

UNIVERZITA KARLOVA

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

DISERTAČNÍ PRÁCE

2017

MUDr. Ivan Trávníček

UNIVERZITA KARLOVA

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

Urologická klinika



DISERTAČNÍ PRÁCE

MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE NÁDORŮ LEDVIN V KLINICKÉM VYUŽITÍ

MUDr. Ivan Trávníček

Školitel: prof. MUDr. Milan Hora, Ph.D., MBA.

V Plzni 23.2.2017

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracoval samostatně a vyznačil zde všechny prameny, ze kterých jsem čerpal. Jsem si vědom následků nepravdivosti těchto údajů.

V Plzni 23.2.2017

.....

MUDr. Ivan Trávníček

Souhrn

Cíl: Cílem práce je identifikovat možné tkáňové biomarkery ke zhodnocení efektu sunitinibu v léčbě metastatického světlobuněčného renálního karcinomu.

Materiál a metody: Retrospektivně hodnocená studie. Ze 119 pacientů léčených v naší nemocnici cílenou léčbou pro metastatický karcinom ledviny (mRCC) od 2005 do 2012 bylo 45 vhodných k další analýze. Z nich 42 (93,3%) bylo světlobuněčných (CCRCC), jeden papilární (PRCC), jeden chromofóbní (CHRCC) a jeden neklasifikovaný RCC. Ze skupiny mCCRCC bylo 40 léčeno sunitinibem, u 14 pacientů (32,6%) byl sunitinib podán po selhání léčby cytokiny (INF- α a IL-2), u 4 pacientů (10%) byl sunitinib druhou linií po sorafenibu. Při operačním výkonu pro primární tumor byly odebrány vzorky tkáně tumoru a zdravého parenchymu ledviny, následně byly vyšetřeny imunohistochemicky a semikvantitativně byla hodnocena přítomnost sledovaných biomarkerů: mTOR, p53, VEGF, HIF1, HIF2, CAIX. Průměrná míra exprese tkáňových markerů byla hodnocena ve vztahu k odpovědi tumoru na podávanou léčbu, ve skupinách pacientů bez odpovědi na léčbu (progrese) a pacientů s odpovědí na léčbu (stabilní onemocnění či regrese tumoru), hodnocení při první kontrole po zahájení léčby po 3 až 7 měsících. Výsledky jsme hodnotili pomocí Studentova T-testu.

Výsledky: Statisticky významný rozdíl byl v expresi v tkáni tumoru oproti zdravé tkáni u skupiny bez progrese u mTOR (4% vs. 16,7%; $p < 0,05$), p53 (4% vs. 12,7%; $p < 0,05$), VEGF (62,7% vs. 45%; $p < 0,01$), CAIX (45% vs. 15,33%; $p < 0,01$). Statisticky významný rozdíl mezi tumorem a zdravou tkání byl v expresi p53 a CAIX také ve skupině s progresí onemocnění (3% vs. 21,3%; $p < 0,05$ respektive 36,3% vs. 12%; $p < 0,05$). V porovnání skupin pacientů s odpovědí na léčbu a s progresí onemocnění nebyl nalezen statisticky významný rozdíl mezi testovanými tkáněmi. Statisticky významný rozdíl byl také v porovnání četnosti vysoké exprese znaku mezi tkání tumoru a zdravou tkání (více než 60%) u VEGF (65% vs. 35%; $p < 0,05$) a CAIX (42% vs. 8%; $p < 0,01$) ve skupině bez progrese. CAIX je významně více exprimována ve tkáni tumoru oproti zdravé tkáni ve všech skupinách.

Závěr: Významně vyšší exprese VEGF ve tkáni tumoru oproti zdravé tkáni ledviny může predikovat lepší odpověď na podávání sunitinibu a naopak vysoká exprese VEGF ve zdravé tkáni ledviny může být prediktorem horší odpovědi na léčbu.

Summary

Aim: To identify tissue biomarker that are predictive of the therapeutic effect of sunitinib in treatment of metastatic clear cell renal cell carcinoma (mCRCC).

Material and methods: Our study included 39 patients with mCRCC; these were selected from 119 patients who received sunitinib in our hospital between the years 2005 – 2012 according to inclusion criteria of the study. Patients were stratified into two groups based on their response to sunitinib treatment; non-responders (progression), and responders (stable disease, regression). The effect of treatment was measured by comparing imaging studies performed before the initiation of treatment, with those done between 3rd and 7th months of treatment. Histological samples of tumour tissue and healthy renal parenchyma, acquired during surgery of the primary tumour, were examined with immunohistochemistry to detect tissue biomarkers (mTOR, p53, VEGF, HIF1, HIF2, CAIX). The average levels of biomarker expression in both, tumour tissue, as well as in healthy renal parenchyma were compared between the two groups of patients. Results were evaluated using Student's T-test.

Results: When considering the results of the group of responders, statistically significant differences in marker expression in tumour tissue versus healthy parenchyma were found for mTOR (4% vs. 16.7%; $p=0,01031$), p53 (4% vs. 12,7%; $p=0,042019$), VEGF (62,7% vs. 45%; $p=0,019836$) and CAIX (45% vs. 15,33%; $p=0,001624$). A further significant difference was found in the frequency of high expression (more than 60%) between tumour tissue and healthy parenchyma in VEGF (65% vs. 35%; $p=0,026487$) and CAIX (42% vs. 8%; $p=0,003328$). In the group of non-responders, a statistically significant difference was evident in p53 a VEGF expression in tumour versus healthy tissue (3% vs. 21.3%; $p=0,02824$ resp. 36.3% vs. 12%; $p=0,011921$).

Conclusion: A significantly higher expression of VEGF in CRCC in comparison to healthy parenchyma, can predict a better response to sunitinib. On the other hand, the high expression of VEGF in healthy renal parenchyma can predict worse response to treatment.

Obsah

1	Úvod.....	14
2	Cíl práce.....	22
3	Molekulární biologie nádorového růstu u renálního karcinomu.....	23
3.1	Obecná biologie maligních tumorů.....	23
3.2	Buněčný cyklus.....	26
3.3	Mechanismy reparace DNA.....	27
3.4	„Hallmarks“ nádorového onemocnění.....	28
4	Metody molekulární diagnostiky.....	32
4.1	Preanalytická fáze.....	32
4.2	Imunohistochemie.....	32
4.3	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	35
4.4	Polymerázová řetězová reakce.....	37
4.5	DNA sekvenování.....	38
5	Genetické vlastnosti renálního karcinomu.....	40
5.1	Světlobuněčný renální karcinom.....	41
5.2	Papilární renální karcinom.....	44
5.3	Chromofóbní renální karcinom.....	49
5.4	Karcinom ze sběrných kanálků a medulární renální karcinom.....	51
5.5	Renální karcinom spojený se získanou cystózou ledvin.....	52
5.6	Mucinózní tubulární a vřetenobuněčný renální karcinom.....	52
5.7	Sukcinát dehydrogenáza (SDH) - deficientní renální karcinom.....	52
5.8	Tubulocystický renální karcinom.....	53
5.9	MiT Translokační renální karcinomy (TRCC).....	54
5.9.1	Xp11.2 translokační renální karcinom.....	54
5.9.2	6p21 translokační renální karcinom.....	57
5.10	Hereditární syndromy spojené s renálními tumory.....	58
5.10.1	Von Hippel-Lindau nemoc (VHL).....	58
5.10.2	Hereditární papilární renální karcinom (HPRCC).....	58
5.10.3	Renální karcinom spojený se syndromem hereditární leiomyomatózy a renálního karcinomu (HLRCC-RCC).....	59
5.10.4	Birt-Hogg-Dubé syndrom.....	59

5.10.5	Tuberózní skleróza	60
5.10.6	Další vzácné syndromy spojené s renálními tumory	60
6	Signální dráhy renálního karcinomu	63
6.1	PI3K/Akt/mTOR signální cesta	64
6.2	RAS/RAF/MEK/ERK.....	66
6.3	Signální dráha JAK/STAT	68
6.4	Signální dráha NOTCH	68
7	Systémová léčba metastatického renálního karcinomu	69
7.1	Imunoterapie.....	70
7.1.1	Interleukin-2	70
7.1.2	Interferon- α (INF- α).....	70
7.2	Cílená léčba.....	72
7.2.1	Monoklonální protilátky	73
7.2.2	Tyrosinkinázové inhibitory	74
7.2.3	Inhibitory mTOR.....	78
7.2.4	Inhibice PD-1/PD-L1	80
8	Možnosti predikce účinnosti cílené léčby.....	83
8.1	Prediktivní nomogramy.....	83
8.2	Markery stanovované z tkáně tumoru.....	83
8.2.1	Alterace VHL (von Hippel-Lindau) genu	83
8.2.2	HIF- α (hypoxií indukovaný faktor - α).....	84
8.2.3	Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a VEGF receptor (VEGFR).....	85
8.2.4	Karboanhydráza IX (CAIX).....	86
8.2.5	PI3K/Akt/mTOR signální cesta	86
8.3	Markery stanovované v periferní krvi.....	88
8.3.1	Cirkulující VEGF	88
8.3.2	Cirkulující CAIX.....	88
8.3.3	NGAL (Neutrophil gelatinase associated lipocalin)	88
8.3.4	CRP (C-reaktivní protein).....	89
8.3.5	Trombocytóza a leukocytóza	89
8.3.6	Cirkulující endoteliální buňky.....	89
8.4	miRNA (mikroRNA)	90
8.5	Markery stanovované v moči	91
8.6	Další	91

9	Experimentální část	93
9.1	Cíl	93
9.2	Materiál a metody	93
9.3	Výsledky	97
9.4	Shrnutí	99
10	Závěr	100

Seznam zkratek

ABC – ATB-binding cassette
ACD-RCC – acquired cystic disease – associated RCC
AKT-PKB – protein kinase B
ALK – anaplastic lymphoma kinase
AMPK – AMP-activated protein kinase
ASR-W – age specific rates – world
ATM – ataxia-teleangiectasia mutated
ATR – ataxia-teleangiectasia and Rad3-related
BAP – BRCA associated protein
BER – báзовé excizní reparace
BHD – Birt-Hogg-Dubé
BRCA – breast cancer
CAIX – carboanhydrase IX
CCRCC – clear cell renal cell carcinoma
CDC – collecting duct carcinoma
CDK – cyclin-dependent kinase
CEP – centromeric enumeration probes
CFOS – lidský protoonkogen
CISH – chromogenní in situ hybridizace
CK7 – cytokeratin 7
CNS – centrální nervový systém
DNA – deoxyribonucleic acid
dNTP – deoxynukleosid trifosfát
DSS – disease specific survival
EGFR – epidermal growth factor receptor
ERK – extracellular signal-related kinase
ESKD – end-stage kidney disease
FDA – U.S. Food and Drug Administration
FFPE – formalin-fixed paraffin-embedded
FGF2 – fibroblast growth factor 2
FH – fumarat hydratase
FISH – fluorescenční in situ hybridizace

FLCN – folikulin
FLT1 – gen kódující vascular endothelial growth factor receptor
GLUT1 – glucose transporter 1
HE – hematoxylin-eosin
HGF/cMet – hepatocyte growth factor
HIF – hypoxia inducible factor
HLRCC – hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome
HR – homologous replication
HRAS – Harvey RAS
CHK – check-point kinase
CHRCC – chromophobe renal cell carcinoma
IHC – imunohistochemie
IL-2 – interleukin 2
INF- α – interferon α
ISUP – The International Society of Urological Pathology
JAK – Janus activated kinase
JUN – jeden z transkripčních faktorů
KDR – kinase insert domain receptor
KRAS – Kirstern RAS
LOH – loss of heterozygosity
LSI – locus specific identifier
MAPK – mitogen activated protein kinase
MAPK – mitogen-activated protein kinase
MDR – multidrug resistance
MEK – mitogen-activated protein kinase ERK kinase 1
MGMT – O⁶-methylguanosin metyltransferase
MHC – major histocompatibility complex
miRNA – micro-ribonucleic acid
MiT – microphthalmia-associated transcription
MMR – mismatch repair system
mRCC – metastatic renal cell carcinoma
mTOR – mammalian target of rapamycine
MUC1 – mucin 1
MVP/LRP – major vault protein/lung resistance-related protein

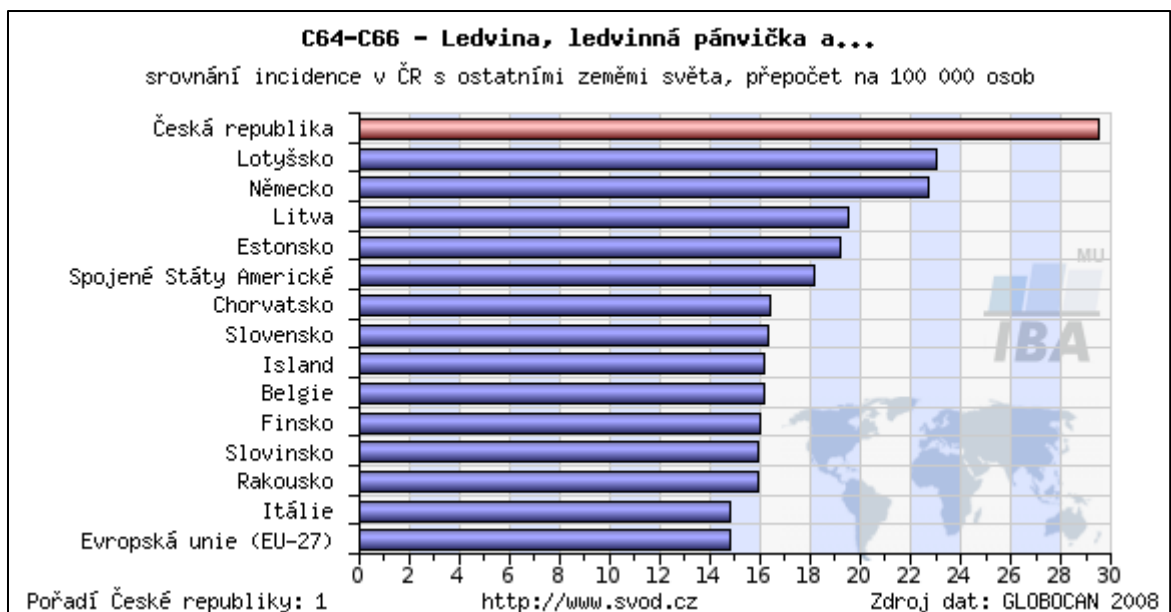
MYC – jeden z transkripčních faktorů
NER – nukleotidové excizní reparace
NGS – next generation sequencing
NHEJ – non-homologous joining
NK – natural killers
NOS – not other specified
NOTCH – signální dráha regulace sebeobnovy buněk
NRAS – neuroblastoma RAS
OS – overall survival
p53 – protein 53
PARP1 – poly (ADP-ribose) polymerase 1
PBRM1 – polybromo 1
PCR – polymerase chain reaction
PD-1 – programmed death 1
PDGF – platelet derived growth factor
PDGFβ – platelet derived growth factor
PD-L1 – programmed death ligand 1
PFS – progression free survival
PHD – prolyl hydroxylase
PI3K – phosphatidyl inositol 3 kinase
PRCC – papillary renal cell carcinoma
PTEN – phosphatase and tensin homologue
RAF – RAS associated factor
RAS – rat adenosarcoma
RB-1 – retinoblastoma 1
RMC – renal medullary carcinoma
RNA – ribonucleic acid
RT-PCR – reverse transcription PCR
SDH – succinate dehydrogenase
SDH – sukcinyl dehydrogenáza B
SMRT – single molecule real-time
STAT – signal transducer and activator of transcription
TCRCC – tubulocystic renal cell carcinoma
TERC – telomerase RNA komponent

TERT – telomerase reverse transcriptase
TFE – transkripční faktor E
TGF α – transforming growth factor α
TSC – tuberous sclerosis complex
VEGF – vascular endothelial growth factor
VEGFR – VEGF receptor
VHL – Von Hippel-Lindau
WCP – whole chromosome painting
WHO – World Health Organisation
2SC – 2-sukcino cystein

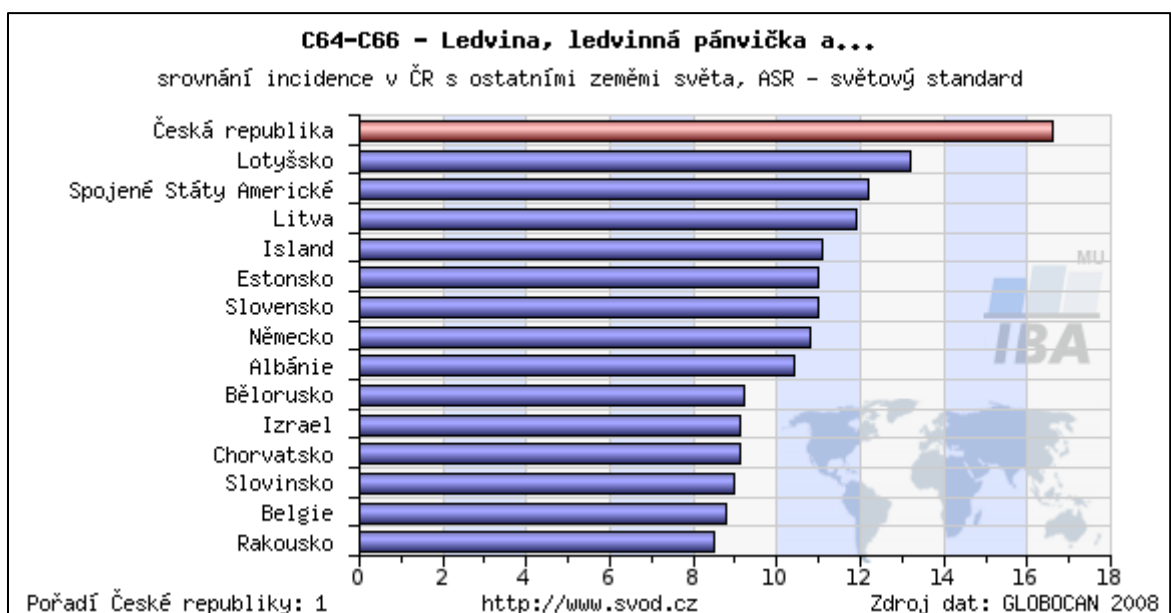
Molekulární biologie nádorů ledvin v klinickém využití

1 Úvod

Incidence zhoubných nádorů ledvin celosvětově narůstá. Nádory ledvin představují 2,4% všech ročně hlášených nádorů celosvětově a 3,8% v Evropě s incidencí přepočtenou na světový standard (ASR-W) 11,6 na 100 tisíc a rok (data za rok 2012) (1). V České republice je však incidence dlouhodobě nejvyšší a dosahuje hodnoty 30,0 absolutně (obrázek 1), v přepočtu na světový standard pak 15,4, data za rok 2014 (obrázek 2) (2). Nárůst incidence je převážně na vrub zvyšujícímu se záchytu nádorů ve stadiu I (T1N0M0), kterých v roce 2001 bylo 29,2% ze všech hlášených zhoubných nádorů ledviny a v roce 2014 již 54,6% (obrázek 3 a 4). Rozdíly v incidenci ostatních stádií nejsou tak markantní. Dlouhodobě však činí incidence zhoubných nádorů ledviny stádia IV, tedy lokálně pokročilých nebo metastazovaných, přibližně jednu pětinu. V období od roku 2000 do roku 2014 je průměrné zastoupení stadia IV v celkové incidenci 18,9% (obrázek 3 a 4) (2). Zhoubné nádory ledvin jsou onemocněním převážně starší populace s maximem incidence v 6. až 7. dekádě života (obrázek 5). V rámci České republiky je dlouhodobě nejvyšší incidence v Plzeňském a Jihočeském kraji a na Vysočině (obrázek 6). Mortalita u nádorů ledvin dlouhodobě klesá, v roce 2000 dosahovala 7,21 úmrtí na 100 tisíc a rok (ASR-W), v roce 2014 pak již 4,8 (obrázek 7). Z pohledu hrubé mortality nepřepočítané na světový standard rozdíl není tak výrazný, v roce 2000 činila mortalita 12,5 a v roce 2014 pak 11,1 na 100 tisíc a rok. Rozdílnější je však hrubá incidence, 23,2 v roce 2000 a 30,0 v roce 2014 (obrázek 8). Trendu klesající mortality je dosaženo především nárůstem incidence nižších stádií nádorů a také možností jejich efektivní chirurgické léčby. Uvedené trendy se odráží na změně indexu mortalita/incidence, který při hodnocení u všech stádií souhrnně má dlouhodobě klesající trend (obrázek 9) a v roce 2014 byl 0,37. Mortalita nádorů metastazovaných je však dlouhodobě vysoká a index mortalita/incidence u generalizovaných onemocnění je také dlouhodobě téměř neměnný. V roce 2000 tak odpovídal hodnotě 0,89 a v roce 2014 hodnotě 0,86 (obrázek 10).



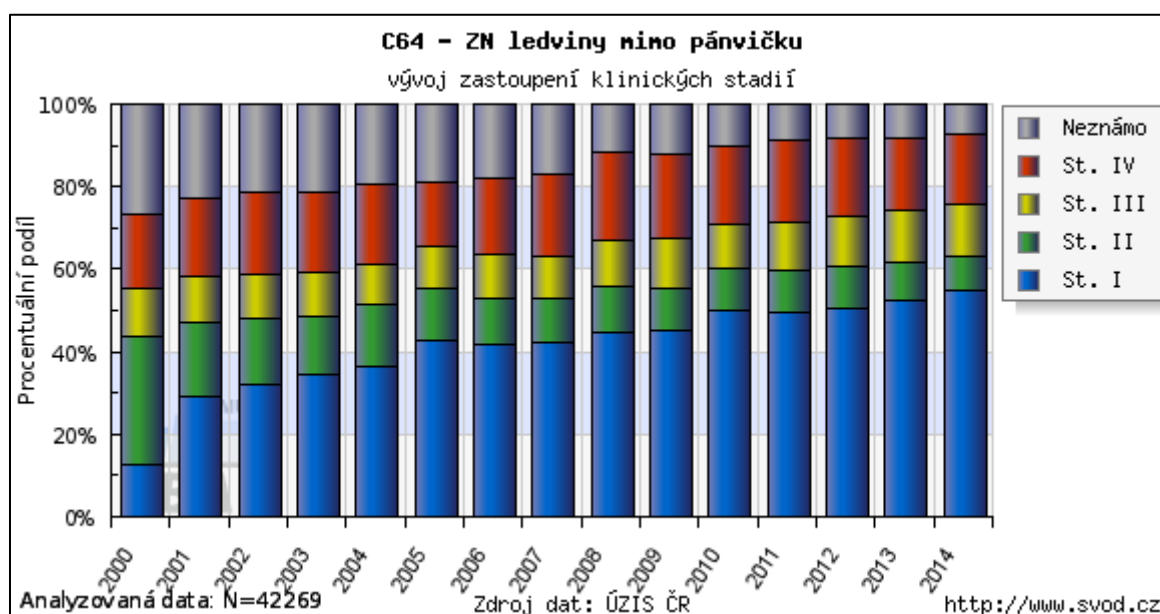
Obrázek 1 - Srovnání incidence se zahraničím



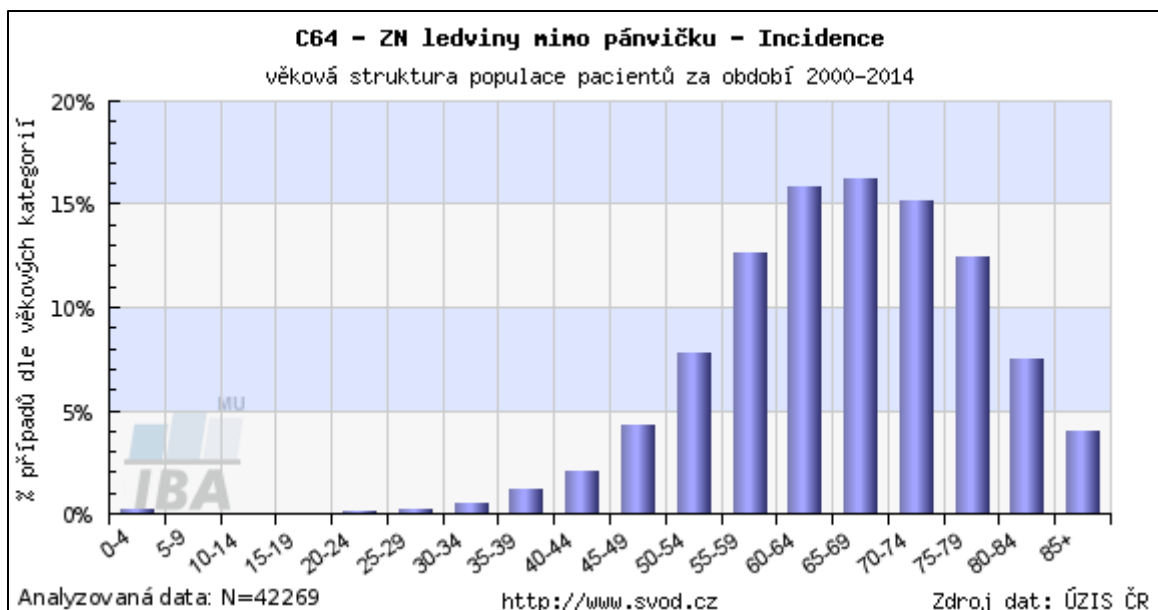
Obrázek 2 - Srovnání incidence se zahraničím dle ASR-W

Rok	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	průměr
Stadium I (%)	12.9	29.1	32.2	34.7	36.3	42.5	41.8	42.2	44.7	45.1	50.2	49.6	50.3	52.5	54.6	42.1%
Stadium II (%)	30.7	17.9	15.7	14	15.3	13	11.2	10.8	11	10.2	10.1	10.1	10.2	9.1	8.4	12.8%
Stadium III (%)	11.6	11	11	10.6	9.4	9.8	10.8	10	11.2	12.2	10.7	11.9	12.2	12.8	12.5	11.2%
Stadium IV (%)	18.1	19.2	19.6	19.6	19.7	15.9	18.2	19.9	21.6	20.3	19	19.7	18.9	17.2	17.3	18.9%
Stadium neznámo (%)	26.7	22.7	21.6	21.2	19.3	18.8	18.1	17.1	11.5	12.3	10.1	8.8	8.3	8.5	7.1	15%

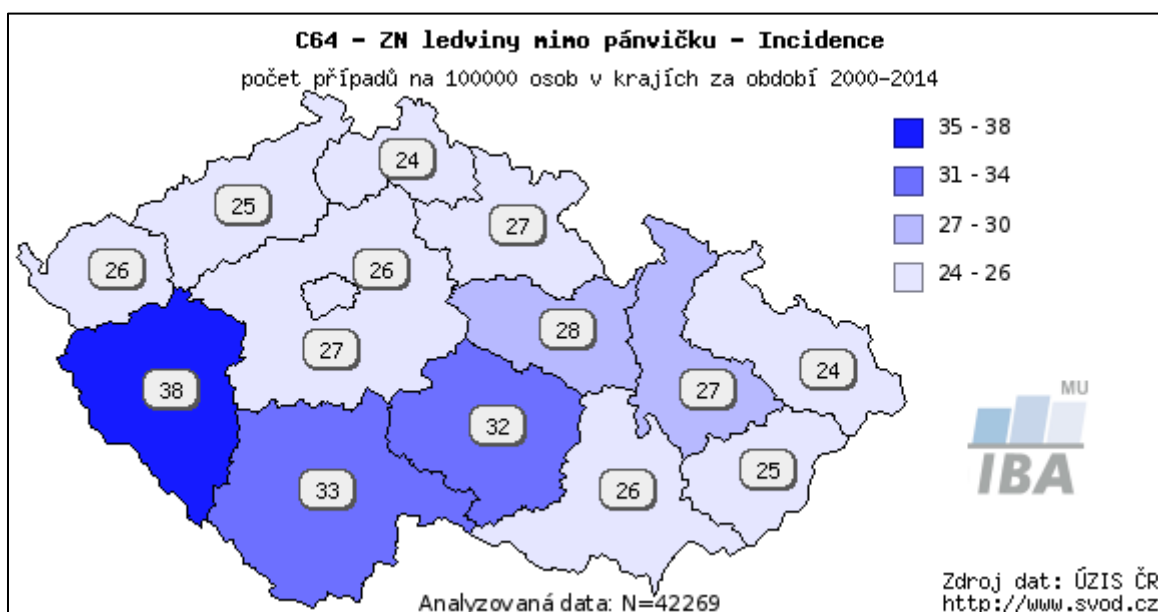
Obrázek 3 - Nárůst incidence stadia I, vyrovnaná incidence stadia IV, pokles nádorů bez zhodnocení stadia



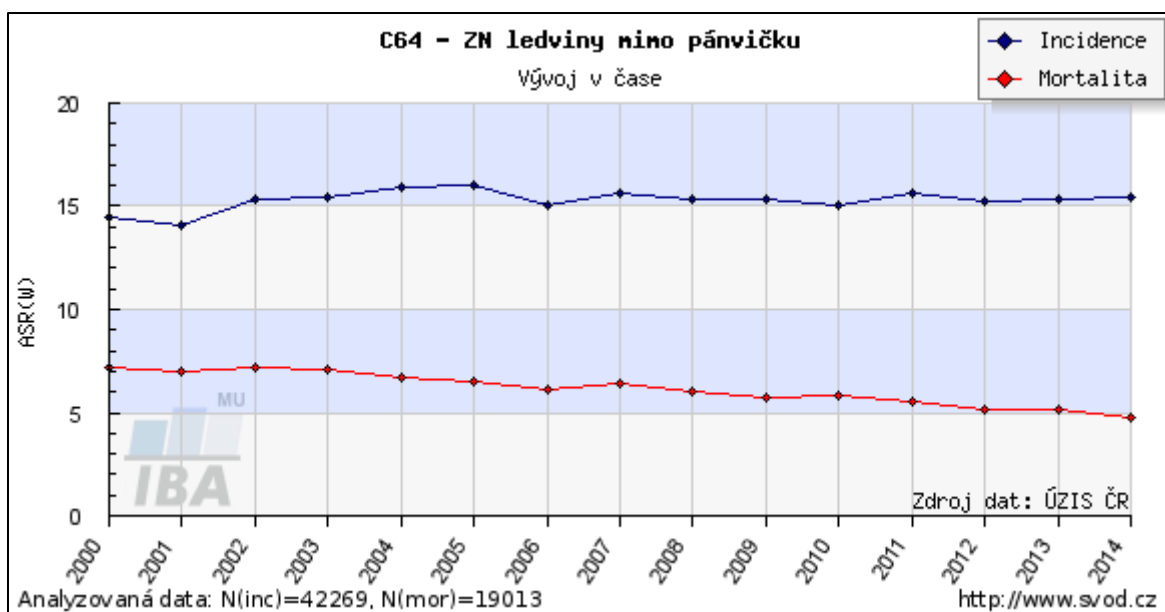
Obrázek 4 - Vývoj zastoupení klinických stadií nádorů ledvin



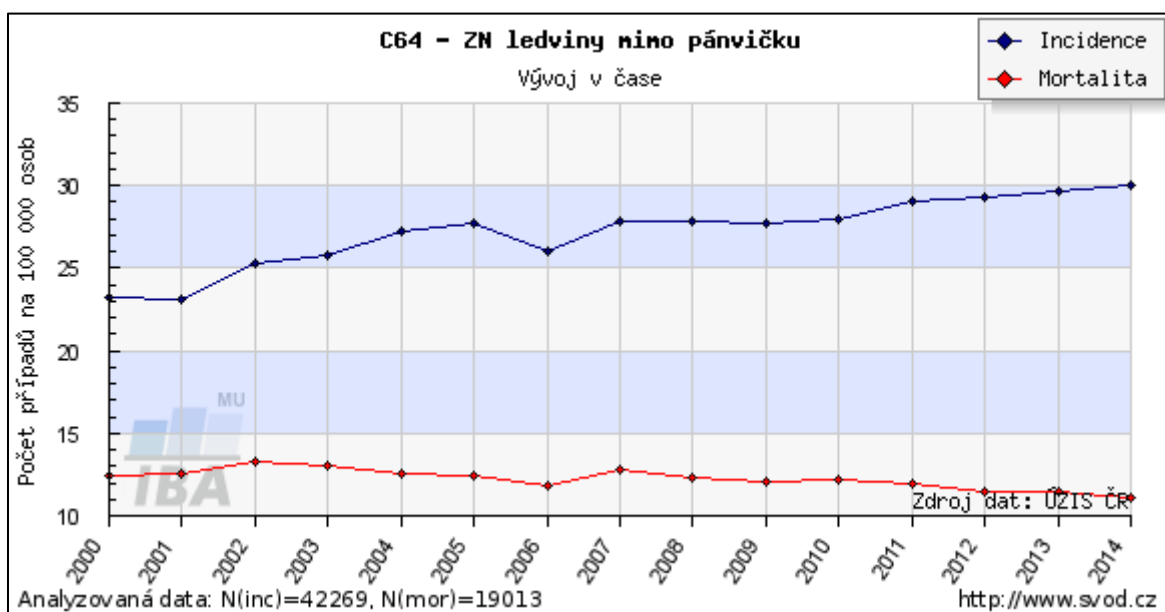
Obrázek 5 - Rozložení incidence dle věkové struktury populace



