab + docetaxel vs. docetaxel

Číslo 17 – OS ve 2. linii léčby ACC – studie LUE-lung 1 – nintedanib + docetaxel vs. docetaxel

Číslo 18 – OS ve studii CHeckmate 017 – nivolumab vs. docetaxel ve 2. linii léčby SCC

Číslo 19 – OS ve studii CHeckmate 057 – nivolumab vs. docetaxel ve 2. linii léčby nonSCC

Číslo 20 – OS ve studii KEYNOTE 10 (pembrolizumab vs – docetaxel)

Číslo 21 – Výsledky OS ze studie fáze II POPLAR (atezolizumab vs. docetaxel ve 2. a 3. linii léčby)

Číslo 22 – Významné tyrozinkinázové dráhy u NSCLC

Číslo 23 A+B – A) OS CHT vs. CHT + sekvenční RT; B) OS dle režimu CHT

Číslo 24 A+B+C – A) OS dle hladiny miR-342-3p ve skupině kuřáků; B) OS dle hladiny miR-34a ve skupině pacientů léčených CHT s gemcitabinem; C) OS dle hladiny miR-224 ve skupině pacientů léčených CHT a RT

Číslo 25 OS v jednotlivých skupinách pacientů dle exprese miR-224 a miR-342

Číslo 26 OS ve skupinách A + D vs. B + C

Číslo 27 OS u skupiny se zvýšenou či sníženou expresí miR-224, miR-342 a miR-34a vs. ostatní kombinace exprese těchto miRNA

Tabulky

Číslo 1 – TNM klasifikace karcinomu plic

Číslo 2 – Stážování karcinomu plic

Číslo 3 – Klinické vlastnosti 1. souboru pacientů

Číslo 4 – Popis celé 2. skupiny pacientů dle TNM klasifikace (včetně stádia tumoru) a histologie

Číslo 5 – Popis podskupiny pacientů, kteří obdrželi adjuvantní CHT – popis dle TNM klasifikace (včetně stádia tumoru) a histologie

Číslo 6 – Klinicko-patologické charakteristiky 3. souboru pacientů (n=81)

Číslo 7 – Vztah mezi hladinou daného markeru a OS

Schémata

Číslo 1 – Určení rozsahu chirurgického výkonu na základě kardiopulmonální rezervy

Číslo 2 – Modrá kniha – doporučení pro léčbu 1. linie NSCLC stadia IV v ČR

8 Přednášková a publikační činnost autora

Přednášky

- 1) **Svaton M**, Krakorova G, Pesek M, Chudacek Z, Kreuzberg B. *Neobvyklý průběh myxoidního sarkomu – kazuistika* Presentováno na XX. Západočeských pneumoonkologických dnech, Darová, 9.11. 2012 a na Kazuistických sděleních z pneumologie a ftizeologie, Praha, 7.12. 2012.
- 2) **Svaton M**. *CHOPN – cesta k cílené léčbě* (kazuistika). Presentováno na: Speakers training, Rančičov u Jihlavy, 12.4.2013.
- 3) **Svaton M**. *Challenges in NSCLC diagnosis*. Presentováno na: Presentation Skills Training Workshop, Vienna, 19-20.4.2013.
- 4) **Svaton M**, Pesek M., Krakorova G, Pesta M, Kulda V, Safranek J. *Opravné geny - prediktivní/prognostický marker u NSCLC?* Presentováno na XXI. Západočeských pneumoonkologických dnech, Darová, 9.11.2013.
- 5) **Svaton M**, Pesek M, Ferda J. *Lymfangioleiomyomatóza – cesta do nitra buněk*. Presentováno na Kazuistických sděleních z pneumologie a ftizeologie, Praha, 6.12.2013.
- 6) **Svaton M**, Fiala O, Pesek M, Bruha F, Mukensnabl P, Racek J, Minarik M, Bortlizek Z. *Prediktivní a prognostický význam natremie u pacientů s NSCLC léčených erlotinibem*. Presentováno na Brněnských onkologických dnech 2014 (24-25.4. 2014) a na 54. Studentské vědecké konferenci (15.5. 2014, Plzeň).
- 7) **Svaton M**, Fiala O, Pesek M, Bruha F, Mukensnabl P, Racek J, Minarik M, Bortliceck. *Predictive and prognostic significance of sodium levels in patients with NSCLC treated by Erlotinib*. Presentováno na ETOP meeting, 14-15.11.2014, Vienna.
- 8) **Svaton M**, Pesek M, Chudacek Z. *Vícečetné mutace u EGFR+ pacientů*. Presentováno na XXII. Západočeských pneumoonkologických dnech, Darová, 16-17.10. 2014.
- 9) **Svaton M**, Pesek M, Chudacek Z. *Tumor – chronické onemocnění*. Presentováno na Kazuistických sděleních z pneumologie a ftizeologie, Praha, 5.12. 2014.
- 10) **Svaton M**. *Možnosti a perspektivy cílené léčby u dlaždicových karcinomů*. Presentováno na Prague Onco, Praha, 23.1. 2015.