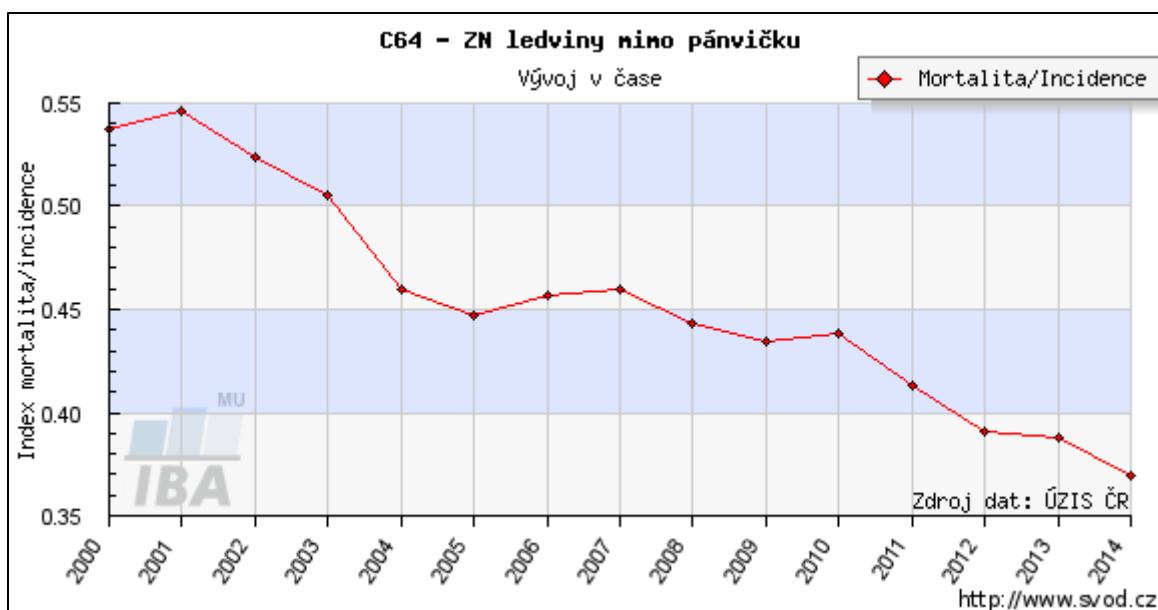
Obrázek 6 - Hrubá incidence v České republice dle krajů



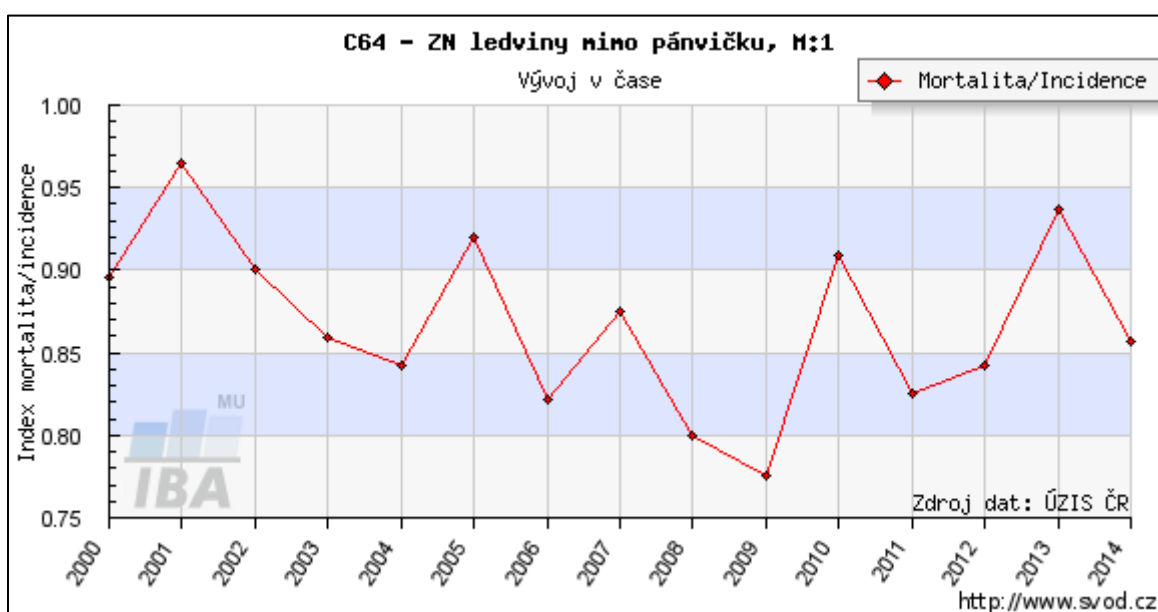
Obrázek 7 - Incidence a mortalita, ASR-W



Obrázek 8 - Incidence a mortalita, počet na 100 000 osob



Obrázek 9 - Index incidence/mortalita, všechna stádia



Obrázek 10 - Index incidence/mortalita u stádia IV

Systémová léčba metastatického karcinomu ledviny (mRCC) v současné době využívá především preparáty tzv. cílené terapie (angl. *targeted therapy*). Jedná se o paliativní léčbu, chirurgické odstranění masy tumoru je dosud jedinou kurativní možností. Tato moderní léčba prodlouží přežití bez progresu (PFS, *progression-free survival*) velké části pacientů až dvojnásobně ve srovnání s cytokinovou terapií a nežádoucí účinky (palmoplantární erytrodysestézie – tzv. *hand-foot syndrome*,

hypertenze, únava, zvracení atd.) jsou méně závažné než u cytokinové léčby („*flu-like*“ syndrom, kardiovaskulární obtíže, neurologické symptomy, hematologická a hepatotoxicita), efekt na celkové přežití (OS, *overall survival*) není tak výrazný. Macleod et al. publikovali v roce 2015 metaanalýzu studií hodnotících efektivitu cytokinové léčby (studie od roku 1990-2005) a cílené léčby (2006-2009) u mRCC. Studie zahrnovala data celkem 14 521 pacientů diagnostikovaných mezi lety 1990 až 2009. Stratifikováni byli dle histologického typu karcinomu ledviny. V hodnocení OS pacientů metastatickým světlóbněným renálním karcinomem (N=4149) byl medián OS zlepšen z 11 měsíců při cytokinové léčbě na 14 měsíců při cílené léčbě ($p < 0,001$). U sarkomatoidní diferenciaci mRCC (N=608) a nespecifikovaného RCC (N=8860) nebyl rozdíl žádný, OS při každé léčbě 4 měsíce. U nesvětlóbněných karcinomů (N=904) bylo pak pozorovatelné zlepšení OS ze 7 na 9 měsíců ($p = 0,008$) (3).

V obsáhlé studii skandinávských autorů z roku 2017 pak byli pacienti stratifikováni podle doby diagnózy onemocnění. Celkem bylo zařazeno 5463 nemocných s diagnostikovaným RCC, v letech 2002–2005 ($n = 1898$), 2006–2008 ($n = 1631$) a 2009–2011 ($n = 1934$). Primárně metastatické onemocnění bylo nalezeno u celkově 31% z nich ($n = 1678$). Ve skupinách pak 32,3% ($n = 542$), 30,2% ($n = 506$) respektive 37,5 ($n = 630$). Rozdíl mezi skupinami v jednotlivých obdobích je v podílu pacientů užívajících cílenou léčbu v léčbě mRCC. V jednotlivých skupinách pak byla léčba užitá u 61 pacientů (11,3%), 238 (47,0%) respektive 399 pacientů (63,3). Celkové přežití (OS) pak bylo signifikantně vylepšeno s užíváním cílené léčby, OS ve skupinách bylo 14 měsíců, 12 měsíců respektive 9 měsíců. Mezi další příznivé prognostické faktory pak patřil vyšší věk pacientů s mRCC (≥ 75 let), primárně metastatické onemocnění a histologie chromofobního mRCC (4). I když jsou rozdíly v OS statisticky prokazatelné, stále se ale jedná o zlepšení přežití v horizontu měsíců.

Léčba je dosud velice nákladná a míra jejího efektu je prakticky nepředvídatelná. Možnost odhadnutí odpovědi na cílenou léčbu by zlepšila a zrychlila strategii léčby a v neposlední řadě by léčbu i zlevnila. Karcinom ledviny je však heterogenní skupinou jak do počtu histopatologických typů, tak i z pohledu genetické variability v rámci jedné histologické kategorie a dokonce i v rámci jednoho nádoru. Snaha o nalezení vhodného molekulárního markeru je navíc ztížena i komplexností a provázáním

signálních drah růstu a angiogeneze nádorů. Není tedy zatím k dispozici žádný specifický biomarker, který by predikci umožnil. Přesná diagnostika nádoru se v současné době neobejde bez genetického vyšetření a právě genetické mapování tkáně tumoru zřejmě bude klíčem k personalizovanému přístupu v léčbě mRCC.

2 Cíl práce

Na souboru vlastních pacientů léčených sunitinibem pro generalizaci světlobuněčného renálního karcinomu, kteří byli operováni na Urologické klinice Fakultní nemocnice Plzeň pro primární tumor ledviny, zhodnotit možnosti využití tkáňových biomarkerů tkáně primárního tumoru i zdravého parenchymu ledviny v predikci efektu cílené léčby metastatického onemocnění.

3 Molekulární biologie nádorového růstu u renálního karcinomu

3.1 Obecná biologie maligních tumorů

Současné principy systémové léčby nádorového onemocnění využívají znalostí biologie nádorové tkáně na buněčné i tkáňové úrovni. Nádorová tkáň se v mnoha ohledech liší od tkáně zdravé a právě pochody vedoucí k excesivní proliferaci nádorových buněk, přežívání, novotvorbě cév, metastázování atd. je možno po jejich dokonalém zmapování a pochopení využít jako cíle léčby v boji s maligním onemocněním.

Karcinom ledviny je heterogenní skupinou, a to nejen z hlediska histologických typů, jak bude uvedeno v kapitole 5, ale z pohledu histologické a genetické diagnostiky je obrovská variabilita i v rámci jedné histologické jednotky. Vidíme tumory obsahující rozdílné tkáně s buňkami různé diferenciace, smíšené tumory a heterogenita tkání je prokazatelná i geneticky. Tuto takzvanou intratumorální heterogenitu lze prokázat při genetickém vyšetření vzorků z více míst jednoho tumoru nebo tkání metastáz.

V zásadní práci z roku 2012 popisující tento jev provedli Gerlinger et al. analýzu až devíti různých regionů primárního tumoru a metastáz u celkem čtyř pacientů s metastatickým renálním karcinomem léčených blokátorem mTOR. Autoři stanovili 128 somatických mutací, ze kterých jen 40 (tedy méně než jednu třetinu) bylo možno prokázat ve všech vyšetřovaných regionech a 29 mutací unikátních pro specifický region. Nalezeny byly tedy buněčné linie vyvíjející se podle darwinovského principu výběru, vývoj zde není lineární, kdy jeden klon buněk přechází vývojem v jiný, ale je patrné „větvení“ buněčných řad tvořících souběžně se vyskytující různé klonální kolonie (5). Tento princip významně zasahuje do dalšího výzkumu nádorových biomarkerů, ale i vlastní léčby cílenými preparáty a do principu personalizované medicíny. Příkladně, v nádorové buňce je určitý protein signální dráhy blokován specifickým cíleným preparátem a blokuje tak proliferaci, vedle toho se však vyvíjí klon, který pro nedostatek cílového proteinu je k léčbě rezistentní, a proliferuje dál.

Nádorová tkáň obecně se vyznačuje nekontrolovatelným růstem s tendencí k lokální invazivitě a metastázování. Vyjímá se tak z principů kontroly růstu, kterými jsou normální tkáně organismu řízeny. Na úrovni orgánových struktur je řízení především hormonální, regulace růstu na úrovni buněk je zajištěna především lokálními signály

(růstové faktory, cytokiny, adhezivní molekuly). Správná funkce je trvale kontrolována imunitním systémem.

Maturované buňky mají omezený počet možných buněčných dělení, mitóz, čítající několik desítek (takzvaný Hayflickův limit) (6). Tento tzv. replikační potenciál je omezen postupným zkracováním koncových částí chromozomů, telomer, při každém dělení buňky. Jedná se o úseky DNA (deoxyribonukleové kyseliny), které jsou tvořeny repetitivní sekvencí nukleoidů (TTAGGG). Na telomery se vážou specifické proteiny, které ochraňují konce chromozomů, zabraňují rekombinaci s jinými chromozomy a zachovávají tak funkční tu část DNA, která nese kódující geny. Při zkrácení telomer na kritickou délku, nastává tzv. replikační senescence buňky, buňka se přestává dělit a nakonec nastává buněčná smrt, apoptóza. Tkáňová homeostáza je tedy udržována rovnováhou mitogeneze, senescence a následné apoptózy.

Kmenové buňky, které zajišťují obnovu buněčných populací rychle se dělících tkání, mají zvýšenou expresi genu *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*), kódujícího enzym telomerázu. Jedná se o RNA-dependentní DNA polymerázu (reverzní transkriptázu). Skládá se z vlastního enzymu a krátkého úseku RNA (*TERC*; *telomerase RNA component*) čítajícího několik desítek až stovek nukleotidů. Tento úsek RNA je užíván jako templát k tvorbě DNA telomery, umožněno je tak specifické prodlužování telomer. Exprese tohoto genu je obecně v maturovaných buňkách velmi nízká, naopak vysoká je v buňkách kmenových a buňkách nádorových.

Většina nádorových buněk používá telomerázu k zajištění trvalé replikační aktivity. Nutná je však reaktivace genu a ta je zapříčiněna nejčastěji mutacemi promotoru genu *TERT* (7). Takové mutace byly nalezeny u sporadických i familiárních typů melanomů, dále u gliomů, karcinomu štítné žlázy a uroteliálního karcinomu močového měchýře. V případě uroteliálního karcinomu je pak detekce mutací promotoru *TERT* v materiálu cytologie moči již zavedeno jako neinvazivní diagnostická a screeningová metoda (8).

Samotná maligní transformace tkáně a další růst nádoru je obecně umožněn několika souvisejícími mechanismy. Hlavní příčinou změny normální tkáňové buňky v buňku nádorovou je kumulace řady genetických mutací a epigenetických alterací. Tyto somatické (vzniklé v průběhu života) genetické mutace mění strukturu nukleových kyselin (deoxyribonukleové kyseliny, DNA nebo mikro-ribonukleové

kyseliny, miRNA). Genetické mutace mohou být tzv. bodové, změny na jednom nukleotidu (delece, inserce, substituce), nebo mutace rozsáhlejších oblastí (např. chromozomální translokace, chromozomální delece či inserce). Tyto změny genetického kódu vedou ve svém důsledku ke strukturálnímu narušení proteinů a poruše jejich funkce (v případě DNA) nebo ke změněné expresi cílových proteinů (v případě miRNA).

Některé takové změny přenosu genetické informace mohou mít charakter tzv. kritických mutací. Takové jsou přímým podkladem maligní transformace. Patří mezi ně aktivace onkogenů, inaktivace tumor supresorových genů, zvýšená exprese inhibitorů apoptózy, porucha genů pro regulátory buněčného cyklu apod. U solidních nádorů je v průběhu karcinogeneze často nahromaděno i více než 6 kritických mutací (9).

Aktivace protoonkogenů v onkogeny se může odehrát pouze změnou na jedné alele genu, jedná se o dominantní geny. Takové mutace se nazývají „*gain of function*“. Tumor supresorové geny jsou pak zpravidla recesivní a jejich inaktivace nastává při změnách v obou alelách (tzv. „*two hit*“ model karcinogeneze). Tuto hypotézu popsal Knudson v r. 1971, kdy analýzou věkové incidence sporadického unilaterálního a bilaterálního (familiárního) retinoblastomu vyskytujícího se u dětí bylo možno předpokládat rozvoj familiárních tumorů při mutaci pouze jedné alely, kterou jedinec získá od rodiče a tak všechny buňky orgánu jsou rizikové k rozvoji nádoru a nádor je tak multifokální a vzniká časně, a sporadických nádorů při bielačickém postižení. Mutace na obou alelách, nebo druhé nepostižené, pak mohou vzniknout v průběhu života jedince, sporadicky a tak tumory jsou bifokální a většina se vyvine v pozdějším věku (10)(11). Změny na alelách mohou mít formu inaktivace genu ztrátovou „*loss of function*“ mutací, ale také ztrátou samotného lokusu DNA obsahujícího patřičný gen, tzv. „*loss of heterozygosity*“ (LOH).

Tedy získané mutace hereditární, přenášené v generacích zárodečnými buňkami, jsou základem hereditárních nádorových syndromů (např. Von Hippel-Lindau choroba - mutace genu *VHL* (3p25), hereditární papilární renální karcinom - mutace protoonkogenu *MET* (7q31), familiární adenomatózní polypóza - mutace genu *APC* (5q21-q22), apod.) (12).

Epigenetické změny představují poruchy posttranslační úpravy DNA, tedy sekundární struktury DNA. Patří sem metylace DNA či acetylace histonů. Výslednou změnou uspořádání DNA je ovlivněna exprese příslušných genů. Může docházet ke snížení či zvýšení exprese transkripčních faktorů, utlumení tumor supresorových genů, nebo naopak zvýšenou expresi onkogenů.

Genetický kód a celý děj přenosu informace ke vzniku vlastního proteinu je kontrolován systémem reparačních mechanismů. Geny kódující proteiny zodpovědné za opravy DNA jsou jedním druhem tumor supresorových genů. Právě deregulace kontrolního reparačního systému nakonec umožňuje vlastní maligní transformaci.

3.2 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je soustava dějů vedoucích k dělení buňky. Jednotlivé fáze cyklu jsou návazné a průchod cyklem je regulován kontrolními a reparačními mechanismy, které detekují a následně opravují poruchy v syntéze DNA. Střídají se fáze syntézy DNA (tzv. S fáze) a fáze dělení buňky (M fáze) oddělené dvěma fázemi klidu (G1 a G2 fáze). Tzv. fáze G0 označuje stav buněk, kdy se nedělí a zůstávají v klidové fázi. Cyklus je řízen pozitivními a negativními regulátory, proteiny, které podporují průchod cyklem nebo cyklus přerušují a ukončují. Pozitivními regulátory jsou cyklin dependentní kinázy (CDK), které v komplexech s adekvátními cykliny stimulují průchod jednotlivými fázemi cyklu (tabulka 1). Dále transkripční faktory (E2F) ovlivňující produkci nezbytných efektorových proteinů. Negativními regulátory jsou pak různé druhy inhibitorů CDK nebo RB1 (*retinoblastoma 1*).

Tabulka 1 - Cykliny a cyklin dependentní kinázy a místo efektu v buněčném cyklu

CDK	Partnerský cyklin	Místo efektu
CDK1	Cyklin B	M fáze
CDK2	Cyklin E	G1/S přechod
CDK2	Cyklin A	S fáze, G2 fáze
CDK3	Cyklin C	G1 fáze
CDK4	Cyklin D	G1 fáze
CDK6	Cyklin D	G1 fáze

Zachování integrity DNA je zajištěno opakovanou kontrolou celé dvoušroubovice DNA v částech cyklu, které se nazývají kontrolní, nebo restriční body (*check points*).

Hlavní kontrolní body jsou mezi fázemi G1-S a G2-M. Je-li detekčními mechanismy nalezena mutace, proběhne reparace DNA a cyklus může pokračovat.

Nejdůležitější detekční nástroje jsou kinázy ATM (*ataxia-teleangiectasia mutated*) a ATR (*ataxia-teleangiectasia and Rad3-related*), tyto se vážou na mutovanou DNA, a CHK1 a 2 (*check-point kinase*), které informaci o poruše DNA dále amplifikují a předávají efektorovým proteinům opravy DNA (BRCA, PARP1 atd.), zástavy buněčného cyklu (p21, CDC25) nebo apoptózy (p53). Hlavní efektor kontrolního bodu G1-S je protein 53 (p53). Mnoho nádorů vykazuje alteraci dráhy p53 (mutace genu, delece, poruchy ostatních molekul dráhy), vstup do S fáze tedy není kontrolován. U těchto buněk je tedy zbývajícím checkpointem přechod G2-M s kinázou CHK1. Inhibice CHK1 pak dovolí vstup buňky s kritickými mutacemi do mitotické fáze.

Průchod buňky mezi fázemi G1-S je podmíněn působením tzv. mitogenů (růstové faktory, hormony apod.) z extracelulárního prostředí. Mitogen aktivuje povrchový membránový receptor buňky a dochází k aktivaci proteinu RAS (*rat sarcoma*) a následní signální dráhy, přenášející mitogenní singál do buněčného jádra. Signální dráha se skládá z tzv. mitogenem aktivovaných protein-kináz (MAPK). Poslední články dráhy jsou transkripční faktory (například MYC) stimulující expresi proteinů potřebných k proběhnutí G1-S přechodu (cytokiny D-E, CDK 2, 4, 6). Vedle toho je další regulační mechanismus, tedy transkripční faktor E2F stimulující průchod fází G1 a přechod do fáze S a jeho regulace navázáním RB1. Po průchodu kontrolním bodem G1-S je již buněčný cyklus nezávislý na vnějších signálech.

Receptory pro mitogeny, protein RAS, proteiny dráhy MAPK, cílové transkripční faktory jsou řazeny mezi onkogeny. Při jejich zvýšené expresi, nebo mutaci, nebo poruše regulace (např. hyperfosforylace RB1 a uvolnění E2F z vazby) může dojít k rozvoji aberantního mitogenního signálu (onkogenního signálu) i bez přítomnosti extracelulárního mitogenu. To může za určitých okolností, třeba defekt dráhy p53, vést k autonomní proliferaci a malignímu zvratu.

3.3 Mechanismy reparace DNA

Pro konkrétní typy poškození DNA existují specifické reparační systémy, které obnovují strukturu DNA. Pokud však dojde k neopravitelnému poškození DNA, další

kontrolní mechanismy způsobí zástavu buněčného cyklu, indukují senescenci buňky a apoptózy.

Oprava poškození bází a poruch jejich párování je zajištěna enzymem MGMT (*O⁶-methylguanosin methyltransferase*), který odstraňuje metylový zbytek z *O⁶-methylguanosinu* a obnovuje normální funkci guaninu. Tento princip je však využíván i nádorovými buňkami, které zvýšenou expresí MGMT dokážou čelit změnám DNA navozených alkylačními chemoterapeutiky, u anaplastického gliomu je snížená exprese MGMT pozitivním prognostickým faktorem (13).

„*Mismatch repair system*“ (MMR) opravuje chyby v párování nukleotidů způsobené nepřesnostmi DNA polymeráz. Může dojít k záměnám jednotlivých nukleotidů, nebo sekvencí nukleotidů jejich inzercí či delecí. Takto chybně umístěné nukleotidy jsou rozpoznány, vyjmuty a nahrazeny novou sekvencí.

Bázové (BER) a nukleotidové (NER) excizní reparace řeší strukturální poruchy DNA buď vyštěpením a nahrazením pouze dusíkaté báze v případě BER, nebo, v případě NER, odstraňují tzv. adukty bází, tedy vazby s látkami poškozující DNA strukturu (např. acetaldehyd, cis-platina apod.)

Dvouřetězcové zlomy jsou významně onkogenní poruchy genomu. Může k nim docházet na podkladě vnějších inzultů (radiace) i vnitřních faktorů jako například chybné reparace DNA pomocí NER. Takového poškození DNA lze i využít k destrukci nádorových buněk s nestabilním genomem, při vysoké mitotické aktivitě, působením radiační léčby nebo chemoterapeutik. Reparační dráhy jsou dvě základní.

Nehomologní spojování volných konců DNA (NHEJ, *non-homologous joining*) je nejčastěji používaným principem ligace porušené dvoušroubovice. Při asymetrickém zlomu jsou přesahující konec řetězců odštířeny a následně jsou obě části DNA spojeny. Může tak docházet ke ztrátám funkčních genů. Naproti tomu při homologní replikaci (HR) jsou chybějící úseky při zlomu dosyntetizovány podle templátu sesterské chromatidy. Dochází k tomu v S a G2 fázi buněčného cyklu, kdy je sesterská chromatida přítomna.

3.4 „Hallmarks“ nádorového onemocnění

V posledních dekádách došlo díky rozvoji poznatků v biologii nádorového onemocnění k zásadnímu posunu v koncepci systémové léčby nádorových

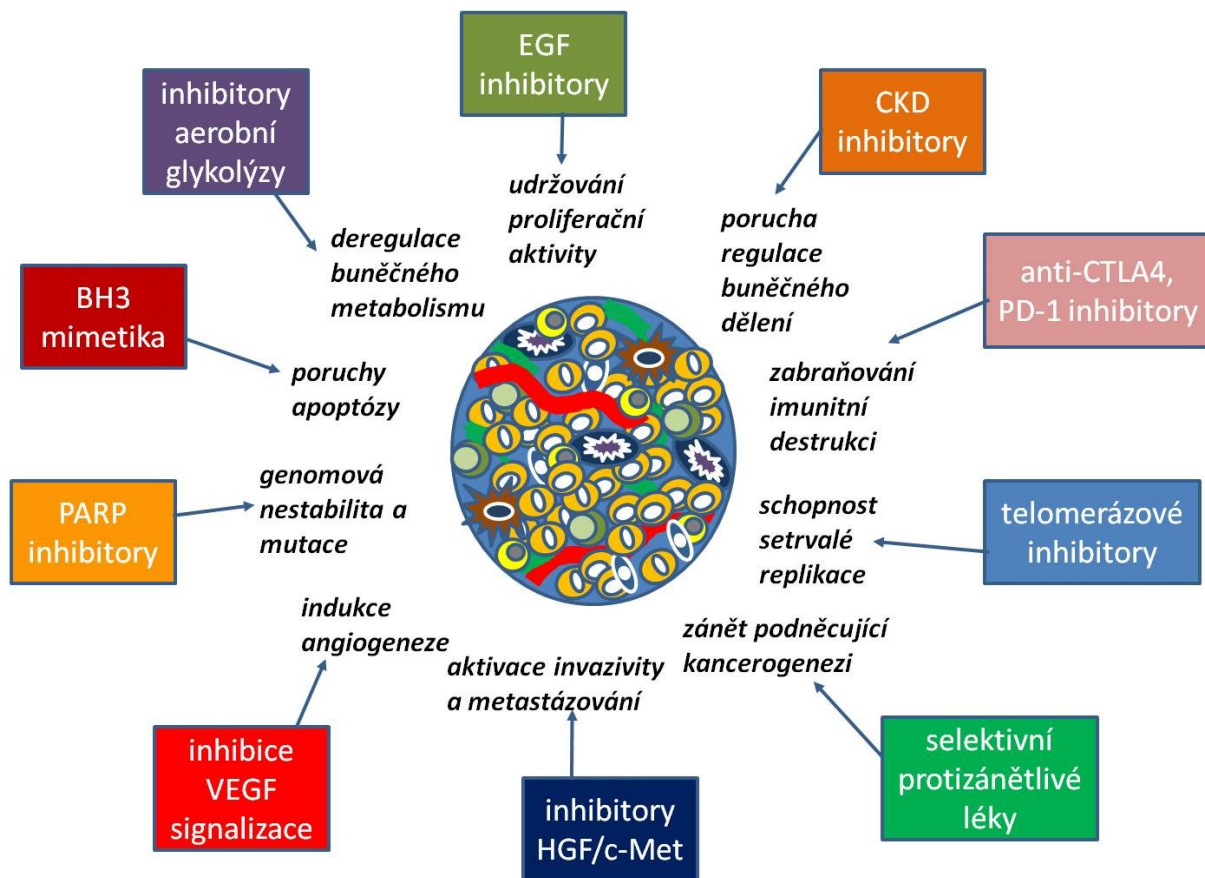
onemocnění. Nádorová tkáň je komplexním systémem obsahující nejen rychle se dělící nádorové buňky, ale také cévní struktury, buňky imunitního systému, podpůrné buňky a tkáň pojiva a jiné. Také pojetí nádorového růstu nyní zohledňuje množství souběžných a vzájemně se podmiňujících jevů.

Hanahan a Weinberg definovali v roce 2011 soubor charakteristik nádorového onemocnění, které nazvali „*hallmarks of cancer*“.

- Poruchy genomové integrity a vznik mutací včetně poruch genů pro DNA reparační proteiny, epigenetické změny (metylace promotorů tumor supresorových genů).
- Mitotická hyperstimulace. Porucha v signalizaci vedoucí k buněčné proliferaci může být na všech úrovních, jak u receptorů a jejich tyrosinkináz, tak i cytoplazmatických přenašečů signálů a transdukčních kináz.
- Porucha regulace buněčného dělení podmíněná zvýšením aktivity cyklinů a cyklin dependentních kináz (CDK), inhibicí jejich regulátorů (například p21), poruchami regulačních proteinů klíčových kontrolních bodů buněčného cyklu (například p53).
- Poruchy senescence a immortalizace buňky, například při zvýšené aktivitě telomerázy.
- Poruchy apoptózy jsou způsobeny řadou alterací na různých úrovních aktivačních drah apoptózy. Například mutace genů pro aktivační membránové receptory a antiapoptotické regulátory (BCL2, BAX, PUMA apod.)
- Aktivace invazivního chování a metastázování při poruchách genů pro adhezivní proteiny nebo jejich regulátory (mutace genu pro E-kadherin).
- Zvýšená angiogeneze k zajištění přísunu kyslíku a živin umožňující akcelerovaný růst. Inhibice angiogeneze je zásadním principem v léčbě metastatického renálního karcinomu.
- Nedostatečná imunitní regulace, neschopnost imunitních buněk efektivně eliminovat nádorové buňky. Tato vlastnost je opět dána několika mechanismy, například produkcí signálních molekul s imunosupresivními účinky, změny stavby novotvořených cév nedovolující průnik buněk nespecifické imunity (*natural killers*; NK-buňky), pronádorová zánětlivá reakce.

- Poruchy energetického metabolismu s akcentovanou anaerobní glykolýzou. Změny mnoha signálních drah (obsahující PI3K, HIF, p53, MAPK1 a jiné) vedou ke změnám metabolismu nádoru ve prospěch anaerobní glykolýzy. Extenzivní metabolismus nádorové tkáně je příčinou nádorové kachexie u pokročilých onemocnění a v konečném důsledku i smrti.

Moderní systémová léčba je vyvíjena s cílem konkrétního efektu v nádorovém mikroprostředí, jak v samotných nádorových buňkách, tak i mimo ně. V případě renálního karcinomu hraje v současné době hlavní úlohu inhibice angiogenní dráhy signalizované růstovým faktorem VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Mezi další cíle léčby mRCC patří signální dráha PI3K/Akt/mTORC1 (přenášející signály pro buněčný růst, přežití, motilitu i angiogenezi), dráha RAS-RAF-MEK-ERK, dále nejnověji i inhibice PD-1 (*programmed death-1*) jako aktivace imunitní destrukce nádorových buněk. Některými multikinázovými inhibitory lze ovlivnit i signalizaci HGF/cMet, viz kapitola 7.2.2.



Obrázek 11 - "Hallmarks of cancer" a možnosti terapeutického ovlivnění. Podle D. Hanahan a R.A. Weinberg: Hallmarks of cancer: The Next Generation. Cell. 2011;144:647-74

4 Metody molekulární diagnostiky

4.1 Preanalytická fáze

Preanalytické zpracování a uchování vyšetřovaného materiálu je klíčovým momentem pro následné histopatologické a cytogenetické metody. Zachování buněčných struktur a zabránění degradaci proteinů a nukleových kyselin je podmíněno řádnou fixací materiálu ihned po odběru. Ke klasické fixaci se užívá 10% formaldehydu s neutrálním pH. Podstatná je délka fixace odvislá od objemu tkáně (6-48 hodin). Tkáň je po fixaci zalita v bločcích do parafinu a tak je uchována k dalšímu zpracování. Takto ošetřený vzorek tkáně se nazývá ve zkratce FFPE (*formalin-fixed paraffin-embedded*) a při správném zpracování zůstává fragmentovaná, ale dále nepoškozená DNA k analýze.

Dalším způsobem zachování intaktních nukleových kyselin k analýze je hluboké zamražení tkání ihned po odběru. Lze využít tekutý dusík, tkáň je však nutno udržovat při teplotě nepřekračující - 80 °C (14). Rychlé zamražení způsobí porušení buněčných membrán a po rozmražení dochází k enzymatické degradaci RNA. Využívají se tedy roztoky inhibující enzymy RNázy. Také běžné histopatologické hodnocení světelnou mikroskopií je pro destrukci buněčných membrán nemožné.

Histologický preparát vytvořený z FFPE bločku je standardně krájen mikrotomem na 2-5 µm silné řezy, tyto jsou dále barvené hematoxylinem-eosinem (HE).

Charakteristika nádorové tkáně na podkladě HE barvení je základem diagnostiky, hodnotí se charakter nádorové tkáně v souvislosti se zdravou tkání, charakter buněk, vlastnosti cytoplazmy, jádra, četnost nádorových buněk apod. Následuje mikrodisekce tkáně na základě prvního vyšetření větší oblasti v HE, a na tomto cíleném vzorku je dále prováděna speciální diagnostika.