- 11) **Svaton M**, Fiala O, Pesek M, Bortlicek Z, Minarik M, Benesova L - *Prognostický význam KRAS mutace u pacientů s pokročilým NSCLC léčených 2. nebo 3. linií chemoterapie*. Prezentováno na XXIII. Západočeských pneumoonkologických dnech, Darová, 5-6.11. 2015.
- 12) **Svaton M**, Pesek M, Kakorova G. *Crizotinib jako účinná léčba pacientky s ROS1 translokací*. Prezentováno na XXIII. Západočeských pneumoonkologických dnech, Darová, 5-6.11. 2015.
- 13) **Svaton M**, Pesek M. *Nádorové rebiopsie*. Prezentováno na XXIII. Západočeských pneumoonkologických dnech, Darová, 5-6.11. 2015.
- 14) **Svaton M**, Pesek M, Chudacek Z. *Tumorlety vs. plicní metastázy u pacienta s melanomem*. Prezentováno na Postgraduálních lékařských dnech v Plzni, 9.2. 2016.
- 15) **Svaton M**, Kulda V, Mukensnabl P, Topolcan O, Pesek M, Fiala O, Rousarova M, Pesta M. *Vliv vybraných RNA a microRNA v histologických tkáňových vzorcích na riziko relapsu plicních adenokarcinomů stadia I*. Prezentováno na XXIV. Západočeských pneumoonkologických dnech, Darová, 3-4.11. 2016.
- 16) **Svaton M**, Kulda V, Mukensnabl P, Topolcan O, Pesek M, Fiala O, Pesta M. *Vliv microRNA v histologických tkáňových vzorcích na predikci efektu paliativní chemoterapie u dlaždicového plicního karcinomu*. Prezentováno na XXIV. Západočeských pneumoonkologických dnech, Darová, 3-4.11. 2016.
- 17) **Svatoň M**. *Nintedanib v druhé linii léčby pacientů s adenokarcinomem*. Prezentováno na XXIV. Západočeských pneumoonkologických dnech, Darová, 3-4.11. 2016

Postery

- 1) **Svaton M**, Rehor L, Kulda V, Pesta M, Safranek O, Topolcan M, Pesek M. *Prognostic significance of TIMP-1 in non-small cell lung cancer*. 13th Central European Lung Cancer Conference, Prague, 24.-27.6. 2012.
- 2) **Svaton M**, Pesek M, Chudacek Z, Ferda J. *Současné dvě řídicí mutace u adenokarcinomu plic – kazuistika*. XVIII. kongres SPFS a ČPFS, Horný Smokovec – Vysoké Tatry, 12.-14.6. 2013
- 3) **Svaton M**, Krakorova G, Pesek M. *Tolernace léčby afatinibem na našem souboru pacientů*. II. kongres ČPFS, Olomouc, 18.-20.9. 2014.