4.2 Imunohistochemie

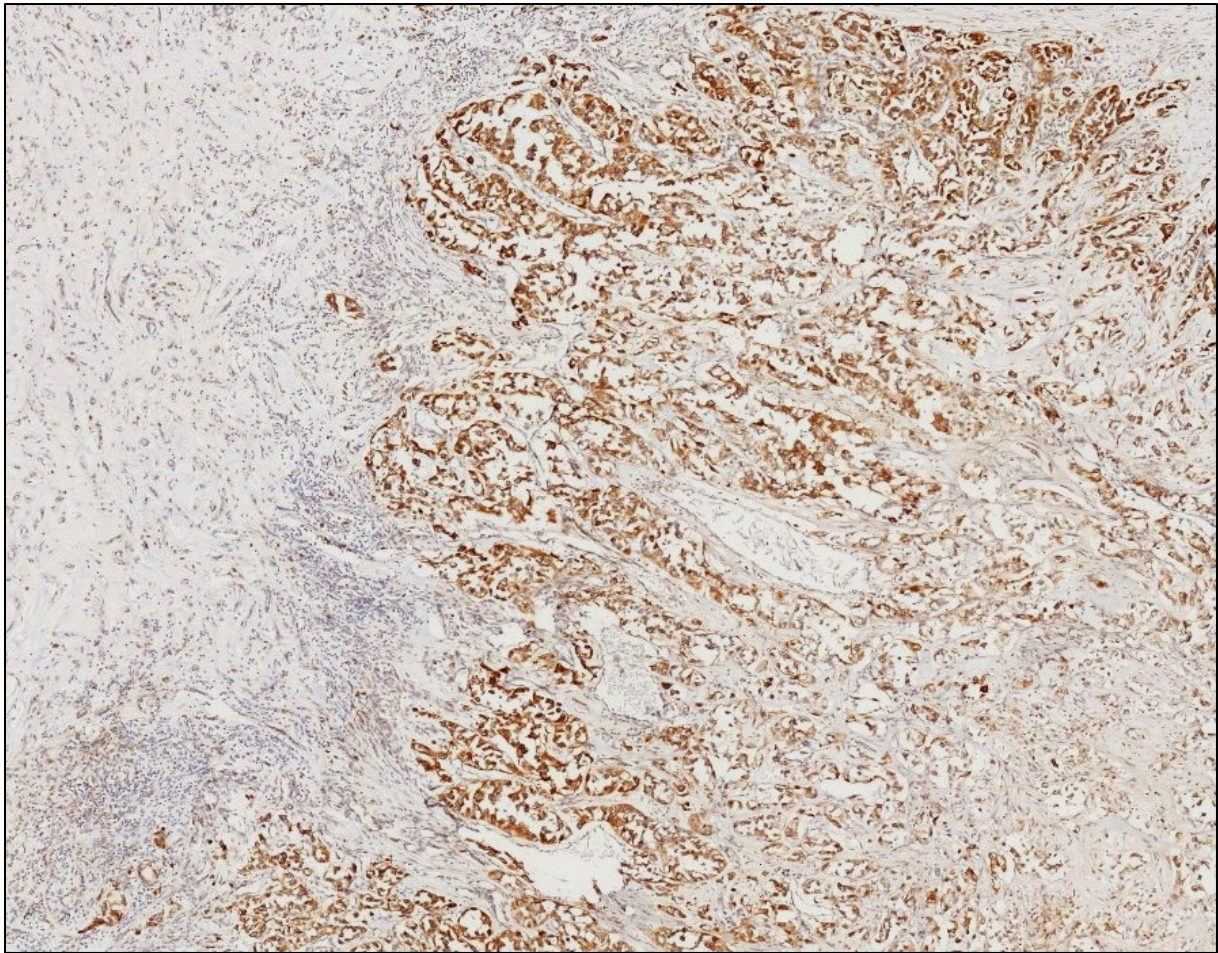
Imunohistochemická (IHC) analýza tkáně je nyní nedílnou součástí histopatologie. Lze stanovit určité proteiny, nebo jejich části. Jedná se převážně o kvalitativní analýzu k průkazu přítomnosti, nebo nepřítomnosti antigenu. Někdy je možno určit semikvantitativně míru aktivity sledovaného proteinu na podkladě úrovně zbarvení pozitivní tkáně. Toto hodnocení je dosti závislé na vlastní interpretaci odečítajícího

patologa, což je jedna z limitací kvantitativních výstupů vyšetření. Vlastním principem vyšetření je vazba značené protilátky na sledovaný antigen tkáně.

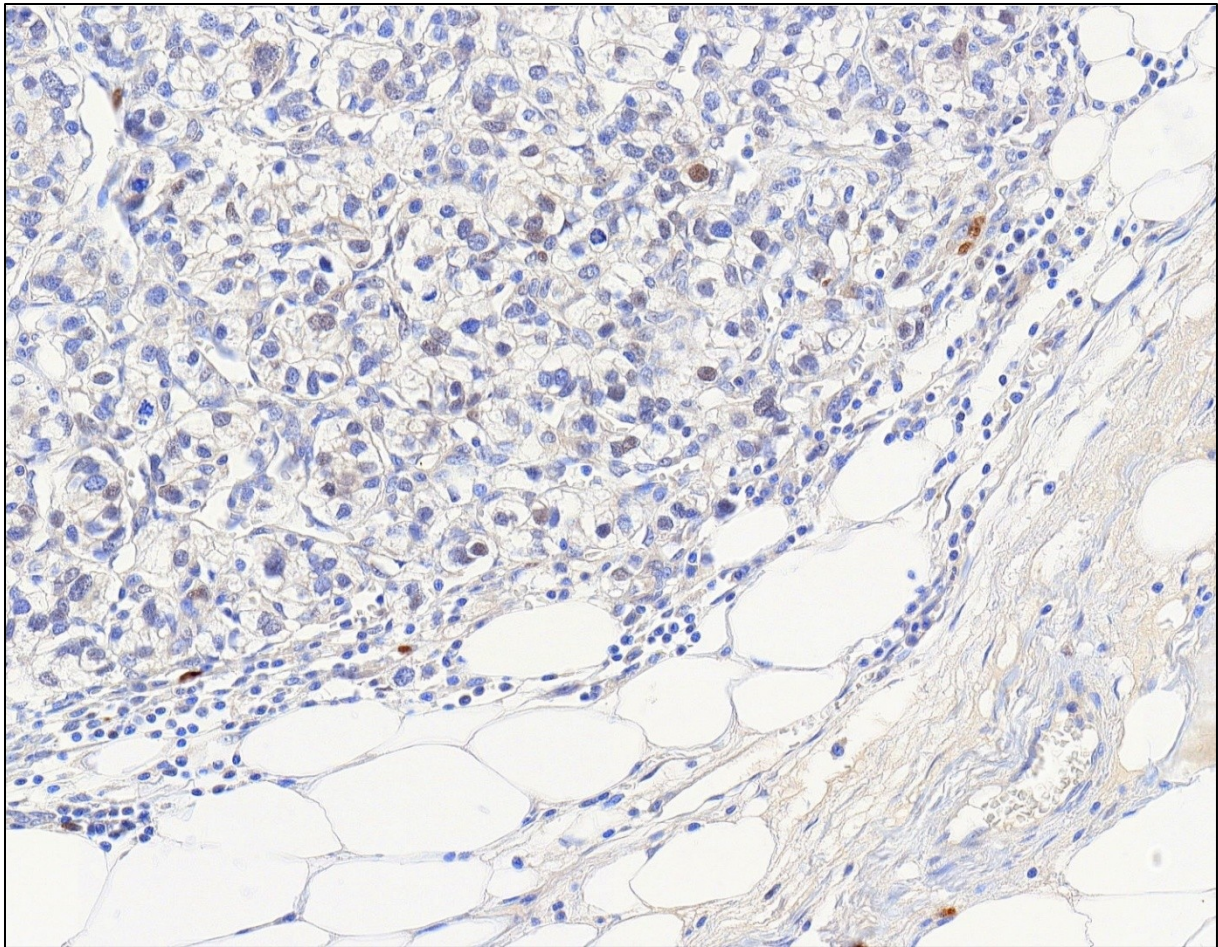
Užívány jsou dvě hlavní metody IHC, přímá a nepřímá IHC. Při přímé metodě reaguje značená protilátka přímo s tkáňovým antigenem, je to relativně rychlá metoda limitovaná však nízkou senzitivitou. Druhá metoda nepřímého stanovení je vícekroková. S tkáňovým antigenem reaguje primární protilátka, která je neznačená a slouží jako vazebné místo pro sekundární značenou protilátku. Signál je touto metodou zesílen a zlepšena je tak citlivost vyšetření. Nepřímé stanovení je v současné době užíváno častěji.

Značení protilátek může být fluorescenčními barvivy (rhodamin, fluorescein isothiokyanát – FITC apod.), tzv. imunofluorescence, nebo jsou značeny enzymaticky (alkalická fosfatáza, peroxidáza apod.), tzv. imunoenzymatická metoda. V místě přítomnosti sledovaného proteinu je pak detekovatelné zbarvení buněk (15, 16).

Imunohistochemická analýza je v patologické diagnostice renálních tumorů nezbytná. Například typickými znaky papilárního renálního karcinomu (PRCC) typu 1 je pozitivita CK7 (cytokeratin 7), vimentinu a MUC1 (mucin 1), u PRCC typu 2 je více exprimován E-cadherin a CK20. Patognomickým znakem SDH (sukcinyl dehydrogenáza B) deficientních renálních karcinomů je právě IHC průkaz ztráty SDH. U renálního karcinomu spojeného se syndromem hereditární leiomyomatózy (HLRCC) je díky inaktivaci genu pro fumarát hydratázu tento enzym nedetekovatelný a lze tak diferenciatně diagnostiky odlišit od sporadického PRCC typu 2. V případě translokačních renálních karcinomů (TRCC) lze diagnózu stanovit jak cytogeneticky, tak imunohistochemicky. V případě Xp11.2 TRCC je díky genetickým změnám zvýšeně exprimován jaderný protein transkripční faktor E3 (TFE3) a u TRCC typu t(6;11) pak transkripční faktor B (TFEB) (17).



Obrázek 11 - Imunohistochemické zbarvení VEGF v tkáni světlobuněčného renálního karcinomu, difuzní pozitivita (s laskavým svolením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D., Šiklův ústav patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň)



Obrázek 12 - Imunohistochemické zbarvení p53 v tkáni světlobuněčného renálního karcinomu, fokální pozitivita (s laskavým svolením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D., Šiklův ústav patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň)

4.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

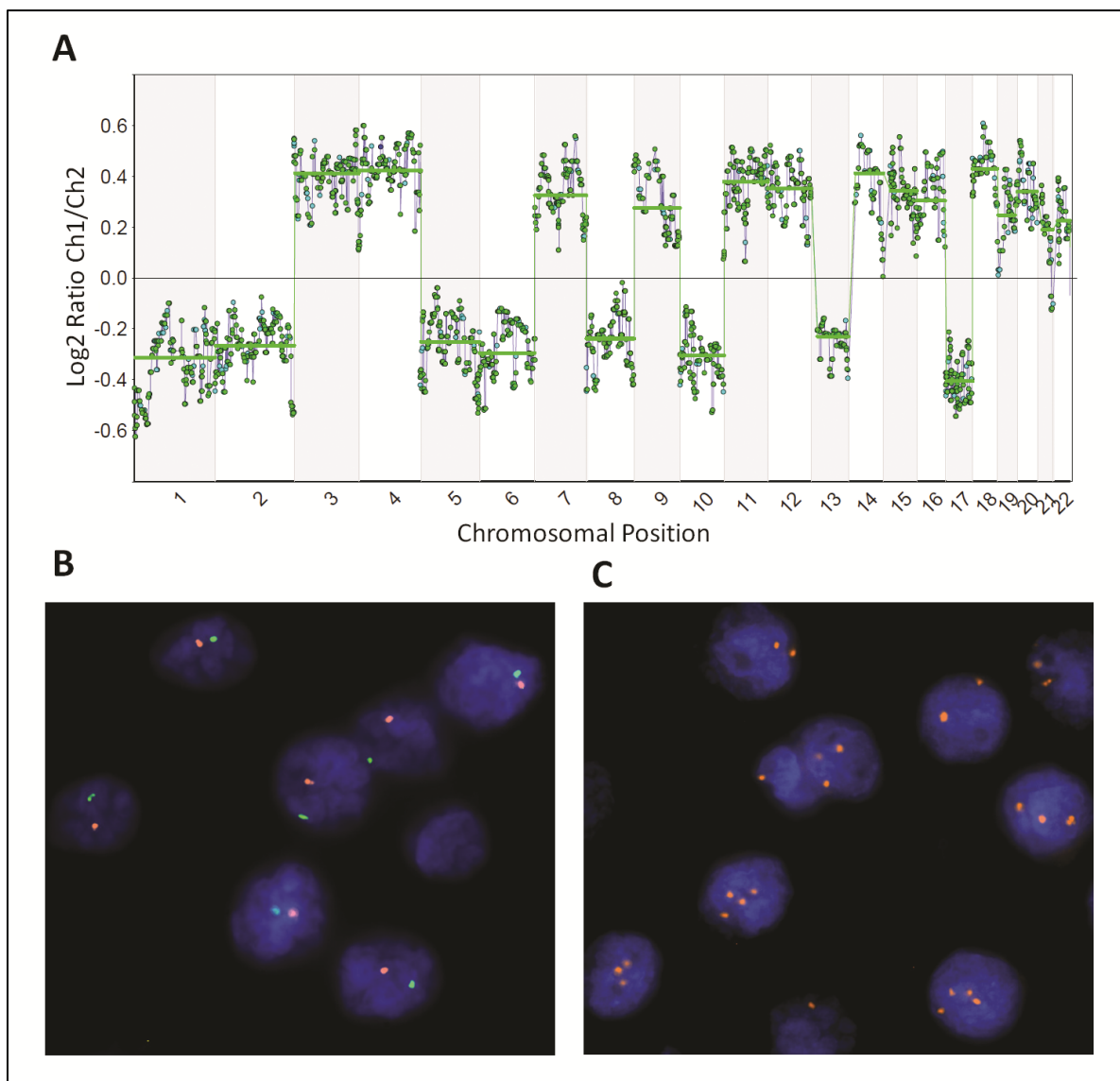
Jedná se o molekulární metodu detekující cytogenetické změny buněk. Metoda je založena na komplementárním párování vyšetřované DNA a značené proby. Proba (sonda) je uměle vytvořený oligonukleotidový řetězec značený fluorescenčním barvivem. Metoda je vysoce specifická a senzitivní a lze ji aplikovat jak na tkáň FFPE, tak i čerstvě zmražené tkáňe nebo cirkulující nádorové buňky.

Lze takto detekovat genetické změny jak na vytvořených chromozómech, tak na interfázních jádrech DNA. Kromě DNA lze detekovat i molekulu RNA (mRNA, miRNA).

Použitím různých typů sond pak lze stanovit odlišné genetické změny

- Proby (sondy) specifické pro lokus DNA (LSI, *locus specific identifier*). Po jejich vazbě na určitý lokus (gen, úsek chromozómu) lze detekovat počet kopií genu, daných oblastí chromozómů.
- Proby cílené na sekvence centromer nebo telomer (CEP, *centromeric enumeration probes*). Vyšetřuje se tak počet kopií daného chromozómu.
- Celochromozómové proby (WCP, *whole chromosome painting*) označí celý chromozóm, nebo jeho rameno, a lze tak sledovat strukturální změny chromozómů.

Po denuraci DNA vzorku je sonda hybridizována na dané úseky DNA, nenavázané sondy jsou ze vzorku vymyty. Po dobarvení vzorku je tento vyšetřován fluorescenční mikroskopií. V případě speciální diagnostiky renálních tumorů je metoda FISH excelentní při detekci chromozomálních translokací, polysomií nebo chybění chromozómů, viz kapitola 5.



Obrázek 13 - Fluorescenční in situ hybridizace zobrazující rozdíly v chromozomálních aberacích mezi chromofobním renálním karcinomem Panerova gradu 1 a sarkomatoidní diferenciací (s laskavým svolením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D., Šiklův ústav patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň)

Vizualizace pomocí chromogenního barvení (peroxidáza, alkalická fosfatáza) namísto fluorescenčního značidla se nazývá chromogenní *in situ* hybridizace (CISH).

4.4 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR, *polymerase chain reaction*) slouží k namnožení, amplifikaci, vyšetřovaného úseku nukleové kyseliny. Úsek templátové (předlohové) DNA, který má být replikován, je vymezen primery, oligonukleotidy

délky několik desítek bazí. DNA polymeráza je termostabilní enzym, který od místa primeru, kde končí dvouřetězec nukleové kyseliny, doplňuje jednotlivé nukleotidy a dostavuje tak úsek komplementární s templářovou DNA. Nukleotidy jsou v roztoku ve formě deoxynukleosid trifosfátů (dNTP).

Reakce samotná je řízena automatickým termocyklem, ve kterém dochází k cyklům denaturace DNA pomocí zvyšování teploty. V každém cyklu dochází k denuraci DNA, hybridizaci primerů na templátovou DNA a syntéze nového řetězce DNA. Takových cyklů je typicky 20-40.

Modifikací je tzv. *real-time* PCR, kdy je průběh reakce pozorovatelný v reálném čase na základě změn fluorescence. Fluorescenční činidlo se váže na dvouvláknovou DNA, nebo se přidávají fluorescenčně značené proby. Fluorescence je snímána v průběhu reakce v termocykleru a při známé koncentraci DNA je možné kvantifikovat počet kopií DNA ve vzorku. Užívá se tedy pojem qPCR (*quantitative PCR*).

Modifikace metody, při níž lze amplifikovat DNA z templátu nejčastěji mRNA se nazývá *reverse transcription-PCR* (RT-PCR). Lze tak stanovit expresi mRNA, což je užíváno při speciální diagnostice, v případě renálních tumorů například translokačních karcinomů (18).

4.5 DNA sekvenování

Vyšetření genových mutací je nejpřesnější pomocí přímého sekvenování DNA. Umožňuje stanovení pořadí jednotlivých nukleotidů. Biochemická metoda byla vyvinuta Sangerem v roce 1977, je založena na elektroforetickém rozdělení získaných rozdílně dlouhých fragmentů DNA na elektroforetickém gelu. Úseky DNA jsou vytvořeny DNA polymerázou ale pouze z jedné strany templátu DNA. Do reakce jsou kromě normálních nukleotidů vřazeny i degenerované nukleotidy fluorescenčně označené, které nedovolí další stavbu řetězce za nimi. Tyto degenerované nukleotidy jsou zařazovány náhodně, díky tomu jsou produkovány různé dlouhé řetězce se známým terminálním nukleotidem. Díky rozdílné délce pak obsadí rozdílnou pozici při elektroforéze. Je tedy možné uspořádat jednotlivé úseky dle délky a tak získáme i pořadí terminálních nukleotidů v sekvenci.

Chybou těchto metod je nízká senzitivita. Díky kontaminaci vlastní populace nádorových buněk ve vyšetřovaném vzorku i tkáněmi podpůrnými je senzitivita přibližně 25% (15).

Sekvenování nové generace (NGS, *next-generation sequencing*) je obecný pojem označující nové metody, které díky high-tech technologiím a speciálním softwarům umožňují v krátké době analyzovat i rozsáhlé genomy a v současnosti i daleko levněji. Mezi tyto metody patří tzv. „454 sekvenování“, „*Single Molecule Real-Time* sekvenování“ (SMRT), „*Illumina* sekvenování“, technologie nanopórů a jiné.

5 Genetické vlastnosti renálního karcinomu

Nádory ledvinného parenchymu jsou heterogenní skupinou, jak ukazuje nová klasifikace nádorů ledviny ISUP (*The International Society of Urological Pathology*) z roku 2013 tzv. „Vancouverská klasifikace“ a z ní vycházející i nová WHO (*World Health Organization*) klasifikace z roku 2016 (17, 19). V ISUP klasifikaci se jen skupina nádorů vycházejících z epitelálních struktur rozrostla o renální karcinom asociovaný se syndromem hereditární leiomyomatózy (*Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome (HLRCC) – associated RCC*), tubulocystický RCC (*tubulocystic RCC*), RCC spojený se získanou cystózou ledvin (*acquired cystic disease – associated RCC*) a světlobuněčný papilární renální karcinom a MiT translokační karcinomy (*t(6;11)RCC a Xp11.2 TRCC*).

Jako provizorní jednotky byly přidány další 3 typy renálního karcinomu, thyroid-like follicular RCC, sukcinát-dehydrogenáza deficientní renální karcinom (*succinate dehydrogenase (SDH) – deficient RCC*), ALK - translokační renální karcinom (*anaplastic lymphoma kinase TRCC*).

Nově byla v ISUP zařazena původně samostatná jednotka multilokulárního cystického renálního karcinomu pod světlobuněčný RCC jako podskupina s názvem multilokulární cystická světlobuněčná renální neoplázie nízkého maligního potenciálu (*multilocular cystic clear cell renal cell neoplasm of low malignant potential*).

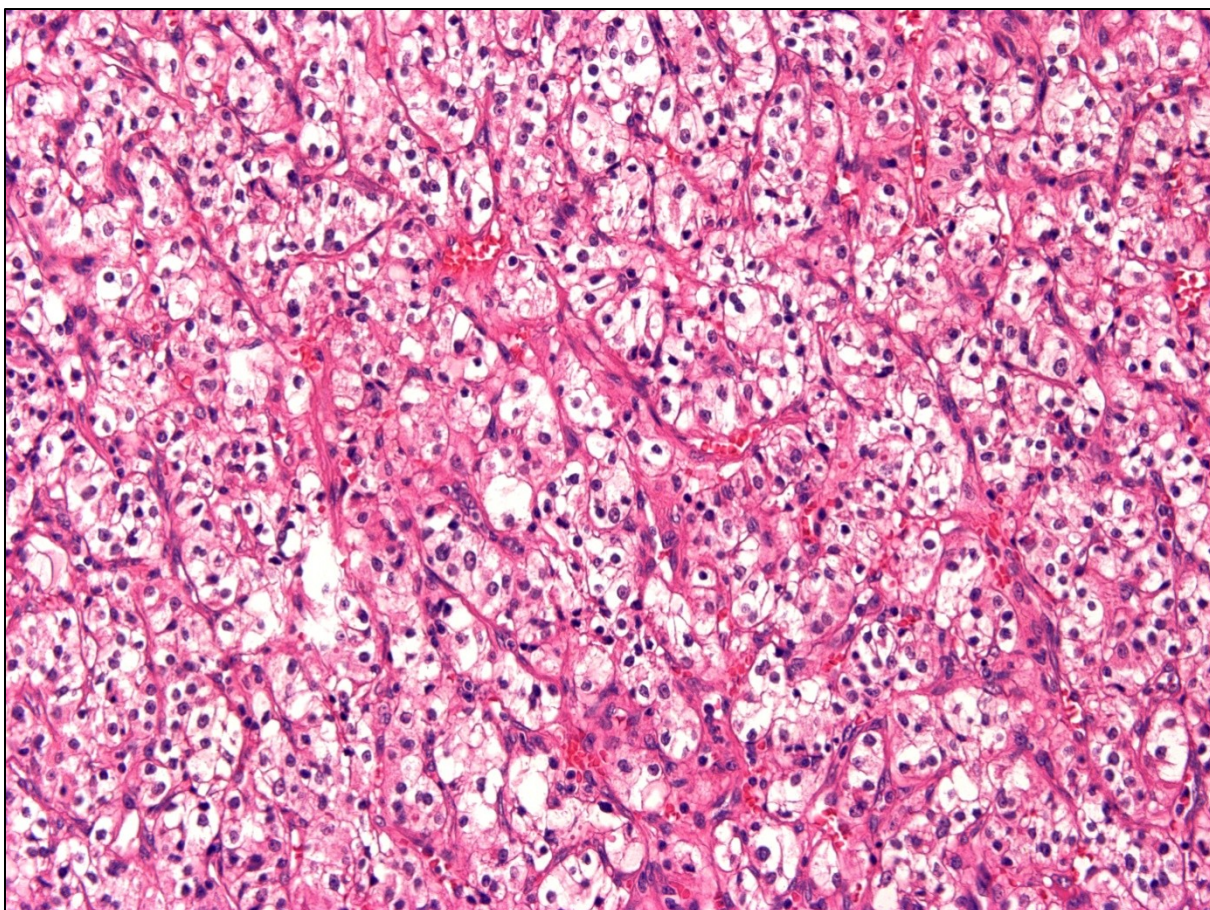
Čtvrtá edice WHO klasifikace urogenitálních nádorů byla publikována v roce 2016 a přebírá změny z klasifikace ISUP. Oproti ISUP jsou SDH-deficientní renální karcinom a multilokulární cystická světlobuněčná renální neoplázie nízkého maligního potenciálu vymezeny jako samostatné jednotky.

Je tedy patrné, že klasifikace renálních tumorů se v nomenklatuře opírá jak o faktory buněčné stavby – cytoplazmatické změny (jako světlobuněčný RCC, chromofobní RCC), vlastnosti architektonické stavby nádoru (papilární RCC), anatomický původ buněk nádoru (karcinom ze sběrných kanálků, medulární renální karcinom), spojitost se základní nemocí (RCC spojený s polycystózou ledvin), ale také o molekulární změny patognomické pro podtypy RCC (MiT translokační karcinomy, SDH – deficientní karcinom) nebo o hereditární predispozice (RCC spojený s hereditární

leiomyomatózou). Právě molekulárně biologickému podkladu sporadických i hereditárních forem renálních nádorů je věnována tato kapitola.

5.1 Světlobuněčný renální karcinom

Světlobuněčný renální karcinom (CCRCC, *clear cell renal cell carcinoma*) představuje přibližně 72-87% renálních karcinomů řešených chirurgicky (20, 21). Pochází z buněk proximálních tubulů. Makroskopický vzhled tumoru je dán vysokým obsahem lipidů, cholesterolu a glykogenu v buněčné cytoplazmě, proto je nádor na řezu typicky žlutavé až šedobílé barvy. Granulární varianta CCRCC je díky vyššímu obsahu cytoplazmatických organel, zvláště mitochondrií, a tkáň na řezu je hnědavá. Nádory jsou často makroskopicky heterogenní stavby s nekrózami, hemoragiemi, cystickou degenerací a fibrózními septy (22). Diferenciace tumoru se od vydání nové klasifikace hodnotí doporučenými kritérii WHO (19). Tento systém vychází z jaderného gradingového systému podle Fuhrmanové, sledující velikost a vzhled jader buněk, přítomnost jadérek, poměr jader a cytoplazmy buněk. V původní Fuhrmanové páci rozdíl v gradu korelovaly s agresivitou tumoru a metastatickým potenciálem (23). V rozsáhlé retrospektivní studii našli Patard et al. ve skupině celkem 3564 světlobuněčných karcinomů našli ve 20,5% zastoupení GI, GII ve 36,7%, GIII ve 34,4% a GIV v 8,4% (21). Lee et al. sledovali grade u nádorů metastazovaných, histologie byla získána punkční biopsií nebo excizí. Buněčný grade I nebyl nalezen u žádného případu, GII u 23,5%, GIII v 59,3% a GIV v 17,3% (24). Jasně je vidět vyšší tendence k disseminaci u hůře diferencovaných tumorů.



Obrázek 14 - Low grade světlóuněčný renální karcinom, hematoxylin-eosin, zvětšení 100x (s laskavým svolením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D., Šiklův ústav patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň)

Zásadní vliv v etiopatogenezi CCRCC má osa VHL-HIF. V roce 1904 popsal Eugen von Hippel prvně angiomatózu retiny a v roce 1927 Arvid Lindau hemangiomy v mozečku a páteřním kanálu a vícečetné tumory ledvin, termín von Hippel-Lindauova choroba byl prvně použit v r. 1936, ale do běžného povědomí se dostal až v 70. letech (25). Jedná se autozomálně dominantně dědičné onemocnění s incidencí 1,18-2,78 případů na 100 000 obyvatel predisponující ke vzniku nejčastěji multifokálních CCRCC, hemangioblastomů různých lokalizací, nejčastěji centrálního nervového systému, pankreatických cyst, angiomů retiny, neuroendokrinních tumorů a feochromocytomů, epididymálních cyst a různých vaskulárních lézí (10). CCRCC se vyskytuje asi u 35-50% s VHL onemocněním a je hlavní příčinou mortality u postižených (22). Gen se nachází na krátkém raménku třetího chromozomu v oblasti 3p25.3. Jedná se o tumor supresorový gen a jak již bylo zmíněno výše, k jeho plné inaktivaci je nutná alterace na obou alelách genu. Proto u vrozené poruchy, kdy už

jedna alela mutovaná je, dochází k rozvoji symptomů onemocnění dříve, po mutaci zbylé alely, oproti sporadickému výskytu sejných poruch, kdy je potřeba tzv. „two hit“ mechanismus, postupná alterace obou alel. Tedy v případě renálního karcinomu průměrně ve 40 letech u VHL nemoci, oproti sporadickému RCC, kde je průměrný věk incidence více než 65 let (26).

Produktem *VHL* genu je protein VHL (pVHL). Spolu s dalšími proteiny (elonginy B a C, RING box protein, cullin 2) tvoří ubikvitin ligázový komplex, který za normoxických podmínek váže hypoxií indukovaný faktor 1 α (HIF1 α) a tento je následně rychle degradován v proteasomu. V podmínkách hypoxie nebo v případě snížené produkce pVHL (při mutaci nebo inaktivaci *VHL* genu) není HIF1 α degradován a je stimulována jeho produkce. Vstupuje do buněčného jádra, kde tvoří dimer s HIF β a transkripčním koaktivátorem p300/CBP a indukuje pak transkripci množství genů včetně genu pro VEGF (*vascular endothelial growth factor*), PDGF β (*platelet derived growth factor*), TGF α (*transforming growth factor α*), GLUT1 (*glucose transporter 1*), MUC1 (*mucin 1, cell surface associated*) a další (25, 27).

Fenotypicky lze odlišit 4 typy VHL syndromu. Ve zjednodušení lze rozlišovat typy dva, a to typ 1 s nízkým rizikem vzniku feochromocytomů, kdy bývají vyjádřeny retinální angiomy, hemangioblastomy centrálního nervového systému, renální karcinomy a neuroendokrinní tumory. Typ 2 je charakterizován feochromocytomy, retinálními angiomy a CNS hemangioblastomy. Typ 2 je dále dělen na typ 2A (s nízkým rizikem RCC), 2B (s vysokým rizikem RCC) a typ 2C (riziko pouze pro feochromocytom) (28).

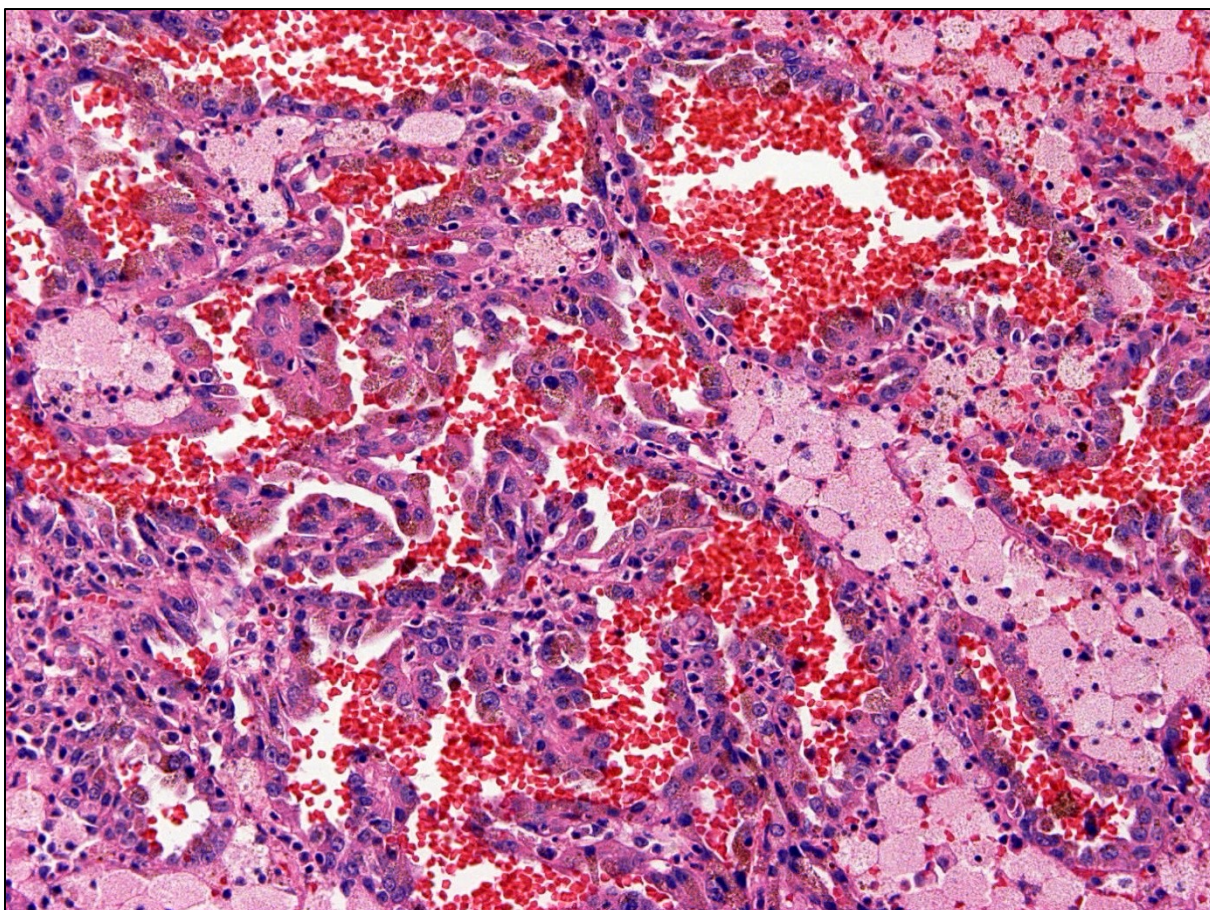
U sporadického CCRCC lze nalézt alterace genu VHL v 55-65% případů, nejčastěji je pak pozorována ztráta heterozygoty (LOH) při delecí genového lokusu.

Druhým nejčastěji alterovaným genem po *VHL* je polybromo 1 (*PBRM1*), je mutovaný až v 45% CCRCC. Kóduje protein BAF180, komponentu nukleosom-remodelujícího komplexu. Není známo, jak defekt *PBRM1* působí tumorigenně, ale jedním z vysvětlení může být nedostatek inhibitoru p21 cyklin-dependentní kinázy. Zřejmě tedy *PBRM1* reguluje buněčnou proliferaci. Jelikož se gen nachází v blízkosti *VHL* na krátkém raménku 3. chromozomu, delece postihuje často oba geny (29).

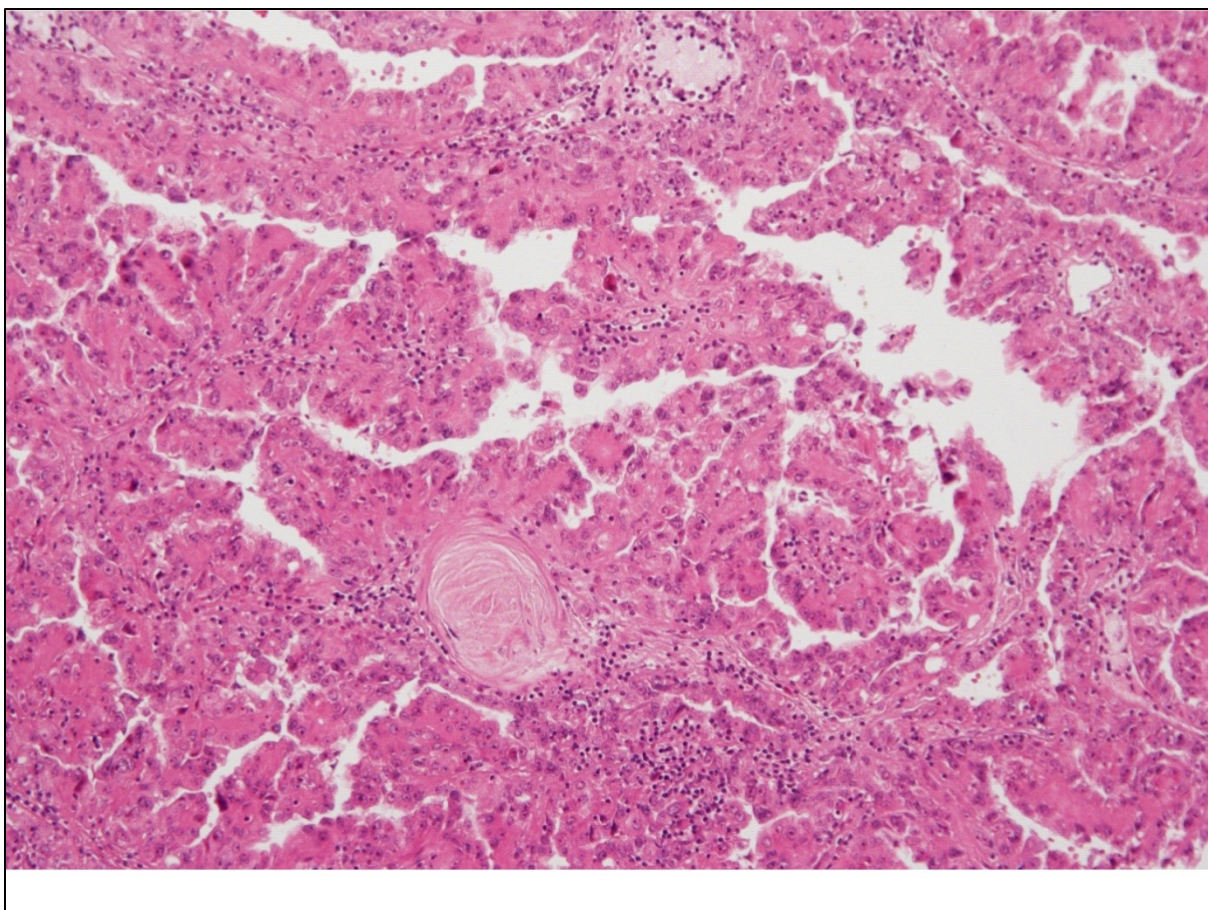
Další změny v cytogenetickém profilu CCRCC mohou zahrnovat ztrátu 8p, 6q, 9p, 4p a ztrátu Y u mužů, dále trisomii chromosomu 7 nebo gain 5q. Klatte et al. studovali souvislost mezi cytogenetickým profilem CCRCC a prognózou onemocnění. U 282 tumorů stanovili nejběžnější cytogenetické aberace a korelovali výsledky tumor-specifickým přežitím (DSS, *disease specific survival*). Ztráta 3p byla nalezena v 60% a korespondovala s nižším TNM stagem a lepší prognózou onemocnění. Ztráty 4p (13%), 9p (16%) a 14q (28%) byly spojeny s vyšším TNM stagem, vyšším grade a větším rozměrem tumoru a také i s horší prognózou onemocnění. Ztráta Y korelovala s lepším přežitím bez progrese (PFS, *progression free survival*). V multivarietní analýze byla ztráta 9p nezávislým prognostickým faktorem (30).

5.2 Papilární renální karcinom

Papilární renální karcinom (PRCC, *papillary renal cell carcinoma*) tvoří přibližně 9-17% ze všech renálních karcinomů (20, 21). Původem jsou nádorové buňky z distálních tubulů ledvinného parenchymu. Díky vyššímu obsahu pěníých makrofágů ve stromatu nádoru má vitální tkáň nádoru světle šedou až žlutavou barvu. Častý je však výskyt intratumorálních hemoragií a nekrotizací (10). Klasicky se PRCC dělí dle Delahunta na typ 1 a typ 2 (31). PRCC typu 1 se skládá z papil a tubulárních struktur pokrytých malými buňkami se světlou cytoplazmou a malými oválnými jádry s nenápadnými jádérky, časté jsou glemoruloidní papily, edém papil, pěníé makrofágy ve stromatu papil a psammomatózní tělíška. PRCC typu 2 se vyznačuje papilami s velkými buňkami s bohatou eozinofilní cytoplasmou, je charakterizován pseudostratifikací a velkými sférickými jádry s výraznými jádérky. PRCC typu 2 bývá diagnostikován u mladších jedinců, častěji s vyšším Fuhrmanové gradem a významně horší prognózou oproti typu 1 (32). Toto základní dělení bylo dlouho používáno, ale dnes je zřejmé, že i PRCC je heterogenní jednotkou a již v nové klasifikaci WHO 2016 jsou zakotveny nové podjednotky PRCC a to onkocytický PRCC a PRCC NOS (*not other specified*, blíže nespecifikovaný). Dále byl vyčleněn tumor charakteru PRCC spojený s germ line mutací genu pro fumarát hydratázu, tzv. renální karcinom spojený s hereditární leiomyomatózou (19, 33, 34).



Obrázek 15 - Papilární renální karcinom typu 1, hemaoxylin-eosin, zvětšení 100x (s laskavým svolením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D., Šiklův ústav patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň)



Obrázek 16 - Papilární renální karcinom typu 2, hematoxylin-eosin, zvětšení 40x (s laskavým svolením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D., Šiklův ústav patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň)

Z histopatologického hlediska je nejkonzistentnější skupinou PRCC typu 1. Typickými znaky nádorového růstu této jednotky je exofytický růst nádoru (více než polovina tumorů roste většinou svého objemu nad konturou normálního ledvinného parenchymu), téměř 99% tvoří sférický tvar. Hypotéza vysvětlující tento znak pracuje s vysokým podílem nekrotických tkání uvnitř tumoru, kde degradované proteiny a makromolekuly působí osmoticky a přenos tlaku v kapalině podle Pascalova zákona podporuje tendenci ke kulovitému tvaru tumoru (35).

V případě PRCC typu 1 je typická ztráta chromozomu Y u mužů a trizomie chromozomu 7 a 17 (36). Méně jsou nacházeny další aberace, jako trisomie chromozomem 8, 12, 16 a 20 (37).

Hereditární forma PRCC typu 1 je spojena s defektem genu pro c-Met. Tento protein je také nazýván tyrosin-protein kináza Met a je receptorem pro růstový faktor

hepatocytů (HGFR), tento má důležitou funkci v regulaci proliferace a diferenciaci endotelových buněk a epitelů. Gen *MET* je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 7 v lokusu 7q31.3. Dědičnost je autozomálně dominantní s nekompletní penetrací (10). Inhibice c-Met se uplatňuje již nyní v léčbě metastatického renálního karcinomu. Cabozantinib je nový tyrozinkinázový inhibitor cílící na c-Met a VEGFR2. Ve studii METEOR byl cabozantinib porovnáván s everolimem v druhé linii léčby u pacientů předléčených první řadou tyrozinkinázových inhibitorů (TKI). U skupiny s cabozantinibem bylo prokázáno zlepšení v celkovém přežití, delší čas do progresu a výraznější objektivní odpověď ve srovnání s everolimem (38).

Dalším syndromem asociovaným s PRCC, i když vzácně, je komplex **tuberózní sklerózy** (TS, *tuberous scleriosis*). Tuberózní skleróza je autozomálně dominantní syndrom predisponující k mnohočetným benigním tumorům kůže, mozku a vnitřních orgánů. V rámci syndromu je zvýšená frekvence nejen benigních angiomyolipomů ledvin, ale také bilaterálních a mnohočetných renálních karcinomů. Mezi nejčastější histologie patří CCRCC, CHRCC a PRCC. Nalezeny bývají mutace v genech *TSC1* (*tuberous sclerosis 1*) na chromozomu 9q34 kódujícím hamartin nebo *TSC2* na chromozomu 16p13 kódujícím tuberin (39).

Dříve popisovaná hereditární varianta PRCC typu 2 s defektem genu pro fumarát hydratázu (FH), enzym Krebsova cyklu konvertující fumarát na malát (40), je v současné klasifikaci přehodnocena na samostatnou nádorovou podjednotku, **renální karcinom spojený se syndromem hereditární leiomyomatózy** (HLRCC-RCC, *hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma associated renal cell carcinoma*). Jedná se o agresivní tumor s velmi špatnou prognózou. Vyskytuje se jak ve formě hereditárního syndromu, tak i sporadicky (33, 41). Součástí hereditárního syndromu jsou mnohočetné kožní leiomyomy, u žen uterinní leiomyomy a renální karcinom (42, 43). Dědičnost je autozomálně dominantní. Gen pro fumarát hydratázu je lokalizován na 1q42.3-q43. Je-li defektní, neprodukuje funkční enzym a hromadí se fumarát. To vede ke zvýšené produkci reduktázového enzymu AKR1B10 (41). Dále fumarát funguje jako kompetitivní inhibitor prolyl hydroxylázy (PHD). Při normoxických podmínkách PHD hydroxyluje dva proliny HIF, to je nezbytné k navázání VHL a následné ubiquitinizaci a degradaci komplexu (44). Při nadbytku fumarátu je PHD afunkční, což ve svém důsledku stabilizuje HIF, jeho osa je stále stimulována a tím je zřejmě podpořena tumorigeneze (45).

Jedná se o agresivní onemocnění vyskytující se u mladších jedinců (průměrně 44 let, v rozmezí 21-65) s mírnou predominancí mužů (33). Vyskytuje se vzácně, představuje od 0,05 – 0,2% (19) nebo až 0,8% (33) ze všech renálních karcinomů, je to však jednotka velmi důležitá vzhledem k malignímu průběhu onemocnění. Trpkov et al. analyzovali soubor 24 případů (IHC prokázaná FH deficiencie u tumoru morfologicky hodnoceného jako PRCC typu 2 nebo neklasifikovaného high-grade RCC nebo neklasifikovaného RCC s papilární strukturou, celkem 124 vyšetřených tumorů). V době diagnózy byl v 57% tumor stadia pT3 a vyšší, v 52% byly prokázány metastaticky postižené uzliny a v 19% již vzdálené metastázy. Tumor byl ve 39% spojen s kožními leiomyomy a v 55% s uterinními leiomyomy. Medián sledování byl 27 měsíců (1-114 měsíců), za tuto dobu 39% pacientů zemřelo následkem tumoru a v 25% ostatních byla prokázána progresse onemocnění (33). Jako vhodná strategie je všeobecně akceptováno testování germline mutací a následné sledování u rodinných příslušníků postižených (46).

Standardní histopatologická diagnostika s hematoxylinem-eosinem (HE) i s běžnou imunohistochemickou (IHC) analýzou je pro diagnózu takové nádorové jednotky nedostatečná. I když primární morfologický vzhled tumoru ledviny při HLRCC je papilární, mohou vznikat různé morfologické projevy a často v kombinaci. Správné stanovení diagnózy je tedy náročné.

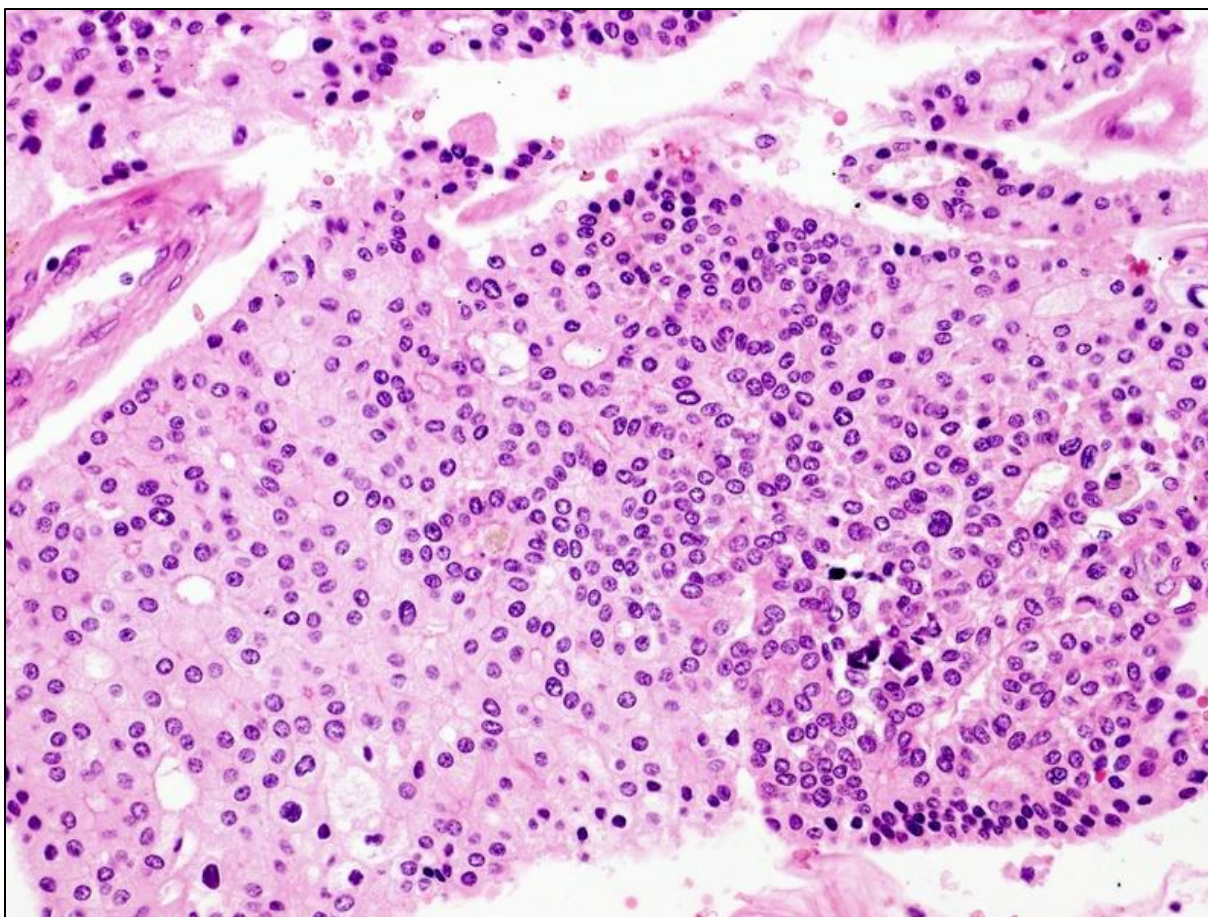
V diagnostice se tedy nejvíce využívá specifické IHC stanovení aktivity 2SC nebo negativity FH. Zvýšená hladina fumarátu modifikuje rezidua cystinu v mnoha proteinech rezultující ve zvýšenou sukcyinylaci proteinů a produkci S-(2-sukcino)-cystein (zkráceně 2-sukcinocystein; 2SC). Stanovení 2SC je užíváno jako marker ke stanovení těchto FH-deficientních tumorů, které vykazují vysoké hladiny 2SC. Naopak ztráta enzymatické aktivity FH je demonstrována nízkým, nebo zcela chybějícím IHC zbarvením. Tato vyšetření jsou tedy vysoce specifická pro HLRCC asociované tumory (33, 47).

Diagnostika pomocí IHC je však problematická pro obtížnou interpretaci nálezů a v současné době i komerční dostupnost protilátek. Proto nejlepší metodou v diagnostice je analýza samotného FH genu. Molekulárně genetická diagnostika se užívá zvláště u některých obtížných a vzácných případech. Využívá se zvláště metod

tzv. *Next Generation Sequencing* při odhalování mutací nebo jiných alterací FH genu (48).

5.3 Chromofóbní renální karcinom

Chromofóbní renální karcinom (CHRCC) tvoří přibližně 5% renálních karcinomů (2,7% - 12%) (20–22). Vyrůstá z buněk kortikálních sběrných kanálků. Ve srovnání s CCRCC má tendenci k nižšímu klinickému stage. Nízké je riziko nádorové progresse, metastázování a nádor – specifické přežití je delší (49). Makroskopicky je tumor homogenní, béžový až šedohnědý, solidně uspořádaný. Typicky chybí nekrózy a hemoragie. Histologický nález v barvení hematoxylin-eosinem ukazuje buňky s výraznou nebarvící se cytoplazmou. Buňky bývají často binukleární nebo ultinukleární s perinukleárním projasněním. Jen vzácně jsou tumory vícečetné (10). Vyskytují se vzácně, přibližně v 8%, dediferencované varianty sarkomatoidní, které mají špatnou prognózu (50). Přibližně v 30-45% jsou nádory smíšené s obsahem eozinofilních a světlých buněk. Tyto onkocytické varianty jsou obtížně diferencovatelné od renálních onkocytomů. Zde je nutná jak imunohistochemická analýza, stanovení cytokeratinu 7 a mitochondriálního antigenu, ale také stanovení chromozomálních aberací k odlišení benigního onkocytomu od onkocytické varianty CHRCC (51). Typické jsou u CHRCC ztráty chromozomů 1, 2, 6, 13, 17 a 21 (52). V nedávné době byla představena nová gradingová klasifikace pro CHRCC dle Panera, která je prognosticky relevantnější oproti standardnímu grade dle Fuhrmannové (53). Práce Sperry et al. z roku 2013 nejen, že ukazuje daleko širší spektrum chromozomálních aberací nacházených u CHRCC. Nejčastěji byly nalezeny ztráty chromozomu 1, 2, 6, 10, 13, 17 a 21, ale také trisomie chromozomů 4, 7, 15, 19, a 20. Korelace mezi chromozomálními aberacemi a Panerovým grade nebyla nalezena (52).



Obrázek 17 - Low grade chromofóbní renální karcinom, hematoxylin-eosin, zvětšení 100x (s laskavým svolením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D., Šiklův ústav patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň)

Vzácná multicystická varianta CHRCC je indolentního chování s nízkou mitotickou aktivitou (IHC aktivita Ki67 je menší než 1%) a byly popsány nepravidelné a vícečetné chromozomální aberace (54).

Chromofobní RCC se vyskytuje také jako součást hereditárního **syndromu Birt-Hogg-Dubé (BHD)**. Mezi další entity vyskytující se u BHD patří onkocytom, PRCC a CCRCC (22, 55), CHRCC je však u BDH nejčastější. Jedná se o autozomálně dominantně dědičný syndrom vznikající na podkladě alterace v tumor supresorovém genu *FLCN* lokalizovaném v lokusu 17q12 - q11.2, jehož produktem je protein folikulin (FLCN). Vzhledem k širokému spektru renálních tumorů asociovaných s BHD syndromem se předpokládá, že gen *FLCN* hraje zásadní roli v diferenciaci buněk renálních tubulů (55). Tedy, mutace *FLCN* postihne progenitorovou buňku proximálního nebo distálního tubulu nebo sběrného kanálku, dojde k poruše tvorby

extracelulární matrix, jejím strukturálním změnám a poruchám mikroprostředí (56). FLCN také negativně ovlivňuje jednu ze signálních drah mTOR (*mammalian target of rapamycine*, savčí rapamycinový receptor), dráhu AMPK/mTOR (*AMP-activated protein kinase*, AMP-aktivovaná protein kináza). Zvyšuje se tak vliv dráhy PI3K/AKT-PKB/mTOR (*phosphatidylinositol-3-kinase/protein-kinase B/mTOR*) (57). To zřejmě přispívá k nekontrolovatelné buněčné proliferaci.

Syndrom BHD se prezentuje jako genodermatóza s multifokálními benigními kožními nádory na horní polovině těla včetně obličeje (fibofolikulomy, fibrodiskomy, akrochondrony). Mezi další projevy patří multifokální plicní cysty s možnými spontánními pneumotoraxy, střevní polypy, medulární karcinom štítné žlázy a bilaterální, multifokální renální nádory.

Renální tumory jsou součástí BHD syndromu v 25-35% (58). Nejčastější výskyt nádorů ledvin u BHD syndromu je okolo 50. roku věku, patrná je mužská predominance, v příbuzenské linii je asi 7x vyšší riziko vzniku nádorů ledvin než je v běžné populaci (58, 59).

5.4 Karcinom ze sběrných kanálků a medulární renální karcinom

Karcinom ze sběrných kanálků (CDC, *collecting duct carcinoma*) má predominantní tubulární strukturu s buňkami vysokého grade a roste infiltrativně. V méně než 5% případů dochází k diagnostickým obtížím při přítomnosti uroteliální komponenty, která může být dána divergentní diferenciací z místa ductu, kde je v kontaktu s urotelem. Obě entity se částečně překrývají i v imunohistochemických vlastnostech, PAX8 typický pro CDC je přítomen také až u 20% karcinomů horních močových cest a marker p63 typický pro uroteliální karcinom, je pak nalezen asi v 15% CDC. Tyto tumory jsou často diagnostikovány v lokálně pokročilém stadiu nebo s již založenými vzdálenými metastázami.

Medulární renální karcinom (RMC, *renal medullary carcinoma*) byl popsán v roce 1995 a vyskytuje se téměř výhradně u dětí a mladých dospělých se srpkovitou anémií (60). Jedná se o vysoce invazivní a letální onemocnění. Dochází k hromadění HIF 1 α a akcentaci HIF 1 α signální cesty. Uvažuje se ontologická souvislost mezi RMC a uroteliálním karcinomem. Tato jednotka nemá konzistentní soubor chromozomálních aberací, nebo molekulárně genetických poruch (17).

5.5 Renální karcinom spojený se získanou cystózou ledvin

Renální karcinom spojený se získanou cystózou ledvin (ACD-RCC, *acquired cystic disease – associated RCC*) je nejčastější renální karcinom vyskytující se u tzv. „*end-stage kidney disease*“ (ESKD), tedy konečné fáze ledvinného selhání, zvláště v těch případech kdy je spojitost se získanou cystózou (až 46% z nich). Tumor se skládá z buněk s eozinofilní cytoplazmou, kribriformní architektury a intratumorálních oxalátových krystalů. Zvažuje se také dlouhotrvající hemodialýza (více než 10 let) (61). Tumor často vykazuje tubulární, papilární, cystickou nebo acinární strukturu, často je multifokální, někdy bilaterální. Makroskopicky se často jeví jako noduly vyrůstající ze stěny cysty, nebo tuto cystu vyplňují. Díky časté papilární architektuře dochází k záměnám za PRCC typu 2 (dříve byl PRCC typu 2 považován za nejčastější tumor u ESKD). Molekulárně geneticky lze detekovat ztráty nebo navýšení mnoha chromozómů, nejčastěji polysomie 7 a/nebo 17, dále 1, 2, 3, 6, 16 a Y (17). Biologické chování tumoru je popisováno jako agresivnější v porovnání s jinými typy nádorů vyskytujícími se u ESKD (62).

5.6 Mucinózní tubulární a vřetenobuněčný renální karcinom

Tumor připomínající morfologicky stavbu Henleyho kličky. Jsou přítomné dva typy buněčných populací. První, četnější, obsahuje ploché vřetenovité buňky s řídkou cytoplazmou. Jsou aranžovány podobně jako low grade tumory s hladkého svalstva. Druhou populaci tvoří kuboidní buňky seřazené do tubulárních struktur s eozinofilní, nebo světlou cytoplazmou. Často se vyskytuje v kombinaci s urolitiázou. Objevují se chromozomální alterace podobné jako u PRCC, tedy polysomie 7 a 17 a chybění Y. Jeho maligní potenciál je celkem malý, ale objevují se i agresivní sarkomatoidní variace tumoru (17, 63, 64).

5.7 Sukcinát dehydrogenáza (SDH) - deficientní renální karcinom

Sukcinát dehydrogenáza (SDH) - deficientní RCC byl uznán jako nová nádorová jednotka WHO 2016 (17, 19). Dle provedených studií na dostupných souborech se odhaduje četnost tumorů s deficiencí SDH od 0,05% do 0,2% všech renálních karcinomů. Střední věk pacientů v době diagnózy byl 37 let, patrná mírná predominance mužů. Asi ve čtvrtině případů je tumor zachycen jako bilaterální, nebo mnohočetný a u 1/3 se rozvine metastatické postižení (65). Nádor obsahuje

eozinofilní buňky s výraznými vakuolami nebo světlé buňky. SDH-B je jedním ze 4 proteinů (SDH-A až D) tvořících společně SDH. SDH konvertuje sukcinát na fumarát v Krebsově citrátovém cyklu. Při defektu SDH se hromadí sukcinát a následně HIF s akcentací signální dráhy. Tyto defekty jsou spojeny s rozvojem mnoha tumorů, feochromocytomů, paragangliomů, gastrointestinálních stromálních tumorů, pituitárních adenomů a renálního karcinomu (65). V diagnostice lze užít IHC k zobrazení deficiencie SDH-B (19) nebo vyšetření poměru sukcinát/fumarát ve tkáni tumoru (66). Ke genetické analýze mutací genu pro SDH se užívá PCR a přímého sekvenování (65).

5.8 Tubulocystický renální karcinom

Tubulocystický renální karcinom (TCRCC) je převážně cystický tumor.

Makroskopicky se skládá z mnohočetných malých až středně velkých cyst a má houbovitý charakter. Jádra buněk jsou zvětšená s výraznými jádérky. Cytoplazma je výrazně eozinofilní s podobností s buňkami onkocytomu. Bylo popsáno dosud okolo 70 případů. Morfologické spektrum zahrnuje jak čistě tubulocystickou stavbu, tak tumor s okrsky papilárního karcinomu, komponenty světlobuněčného karcinomu i angiomyomatózní komponenty. Tumor vykazuje variabilitu v chromozomálních aberacích, zvláště polysomie chromozomů 7, 17 a ztrátu Y, dále heterozygotitu 3p, a to jak v okrscích typické stavby tubulocystické komponenty, tak i v okrscích odlišných morfologických komponent (48).

U špatně diferencovaných (high-grade) karcinomů s tubulocystickou stavbou se zvažuje vztah k tumorům s deficitem fumarát hydratázy, jedná se vždy o tumory agresivní s častými nálezy uzlinového postižení nebo vzdálených metastáz v době diagnózy. U více než 50% je nalezena IHC negativita FH a u 100% pozitivita 2SC (67). Morfologicky i IHC jsou high-grade TCRCC a HLRCC zaměnitelné a proto by se v hraničních případech měly vyšetřit možné alterace *FH* genu (48).

Ve studii zabývající se možnou predikcí efektu antiangiogenní léčby současnými tyrosinkinázovými inhibitory u metastatického TCRCC stanovili Steiner et al. alterace v 16 genech pro zásadní proteiny signálních drah angiogeneze (VHL/HIF, RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR) u vzorků tumorů 7 pacientů v porovnání se vzorky zdravé tkáně. Navíc byl hodnocen stav mutací a metylací genu pro VHL a pomocí IHC také hladiny VEGFA, HIF 1 α a HIF 2 α a mTOR. V porovnání výsledků

tumorózní tkáně a zdravé tkáně nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v mRNA genů pro VHL, HIF 1 α , HIF 2 α , PTEN, Akt2, Akt3, mTOR, VEGFA, KDR, HRAS, C-Jun, EGFR a FGF2. Signifikantně zvýšená hladina mRNA pro p53 byla prokázána ve tkáni tumoru, zatímco mRNA pro FLT1 a CFOS byla snížena. Změny v hladinách sledovaných proteinů VEGFA, HIF 1 α a HIF 2 α nebyly mezi vzorky prokázány, stejně tak jako fosforylace mTOR. Nebyla tedy prokázána upregulace žádné ze signálních drah vedoucích k angiogenezi v TCRCC a tedy lze předpokládat i limitovaný efekt současné antiangiogenní cílené léčby u této nádorové jednotky (68).

5.9 MiT Translokační renální karcinomy (TRCC)

Jedná se o renální karcinomy spojené s translokacemi alterujícími funkci genů pro transkripční faktory TFE3 (gen na krátkém raménku X chromozomu, označení lokusu jako Xp11.2) nebo TFEB (gen na krátkém raménku 6. chromozomu v místě 6p21). TFE3 a TFEB patří spolu s MITF a TFEC do MiT (*microphthalmia transcription*) rodiny transkripčních faktorů. Nejvýraznější roli hrají v diferenciaci osteoklastů a melanocytů (18), ale podstatná je role těchto faktorů v kancerogenezi. MITF je významně amplifikován u maligního melanomu a u určitých tumorů mladého a dětského věku jsou nalezeny translokace genů pro TFEB a TFE3 (69). Translokacemi částí chromozomů dochází k fúzím genů a změněné funkci výchozích proteinů. Tyto tzv. fúzní proteiny mají funkci transkripčních faktorů a způsobují aberantní overexpresi určitých genů. MiT translokační renální karcinomy byly ustanoveny jako samostatná skupina ISUP v roce 2013 (17).

5.9.1 Xp11.2 translokační renální karcinom

V lokusu Xp11.2 se nachází gen pro transkripční faktor E3 (TFE3). Prokázané translokace Xp11.2 má asi 40% renálních karcinomů u mladých dospělých a dětí (dříve byly taky tyto tumory nazývány „juvenilními renálními karcinomy“) a asi 5% u starších dospělých (18). Vzhledem k incidenci renálního karcinomu ve věkových skupinách (viz obrázek 5) je zjevné, že v absolutních počtech řádově převyšují dospělí pacienti.

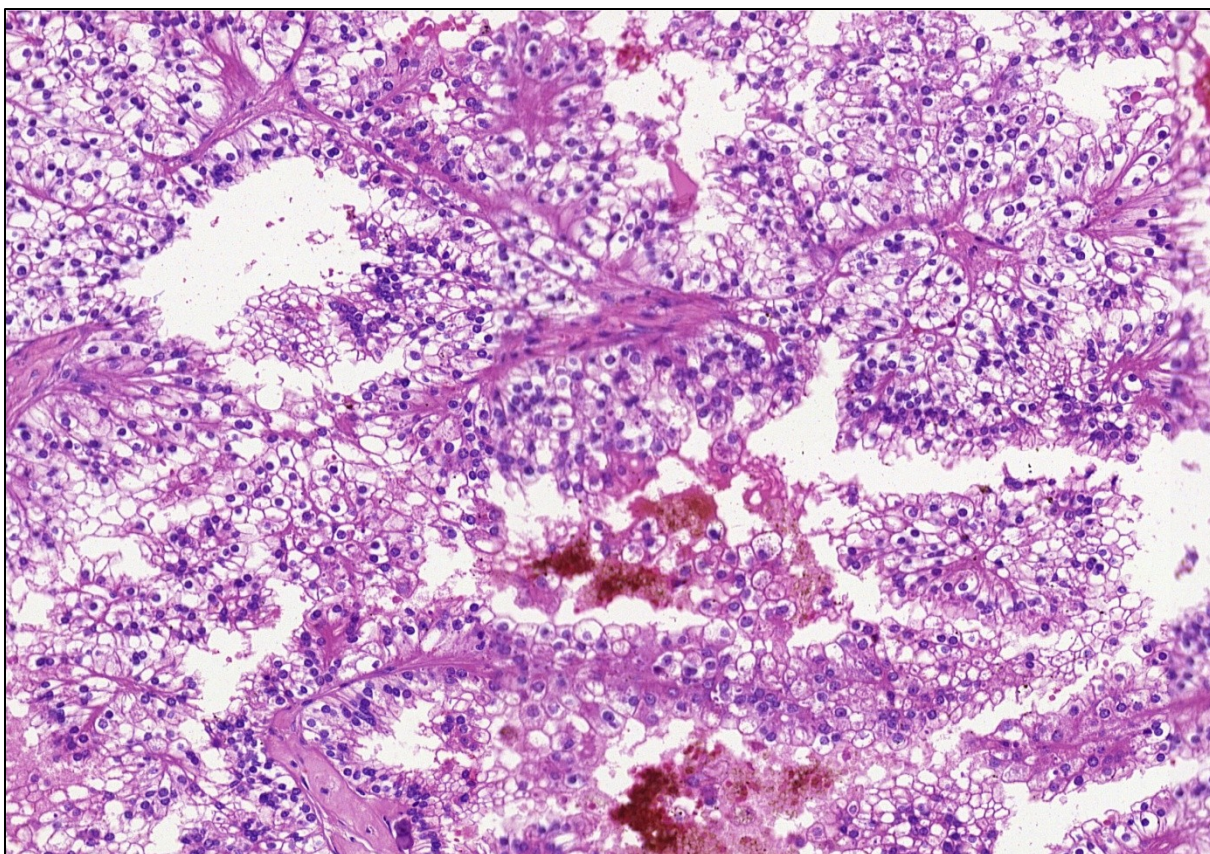
Mezi nejčastější translokace Xp11.2 patří (18):

- t(X;1)(p11.2;q21) \approx přesun genu TFE3 \rightarrow gen PRCC (TFE3-PRCC)
- t(X;17)(p11.2;q25) \approx (TFE3-ASPL)

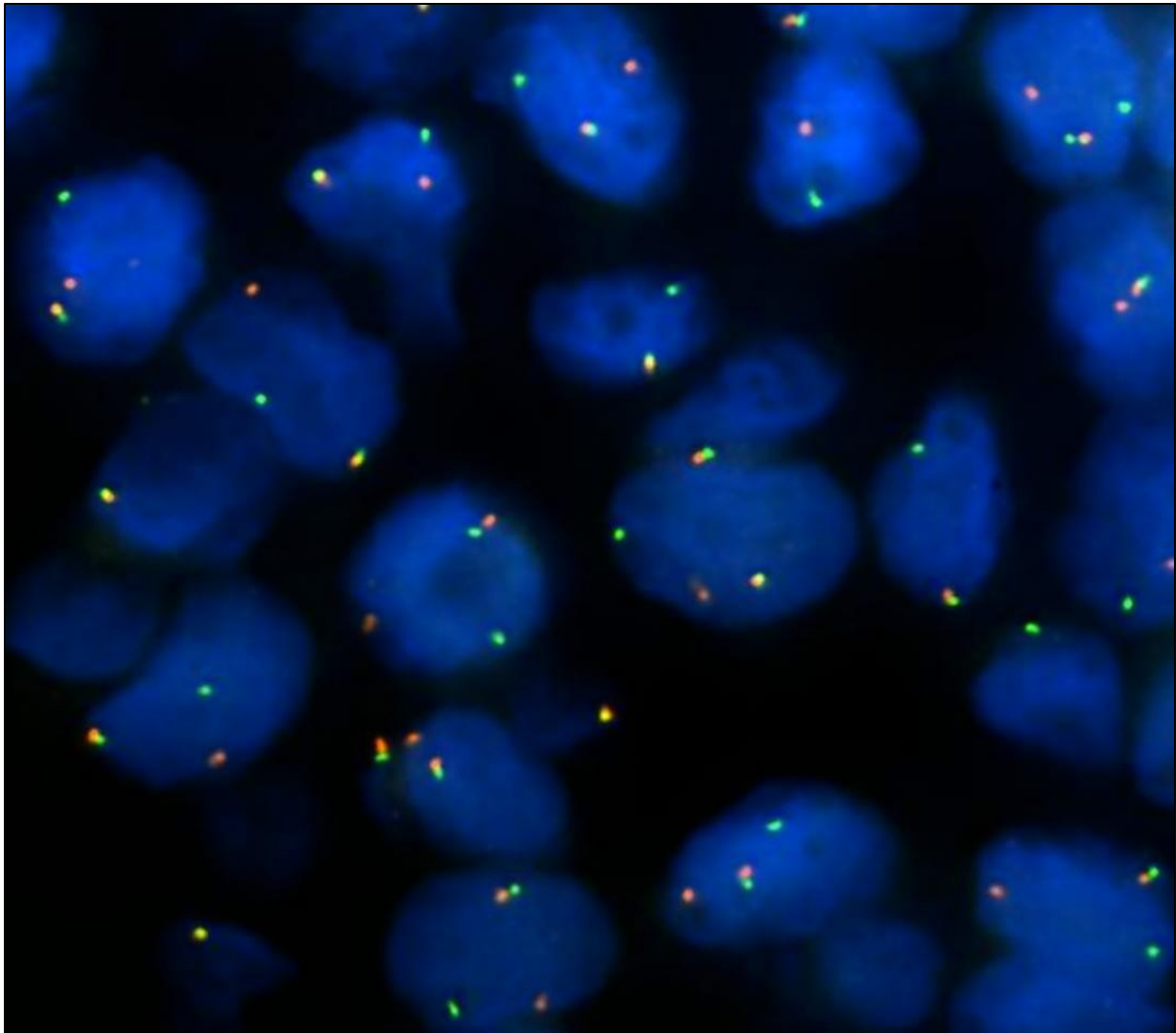
- $t(X;1)(p11.2;p34) \approx (TFE3-PSF)$
- $t(X;17)(p11.2;q23) \approx (TFE3-CLTG)$
- $inv(X)(p11;q12) \approx (TFE3-NonO)$

TRCC Xp11.2 je zařazen do klasifikace WHO od roku 2004 (70). Hlavní vlastnosti Xp11.2 TRCC jsou obdobné jako u světlobuněčného renálního karcinomu (CCRCC). Tumor je typicky solidní, žlutohnědé nebo šedavé barvy s nekrózami, hemoragiemi, ojediněle s papilární stavbou. Mikroskopicky jsou tyto tumory složeny z velkých buněk s abundantní světlou až eozinofilní nebo granulární cytoplazmou seřazených do papilárních větvících se struktur, někdy vytvářející hnízda. Jádra jsou zvětšená a nepravidelná, vysokého nukleárního gradu. Takový je vzhled typický pro ASPL-TFE3 TRCC. Často se prezentuje agresivním fenotypem, v době diagnózy jsou tumory často pokročilé s uzlinovým postižením nebo vzdálenými metastázami. Pro translokaci PRCC-TFE3 je typičtější architektura papilární nebo kompaktní s buňkami méně výraznou cytoplazmou a nižším nukleárním grade než ASPL-TFE3 varianta (18, 71).