- 4) **Svaton M**, Pesek M, Chudacek Z, Vosmikova H. *Současné dvě EGFR mutace u adenokarcinomu plic – kazuistika*. II. kongresu ČPFS, Olomouc, 18.-20.9. 2014.
- 5) **Svaton M**, Pesek M, Mukensnabl P, Spidlen V. *Tumor Rebiopsy – Guide to Targeted Therapy*. Jubilee world congress to the 80th anniversary of the founding of the ICS, Praha a Plzeň, 9-12.9. 2015 a Pneumouupdate Prague 24-25.6. 2016.
- 6) **Svaton M**, Fiala O, Pesek M, Bortlicek Z, Minarik M, Benesova L. *The Prognostic Role of KRAS Mutation in Patients with Advanced NSCLC Treated with Second or Third-line Chemotherapy*. CELCC 2015, Praha , 28-30.11. 2015 – oceněno jako nejlepší poster.
- 7) **Svaton M**, Kulka V, Hrda K, Fiala O, Mukensnabl P, Pesek M, Pesta M. *Prognostic significance of miR-34a and miR-224 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung undergoing palliative chemotherapy*. XXIII. Jihočeské onkologické dny, Český Krumlov, 20-22.10. 2016 + WCLC 2016, Vídeň, 4-7.12.2016.

Články

a) Impaktované

- 1) **Svaton M**, Fiala O, Pesek M, Bruha F, Mukensnabl P, Racek J, Minarik M, Bortlicek Z. Predictive and Prognostic Significance of Sodium Levels in Patients with NSCLC Treated by Erlotinib. *Anticancer Res* 2014; 34(12): 7461-5.
- 2) Fiala O, Pesek M, Finek J, **Svaton M**, Sorejs O, Bortlicek Z, Kucera R, Topolcan O. Prognostic Significance of Serum Tumor Markers in Patients with Advanced-stage NSCLC Treated with Pemetrexed-based Chemotherapy. *Anticancer Res* 2016; 36(1): 461-6.
- 3) Fiala O, Pesek M, Finek J, Minarik M, Benesova L, Sorejs O, **Svaton M**, Bortlicek Z, Kucera R, Topolcan O. Epidermal Growth Factor Receptor Gene Amplification in Patients with Advanced-stage NSCLC. *Anticancer Res* 2016; 36(1): 455-60.
- 4) Fiala O, Pesek M, Finek J, **Svaton M**, Minarik M, Benesova L, Bortlicek Z, Kucera R, Topolcan O. Pemetrexed Versus Erlotinib in the Second-line Treatment of Patients with Advanced-stage Non-squamous NSCLC Harboring Wild-type EGFR Gene. *Anticancer Res* 2016; 36(1): 447-53.
- 5) **Svaton M**, Fiala O, Pesek M, Bortlicek Z, Minarik M, Benesova L, Topolcan O. The Prognostic Role of KRAS Mutation in Patients with Advanced NSCLC Treated with Second- or Third-line Chemotherapy. *Anticancer Res* 2016; 36(3): 1077-82.

6) Fiala O, Pesek M, Finek J, Topolcan O, Racek J, **Svaton M**, Kucera R, Minarik M, Benesova L, Bortlicek Z, Chloupkova R, Poprach A, Buchler T. Change in Serum Lactate Dehydrogenase Is Associated with Outcome of Patients with Advanced-stage NSCLC Treated with Erlotinib. *Anticancer Res* 2016; 36(5): 2459-65.

7) Fiala O, Pesek M, Skrickova J, Kolek V, Salajka F, Tomiskova M, Satankova M, Kultan J, Kuliskova J, **Svaton M**, Hrniciarik M, Hejduk K, Chloupkova R, Topolcan O, Hornychova H, Nova M, Ryska A, Finek J. Thyroid transcription factor 1 expression is associated with outcome of patients with non-squamous non-small cell lung cancer treated with pemetrexed-based chemotherapy. *Tumour Biol* 2017; 39(2): 1010428317691186.