Diagnostika TRCC se opírá jak o morfologické známky, tak o vyšetření IHC i genetickou analýzu. Histopatologické metody však nevedou k bezchybným výsledkům. Genová translokace vede k overexpresi TFE3, předpokládá se, že IHC stanovení TFE3 je dobrým diagnostickým nástrojem. Přesnější diagnostika je však pomocí cytogenetických metod (například fluorescenční in situ hybridizace, FISH), nejsou však zcela rutinně používané. Klatte et al. popsali u 17 TFE3 pozitivních případů pouze 2 cytogeneticky potvrzené (72). Komai et al. popsali 7 případů TRCC Xp11.2 ze souboru 443 pacientů, 4 byli diagnostikováni geneticky, 3 pomocí IHC (73). Argani et al. pak v souboru 28 IHC diagnostikovaných potvrdili TRCC pomocí cytogenetiky (74).



Obrázek 18 - Translokační renální karcinom Xp11.2, hematoxylin-eosin, zvětšení 100x (s laskavým svolením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D., Šiklův ústav patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň)



Obrázek 19 - Fluorescenční in situ hybridizace, translokační renální karcinom Xp11.2, TFE3 break apart (s laskavým svolením prof. MUDr. Ondřeje Hese, Ph.D., Šiklův ústav patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Plzeň)

K diagnostickým možnostem přispěli i Xu et al., popsali chimerický protein TMED6-COG8 výrazně exprimovaný u tumorů s translokací Xp11 jako nový marker těchto translokačních tumorů (75).

5.9.2 6p21 translokační renální karcinom

Další část tumorů této skupiny je charakterizována translokací místa 6p21, kde se nachází gen pro transkripční faktor EB (TFEB), jinak také bývá značen t(6;11).

Dochází tedy ke genové fúzi *TFEB* v místě 21 na krátkém raménku 6. chromozómu (p21) a genu *Alpha (MALAT1)* na dlouhém raménku 11. chromozómu (q12). Vede to k overexpresi celého proteinu TFEB (18). Tumor má typické histopatologické

vlastnosti, díky kterým jeden z dřívějších názvů byl „rosette forming“ renální karcinom, nebo také HMB45 pozitivní karcinom. Jedná se extrémně vzácný tumor popisovaný od roku 2007, první review popisující 11 případů publikoval Hora et al. v roce 2009 (76). Histologicky se projevuje papilární stavbou se světlými nebo eozinofilními buňkami, morfologické spektrum je však široké.

Diagnosticky lze užít imunohistochemické zobrazení zvýšené přítomnosti TFEB, které se jinak u renálního karcinomu nevyskytuje (77). Dále pomocí FISH lze odhalit translokaci přímo, nebo pomocí *reverse transcriptase* –PCR (RT-PCR) stanovit zvýšen množství fúzní Alpha-TFEB mRNA, nebo přímo fúzi genů detekovat pomocí DNA PCR (76–78). V diferenciální diagnostice je třeba odlišit od PRCC, kdy chybí typická trisomie chromozómů 7 a 17 a ztráta Y u mužů, dále od CCRCC, kdy není přítomná delece 3p (18).

5.10 Hereditární syndromy spojené s renálními tumory

Zde jsou ve zkratce shrnuty nejčastější hereditární syndromy spojené s výskytem renálních tumorů (25, 39, 42, 43, 79, 80).

5.10.1 Von Hippel-Lindau nemoc (VHL)

- postižený gen: *VHL* (supresorový gen)
- lokus: 3p25
- penetrance: vysoká (RCC se vyskytne asi u 45% z postižených, do 65 let věku)
- dědičnost: autozomálně dominantní (AD)
- produkt: VHL protein
- funkce: vazba a degradace HIF1 α
- typ renálního tumoru: světlobuněčný RCC
- manifestace syndromu: hemangioblastomy retiny, CNS (mozečku), feochromocytomy, cysty pankreatu, neuroendokrinní tumory, cysty nadvarlat
- incidence: 1,18-2,78/100 000

5.10.2 Hereditární papilární renální karcinom (HPRCC)

- postižený gen: *MET* (protoonkogen)

- lokus: 7q31
- penetrace: inkompletní
- dědičnost: AD
- produkt: c-MET (HGFR)
- funkce: tyrozinkinázový receptor pro HGF (*hepatocyte growth factor*)
- typ renálního tumoru: papilární RCC typu 1
- manifestace syndromu: jen PRCC
- incidence: není jasná

5.10.3 Renální karcinom spojený se syndromem hereditární leiomyomatózy a renálního karcinomu (HLRCC-RCC)

- postižený gen: *FH* (supresor)
- lokus: 7q31
- penetrace: inkompletní
- dědičnost: AD
- produkt: c-MET (HGFR)
- funkce: tyrozinkinázový receptor pro HGF (*hepatocyte growth factor*)
- typ renálního tumoru: papilární RCC typu 1
- manifestace syndromu: jen PRCC
- incidence: není jasná

5.10.4 Birt-Hogg-Dubé syndrom

- postižený gen: *FLCN* (supresor)
- lokus: 17q12-q11.2
- penetrace: renální tumory se vyskytnou v 25-30% BHD pacientů
- dědičnost: AD
- produkt: folikulin
- funkce: součást dráhy MAPK/AKT/TSC1-TSC2/mTOR; ovlivňuje TFE3 a TFEB transkripční aktivitu
- typ renálního tumoru: CHRCC, onkocytom, PRCC a CCRCC

- manifestace syndromu: fibrofolikulomy kůže, plicní cysty, spontánní pneumotoraxy, polypy tračníku a renální nádory

5.10.5 Tuberózní skleróza

- postižený gen: *TSC1*, *TSC2* (*tuberous sclerosis complex*)
- lokus: 9q34 (*TSC1*) 16p13.3 (*TSC2*)
- penetrance: téměř kompletní
- dědičnost: AD
- produkt: hamartin, tuberin
- funkce: heterodimer hamartinu a tuberinu inhibuje dráhu mTOR
- typ renálního tumoru: renální angiomyolipomy (přibližně v 75-80%), cysty, onkocytomy a renální karcinomy (přibližně v 5%)
- manifestace syndromu: angiofibromy obličeje, hypomelanocytární makuly, hamartomy různých orgánů, angiofibromy různých lokalizací, epilepsie

5.10.6 Další vzácné syndromy spojované s renálními tumory

PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) hamartoma syndrom

- CCRCC

Syndrom spojený s mutací BAP1 (*BRCA associated protein*)

- CCRCC

SDH- deficientní renální karcinom

- CCRCC, CHRCC, onkocytomy (43)

Tabulka 2 - WHO klasifikace renálních nádorů z roku 2016

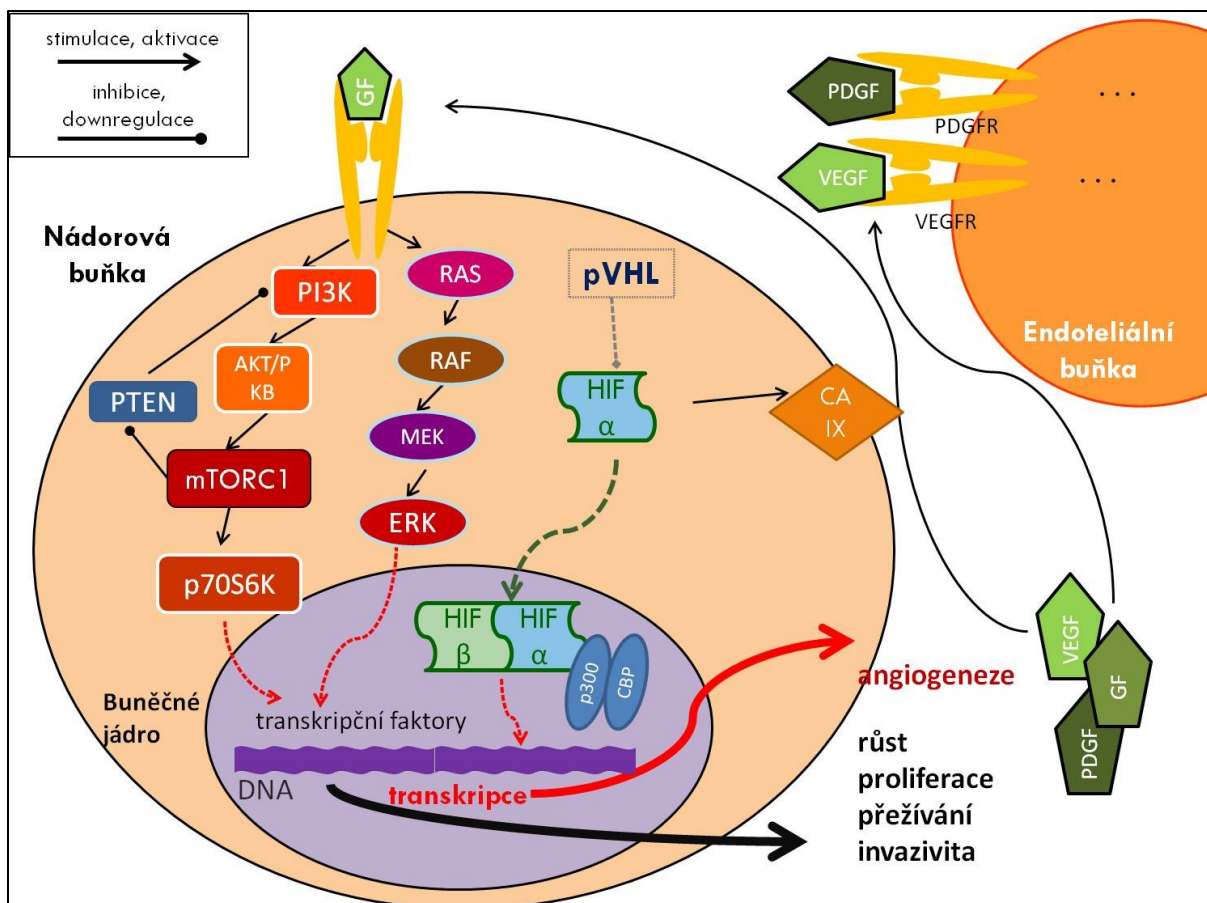
Nádory z renálních buněk	Světlobuněčný renální karcinom (CCRCC)
	Multilokulární cystická renální neoplazie nízkého maligního potenciálu
	Papilární renální karcinom (PRCC)
	Renální karcinom asociovaný s hereditární leiomyomatózou
	Chromofobní renální karcinom
	Karcinom ze sběrných kanálků (Bellini)
	Medulární renální karcinom
	MiT translokační renální karcinomy
	Sukcinát dehydrogenáza-deficientní renální karcinom
	Mucinózní tubulární a vřetenobuněčný renální karcinom
	Tubulocystický renální karcinom
	Renální karcinom spojený se získanou cystózou ledvin
	Světlobuněčný (tubulo-) papilární renální karcinom
	Neklasifikovaný renální karcinom
	Papilární adenom
	Onkocytom
Metanefrické tumory	Metanefrický adenom
	Metanefrický adenofibrom
	Metanefrický stromální tumor
Nefroblastické a cystické tumory vznikající hlavně u dětí	Nefroblastom
	Nefrogenní pozůstatky
	Cystický částečně diferencovaný nefroblastom
	Cystický nefrom dětského věku

Mesenchymální tumory	Světlobuněčný sarkom
<i>vznikající hlavně u dětí</i>	Rhabdoidní tumor
	Kongenitální mesoblastický nefrom
	Osifikující renální tumor dětí
	Leiomyosakrom
<i>vznikající hlavně u dospělých</i>	Angiosarkom
	Rhabdomyosarkom
	Osteosarkom
	Ewingův sarkom
	Angiomyolipom
	Epiteloidní angiomyolipom
	Synoviální sarkom
	Leiomyom
	Hemangiom
	Lymfangiom
	Hemangioblastom
	Tumor z juxtaglomerulárních buněk
	Renomedulární intersticiální tumor
	Schwannom
	Solitární fibrózní tumor
Cystický nefrom	
Smíšené mezenchymální a epitelové tumory	Smíšený epiteliální a stromální tumor
	Dobře diferencovaný neuroendokrinní tumor
Neuroendokrinní tumory	Neuroendokrinní karcinom (high-grade neuroendokrinní tumor)
	Velkobuněčný neuroendokrinní karcinom
	Malobuněčný neuroendokrinní karcinom
	Feochromocytom
Hematopoetické a lymfoidní tumory	
Nádory ze zárodečných buněk	
Metastatické tumory	
Ostatní	

6 Signální dráhy renálního karcinomu

V případě renálního karcinomu obecně je nejpodstatnější hyperaktivita proangiogenní dráhy VEGF hyperstimulované nadbytkem HIF 1 α při defektu *VHL* a nedostatku pVHL. Pro nádory ledvin je charakteristická tkáňová hypoxie při vyšší spotřebě než přísunu kyslíku. Neoangiogeneze je u karcinomu ledviny oproti jiným solidním nádorům výraznější (81).

Defektní gen *VHL* (bodová mutace, delece či hypermetylace promotoru genu) netvoří VHL, nedochází k ubikvitinizaci HIF1 α a dochází ke zvýšené transkripci množství genů, zvláště pro VEGF, PDGF β a další (27). Efekty takto podmíněné genové exprese, jsou jednak intrinsické (tedy ve vlastní nádorové buňce), ale také extrinsické s účinkem na blízké endoteliální buňky cév, kde podmiňují růst cév. Růstové faktory, jako zde VEGF a PDGF, po navázání na příslušné receptory spustí kaskády dějů, které ve svém důsledku vedou k stimulaci exprese genů pro vlastní efektorové proteiny. Tyto pomyslné kaskády jsou představovány jednotlivými intracytoplazmatickými proteiny s kinázovou aktivitou. Vzájemně se aktivují a dochází tak k přenosu impulzu od extracelulárního mitogenu (růstového faktoru) do jádra buňky, kde je spuštěna genová transkripce. U renálního karcinomu jsou nejvíce prostudovány následující signální dráhy.



Obrázek 20 - Buněčné signální dráhy, cíle systémové léčby. Upraveno podle Sun M et al.: Prognostic Factors and Predictive Models in Renal Cell Carcinoma: A Contemporary Review. Eur Urol 60: 644–661, 2011

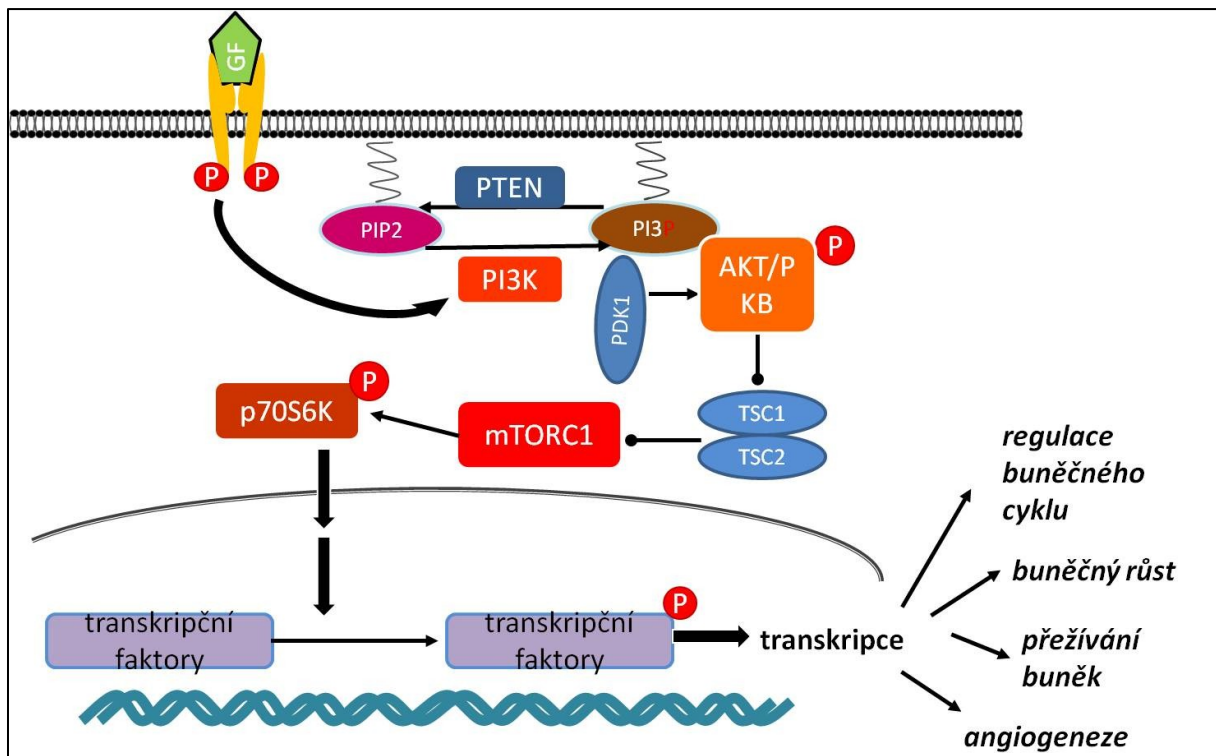
6.1 PI3K/Akt/mTOR signální cesta

Jedná se o významnou signální dráhu integrující různé mitogenní stimuly extracelulární i intracelulární, která má důležitou úlohu v kontrole buněčného růstu, proliferace, angiogeneze, invazivity a buněčného přežití. Cytoplazmatické signální dráhy obecně jsou velmi komplexní a provázané. PI3K/Akt/mTOR cesta je propojena s dráhami MAPK, NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) a proteiny RAS, RAF, STAT (*signal transducer and activator of transcription*) a jinými. Kináza PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) fosforyluje PIP2 (*PI -2-phosphate*) na PIP3. Tato přeměna je negativně regulována PTEN (*phosphatase and tensin homologue*). PIP3 aktivuje další kinázy jako PDK1 (*phosphoinositide-dependent*

kinase 1) a následně PKB (*protein kinase B*), běžně nazývanou Akt/PKB, zkráceně Akt (9, 82, 83)

Aktivovaná Akt inhibuje apoptózu (inaktivací proapoptotických proteinů, např. bcl-2/BAD) a má vliv na udržení buněčného cyklu. Při aktivaci Akt cestou VEGF dále fosforyluje TSC2 (*tuberous sclerosis komplex 2*) a tím brání vytvoření komplexu TSC1/TSC2. Tím jsou vytvořeny podmínky pro aktivaci mTOR (pomocí enzymu s GTPázovou aktivitou).

mTOR (*mammalian target of rapamycine*) je serin-threoninová kináza, která působí ve dvou komplexech, mTORC1 a mTORC2. Komplex mTORC1 stimuluje syntézu proteinů a buněčný cyklus, komplex mTORC2 má vliv na stavbu cytoskeletu při dělení buňky a navíc sám fosforyluje Akt, působí tedy v kaskádě nad i pod touto kinázou (82). Komplex mTORC1 dále působí cestou kinázy p70S6K1 kterou aktivuje a proteinu 4EBP1, který blokuje. Tato dráha má více efektů, reguluje autofagii, stimuluje růst a proliferaci, buněčnou migraci a angiogenezi.



Obrázek 21 - Signální dráha PI3K/AKT/mTOR. Upraveno podle Klener P jr. and Klener P: Principy systémové protinádorové léčby. Praha, Grada Publishing a.s., 2013

Overexprese signální dráhy mTOR, nebo jednotlivých jejích proteinů (4EBP1, p70S6K1), byla opakovaně prokázána v různých solidních tumorech a popsán byl i vztah k horší prognóze onemocnění (83, 84).

Inhibice mTOR je jedním z mechanismů cílené protinádorové léčby užívané u metastatického renálního karcinomu. Přímé inhibitory blokuující katalytické místo mTOR kinázy nejsou zatím klinicky využívány. Tzv. nepřímá inhibice mTOR je zprostředkována disociací a inhibicí komplexu mTORC1. Jedná se o nejdéle používaný mechanismus inhibice této signální dráhy. První inhibitor, rapamycin (sirolimus), byl nejprve používán pro své imunopresivní účinky v předcházení rejekce štěpu po transplantacích. Nyní jsou analoga rapamycinu (temsirolimus, everolimus) indikována v léčbě mRCC, rezistentního lymfomu z plášťových buněk a HER2 negativních karcinomů prsu menopauzálních žen (9).

6.2 RAS/RAF/MEK/ERK

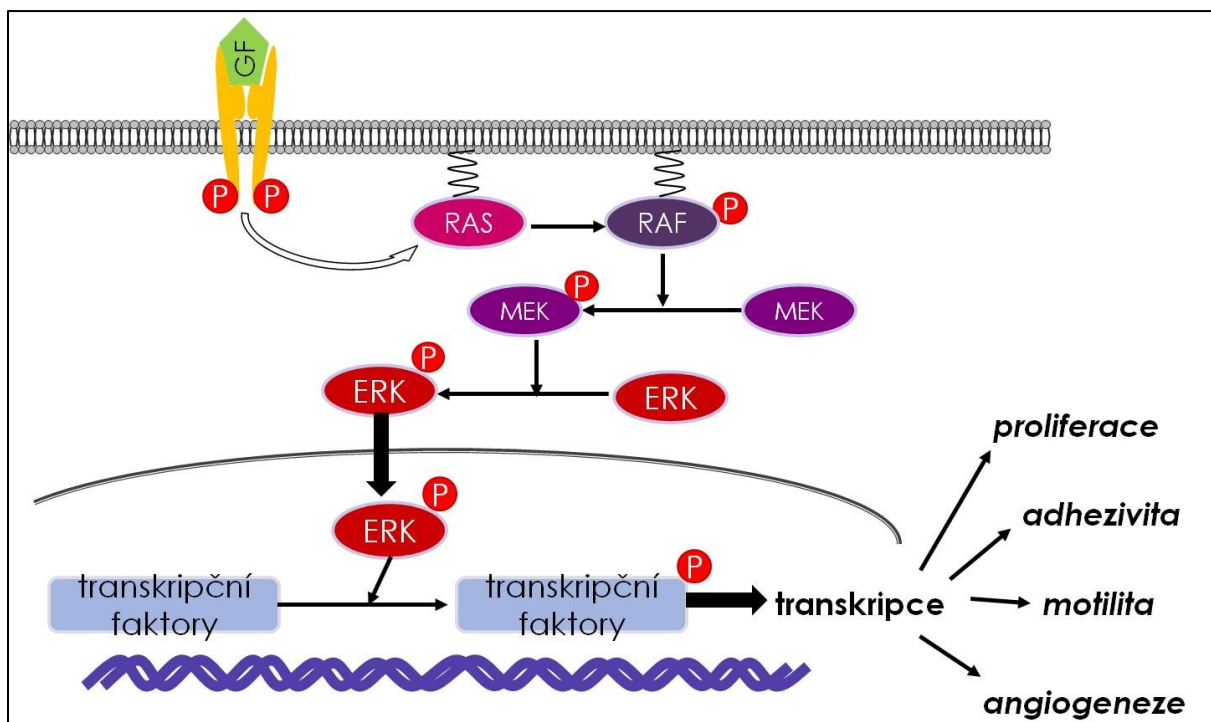
Protein RAS (*Rat adenocarcinoma*) je intrinzická GTPáza s klíčovou funkcí v přenosu mitogenních signálů z vnějšího prostředí intracelulárně. Po navázání GTP je kináza aktivní v přenosu signálu, záhy však dochází k degradaci GTP na GDP vlastním vnitřním účinkem RAS. Do doby další fosforylace není kináza RAS dalšího přenosu schopna.

RAS rodina zaujímá mnoho proteinů, z nich 3 jsou pro onko-biologii velmi významné, HRAS (*Harvey*), KRAS (*Kirsten*), NRAS (*neuroblastoma*). Různé mutace genů pro proteiny RAS mohou způsobit na ligandu nezávislou aktivaci proteinu a signalizaci (*ligand-independent signaling*) vedoucí k patologické proliferaci. Geny RAS patří mezi nejčastěji alterované geny u solidních nádorů. Nejčastější jsou mutace KRAS, nalezeny bývají až u 90% karcinomů pankreatu, 50% karcinomů kolorekta a 30% karcinomů plic (85). Význam proteinů RAS v terapii solidních nádorů je jednak v možnosti samotného terapeutického ovlivnění jejich aktivity (inhibitory farnesyl-transferázy v klinických studiích léčby metastatického kolorektálního karcinomu), jednak jako signálního proteinu v dráze, kterou léčbou inhibujeme. Zde důležitost zachování normální funkce nemutovaného KRAS pro efekt monoklonální protilátky cetuximabu v léčbě metastatického kolorektálního karcinomu. Cetuximab blokuje

extracelulární doménu receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) a blokuje tak přenos signálu. Je-li KRAS jako další protein v „downstream“ signalizaci mutován, je signální dráha trvale stimulována bez ohledu na blokádu EGFR. Nemutovaná forma KRAS (*wild type*) je indikační podmínkou k cetuximabu v léčbě kolorektálního karcinomu (12, 85).

V současné době je popsáno asi deset efektorových molekul RAS, ale mezi nejpodstatnější kaskády spouštěné RAS patří dráha mitogen aktivovaných protein kináz RAF/MEK/ERK a dále též PI3K/Akt/mTOR (viz výše).

Skupina RAF (*RAS-associated factor*) představuje tři formy serin/treoninových kináz (ARAF, BRAF, CRAF) na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. Aktivovaný RAF fosforyluje kinázy MEK (*mitogen-activated protein kinase ERK kinase 1*) 1 a 2 a ty dále zase ERK (*extracellular signal-related kinase*) 1 a 2. Aktivní ERK pak vstupují do jádra, kde působí na transkripční faktory (JUN, MYC apod.) a ty stimulují expresi genů se vztahem k adhezivitě buněk, motilitě a angiogenezi (9, 86, 87).



Obrázek 22 - Signální dráha RAS-RAF-MEK-ERK. Upraveno podle Klener P jr. and Klener P: Principy systémové protinádorové léčby. Praha, Grada Publishing a.s., 2013

V cílené léčbě mRCC se uplatňuje zatím pouze jedna molekula s inhibičním efektem v dráze RAF/MEK/ERK. Sorafenib je multikinázový inhibitor s aktivitou proti intracelulární komponentě VEGFR2-3, PDGFR a A-RAF a B-RAF. Kromě renálního karcinomu je indikován v léčbě neresekabilních hepatocelulárních karcinomů a karcinomu štítné žlázy (87, 88).

6.3 Signální dráha JAK/STAT

Dráha JAK (*Janus activated kinase*)/STAT (*signal transducers and activators of transcription*) není v růstu renálního karcinomu zřejmě tolik vyjádřená a větší význam patogenetický a terapeutický má u různých myeloproliferativních onemocnění. Jako signální molekuly obsazující receptory této dráhy se uplatňují různé cytokiny, většina interleukinů, hematopoetické růstové faktory a všechny interferony. Dráha interferuje s kaskádami od PI3K i proteinu RAS (9). Význam u mRCC má tato dráha snad v nalezené souvislosti s efektem léčby interferonem- α (INF α). Předpokládá se účinek INF α na pozastavení buněčného cyklu ve fázi G1 cestou JAK/STAT a tím i zamezení proliferaci (89). Navíc byla prokázána souvislost mezi rezistencí mRCC k INF- α a mutačním stavem JAK/STAT (90).

6.4 Signální dráha NOTCH

Význam této dráhy je nyní především v patogenezi a léčbě akutních lymfoblastických leukémií, dále bývá nalezena aberantně zvýšená aktivace NOTCH u karcinomu prsu a ovaria. Jedná se o transmembránové receptory se specifickými ligandy ovlivňující regulaci sebeobnovy kmenových buněk, také v embryogenezi a v hematopoéze. Po navázání ligandu se odštěpí intracelulární část receptoru pomocí enzymu γ -sekretázy a translokuje se do jádra, kde aktivuje transkripční faktory a tím exprese genů. Z hlediska onkologické léčby jsou inhibitory γ -sekretázy slibnou cestou v antiangiogenní léčbě (9). Byla prokázána exprese NOTCH dráhy u CCRCC a také in vitro i in vivo prokázána inhibice růstu buněk CCRCC (91). Inhibitory γ -sekretázy i monoklonální protilátky proti NOTCH nebo ligandu DLL4 jsou však stále předmětem vývoje a klinických studií.

7 Systémová léčba metastatického renálního karcinomu

Generalizovaný renální karcinom (*metastatic renal cell carcinoma*, mRCC) je velmi špatně ovlivnitelný systémovou léčbou. Vykazuje vysokou míru rezistence ke konvenční chemoterapii a v současné době podávaná cílená léčba zasahující do signálních drah angiogeneze, proliferace a přežívání, je vždy jen dočasně účinná. Tyto vlastnosti dělají z renálního karcinomu nejletálnější urologickou malignitu.

Rezistence renálního karcinomu vůči konvenčním chemoterapeutikům je způsobena především mechanismy tzv. mnohočetné lékové rezistence (*multidrug resistance – MDR*). Vytvořené transportní proteiny vypuzují cytostatikum ven z nádorové buňky. Tyto proteiny patří do tzv. ABC rodiny (*ATB-binding cassette*) a z nich nejznámější je MDR-1 P-glykoprotein (MDR-1 P-gp). Jeho zvýšená exprese je příčinou rezistence k řadě cytostatik a je typická pro renální karcinom (92, 93). Detekce zvýšené exprese je možná pomocí PCR amplifikací genu ABCB1/MDR1, který protein kóduje. Lze tak odhadnout stupeň rezistence při plánování chemoterapie. Mezi další exkreční proteiny patří MRP-1 (*multidrug resistance associated protein -1*) kódovaný genem ABCC1/MPR-1 a protein MVP/LRP (*major vault protein/lung resistance-related protein*), který zprostředkovává transporty jak z jádra do cytoplazmy, tak i ven z buňky. Zvýšená přítomnost těchto exkrečních proteinů byla nalezena v buňkách karcinomu tlustého střeva, pankreatu a právě karcinomu ledviny (9).