8) Kulda V, **Svaton M**, Mukensnabl P et al. Predictive significance of miR-34a, miR-224 and miR-342 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the lung undergoing palliative chemotherapy. *Oncology Letters* 2017 – v tisku.

b) Recenzované

1) **Svaton M**, Krakorova G, Pesek M, Chudacek Z, Ferda J. Neobvykly průběh myxoidního sarkomu. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL* 2013; 10(1): 14-18.

2) **Svaton M**, Pesek M, Ferda J. Lymfangioleiomyomatóza – cesta do nitra buněk. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL* 2013; 10(3): 3-8.

3) **Svaton M**, Pesek M, Chudacek Z, Ferda J. Současné dvě řídicí mutace u adenokarcinomu plic – kazuistika. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2013; 73(6): 230-235.

4) **Svaton M**. Afatinib – cílená léčba nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC) druhé generace. *Postgraduální medicína* 2014; 16(2): 219-224.

5) Krakorova G, **Svaton M**. Afatinib – nový ireverzibilní tyrozinkinázový inhibitor v klinické praxi. *Remedia* 2014; 24(2): 130-135.

6) **Svaton M**, Pesek M, Krakorova G, Kulda V, Safranek J, Pesta M. Prognostický význam ERCC1, RRM1 a BRCA1 u chirurgicky léčených pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2014; 74(3): 85-92.

7) **Svaton M**, Krakorova G, Pesek M. Tolernace léčby afatinibem na našem souboru pacientů. *Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL* 2014; 11(3-4): 35-37.

8) **Svaton M**, Pesek M, Grossmann P, Ferda J. ROS1 – další potencionální cíl našich pacientů. *Studia pneumologica et phtiseologica* 2014; 74(6): 216-219.

- 9) **Svaton M**, Pesek M, Chudacek Z. Pokročilý karcinom plic jako chronické onemocnění. Kazuistiky v alergologii, pneumologii a ORL 2015; 12(2): 4-7.
- 10) **Svaton M**, Pesek M, Chudacek Z, Vosmiková H. Current two EGFR mutations in lung adenocarcinoma - case report. Klin Onkol 2015; 28(2): 134-7.
- 11) **Svaton M**, M. Pesek M. Uspěšná terapie české pacientky s ROS1 translokací crizotinibem. Klin onkol 2016; 29(1): 63-65.
- 12) **Svaton M**. Současný stav a vyhlídky cílené léčby nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC). Onkologie 2016; 10(1): 15-18.
- 13) **Svaton M**. Nintedanib - zajímavá možnost pro druhou linii u pacientů s plicními adenokarcinomy. Acta medicae - Kazuistiky v onkologii a hematooonkologii 2016; 5(3): 18-20.
- 14) **Svaton M**, Pesek M. Koincidence tumorletů a metastatického postižení plic u pacientky s anamnézou maligního melanomu. Studia pneumologica et phtiseologica 2016; 76(2): 52-55.
- 15) **Svaton M**. Systémová léčba adenokarcinomu plic. Onkologie 2016; 10(suppl. B): B21-B24.
- 16) **Svaton M**, Pesek M. LUX-LUNG 7 – nový pohled na první linii u pacientů s častými EGFR mutacemi? Akutální témata v onkologii očima českých lékařů 2016; 1(4): 64-69.
- 17) **Svaton M**, Pesek M, Mukensnabl P, Spidlen V. Tumor rebiopsy – Guide to targeted therapy. Eur Surg 2016; 48(Suppl 3): S194-S196.
- 18) **Svaton M**, Kulda V, Mukensnabl P, Topolcan O, Pesek M, Dvorak P, Fiala O, Milena Rousarova M, Hrda K, Pesta M. Vliv exprese vybraných protein kódujících genů a mikroRNA na riziko relapsu plicních adenokarcinomů stadia 1. Studia pneumologica et phtiseologica 2017; 77(3): 93-103.