Existuje několik prognostických modelů přežití, které byly vytvořeny v době, kdy jedinou léčebnou možností s pozorovatelným efektem byla imunoterapie, tedy léčba interleukinem-2 a interferonem- α , tedy na konci 90. let 20. století a začátek 21. století. Tyto prognostické modely byly založeny převážně na klinických parametrech zdravotního stavu nemocného, s projevy pokročilosti onemocnění a rychlosti růstu (viz tabulka 3) (94–97). Přesto, že systémová léčba má nyní základ v cílené bloádě konkrétních proteinů či dějů v biologii nádorové buňky, jsou dosud užívána tzv. MSKCC (*Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre*) kritéria, ke stratifikaci nemocných před indikací systémové léčby (tabulka 4). Trvá tedy snaha o nalezení vhodných biomarkerů k predikci efektu cílené léčby.

7.1 Imunoterapie

Nespecifická imunoterapie interleukinem-2 a interferonem- α byla od 80. let 20. století, kdy se začala u mRCC užívat, dlouhou dobu jedinou systémovou léčbou s prokázanou objektivní odpovědí. Zaznamenané výsledky studií v 90. letech ukazovaly přibližně u 20-30% nemocných objektivní odpověď na léčbu, což byl do té doby nejlepší výsledek (10).

7.1.1 Interleukin-2

Interleukin-2 (IL-2) byl k léčbě mRCC užíván od 80. let 20. století. Ve vysokých dávkách má zdaleka nejvýraznější prozánětlivý efekt, díky kterému lze dosáhnout dlouhodobé léčebné odpovědi, ale také má velmi vysokou toxicitu. Byl součástí kombinačních léčebných protokolů. V léčbě se již nepoužívá (12, 98, 99).

7.1.2 Interferon- α (INF- α)

Význam cytokinů je v současné éře cílené terapie velmi okrajový. Stále je možné užít interferon- α v kombinaci s bevacizumabem u pacientů s dobrou prognózou dle MSKCC kritérií, ale prakticky vždy dostávají přednost v první linii léčby tyrosinkinázové inhibitory (TKI) (99).

Jasně vysvětlení efektu interferonu- α u mRCC nemáme. Zda samotný INF- α působí antiproliferačně, nebo je efekt dán stimulací imunitní odpovědi organismu není přesně známo. Jeho antivirová aktivita probíhá přes dráhu JAK-STAT, antiproliferační aktivita je pak nejčastěji vysvětlována indukcí exprese inhibitorů buněčného cyklu přechodu G1-S fáze, stimulací aktivity NK buněk, CD8 T-lymfocytů, indukcí exprese MHC I a II (*major histocompatibility complex*) (9, 89, 90). Potvrzení efektu léčby a další doporučení včetně rozdělení do rizikových skupin vychází z prací Motzera et al. z let 1999 a 2000, kdy hodnotil výsledky souboru 670 pacientů s mRCC léčených INF- α . Z multivarietní analýzy vyšly tyto rizikové faktory, snížený Karnofského performance status (KPS < 80%), zvýšená laktát dehydrogenáza (LDH > 1,5 násobek normálu), hemoglobin nižší než normální rozmezí, korigované kalcium > 2,5 mmol/l a neprovedená nefrektomie primárního nádoru. Nemocní s žádným rizikovým faktorem byli řazeni do skupiny s dobrou prognózou, s 1-2 rizikovými faktory do skupiny se střední prognózou a s 3 a více faktory do skupiny se špatnou prognózou. Medián přežití byl pak 27, 12 a 6 měsíců u skupiny s dobrou, střední a

špatnou prognózou. Pacienti v rameni studie léčení různými druhy chemoterapie nebo hormonální léčby pak měli ve stejných rizikových skupinách přežití 15, 7 a 3 měsíce (94, 100).

Tento soubor prognostických faktorů byl v roce 2002 revidován a místo kritéria odstranění primárního nádoru bylo přiřazeno kritérium zahájení léčby od diagnózy onemocnění do 1 roku (95). Rozdělení do rizikových skupin dle Motzera bylo používáno i v indikaci cílené léčby. V současnosti je preferován model dle Henga (DCM, *Database Consortium Model*) vyjímající údaj o hladině LDH, navíc však s přidáním kritérií leukocytózy a trombocytózy (101, 102). V České republice jsou užívaná tzv. modifikovaná MSKCC kritéria s kritériem 2 a více postižených orgánů (tabulka 3 a 4) (103).

Tabulka 3 – Užívané prognostické modely pro systémovou léčbu mRCC

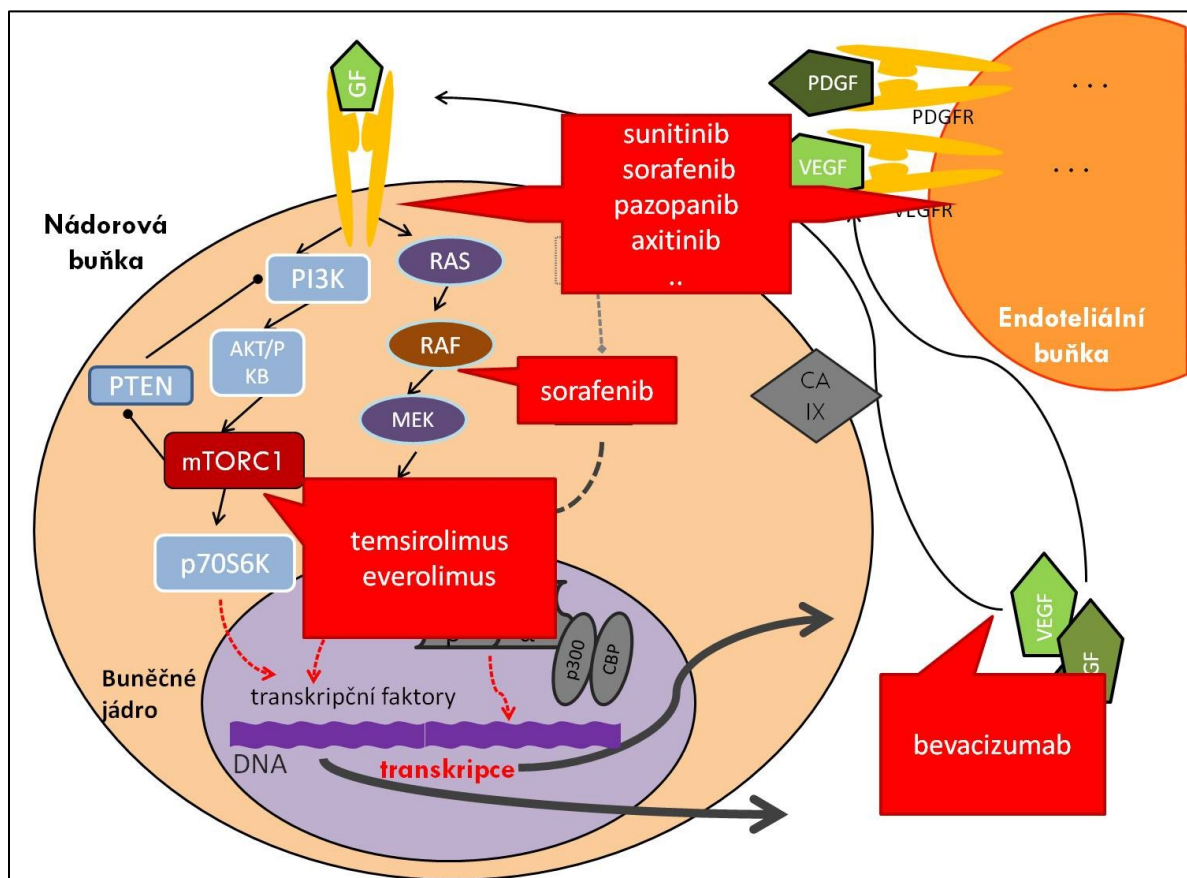
Kritéria	hodnota	MSKCC 1999	MSKCC 2002	Modif. MSKCC	DCM
Karnofského skóre	< 80	*	*	*	*
sérová laktát dehydrogenáza (LDH)	> 1,5 násobek normálu	*	*	*	
hemoglobin	< dolní hranice normálu	*	*	*	*
korigované kalcium	> 2,5 mmol/l (10,0 mg/dl)	*	*	*	*
čas od diagnózy do systémové léčby	< 1 rok		*	*	*
počet postižených orgánů	2 a více			*	
primární tumor in situ		*			
leukocytóza					*
trombocytóza					*

Tabulka 4 – Rozdělení do prognostických skupin

Prognostické skupiny	počet rizikových faktorů
dobrá prognóza	0
střední prognóza	1 až 2
špatná prognóza	2 a více

Začátkem 21. století byla cytokinová léčba součástí kombinační léčby s 5-fluorouracilem s objektivní odpovědí u 31% pacientů a celkový přežitím (OS) 25 měsíců (98). Na základě metaanalýzy 53 studií s celkem 6117 pacienty z Cochrane databáze je prokazatelný efekt cytokinové léčby u 12,9% nemocných s OS 13,3 měsíce (v rozmezí 6-27 měsíců) (104). Důležitým faktorem léčby cytokiny jsou vedlejší účinky léčby. Jako velmi účinné imunomodulační preparáty působí INF- α i IL-2 časně tzv. „*flu-like syndrom*“ s chřipce podobnými příznaky (horečky, zimnice, svalové bolesti, bolesti hlavy, nevolnosti) s počátkem několika hodin po podání léku a trvají přibližně 24 hodin. Dále snížení všech řad krevních buněk s rizikem rozvoje anémie, krvácení, náchylnosti k infekcím. Mezi další nežádoucí účinky léčby patří zhoršení jaterních funkcí, průjemy, slabosti, ztráta vlasů a další (95, 105, 106). Jak už bylo uvedeno výše, léčba cytokiny v monoterapii nebo kombinaci s klasickou chemoterapií již v dnešní době není doporučována.

7.2 Cílená léčba



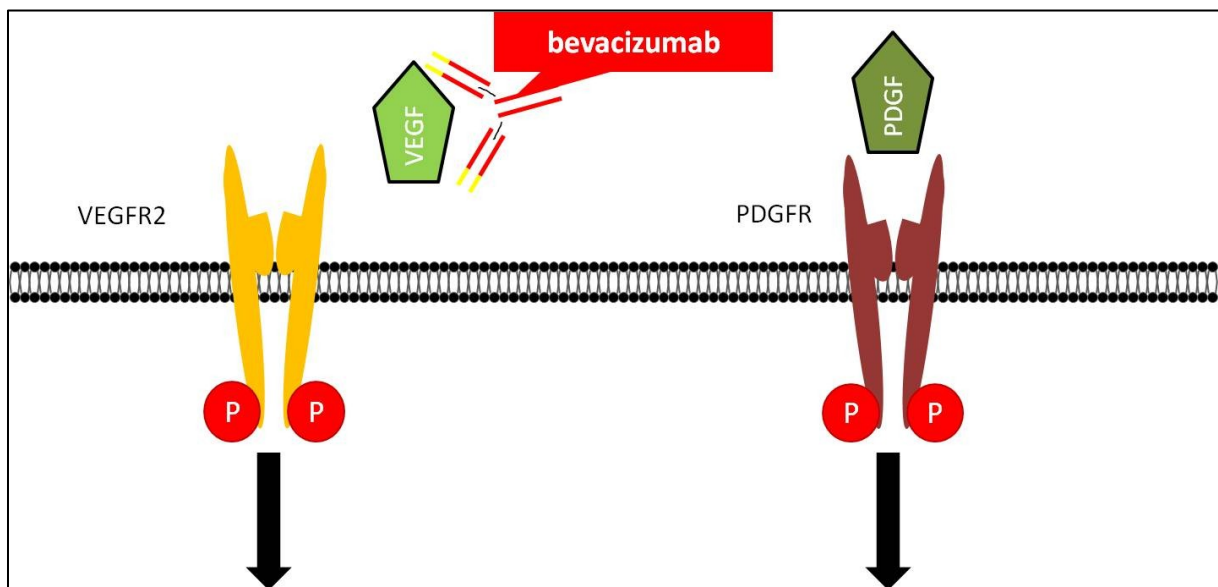
Obrázek 23 - Cíle systémové léčby u renálního karcinomu. Upraveno podle Klener P jr. and Klener P: Principy systémové protinádorové léčby. Praha, Grada Publishing a.s., 2013

7.2.1 Monoklonální protilátky

7.2.1.1 Bevacizumab

Bevacizumab (Avastin®) je rekombinační humanizovaná monoklonální protilátka blokující VEGF-A. Schválení americkou FDA (*Food and Drug Administration*) proběhlo v roce 2004 jako prvního inhibitoru angiogeneze se schálením užití u metastatického kolorektálního karcinomu. V dalších letech proběhlo schválení v indikaci léčby karcinomu plic, prsu, mozku a v roce 2009 také ledviny (dostupné online: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm>).

Ve studii *AVOREN* porovnávající účinek kombinace bevacizumabu a INF- α oproti INF- α samotnému byl medián PFS 10,2 měsíce u kombinace oproti 5,4 měsíce u INF- α samotného ($p=0,0001$) u pacientů s dobrou a střední prognózou. Efekt u skupiny se špatnou prognózou nebyl prokázán a nebyla prokázána signifikantní rozdílnost v OS mezi sledovanými skupinami (23,3 vs. 21,3 měsíců) (107). Doporučení pro bevacizumab je v guidelines EAU (*European Association of Urology*) a NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) pro užití u pacientů s dobrou a střední prognózou v první linii léčby v kombinaci s INF- α (99, 108)



Obrázek 24 - Extracelulární blokáda ligandu tyrosinkinázového receptoru, zde VEGF. Upraveno podle Kleiner P jr. and Kleiner P: *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha, Grada Publishing a.s., 2013

7.2.2 Tyrosinkinázové inhibitory

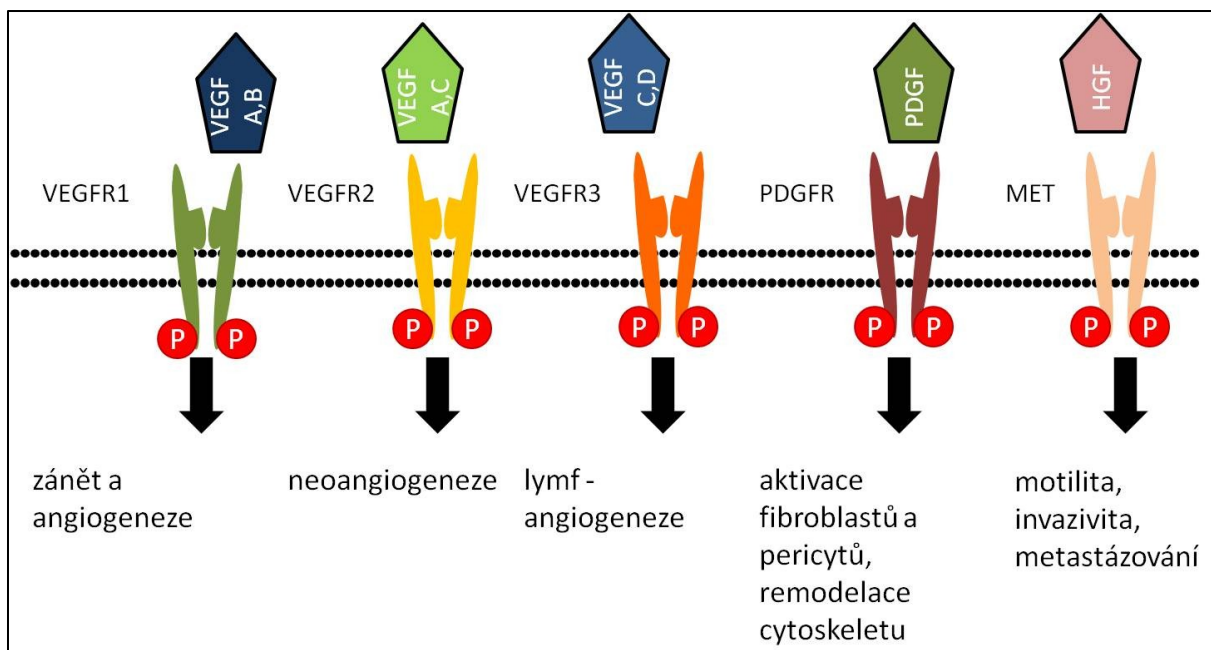
Inhibitory intracelulárních tyrosinkináz (TKI, *tyrosine-kinase inhibitors*) membránových receptorů pro růstové faktory jsou v současné době léky volby u mRCC. Svým účinkem blokují přenos signálu růstového faktoru již na úrovni receptoru. Molekuly užívané u mRCC jsou multikinázovými inhibitory, tedy kromě tyrosinkinázy receptoru blokují také další intracelulární kinázy paralelních signálních drah. V léčbě mRCC znamenaly revoluci, nejen v samotném sofistikovaném principu léčby a zlepšení terapeutického efektu, za pozornost stojí i dobrá tolerance léčby s méně výraznými nežádoucími účinky oproti INF- α , ale i léková forma v podobě perorálně podávaných tablet.

Nějkčastějšími nežádoucími účinky léčby TKI jsou obecně poruchy kůže jako změna pigmentace pokožky nebo vlasů, suchost, ztluštění, rozpraskání či puchýře dlaní a plosek chodidel (tzv. „*hand-foot syndrome*“), krvácivé příhody, gastrointestinální poruchy jako průjem, zvracení, bolesti břicha, stomatitida, vzácně též perforace střeva. Hypertenze, pokles počtu neutrofilů, anémie, žilní tromboembolické příhody převodní srdeční poruchy, vzácně kardiomyopatie či ischemie myokardu. I pozdě během léčby TKI se může objevit dysfunkce štítné žlázy, pankreatitida, hepatotoxicita či poruchy renálních funkcí. Další, zvláště neurologické symptomy, jsou vzácné. Nicméně v porovnání s léčbou cytokiny jsou TKI tolerovány o mnoho lépe (106, 109–112).

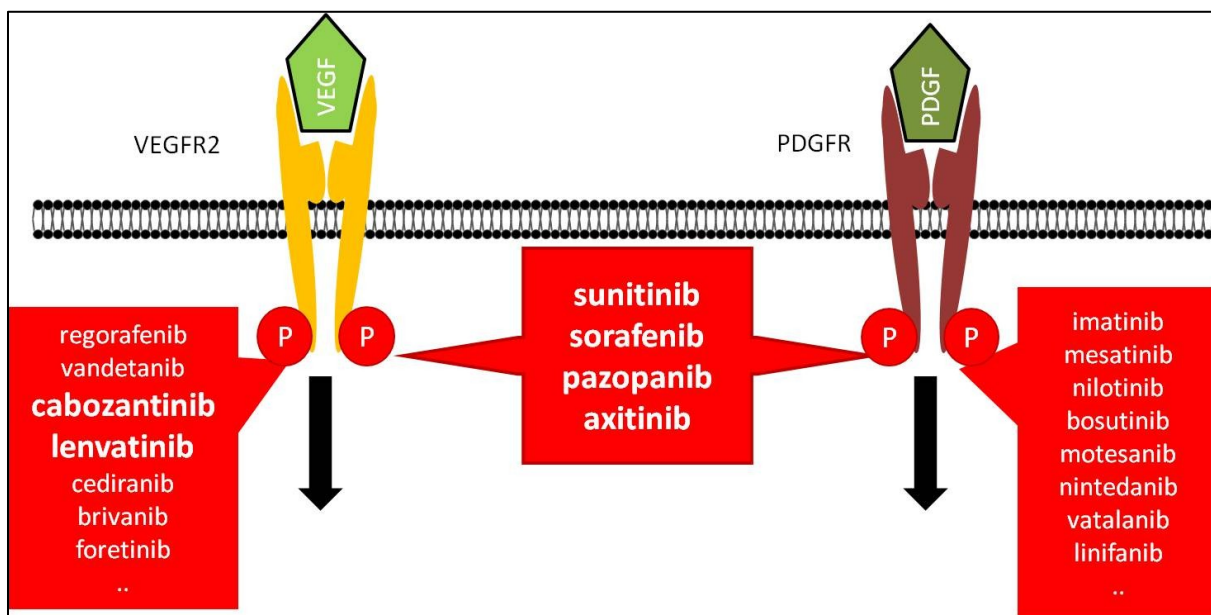
K léčbě mRCC jsou v současné době schváleny tyto molekuly: sunitinib (Sutent®), sorafenib (Nexavar®), pazopanib (Votrient®), axitinib (Inlyta®) a v současné době i cabozantinib (Cabometyx®) a lenvatinib (Lenvima®).

Cílové proteiny pro TKI:

- sunitinib: VEGFR2, PDGFR, KIT, RET, CFS-1R, FLT3
- sorafenib: VEGFR, PDGFR, C-RAF, B-RAF, FLT3, c-KIT
- pazopanib: VEGFR, PDGFR, KIT, FGFR
- axitinib: VEGFR, PDGFR, KIT
- cabozantinib: c-Met, VEGFR2
- lenvatinib: VEGFR1-3



Obrázek 25 - Nejběžněji cílené membránové receptory růstových faktorů. Upraveno podle Klener P jr. and Klener P: *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha, Grada Publishing a.s., 2013

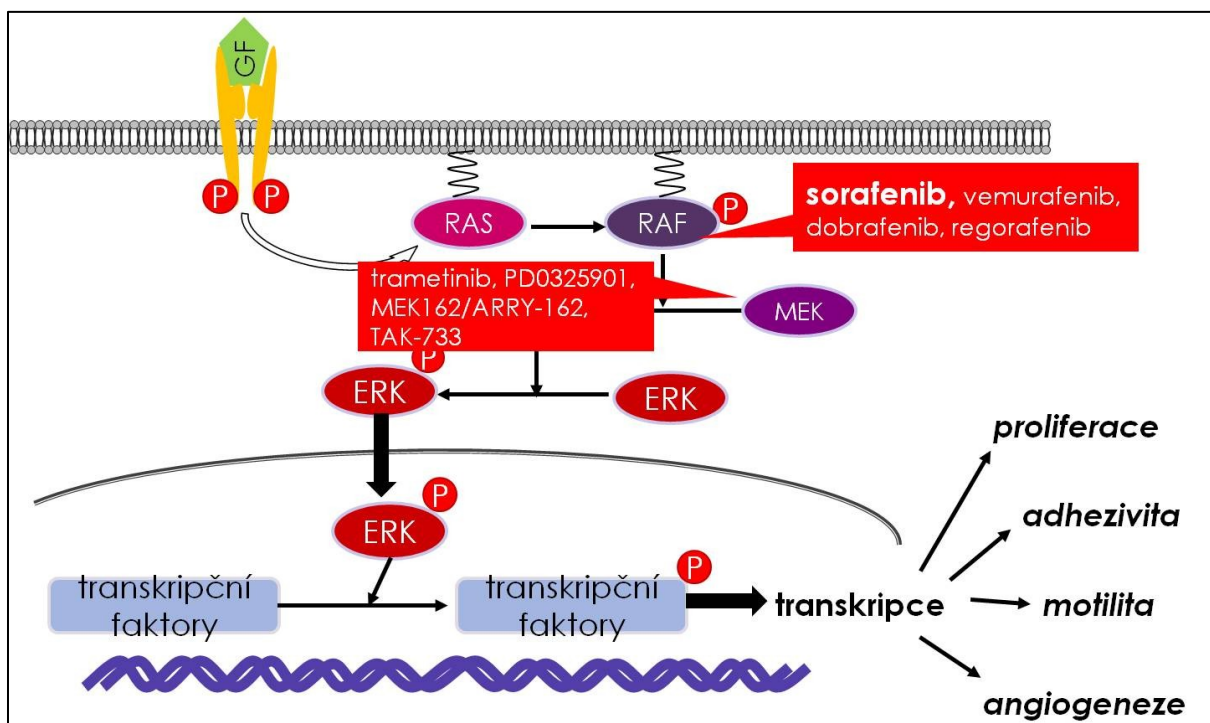


Obrázek 26 - Inhibice intracelulární komponenty - tyrosinkinázy - receptorů pro růstové faktory. Upraveno podle Klener P jr. and Klener P: *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha, Grada Publishing a.s., 2013

7.2.2.1 Sorafenib

Sorafenib (Nexavar®) byl prvním ze schválených (FDA, leden 2005) TKI pro léčbu mRCC. Mezi další indikace patří hepatocelulární karcinom a pokročilý karcinom štítné žlázy. Svým účinkem blokuje neoangiogenezi a také růst a motilitu buněk.

Studie TARGET (*Treatment Approaches in Renal Cancer Global Evaluation Trial*) hodnocená v roce 2007 prokázala na souboru 903 pacientů randomizovaných 1:1 efektivitu sorafenibu proti placebo u pacientů po léčbě cytokiny zlepšení PFS (5,5 vs. 2,8 měsíce; $p < 0,01$) (113). Další provedené studie mírně odlišného designu udávají mírně vyšší PFS oproti TARGETu (5,5-6,5 měsíce) (111). V léčbě mRCC je indikován v druhé linii po TKI, nebo ve třetí linii po mTOR inhibitorech (99, 108). Ve studii INTORSECT bylo srovnáváno PFS a OS ve druhé linii po TKI mezi sorafeniem a mTOR inhibitorem temsirolimem. Nebyl nalezen signifikantní rozdíl v PFS (3,9 vs. 4,3 měsíce; $p = 0,19$), signifikantně však bylo lepší OS v souboru se sorafenibem (16,6 vs. 12,3 měsíce; $p = 0,01$) (114).



Obrázek 27 - Inhibice RAS-RAF-MEK-ERK signální dráhy. Upraveno podle Klener P jr. and Klener P: *Principy systémové protinádorové léčby*. Praha, Grada Publishing a.s., 2013

7.2.2.2 Sunitinib

Nejčastěji užívaným TKI v první linii léčby mRCC s dobrou a střední prognózou světlobuněčné histologie a také v první linii léčby nesvětlobuněčných mRCC je sunitinib (Sutent®). Registrován FDA je od roku 2006, kdy byla prokázána efektivita u pacientů předlčených INF- α . V souboru 63 léčených pacientů byla částečná

odpověď (PR, *partial response*) prokázána u 40% a dalších 27% vykazovalo stabilní onemocnění (SD, *stable disease*) po 3 a více měsících. Medián PFS byl 8,7 měsíce a OS 16,4 měsíce (115). V první linii léčby prokázal sunitinib oproti INF- α výrazné prodloužení PFS (11 vs. 5 měsíců; $p=0,001$), OS (26,4 vs. 21,8 měsíců; $p=0,051$) a výraznější objektivní odpověď na léčbu (47% vs. 12%; $p=0,001$). Kromě toho byla hodnocena také kvalita života (QoL, *quality of life*), která byla výrazně lepší v rameni se sunitinibem (116). Aktuálně zůstává sunitinib na pozici léku volby v první linii léčby většiny mRCC.

7.2.2.3 Pazopanib

Pazopanib (Votrient®) je indikován v první linii léčby světlobuněčného mRCC, nebo v druhé linii po TKI nebo cytokinové léčbě. Ve srovnání s placebem u skupiny bez předchozí léčby dosahoval pazopanib mediánu PFS 11,1 měsíce oproti 2,8 měsícům u skupiny s placebem ($p<0,0001$) a u skupiny předléčených cytokiny pak 9,2 vs. 4,2 měsíce ($p<0,0001$). Rozdíl v OS však nebyl mezi oběma skupinami statisticky významný (22,9 vs. 20,5 měsíce, $p=0,229$), výsledek je však zkreslen četnými cross overy v ramenech studie, tedy přechodu z placeba na účinnou léčbu při progresi (117). Ve srovnání se sunitinibem v randomizované studii (COMPARZ) byla prokázána non-inferiorita pazopanibu oproti sunitinibu, rozdíl nebyl statisticky signifikantní v PFS (1,05; 95% CI, 0,9-1,22) ani v OS (0,91; 95% CI, 0,76-1,08) lépe však byla hodnocena kvalita života při užívání pazopanibu (118). Přímou se tolerabilitou léčby a kvalitou života zabývala randomizovaná cross over studie studie PISCES sledující preferenci pacientů. Signifikantně větší byla preference pazopanibu (70%) oproti sunitinibu (22%) pro nižší toxicitu, 8% pacientů bez preference ($p<0,001$) (119).

7.2.2.4 Axitinib

Axitinib (Inlyta®) je TKI druhé generace inhibující pouze VEGFR1-3. Indikován je v druhé linii po selhání TKI nebo cytokinů a jako takový byl také hodnocen ve studii AXIS oproti sorafenibu. V celém souboru 723 pacientů bylo prokázáno zlepšení PFS v rameni s axitinibem (6,7 měsíců) oproti sorafenibu (4,8 měsíce). Výraznější efekt byl u pacientů po selhání cytokinové léčby (12,1 vs. 6,5 měsíců; $p<0,0001$), u pacientů předléčených sunitinibem nebyl rozdíl tolik markantní (4,8 vs. 3,4 měsíce; $p<0,01$) (120).

7.2.2.5 Cabozantinib

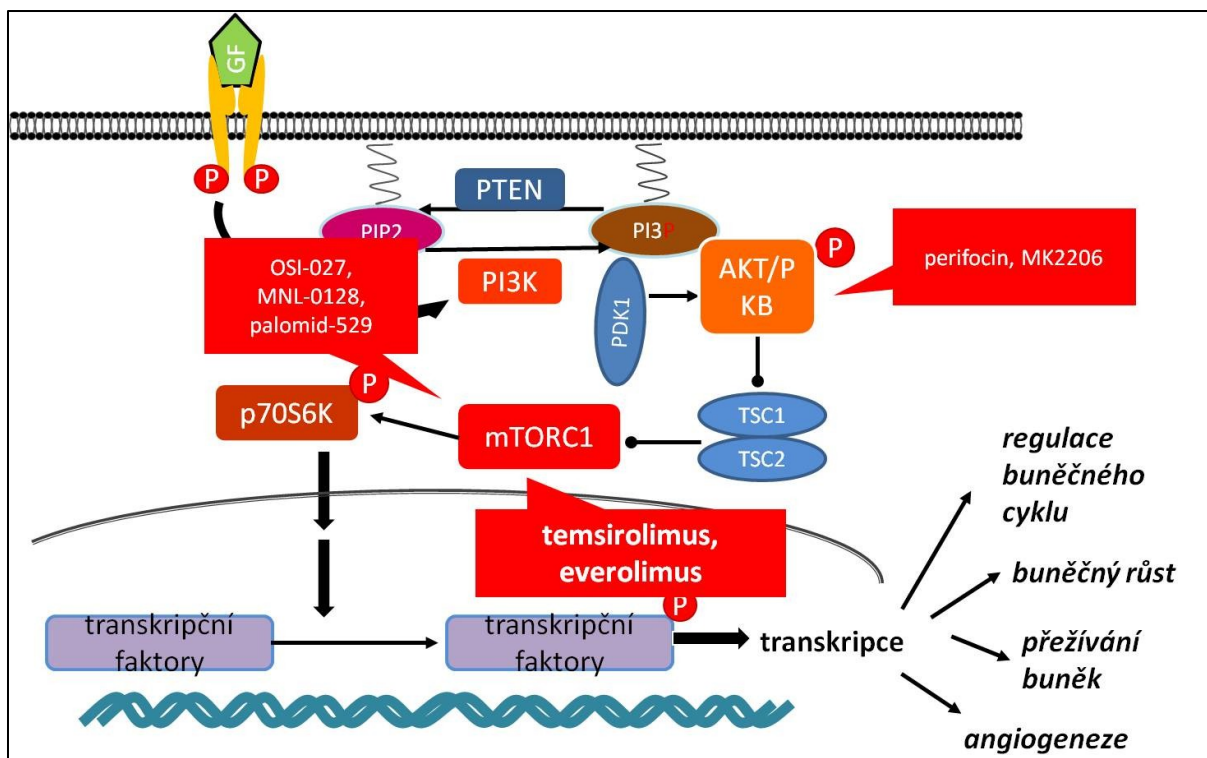
Mezi nově schválené TKI v léčbě mRCC je cabozantinib (Cabometyx®). Kromě VEGFR blokuje také kinázu c-Met. Ve studii METEOR byla hodnocena účinnost a bezpečnost v druhé linii léčby po selhání TKI oproti everolimu. Cabozantinib vykazuje delší OS (21,4 vs. 16,5 měsíců; $p=0,00026$) i PFS a lepší objektivní odpověď (17% vs. 3%; $p<0,0001$). Četnost závažných vedlejších účinků léčby oběma preparáty byla shodná (40% vs. 39%) (38).

7.2.2.6 Lenvatinib

Mezi TKI nové generace patří i lenvatinib (Lenvima®). Je FDA schválen k léčbě metastatického karcinomu štítné žlázy, pro mRCC zatím ve fázi klinických studií. V druhé linii léčby po selhání TKI byl hodnocen v randomizované studii 2 fáze oproti everolimu a kombinaci lenvatinib + everolimus u světlobuněčného mRCC. Lenvatinib významně prodloužil PFS oproti everolimu samotnému jak samostatně (HR 0,61; $p=0,048$) tak v kombinaci lenvatinib + everolimus (14,6 vs. 5,5 měsíců; HR 0,4, 95% CI 0,24-0,68; $p=0,0005$) (121).

7.2.3 Inhibitory mTOR

Další skupinou léků užívaných v léčbě mRCC jsou inhibitory kinázy mTOR, přesněji komplexu mTORC1, který disociují a tím inhibují. mTORC1 je součástí signální dráhy pod PI3K přenášející signály pro buněčný růst, proliferaci, angiogenezi a přežívání buňky.



Obrázek 28 - Inhibice PI3K-AKT-mTOR signální dráhy. Upraveno podle Klener P jr. and Klener P: Principy systémové protinádorové léčby. Praha, Grada Publishing a.s., 2013

7.2.3.1 Everolimus

Everolimus (Afinitor®) je orální mTOR inhibitor indikovaný k léčbě mRCC a HER-2 negativního karcinomu prsu u postmenopauzálních žen. V rámci léčby mRCC je pak řazen everolimus do první linie léčby u nesvětlobuněčných typů mRCC a do druhé či třetí linie po selhání VEGFR inhibitorů. Ve studii RECORD-1 byla hodnocena efektivita everolimu po selhání VEGFR inhibitorů oproti placebo. Medián PFS byl ve prospěch everolimu 5,5 vs. 1,9 měsíců ($p < 0,001$), nebyl však prokazatelný rozdíl v OS, 14,8 vs. 14,4 měsíců ($p = 0,162$). Mezi nejčastější vedlejší účinky léčby patřily infekční komplikace, dyspnoe, slabost a nevolnosti (122). V současné době jsou po selhání TKI efektivnější možnosti léčby (cabozantinib, nivolumab), vzhledem k dostupnosti je však everolimus pevnou součástí léčebného protokolu.

7.2.3.2 Temsirolimus

Temsirolimus (Torisel®) byl schválen k terapii mRCC a lymfomu z plášťových buněk v roce 2007. V léčebné strategii mRCC má temsirolimus místo v první linii léčby nesvětlobuněčného mRCC a světlobuněčného mRCC se špatnou prognózou. Ve

studii porovnávající efekt léčby oproti INF- α prokázal temsirolimus prodloužení OS (10,9 vs. 7,3; $p=0,008$) (123). Studie INTORSECT však neprokázala vyšší efektivitu temsirolimu proti sorafenibu u pacientů po selhání léčby sunitinibem (PFS 4,3 vs. 3,9 měsíce; $p=0,19$; OS 12,3 vs. 16,6 měsíců; $p=0,01$), proto není temsirolimus doporučován v dalších liniích léčby po selhání TKI (114).

7.2.4 Inhibice PD-1/PD-L1

Zcela novým konceptem moderní terapie mRCC je cílená imunomodulační léčba blokadou nádorové inhibice imunitního systému. PD-1 (*programmed death 1*) je membránový protein z rodiny CD28/CTLA-4 exprimovaný na aktivovaných T-lymfocytech, jeho intracelulární komponenta je tyrosinová kináza s inhibičním efektem na navazující signální dráhu. Po vazbě specifických ligandů PD-L1 a PD-L2 je funkce T-lymfocytů (produkce cytokinů a také proliferace) utlumena. PD-L2 je exprimován na antigen prezentujících buňkách a má úlohu v navození tolerance vůči vnějším antigenům. PD-L1 je exprimován na povrchu nádorových i nenádorových buněk, nádorové buňky tak inhibují ataky imunitního systému. Blokadou vazby PD-1/PD-L1 se protinádorová imunitní odpověď obnovuje (9, 12, 124)

7.2.4.1 Nivolumab

Jedná se o anti-PD-1 humanizovanou IgG4 monoklonální protilátku blokující PD-1 T-lymfocytů. Nivolumab (Opdivo®) indikován v léčbě metastatického maligního melanomu, nemalobuněčného plicního karcinomu, pokročilého a metastatického renálního karcinomu a ovariálního karcinomu. V druhé linii léčby po selhání TKI je nivolumab superiorní oproti everolimu jak v dosažení OS (HR 0,73, 95% CI, 0,57-0,93; 25 vs. 19,6 měsíců; $p<0,002$), tak objektivní odpovědi (25% vs. 5%, $p<0,001$). Medián PFS nebyl signifikantně rozdílný (4,6 vs. 4,4 měsíce, $p=0,11$) (125). Zde je nutné vzít v úvahu biologii protinádorového efektu nivolumabu. Po inhibici PD-1 je tumor infiltrován dělícími se T-lymfocyty a samotná jejich přítomnost včetně rozvoje zánětlivé protinádorové reakce zvětšuje objem nádorových ložisek. Navíc vlastní protinádorová odpověď se dostavuje s určitým zpožděním, lze tedy pozorovat i vznik nových ložisek, které následně regredují. Tyto jevy pak ve zvyklém hodnocení PFS pomocí RECIST kritérií vede k falešně horším výsledkům nivolumabu (12). Proto jsou

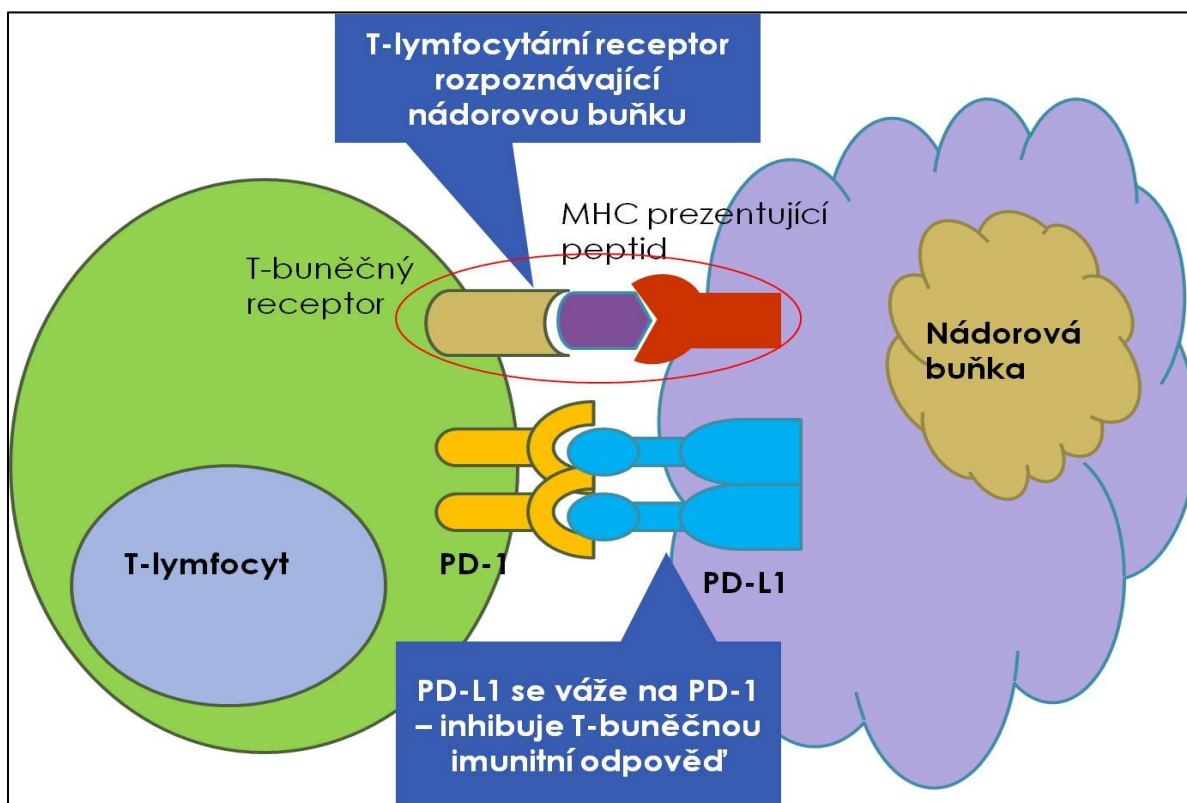
sestavena a validována nová kritéria hodnocení terapeutické odpovědi, tzv. *immune-related response criteria*, IrRECIST (126). I když předcházející studie naznačovaly možnou predikci efektu inhibitorů PD-1 pomocí IHC stanovení exprese PD-L1 v tkáni nádoru před léčbou (objektivní odpověď u IHC PD-L1 negativních 0%, IHC PD-L1 pozitivní pak 36%; $p=0,006$) (127), následné studie tyto závěry nepotvrzují (128) a analýza tumorózní tkáně na přítomnost PD-L1 není před léčbou indikována (129).

Nivolumab je nyní, pokud je dostupný, striktně indikován v následných liniích léčby po selhání TKI (129).

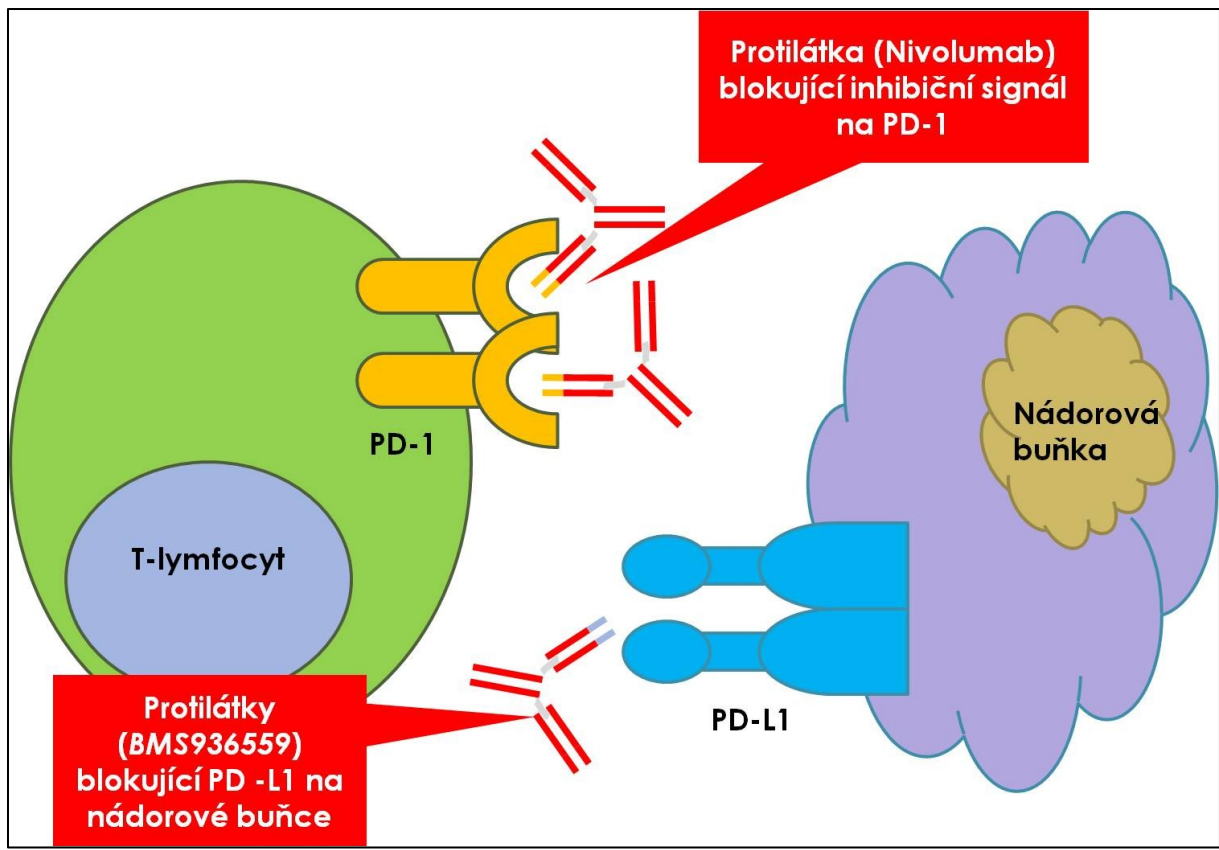
Mezi další používané inhibitory PD-1 patří pembrolizumab zatím užívaný v terapii metastatického melanomu.

7.2.4.2 Inhibitory PD-L1

Monoklonální protilátky proti PD-L1 zatím procházejí studiemi I. a II. fáze. Dosud byly publikovány výsledky s 12% objektivní odpovědí u mRCC, 17% u melanomu a 10% u nemalobuněčného karcinomu plic (124).



Obrázek 29 - Nádorová inhibice T-buněčné odpovědi. Upraveno podle Klener P jr. and Klener P: Principy systémové protinádorové léčby. Praha, Grada Publishing a.s., 2013



Obrázek 30 - Blokádá nádorové inhibice imunitní odpovědi. Upraveno podle Klener P jr. and Klener P: Principy systémové protinádorové léčby. Praha, Grada Publishing a.s., 2013

8 Možnosti predikce účinnosti cílené léčby

8.1 Prediktivní nomogramy

Bylo publikováno několik modelů k predikci efektu antiangiogenních látek. Založeny jsou vesměs na klinických a biochemických faktorech. V roce 2008 publikoval Motzer et al. prediktivní nomogram PFS (*progression-free survival*; přežití bez progresu) při léčbě sunitinibem (130). Součástí nomogramu jsou kromě již užívaných MSKCC kritérií též přítomnost plicních respektive jaterních metastáz, počet metastáz, trombocytóza, hladina alkalické fosfatázy a neodstraněný primární nádor. Heng et al. v r. 2009 zahrnul neutrofilii a trombocytózu ke čtyřem z pěti MSKCC kritériím (hemoglobin, korigovaný vápník, performance status a čas od diagnózy do léčby) k predikci mortality při anti-VEGF léčbě (101). Karakiewicz et al. v r. 2011 komparoval výsledky predikce PFS u pacientů léčených INF + bevacizumabem a INF samotným pomocí nomogramu zahrnujícího performance status, čas od diagnózy do léčby, hladinu sérového albuminu a alkalické fosfatázy s Motzerovými kritérii, výsledky byly významně zpřesněny (131). Tato studie byla opakovaně validována (132). Index konkordance těchto nomogramů je přibližně 60-75%.

8.2 Markery stanovované z tkáně tumoru

Nádorová tkáň je vyšetřena patologem nejen histologicky, ale ke stanovení přesné diagnózy je v současné době nezbytné i vyšetření imunohistochemické a genetické. Jak bylo zmíněno v úvodu, i jediný nádor je tvořen heterogenní tkání s rozdílnými genovými mutacemi DNA v různých místech nádoru (5). Vyšetření tkáňových markerů je tedy z tohoto pohledu limitováno omezeným počtem vyšetřovaných vzorků. Zda tato skutečnost ovlivňuje i odpověď tumoru na cílenou léčbu je otázkou pro další studie.

8.2.1 Alterace VHL (von Hippel-Lindau) genu

VHL gen je tumor supresorový gen lokalizovaný na krátkém raménku 3. chromozomu kódující proteiny, tzv. pVHL, které v multiproteinových komplexech regulují expresi různých genů, ovlivňují tak tvorbu a ukládání extracelulární matrix a proteinů mikrotubulů zapojených do procesu mikroangiogeneze a nádorové invaze. Účastní se též regulace buněčného cyklu cestou p53. Díky deficitu VHL proteinů se snižuje odbourávání HIF -1 α a jeho koncentrace roste i za normálních (normoxických)

podmínek. Tzv. VHL syndrom je autozomálně dědičný syndrom charakterizovaný výskytem vaskularizovaných tumorů (hemangioblastomy mozku, sítnice, tumory ledvin a jater), příčinou je delece krátkého raménka 3. chromozomu obsahující *VHL* gen. Různé alterace *VHL* genu (hypermetylace či mutace) jsou však nalezeny i v téměř 70 % sporadických karcinomů ledviny (133). Přítomnost *VHL* alterace predikuje lepší prognózu, delší PFS (133, 134). Vliv na progresi tumoru mají pouze tzv. „loss-of-function“ mutace (mutace se ztrátou funkce genu) (133, 135). Rini et al. prokázali 60% výskyt alterací *VHL* genů u pacientů s mRCC, objektivní odpověď na léčbu TKI mělo 48% z nich oproti 35% pozitivních odpovědí u pacientů s normálním *VHL* genem. Také našel vysoké procento, 89,2%, alterovaného *VHL* genu u sporadických karcinomů (136). Přítomnost nealterovaného *VHL* genu či mutace *VHL* s vyšší produkcí VEGF korelovalo se špatnou prognózou a agresivnějším fenotypem tumoru (137). Vyšetření alterace *VHL* genu lze považovat za možný prediktor efektu antiangiogenní léčby.

8.2.2 HIF- α (hypoxií indukovaný faktor - α)

Hypoxií indukované faktory (HIFs) jsou transkripční faktory regulující na 200 genů zapojených do zásadních signálních drah tumorigeneze. HIF- α má několik podjednotek, diskutovány jsou dvě, HIF-1 α a HIF-2 α . HIF-1 α se kumuluje v situacích hypoxie buňky či při deficitu pVHL. HIF-1 α vstupuje do jádra buňky, kde po spojení s β podjednotkou tvoří aktivní heterodimer a reguluje geny ovlivňující neoangiogenezi ve stavech hypoxie, proteiny kódované cílovými geny jsou VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet derived growth factor) a další (25, 27, 82). Dále v jádře buňky stabilizuje protein p53 a tím indukuje apoptózu buňky, jako reakci na hypoxii. Dále ovlivňuje metabolismus glukózy, erytropoézu (138) a inhibuje onkoprotein c-Myc (139). Produkce HIF-2 α není ovlivněna pVHL a na rozdíl od HIF-1 α stimuluje aktivaci c-Myc (139). Zvýšená exprese HIF- α byla nalezena v 75% světlobuněčných a pouze v 38% nesvětlobuněčných RCC (140). Jako prediktivní marker přežití u mRCC je kontroverzní, nezávislé studie si svými výsledky odporují. Lindgren et al. v r. 2005 popisuje zvýšenou expresi HIF-1 α jako nezávislý příznivý prediktivní faktor u skupiny 66 pacientů s ccRCC (Western blot) (141), následující studie stejných autorů z r. 2006 se skupinou 176 pacientů tyto závěry nepotvrzuje (142). Klatte et al. v r. 2007 publikoval opačné závěry, v souboru 141 pacientů měla skupina s vysokou expresí HIF-1 α signifikantně horší přežití, než pacienti s nízkou

expresí (13,5 měsíců versus 24,4 měsíce). V této studii byly HIF-1 α a karboanhydráza IX (CAIX) nejsilnější prognostické faktory (143). Rozdíly ve výsledcích studií mohou být dány nesourodostí souborů, rozdílnými metodikami detekce. Lepší odpověď na léčbu sunitinibem (parciální i kompletní regrese) byla pozorována u pacientů s vysokou expresí HIF-1 α nebo HIF-2 α ve tkáni tumoru, např. objektivní odpověď byla zaznamenána u 76 % pacientů s vysokým stupněm exprese HIF-2 α a jen u 13% s nedetekovatelným HIF-2 α (144, 145). Toschi et al. prokázal rozdílnou citlivost syntézy HIF- α podjednotek na inhibitory mTOR, produkce HIF-1 α je výrazně senzitivnější (146). Gordan et al. našel v souboru 160 pacientů s VHL inaktivací rozdílnou expresí HIF- α , skupina s expresí obou podjednotek (HIF-1 α i HIF-2 α – H1H2) a s expresí pouze HIF-2 α (H2). U tumorů H1H2 byla výrazně aktivována Akt/mTOR cesta, u skupiny H2 exprese c-Myc. Efekt inhibitorů mTOR lze očekávat větší u H1H2 skupiny (147).

8.2.3 Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) a VEGF receptor (VEGFR)

VEGF je dimerický glykoprotein podporující angiogenezi tumoru. Produkce VEGF je zvýšená u renálních karcinomů s alterací *VHL* genu (148), tedy hlavně světlobuněčných, nalezena byla však také u papilárních renálních karcinomů (149). Zvýšená exprese ve tkáni je spojena se stage a grade tumoru, nekrózou (150) agresivnějším fenotypem tumoru a signifikantně kratším přežitím (148). V kombinaci se stanovením hladin dalších proteinů inkorporovaných do signálních drah angiogeneze (například cyklooxygenáza 1 - COX-1, CD147, karboanhydrázou IX - CAIX apod.), může být vypovídající hodnota VEGF v prognóze onemocnění i predikci efektu TKI zpřesněna (151–153).

Často jsou studovány defekty genů pro VEGF nebo VEGF receptor (VEGFR) na podkladě polymorfismů jednotlivých nukleotidů (SNP, *single-nucleotide polymorphism*). Popsány byly jednotlivé SNP se signifikantním vztahem k PFS a OS u pacientů léčených sunitinibem. Signifikantně horší PFS a OS při užívání sunitinibu v první linii léčby měli pacienti s prokázanými polymorfismy z tkáně tumoru VEGFA CC rs 699947, VEGFA CC rs2010963, VEGFR3 CG rs6877011 (154). V jiné studii byly nalezeny SNP s korelací s lepším PFS a OS při léčbě TKI, jmenovitě VEGFA CT rs 833061, VEGFA GC rs2010963 (155). V další ze studií, zaujímaví 101

vyšetřovaných pacientů s první linií sunitinibu pro mCCRCC, byly nalezeny dva VEGFR3 SNP signifikatně související s kratším PFS, a to rs307826 a rs307821. V části studie sledující toxicitu léčby pak SNP rs776746 v genu pro CYP3A5.1 (156)

Imunohistochemickou analýzu tkáně primárně metastatického CCRCC provedli You et al. v roce 2015, ze studovanch biomarkerů pak s prodloužením PFS, i objektivní odpovědí korelovala zvýšená exprese VEGFR2 (157). Oproti našemu projektu nebyla provedena korelace s expresí ve zdravé tkáni.

8.2.4 Karboanhydráza IX (CAIX)

Jedná se o HIF-1 α regulovaný transmembránový protein regulující intracelulární a extracelulární pH v závislosti na míře hypoxie v tumorózní tkáni a anaerobním metabolismu. U mnoha solidních metastatických nádorů je vysoká exprese CAIX znakem agresivního fenotypu a špatné prognózy (158, 159). U renálního karcinomu, lokalizovaného i metastatického, je popisován však vztah vysoké exprese CAIX s příznivější prognózou (134, 151, 160). Díky mutacím VHL genu ve většině renálních karcinomů je silný vztah mezi expresí CAIX a VEGF. Nízká exprese CAIX zvláště ve spojení s vysokou expresí VEGF (151) a absencí mutace VHL genu (134) ukazuje na agresivní fenotyp a špatnou prognózu renálního karcinomu. Jako prediktor efektu biologické léčby je CAIX jen omezeně využitelná. Rozdílný efekt léčby dvěma typy TKI, sunitinibem a sorafenibem, ve vztahu k expresi CAIX popsal Choueiri et al. Průměrné zmenšení nádorové masy dle RECIST kriterií u pacientů léčených sunitinibem bylo -17% u skupiny s vysokou expresí versus -25% u skupiny s nízkou expresí, kdežto u pacientů léčených sorafenibem byl rozdíl mezi těmito skupinami výrazný, -13% vs. +9% (161).

8.2.5 PI3K/Akt/mTOR signální cesta

Signální cesta tzv. savčího rapamycinového receptoru (mTOR – mammalian target of rapamycin) reguluje buněčný růst, přežívání a angiogenezi. Autokrinní stimulací nádorové buňky po vazbě VEGF a PDGF a povrchové receptory ve stěně nádorové buňky aktivuje PI3K (fosfatidil inozitol 3- kinázu). Produkty této kinázy podmiňují aktivaci Akt (jinak též PKB - protein kináza B). Aktivovaná Akt jednak působí anti-apoptoticky, podporuje buněčný růst a angiogenezi fosforylací širokého spektra

substrátů v cytoplazmě, včetně mTOR (82, 83). Dysregulace PI3K/pAkt/mTOR signální cesty je znakem světlobuněčného i papilárního renálního karcinomu (162, 163).

- **pAkt/PKB (protein kináza B)**

Závěry studií sledující vztah pAkt a prognózy onemocnění nejsou jednoznačné. Pantuck et al. popisuje příznivější prognózu lokalizovaného karcinomu s vysokou expresí pAkt v jádře, naopak vysoká exprese cytoplazmatické pAkt byla spojena s horší prognózou mRCC. U lokalizovaného karcinomu byla nalezena vyšší exprese jádrové pAkt, než v tkáni mRCC (164). Na souboru vzorků 19 pacientů užívajících temsirolimus prokázal Cho et al. vyšší expresi pAkt pouze u objektivních respondérů (165).

- **mTOR**

mTOR (mammalian target of rapamycin; savčí rapamycinový receptor) vytváří s dalšími proteiny funkční komplexy (mTORC1 a mTORC2) a reguluje buněčný růst, proliferaci, motilitu, přežívání a syntézu proteinů. Výraznější exprese mTOR ve vzorcích mRCC korelovala s lepší prognózou (166).

- **pS6 (ribosomální protein S6)**

Ribosomální protein S6 je kináza regulována mTOR, v buněčném jádře ovlivňuje mRNA translaci. Vysoká exprese byla nalezena u světlobuněčných renálních karcinomů, tumorů s vyšším gradem a stagem a u generalizovaného onemocnění. V multivarietní analýze se pS6 ukázal jako nejsilnější prediktor DSS (disease specific survival) (164). Cho et al. v souboru 20 pacientů prokázal, že vysoká exprese pS6 koreluje s odpovědí na léčbu temsirolimem, naznačený trend byl též pro pAkt, navíc objektivní odpověď na léčbu mTOR inhibitory byla pouze u pacientů se zvýšenou expresí pS6 nebo pAkt (165).

- **PTEN (Phosphatase and tensin homolog)**

PTEN je tumor supresorový protein, regulující mTOR signální cestu inhibicí PI3K a potažmo pAkt. Mutace PTEN genu jsou v RCC poměrně vzácné a jsou

spojeny s horší prognózou (167). Nízká exprese PTEN spolu s vysokou expresí pAkt korelovala s horším přežitím (168). Nicméně, jako prediktor efektu léčby temsirolimem u mRCC se PTEN neprokázal (169).

8.3 Markery stanovované v periferní krvi

8.3.1 Cirkulující VEGF

Paule et al. v r. 2010 prokázal signifikantně vyšší hladiny cirkulujících izoform VEGF (VEGF121 a VEGF165) u pacientů odpovídajících na léčbu sunitinibem (parciální odpověď - PR či stabilní onemocnění - SD). Výsledky byly stejné při analýze transkripční mRNA v tumorózní tkáni pomocí RT-PCR (170). S délkou přežití též korespondoval poměr cirkulujících izoform VEGF121/VEGF165, u pacientů s poměrem nižším než 1,25 bylo celkové přežití signifikantně vyšší než u pacientů s poměrem vyšším 1,25. Jako prediktoru nelze cirkulující VEGF (cVEGF) užít u všech metastatických nádorů, signifikantně vyšší hladiny byly zjištěny pouze u mRCC s prokázaným deficitem pVHL. Zvýšení hladiny cVEGF může být též arteficiální při aktivaci trombocytů ve vyšetřované krvi v průběhu zpracování. Ve studii porovnávající hladiny cVEGF v různých médiích (citrátová plazma, PECT – medium obsahující inhibitory aktivace trombocytů a resuspenze trombocytů) ve skupině zdravých dobrovolníků, pacientů s metastatickými nádory jinými než renálními a mRCC byly signifikantně vyšší hladiny pouze u mRCC i při vyloučení arteficiálního zvýšení při trombocytární aktivaci (171).

8.3.2 Cirkulující CAIX

Solubilní cirkulující CAIX (cCAIX) v periferní krvi byla poprvé stanovena Závadou et al. v 2003. Zvýšené hladiny cCAIX byly nalezeny převážně u pacientů s RCC při porovnání s jinými než renálními karcinomy a zdravými kontrolami. Prokázali také, že cCAIX má původ v nádorové mase, sérové hladiny se po nefrektomii minimalizovaly (172). Byla nalezena korelace mezi hladinou cirkulující CAIX a velikostí tumoru a stage (173, 174), dále také byly zaznamenány zvyšující se hladiny při progresi či rekurenci onemocnění (173). Význam cirkulující CAIX v predikci renálního karcinomu je však ještě třeba potvrdit dalšími studiemi.

8.3.3 NGAL (Neutrophil gelatinase associated lipocalin)

Jedná se o protein upregulovaný v buňkách vystavených zátěži a také v buňkách tumoru. Má protektivní účinky při ischemii tkání. Zvýšené hladiny jsou spojené se sníženým přežitím bez progresu u pacientů léčených sunitinibem (3,4 vs. 8,2 měsíce) (175). Jako diagnostický marker je NGAL studován v souvislosti s histologickými typy RCC, nejvyšší exprese byla nalezena u papilárního a chromofobního renálního karcinomu, a možností časně diagnostiky metastatické progresu RCC (176).

8.3.4 CRP (C-reaktivní protein)

CRP je protein akutní fáze, jehož plazmatické koncentrace vzrůstají několikasetnásobně jako odpověď na infekce, trauma, autoimunní inzulty či malignitu. Zvýšené hladiny CRP (již nad 4ng/ml) byly prokázány jako nezávislý prediktor špatné prognózy celkového přežití u pacientů s RCC (177). Jako specifický prediktivní marker efektu biologické léčby mRCC není použitelný.

8.3.5 Trombocytóza a leukocytóza

Trombocytóza a leukocytóza jsou součástí několika prediktivních nomogramů (101, 130, 178). Nicméně, jiné práce prognostickou hodnotu hladiny trombocytů nepotvrzují (179).

8.3.6 Cirkulující endoteliální buňky

Cirkulující endoteliální buňky (CECs) jsou zralé buňky endotelu cév, které se uvolňují z intimy cév při fyziologickém obratu endotelií. Zvyšují také svoji četnost při různých chorobných stavech spojených s poškozením endotelu, jako je infarkt myokardu, rejekce transplantovaných štěpů, infekční nemoci nebo při maligních onemocněních (180). Byla nalezena korelace mezi hladinami cirkulujících endoteliálních buněk a PFS u pacientů léčených bevacizumabem pro kolorektální karcinom. U respondérů bylo zaznamenáno signifikantní snížení hladin CEC, signifikantně delší PFS měli pacienti s nižší výchozí hladinou CEC, tedy méně než 40 CEC/ml periferní krve (181). Korelaci mezi počty CEC a odpovědí na léčbu mRCC sunitinibem prokázal Gruenwald et al. Časně zvýšení počtu CEC u respondérů na léčbu TKI korelovalo také s delším PFS (182). Progenitorové buňky (CEP) uvolňované z kostní dřeně osídľují ischemické tkáně a podílí se na novostavbě cév, v periferní krvi jsou též zmnožené při progresi nádorového růstu. Farace et al. popsal ve studii s 5 pacienty

zvýšení počtů cirkulujících progenitorových buněk (CEP) u respondérů na antiangiogenní léčbu kombinovanou s cisplatinou (183). V další studii však vztah mezi zvýšeným počtem cirkulujících progenitorových buněk (CD45dim, CD34+ a VEGFR2+) a efektem sunitinibu u mRCC neprokázal. Signifikantně kratší však byl PFS a OS (184). Možnost užití CEC a CEP jako časných markerů efektu podávané antiangiogenní léčby musí prokázat další studie.

8.4 miRNA (mikroRNA)

Takzvané mikro-RNA (miRNA) jsou nekódující krátké (cca 20 nukleotidů) úseky RNA, hrají významnou úlohu v posttranskripční regulaci exprese mnoha onkogenů a tumor supresorových genů a sami o sobě představují velmi slibnou skupinu biomarkerů. MiRNA jsou velmi stabilní molekuly a proto je lze dobře stanovit a kvantifikovat v tkáních, i fixovaných formalinem a konzervovaných v parafinových blocích (FFPE, *formalin-fixed paraffin-embedded*) i tělních tekutinách. Lze je tedy zkoumat i retrospektivně. Využívají se tedy i cirkulující miRNA, v současné době zatím největší význam mají v detekci karcinomu prsu, plic, ovária, prostaty či kolorekta (15).

V současné době jsou miRNA terčem mnoha studií sledujících vztah exprese určitých miRNA a metastatického renálního karcinomu, ať už jako prognostický faktor přežití, tak i efektu léčby TKI. Prior et al. v in vitro experimentu screeningem z celkem 673 miRNA identifikovali 64 rozdílně exprimovaných miRNA ve skupinách pacientů s dobrou odpovědí na podávaný sunitinib a se špatnou odpovědí. Seletovali 7 miRNA a pomocí RT-PCR tyto kvantifikovali v testovací skupině. Jako nejpřesnější prediktor efektu sunitinibu vyšel úsek MiR-942. Vysoká exprese miR-942, miR628-5b, miR-133a a miR-484 byla signifikantně asociována s kratším PFS i OS. Stejně úseky byly zvýšeně exprimovány i v buněčných liniích rezistentních k sunitinibu (Caki-2) (185). Lukamowicz et al. ve své studii našli snížení exprese miR-99b-5p u pacientů s krátkou dobou PFS (<8 měsíců) a TKI non-respondérů. Při validaci pomocí RT-PCR byla navíc potvrzena zvýšená exprese této miRNA u jasných respondérů léčby (186). Khella et al. v obdobném schématu našli signifikantní korelaci mezi miR-221 overexpresí a krátkým PFS. Navíc prokázali antiangiogenní a

antiproliferativní účinky miR-221 a miR-222 na buněčné linii endoteliálních buněk (187).

8.5 Markery stanovované v moči

NMP-22 (nuclear matrix protein – 22) je biomarker užívaný ke screeningu a monitoraci karcinomu močového měchýře uznaný FDA. Vyšší hladiny v moči byly nalezeny také u pacientů s RCC (188). Studovány byly též močové hladiny aquaporinu 1 (AQP1) a adipofilinu, ukázaly se jako specifické i dostatečně senzitivní biomarkery k časně diagnostice renálního karcinomu z proximálních tubulů (189).

8.6 Další

Možnost zhodnocení efektu již podávané léčby a v krátkém intervalu od prvního podání je užitečné pro další plánování léčby. Jedním z vedlejších efektů podávání antiangiogenní léčby ovlivňující VEGF dráhu je hypertenze. Její příčiny nejsou přesně známy, udáván je negativní vliv TKI na produkci NO. Byl však nalezen signifikantní efekt léčby a lepší PFS u pacientů s rozvinutou hypertenzí (tedy více než 140/90mmHg) způsobenou léčbou sunitinibem (190). Rozvoj hypertenze lze tedy považovat na časný indikátor účinnosti léčby sunitinibem. Samotné vyšetřování zobrazovacími metodami v krátkém odstupu od zahájení léčby lze užít nejen jako zhodnocení efektu léčby, ale dle míry změn sledovaných parametrů je možno i predikovat další chování tumoru. Nakaigawa et al. v roce 2016 hodnotil přežití u pacientů s mRCC před léčbou vyšetřených FDG PET-CT v závislosti na hodnotě nejvyšší naměřené aktivity FDG akumulujících ložisek. S vyšším SUVmax byl trend k horší prognóze. V podskupině pacientů s SUV max < 7,0 bylo celkové přežití (OS) 41,9 měsíců, ve skupině s SUV max 7,0-12,0 průměrně 20,6 měsíců, ve skupině s SUV ≥ 12 bylo OS 4,2 měsíce (191). Jiná studie od autorů Ueno et al. z roku 2012 udává, že vyšetření FDG PET-CT 1 měsíc po zahájení léčby může být použito k predikci další odpovědi na léčbu, lepší efektivita byla prokázána u případů, kdy SUVmax pokleslo o 20% a více (192). Další studie (Horn et al.) hodnotí efekt sunitinibu v léčbě mCCRCC pomocí nejen detekce zvýšení metabolismu pomocí 18FDG, ale také proliferační aktivitu pomocí 18FLT (18-fluorothymidin). Již po dvou

týdnech užívání sunitinibu byl zřejmý pokles v proliferační aktivitě tumoru a v průběhu dalšího vyšetřování byl tento pokles stabilní (193).

9 Experimentální část

9.1 Cíl

Identifikovat možné tkáňové biomarkery v nádorové tkáni světlobuněčného renálního karcinomu, které by bylo možné využít k predikci efektu léčby sunitinibem ve fázi generalizovaného onemocnění.

9.2 Materiál a metody

Stanovili jsme panel proteinů, které jsou součástí signálních drah angiogeneze, růstu a přežívání nádorových buněk. Byly zahrnuty klíčové proteiny VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*) signální dráhy a molekuly podstatné pro hypoxický metabolismus tumoru: hypoxií indukovaný faktor alfa 1 (HIF- α 1), hypoxií indukovaný faktor alfa 2 (HIF- α 2), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), karboanhydráza IX (CAIX), savčí rapamycinový receptor (mTOR) a protein 53 (p53). Pomocí imunohistochemického vyšetření histologických řezů byla stanovena aktivita těchto proteinů jak v tkáni tumoru, tak ve zdravé tkáni ledviny. Vzorky tkáně tumoru a ledvinného parenchymu byly získány z preparátu odstraněného primárního nádoru. Tkáně byly poté uchovány v parafinových bločcích k dalšímu zpracování.

Do studie bylo zahrnuto 39 pacientů s metastatickým světlobuněčným renálním karcinomem (mCRCC). Tito byli vybráni z celkového počtu 119 pacientů, kteří byli léčeni sunitinibem v onkologickém centru naší nemocnice pro metastatický renální karcinom v letech 2005-2012. Pacienti byli selektováni podle inkluzních kritérií studie, která zahrnovala jednotný histologický typ nádoru, světlobuněčný renální karcinom. Dále dobu podávání sunitinibu alespoň 3 měsíce, hodnocení efektu léčby v pravidelných intervalech pomocí RECIST kritérií 1.1 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1) (194) a přítomnost dostatečného množství uchované tkáně nádoru a zdravého parenchymu ledviny ve formě parafinových bločků v tkáňovém archivu k imunohistochemickému vyšetření.

Z celkového počtu 119 pacientů léčených v onkologickém centru naší nemocnice sunitinibem pro metastatický renální karcinom (mRCC) pouze u 45 byly k dispozici vzorky tkáně tumoru a zdravého parenchymu ledviny. Z nich byli 3 vyloučeni pro odlišný histologický typ nádoru (1x papilární RCC typ 1 dle Delahunta, 1x chromofobní RCC, 1x neklasifikovaný RCC), 1 pacient pro nedostatečně dlouhou

dobu užívání sunitinibu (méně než 2 cykly) a 2 pacienti pro insuficientní data ve fázi sledování onemocnění. Pacienti zařazení do studie byli pro primární nádor operováni mezi lety 2002 a 2012.

Ihned po operačním výkonu standardně odebíráme vzorky tkáně tumoru a zdravé tkáně ledviny, které jsou následně hluboce zmrazeny a uchovány pro potřebu možného dalšího zpracování především genetické analýzy. Odběr tkání, jejich uchovávání i následné použití pro vědeckou práci je legislativně ošetřeno a schváleno lokální etickou komisí Fakultní nemocnice (FN) Plzeň. Pacienti před plánovanou operací pro nádor ledviny na Urologické klinice FN Plzeň podepisují informovaný souhlas s využitím odebraných tkání k vědeckým účelům.

V naší studii však byly použity tkáňové bločky po fixaci tkáně formaldehydem a fixované v parafinu (FFPE, *formalin-fixed paraffin-embedded*), získané v rámci zpracování samotného preparátu nefrektomované ledviny nebo resekovaného tumoru před histopatologickým vyšetřením. Takto byly uchovány v archivu ústavu patologické anatomie naší nemocnice. Dostatečné množství uchované tkáně k imunohistochemickému vyšetření bylo jednou z podmínek zařazení do studie.

Charakteristiky pacientů zařazených do studie shrnuje tabulka 5.

Sunitinib byl podáván perorálně v jedné denní dávce 50 mg v 1.-28. dnu šestitýdenního cyklu. Dle tolerance léčby či výskytu vedlejších účinků léčby byly dávky individuálně upraveny na 37,5mg nebo 25mg. Redukce dávky nebyla v hodnocení efektu a délky trvání léčby zohledněna, jedná se o standardizovaný léčebný režim.

Ve 14 případech (14/39; 36%) byli pacienti před zahájením léčby sunitinibem léčeni imunochemoterapií (5-fluorouracil + interferon α + interleukin 2) a to alespoň 1 měsíc. Ve 4 případech (4/39; 10%) byl sunitinib podán ve druhé linii cílené léčby po sorafenibu. Průměrná doba od operačního výkonu primárního tumoru do diagnózy metastatického postižení byla 18,2 měsíce (0,0-74,3 měsíce), průměrná doba od průkazu metastatického postižení do zahájení léčby sunitinibem byla 10,2 měsíce (0,2-49,2 měsíce). Průměrné trvání léčby sunitinibem v celé skupině bylo 15,8 měsíce (3,4-57,4 měsíce), ve skupině respondérů 19,4 měsíce (3,9-57,4 měsíce), ve skupině non-respondérů pak 4,9 měsíce (3,4-8,5 měsíce).

Tabulka 5 - Charakteristiky pacientů

Parametr		Počet
Počet pacientů celkem		39 (100%)
Pohlaví	muži	27 (69%)
	ženy	12 (31%)
Věk v době operace (roky)		56.7 (39.6-71.1)
Věk při zahájení léčby (roky)		59.1 (41.0-78.3)
pT	1	7
	2	6
	3a	14
	3b	11
	4	1
Fuhrmanové grade	1	13
	2	21
	3	2
	4	3
Generalizace v době diagnózy	N+ či M+	11 (28%)
Stádium onemocnění v době diagnózy	I	7
	II	5
	III	15
	IV	12

Tabulka 6 - Data o léčbě

Čas od operace do generalizace (měsíce)		18.2 (0.0-74.3)
Čas od generalizace do zahájení léčby (měsíce)		10.2 (0.2-49.2)
Pacienti předléčení imunochemoterapií		14 (36%)
Délka podávání sunitinibu	celkem (měsíce)	15.8 (3.4-57.4)
	skupina s objektivní odpovědí	19.4 (3.9-57.4)
	skupina v progresi	4.9 (3.4-8.5)

Efekt léčby byl hodnocen porovnáním vývoje sledovaných metastatických lézí pomocí komparabilních zobrazovacích metod (CT, RTG plic, celotělová 18-FDG PET-CT) a hodnocen dle RECIST kritérií (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*) 1.1 (194). Vyšetření byla provedena po 2-5 cyklech léčby, průměrně 4,3 měsíce od zahájení léčby (2,6-6,8 měsíce). Tato byla porovnána s vyšetřením provedeným před léčbou, průměrný interval mezi porovnávanými vyšetřeními byl 5,4 měsíce (2,7-9,1 měsíce).

Progrese onemocnění byla zaznamenána u 11 (11/39; 28,2%) pacientů. Podle RECIST kritérií byl jako progrese onemocnění stanoven nárůst součtu nejdelších rozměrů měřených lézí o více než 20% oproti vstupnímu vyšetření, nebo nález nových metastatických ložisek. Pacienti s progresí onemocnění tvořili skupinu tzv. non-respondérů na léčbu. V 19 (19/39; 48,7%) případech byl vývoj onemocnění hodnocen jako regrese ložisek, a to v případě zmenšení součtu nejdelších rozměrů ložisek o 30% a více, v souladu s RECIST. Celkem 9 (9/39; 23,1%) případů, kdy nedošlo ani k signifikantní progresi ani regresi ložisek, bylo hodnoceno jako stabilní onemocnění. Případy s popsanou regresí ložisek a stabilním onemocněním byly zařazeny do skupiny tzv. respondérů. Kompletní remise onemocnění nebyla zaznamenána.

Následně byli pacienti rozděleni do skupin podle přežití bez progrese (PFS, progression free survival) na skupinu s PFS kratším než 1 rok (PFS<1y) a PFS delším než 1 rok (PFS≥1y). Přežití bez progrese jsme definovali jako čas od zahájení léčby sunitinibem do prvního pozorování známek progrese onemocnění. Ve skupině PFS<1y bylo 18 pacientů (18/39; 46,2%) s PFS průměrně 5,6 měsíců (od 3,4 do 9,8 měsíců). Ve skupině PFS≥1y bylo pacientů 21 (21/39; 53,8%), průměrná PFS zde dosahovala 26,5 měsíců (od 12,2 do 56,8 měsíců).

Histologické a imunohistochemické vyšetření:

Pro potřeby histologického vyšetření byly tkáňové vzorky po odběru fixovány v pufovaném 4% formaldehydu a zality do parafinových bločků. Histologické řezy o tloušťce 5 μm byly následně barveny hematoxylinem a eosinem. Pomocí světelné mikroskopie byly vybrány přibližně stejně velké řezy jak nádorové tak nenádorové tkáně z každého vyšetřovaného případu. Imunohistochemická vyšetření byla

provedena pomocí automatického obarvovače Ventana Benchmark XT (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ, USA).

K vyšetření byly užity následující protilátky: mTOR (polyklonální, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA, 1:50), p53 (DO-7, monoklonální, Dako, Glostrup, Denmark, 1: 50), VEGF (Y103, monoklonální, ABCAM, Cambridge, UK, 1:50), HIF 1 (ESEE 122, monoklonální, ABCAM, Cambridge, UK, 0,5: 150), HIF 2 (ep190b, monoklonální, ABCAM, Cambridge, UK, 1:30), karboanhydráza IX (rhCA9, monoklonální, RD systems, Abingdon, GB, 1:100). Každá série vyšetření byla kontrolována pozitivními a negativními vzorky.

Stanovili jsme stupně obarvení vzorků tkání odpovídající přítomnosti sledovaných markerů. Negativní nález, pokud žádné zbarvení při imunohistochemickém vyšetření nebylo přítomno; ojedinělá pozitivita, pokud pouze několik buněk tkáně je jasně pozitivní (méně než 5%); fokální pozitivita, kdy velké skupiny buněk nebo souvislý okresek tkáně (do 50 %) je pozitivní v tkáni jinak negativní; difuzní pozitivita, kdy s protilátkou reaguje většina buněk. Intenzitu zbarvení při pozitivním nálezu jsme kvantifikovali poměrným číslem 1-3, kdy hodnota 3 odpovídá maximální míře zbarvení dle porovnání s pozitivní kontrolou, tedy 100%. Čísla 1 a 2 pak poměrně odpovídala míře zbarvení 33% respektive 66%. V jednotlivých skupinách pak byla vyhodnocena průměrná pozitivita a vyjádřena procentuálně.

V případech positivity jen ojedinělých buněk byly tyto v celkovém výsledku zanedbány a takový vzorek hodnocen jako celkově negativní. V případě středně silně a silně intenzivní fokální positivity, kdy množství pozitivní tkáně sice není ve vzorku majoritní, ale není zanedbatelné, jsme hodnotili takový vzorek jako slabě celkově pozitivní, hodnotou 1, v procentuálním vyjádření 33%.

9.3 Výsledky

U všech pacientů v souboru jsme stanovili délku přežití bez progresu (PFS; progression free survival) a celkového přežití (OS; overall survival), po rozdělení do skupin dle efektu léčby hodnoceného dle RECIST kritérií jsme potvrdili delší PFS i OS ve skupině respondérů (R) oproti non-respondérům (NR).

Průměrné PFS ve skupině R dosahovalo 21,4měsíců (8,5-56,8 měsíců), ve skupině NR (non-respondérů) pak 5,4měsíců (3,4-8,5měsíců), rozdíl je statisticky významný,

$p=0,0003218$. Stejně i rozdíl v celkovém přežití mezi oběma skupinami byl statisticky významný, OS ve skupině R (respondérů) bylo 35,1 měsíců (4,6-83,4 měsíce), ve skupině NR (non-respondérů) pak 17,0 měsíců (5,5-30,3měsíců), $p=0,00187421$.

Ve skupině R ($n=26$; 19 regrese, 7 stabilní onemocnění) při porovnávání míry exprese jednotlivých sledovaných markerů mezi tkání tumoru a zdravým parenchymem jsme získali statisticky významné výsledky pro následující markery. Signifikantně nižší exprese ve tkáni tumoru oproti zdravému parenchymu byla u mTOR a p53. Průměrná pozitivita mTOR byla 4% ve tkáni tumoru, ve zdravém parenchymu pak 16,7% ($p=0,01031$), u p53 pak 4% v tumoru, 12,7% ve zdravé tkáni ($p=0,042019$). Naopak vyšší exprese v tumoru oproti zdravé tkáni byla pozorována u VEGF (62,7% tumor, 45% zdravá tkáň; $p=0,019836$) a u CAIX (45% tumor, 15,3% zdravá tkáň; $p=0,001624$). Rozdíly v expresi HIF1 a HIF2 nebyly statisticky signifikantní ($p=0,66677$ resp. $p=0,843603$)

Ve skupině NR ($n=11$) byly statisticky významné rozdíly nalezeny u p53 a CAIX. Exprese p53 byla v tumorózní tkáni nižší oproti zdravé tkáni (3% tumor, 21,3% zdravá tkáň; $p=0,02824$), u CAIX byla však aktivita v tumorózní tkáni vyšší než ve zdravé (36,3% tumor, 12% zdravá tkáň; $p=0,011921$). U ostatních vyšetřovaných markerů signifikantní rozdíly nalezeny nebyly. Marker VEGF byl v obou druzích tkáně ve skupině non respondérů exprimován stejnou měrou (tumor 57,7%, zdravá tkáň 57,7%, $p=1,00$).

Data jsme analyzovali také hodnocením četnosti vysoké exprese. Hodnoty celkové exprese markerů vyšší než 2+, procentuálně více než 60%, byly uvažovány jako celkové pozitivní nález. Signifikantní rozdíly byly nalezeny u VEGF (65% tumor, 35%zdravá tkáň, $p=0,026487$) a CAIX (42% tumor, 8%zdravá tkáň, $p=0,003328$) ve skupině respondérů.

Následně jsme stratifikovali pacienty dle doby do progresse onemocnění (progression free survival, PFS). Medián PFS celé skupiny pacientů byl 12,7 měsíců, v rozmezí od 3,4 do 56,8 měsíců. Medián celkového přežití (overall survival, OS) byl 29,9měsíců, v rozmezí od 4,6 do 83,4 měsíců. V době hodnocení výsledků bylo 15 pacientů stále naživu (38,5%). Tři z nich pokračovali v léčbě sunitinibem. Analyzovali jsme expresi sledovaných markerů po rozdělení do skupin PFS kratší než 1 rok (PFS<1 rok; $n=18$; medián PFS 4,9 měsíce, od 3,4 do 9,8 měsíců) a PFS delší 1 roku včetně (PFS \geq 1

rok; n=21; medián PFS 26,7 měsíců, od 12,2 do 56,8 měsíců). V obou skupinách byla zjevná vyšší exprese CAIX ve tkáni tumoru v porovnání se zdravou tkání. Ve skupině PFS<1 rok, průměrná exprese dosahovala 33,3% ve tkáni tumoru, ve zdravé tkáni pak 9,8% (p=0,00169647). Ve skupině pacientů PFS≥1 rok pak v tumoru 50,0% a 18,3% ve zdravé tkáni (p=0,00187404). Opačné rozdíly pak byly nalezeny u p53, kde nižší exprese byla nalezena ve tkáni tumoru oproti zdravé tkáni, jak ve skupině PFS<1 rok (5,9% tumor, 15,9% zdravá tkáň; p=0,04237081), tak ve skupině s PFS≥1 rok (1,7% tumor, 13,3% zdravá tkáň; p=0,0035556). Dále statisticky signifikantní výsledky byly získány pro mTOR ve skupině PFS≥1 rok (1,7% tumor, 13,3% zdravá tkáň; p=0,00547403). Ve skupině PFS<1 rok pak byl nalezen pouze statistický trend (5,9% tumor, 17,6% zdravá tkáň; p=0,09153799).

U markeru VEGF byly výsledky po rozdělení podle PFS srovnatelné s výsledky v rozdělení dle objektivního efektu léčby. Signifikantní rozdíl v expresi byl zaznamenán ve skupině s PFS≥1 rok (60% tumor, 45% zdravá tkáň; p=0,04599199), ve skupině s PFS<1 rok výsledky nebyly významné (62,8% tumor, 52,9% zdravá tkáň; p=0,12992678).

9.4 Shrnutí

Prokázali jsme významné rozdíly v expresi p53 a CAIX mezi tumorózní tkání CCRCC a zdravým parenchymem ledviny ve všech porovnávaných skupinách. Ve všech skupinách byla produkce p53 v nádorové tkáni potlačena a jeho přítomnost byla v tumoru signifikantně nižší oproti zdravé tkáni. V případě CAIX byly výsledky opačné, ve všech skupinách je exprese v tumoru signifikantně vyšší. Tyto vlastnosti jsou pro CCRCC typické.

Významnější výsledek jsme získali u VEGF, kde signifikantní rozdíl mezi vyšší expresí v tumorózní tkáni oproti nízké expresi ve tkáni zdravé se jeví jako znak tumorů dobře reagujících na léčbu sunitinibem.

10 Závěr

V projektu jsme na konzistentním souboru pacientů léčených v naší nemocnici jak chirurgicky tak i onkologicky systémovou léčbou pro renální karcinom prokázali souvislost mezi zvýšenou přítomností tkáňových biomarkerů a efektem podávané cílené léčby. Všichni pacienti měli shodný histologický typ nádoru, světlobuněčný renální karcinom, u všech jsme měli k dispozici dostatečné množství tkáně primárního tumoru i zdravého parenchymu ledviny k histopatologickému zpracování a všichni byli léčeni blokátorem tyrosinkinázy receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR) sunitinibem.

Výsledky získané z imunohistochemické analýzy tkání tumoru a zdravého parenchymu byly signifikantní pro tkáňový VEGF, jehož vyšší exprese v tkáni tumoru při nízké přítomnosti v tkáni zdravého parenchymu korelovala s lepší odpovědí na sunitinib. Výsledky pro ostatní sledované markery nebyly statisticky významné, nebo nekorelovaly s efektem léčby, ale byly rozdílné mezi tkání tumoru a zdravým parenchymem (CAIX, p53), v souladu s typickými IHC znaky renálního karcinomu.

Tyto výsledky přinášejí doplňující informace k dosavadním poznatkům o prediktivních biomarkerech renálního karcinomu. Studie zabývající se v podobném rozsahu touto tematikou přinášejí nesourodé informace. V případě VEGF/VEGFR osy byla prokázána korelace mezi lepším efektem sunitinibu v léčbě mCCRCC se ukázal zvýšeně exprimovaný VEGFR2 (157). Výsledky pro tkáňový VEGF jsou spíše nesignifikantní a uvažuje se spíše o využití kombinací markerů (VEGF, COX-1, CAIX apod) (151–153). Efekt léčby dále ovlivňují i bodové mutace v genech pro VEGF i VEGFR (154, 155). Mezi prediktory léčby TKI pak může patřit i status *VHL* genu, není-li prokázána porucha *VHL* u renálního karcinomu, lze očekávat horší prognózu i efekt TKI (136, 137). Mezi další slibné prediktory patří HIF, kdy lepší odpověď na léčbu sunitinibem (parciální i kompletní regrese) byla pozorována u pacientů s vysokou expresí HIF-1 α nebo HIF-2 α ve tkáni tumoru (144, 145).

Nesourodost výsledků je vysvětlitelná rozdílností souborů, metodik, samotného zaměření studií, v neposlední řadě však také heterogenitou vlastních vyšetřovaných nádorů. Ve světle současných poznatků o vnitřní morfologii nádorové tkáně a intratumorální heterogenitě má vyšetření malého vzorku tkáně jakoukoliv metodikou jen omezenou vypovídající hodnotu o vlastnostech nádoru jako celku.

Renální karcinom vykazuje obecně vysoký maligní potenciál, zatím jedinou kurativní metodou je kompletní odstranění nádoru z těla. Současná sofistikovaná systémová léčba je schopna inhibovat buněčné signální dráhy přenosu informace. Od počátku užívání této léčby je snaha o nalezení biomarkerů schopných predikovat efekt léčby, nebo prognózu pacienta. Tato snaha je stejně intenzivní jako vývoj nových léčiv a přesná diagnostika mapováním nádorové tkáně pomocí molekulárně biologických metod bude zřejmě nezbytná pro přiblížení se konceptu personalizované medicíny v léčbě metastatického renálního karcinomu.

Literatura:

- 1 GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
- 2 Dusek L, Muzik J, Kubasek M, Koptikova J, Zaloudik J and Vyzula R: Epidemiology of malignant tumours in Czech Republic (online). SVOD.cz, 2005. Available from: www.svod.cz.
- 3 Macleod LC, Tykodi SS, Holt SK, Wright JL, Lin DW, Tretiakova MS, True LD and Gore JL: Trends in Metastatic Kidney Cancer Survival From the Cytokine to the Targeted Therapy Era. *Urology* 86: 262–268.
- 4 Beisland C, Johannesen TB, Klepp O, Axcrona U, Torgersen KM, Kowalski J, Solli O, Sandin R and Oldenburg J: Overall survival in renal cell carcinoma after introduction of targeted therapies: a Norwegian population-based study. *OncoTargets Ther* 10: 371–385, 2017.
- 5 Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, Martinez P, Matthews N, Stewart A, Tarpey P, Varela I, Phillimore B, Begum S, McDonald NQ, Butler A, Jones D, Raine K, Latimer C, Santos CR, Nohadani M, Eklund AC, Spencer-Dene B, Clark G, Pickering L, Stamp G, Gore M, Szallasi Z, Downward J, Futreal PA and Swanton C: Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med* 366: 883–892, 2012.
- 6 Hayflick L: The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*: 614–636, 1965.
- 7 Vinagre J, Pinto V, Celestino R, Reis M, Pópulo H, Boaventura P, Melo M, Catarino T, Lima J, Lopes JM, Máximo V, Sobrinho-Simões M and Soares P: Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker? *Virchows Arch* 465: 119–133, 2014.
- 8 Pivovarcikova K, Pitra T, Vanecek T, Alaghebandan R, Gomolcakova B, Ondic O, Peckova K, Rotterova P, Hora M, Dusek M, Michal M and Hes O: Comparative study of TERT gene mutation analysis on voided liquid-based urine cytology and paraffin-embedded tumorous tissue. *Ann Diagn Pathol* 24: 7–10.
- 9 Klener P jr. and Klener P: Principy systémové protinádorové léčby. Praha, Grada Publishing a.s., 2013.
- 10 Kawaciuk I: Prognóza karcinomu ledviny. první. Praha, Galén, 1995.
- 11 Knudson AG: Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 820–823, 1971.
- 12 Novotný J, Vítek P, Kleibl Z and a kol.: Onkologie v klinické praxi. Standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů. 2. vydání. Praha, Mladá fronta a.s., 2016.
- 13 Gao D, Herman JG and Guo M: The clinical value of aberrant epigenetic changes of DNA damage repair genes in human cancer. *Oncotarget* 7: 37331–37346, 2016.
- 14 Auer H, Mobley J, Ayers L, Bowen J, Chuaqui R, Johnson L, Livolsi V, Lubensky I, McGarvey D, Monovich L, Moskaluk C, Rumpel C, Sexton K, Washington M, Wiles K, Grizzle W and Ramirez N: The effects of frozen tissue storage conditions on the integrity of RNA and protein. *Biotech Histochem Off Publ Biol Stain Comm* 89: 518–528, 2014.
- 15 Foretová L, Svoboda M and Slabý O: Molekulární genetika v onkologii. Aesculap. Praha, Mladá fronta a.s., 2014.
- 16 Branžovský J, Martínek P, Bauleth K, Trávníček I, Stránský P, Vaněček T, Hora M and Hes O: Využití molekulární genetiky v diferenciální diagnostice nádorů ledvin. (The Usage of Molecular Genetics in Differential Diagnosis of Renal Tumours). *Čes Urol* 16: 2014–21, 2012.
- 17 Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, Egevad L, Epstein JI, Grignon D, Hes O, Moch H, Montironi R, Tickoo SK, Zhou M, Argani P and The ISUP Renal Tumor Panel: The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 37, 2013.
- 18 Magers MJ, Udager AM and Mehra R: MiT Family Translocation-Associated Renal Cell Carcinoma: A Contemporary Update With Emphasis on Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Mimics. *Arch Pathol Lab Med* 139: 1224–1233, 2015.

- 19 Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, Reuter VE and Ulbright TM: The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol* 70: 93–105, 2016.
- 20 Teloken PE, Thompson RH, Tickoo SK, Cronin A, Savage C, Reuter VE and Russo P: PROGNOSTIC IMPACT OF HISTOLOGICAL SUBTYPE IN PATIENTS WITH SURGICALLY TREATED LOCALIZED RENAL CELL CARCINOMA. *J Urol* 182: 2132–2136, 2009.
- 21 Patard J-J, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, De La Taille A, Tostain J, Artibani W, Abbou CC, Lobel B, Guillé F, Chopin DK, Mulders PFA, Wood CG, Swanson DA, Figlin RA, Belldegrun AS and Pantuck AJ: Prognostic Value of Histologic Subtypes in Renal Cell Carcinoma: A Multicenter Experience. *J Clin Oncol* 23: 2763–2771, 2005.
- 22 Kawaciuk I: *Urologie*. První. Praha, Galén, 2009.
- 23 Furhman S, Lasky L and Limas C: Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 6: 655–663, 1982.
- 24 Lee C, Park J-W, Suh JH, Nam KH and Moon KC: Histologic Variations and Immunohistochemical Features of Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Korean J Pathol* 47: 426–432, 2013.
- 25 Maher ER, Neumann HP and Richard S: von Hippel-Lindau disease: A clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet* 19: 617–623, 2011.
- 26 Maher ER, Yates JR and Ferguson-Smith MA: Statistical analysis of the two stage mutation model in von Hippel-Lindau disease, and in sporadic cerebellar haemangioblastoma and renal cell carcinoma. *J Med Genet* 27: 311–314, 1990.
- 27 Semenza GL: HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20: 51, 2010.
- 28 Stebbins CE, Kaelin WG and Pavletich NP: Structure of the VHL-ElonginC-ElonginB Complex: Implications for VHL Tumor Suppressor Function. *Science* 284: 455, 1999.
- 29 Brugarolas J: Molecular Genetics of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 32: 1968–1976, 2014.
- 30 Klatte T, Rao PN, de Martino M, LaRoche J, Shuch B, Zomorodian N, Said J, Kabbinavar FF, Belldegrun AS and Pantuck AJ: Cytogenetic Profile Predicts Prognosis of Patients With Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 27: 746–753, 2009.
- 31 Delahunt B and Eble JN: Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol* 10: 537–44, 1997.
- 32 Leroy X, Zini L, Leteurtre E, Zerimech F, Porchet N, Aubert J-P, Gosselin B and Copin M-C: Morphologic Subtyping of Papillary Renal Cell Carcinoma: Correlation with Prognosis and Differential Expression of MUC1 between the Two Subtypes. *Mod Pathol* 15: 1126–1130.
- 33 Trpkov K, Hes O, Agaimy A, Bonert M, Martinek P, Magi-Galluzzi C, Kristiansen G, Lüders C, Nesi G, Compérat E, Sibony M, Berney DM, Mehra R, Brimo F, Hartmann A, Husain A, Frizzell N, Hills K, Maclean F, Srinivasan B and Gill AJ: Fumarate Hydratase-deficient Renal Cell Carcinoma Is Strongly Correlated With Fumarate Hydratase Mutation and Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome. *Am J Surg Pathol* 40, 2016.
- 34 Hes O, Brunelli M, Michal M, Cossu Rocca P, Hora M, Chilosi M, Mina M, Boudova L, Menestrina F and Martignoni G: Oncocytic papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, ultrastructural, and interphase cytogenetic study of 12 cases. *Ann Diagn Pathol* 10: 133–139.
- 35 Procházková K, Staehler M, Trávníček I, Pitra T, Eret V, Üрге T, Eberlová L, Roušarová M, Hošek P, Chudáček Z, Ferda J, Hes O and Hora M: Morphological Characterization of Papillary Renal Cell Carcinoma Type 1, the Efficiency of Its Surgical Treatment. *Urol Int*: Epub ahead of print, 2016.
- 36 Balint I, Szponar A, Jauch A and Kovacs G: Trisomy 7 and 17 mark papillary renal cell tumours irrespectively of variation of the phenotype. *J Clin Pathol* 62: 892–895, 2009.
- 37 Yap NY, Rajandram R, Ng KL, Pailoor J, Fadzli A and Gobe GC: Genetic and Chromosomal Aberrations and Their Clinical Significance in Renal Neoplasms. *BioMed Res Int* 2015: 476508, 2015.

- 38 Choueiri TK, Escudier B, Powles T, Tannir NM, Mainwaring PN, Rini BI, Hammers HJ, Donskov F, Roth BJ, Peltola K, Lee JL, Heng DYC, Schmidinger M, Agarwal N, Sternberg CN, McDermott DF, Aftab DT, Hessel C, Scheffold C, Schwab G, Hutson TE, Pal S and Motzer RJ: Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 17: 917–927.
- 39 Courthod G, Tucci M, Di Maio M and Scagliotti GV: Papillary renal cell carcinoma: A review of the current therapeutic landscape. *Crit Rev Oncol Hematol* 96: 100–112.
- 40 Sanz-Ortega J, Vocke C, Stratton P, Linehan WM and Merino MJ: Morphologic and molecular characteristics of uterine leiomyomas in hereditary leiomyomatosis and renal cancer (HLRCC) syndrome. *Am J Surg Pathol* 37: 74–80, 2013.
- 41 Ooi A, Wong J-C, Petillo D, Roossien D, Perrier-Trudova V, Whitten D, Min BWH, Tan M-H, Zhang Z, Yang XJ, Zhou M, Gardie B, Molinié V, Richard S, Tan PH, Teh BT and Furge KA: An Antioxidant Response Phenotype Shared between Hereditary and Sporadic Type 2 Papillary Renal Cell Carcinoma. *Cancer Cell* 20: 511–523.
- 42 Udager AM, Alva A, Chen Y-B, Siddiqui J, Lagstein A, Tickoo SK, Reuter VE, Chinnaiyan AM and Mehra R: Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC): a rapid autopsy report of metastatic renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 38: 567–577, 2014.
- 43 Haas NB and Nathanson KL: Hereditary Renal Cancer Syndromes. *Adv Chronic Kidney Dis* 21: 10.1053/j.ackd.2013.10.001, 2014.
- 44 Linehan WM and Rouault TA: Molecular Pathways: Fumarate Hydratase-Deficient Kidney Cancer: Targeting the Warburg Effect in Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19: 3345–3352, 2013.
- 45 Frezza C, Zheng L, Folger O, Rajagopalan KN, MacKenzie ED, Jerby L, Micaroni M, Chaneton B, Adam J, Hedley A, Kalna G, Tomlinson IPM, Pollard PJ, Watson DG, Deberardinis RJ, Shlomi T, Ruppin E and Gottlieb E: Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. *Nature* 477: 225–228, 2011.
- 46 Kamai T, Abe H, Arai K, Murakami S, Sakamoto S, Kaji Y and Yoshida K-I: Radical nephrectomy and regional lymph node dissection for locally advanced type 2 papillary renal cell carcinoma in an at-risk individual from a family with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer: a case report. *BMC Cancer* 16: 232, 2016.
- 47 Buelow B, Cohen J, Nagymanyoki Z, Frizzell N, Joseph NM, McCalmont T and Garg K: Immunohistochemistry for 2-Succinocysteine (2SC) and Fumarate Hydratase (FH) in Cutaneous Leiomyomas May Aid in Identification of Patients With HLRCC (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome). *Am J Surg Pathol* 40, 2016.
- 48 Ulamec M, Skenderi F, Zhou M, Krušlin B, Martínek P, Grossmann P, Peckova K, Alvarado-Cabrero I, Kalusova K, Kokoskova B, Rotterova P, Hora M, Daum O, Dubova M, Bauleth K, Slouka D, Sperga M, Davidson W, Rychly B, Perez Montiel D, Michal M and Hes O: Molecular Genetic Alterations in Renal Cell Carcinomas With Tubulocystic Pattern: Tubulocystic Renal Cell Carcinoma, Tubulocystic Renal Cell Carcinoma With Heterogenous Component and Familial Leiomyomatosis-associated Renal Cell Carcinoma. *Clinicopathologic and Molecular Genetic Analysis of 15 Cases. Appl Immunohistochem Mol Morphol* 24, 2016.
- 49 Volpe A, Novara G, Antonelli A, Bertini R, Billia M, Carmignani G, Cunico SC, Longo N, Martignoni G, Minervini A, Mirone V, Simonato A, Terrone C, Zattoni F, Ficarra V and members of the Surveillance and Treatment Update on Renal Neoplasms (SATURN) Project – Leading Urological No-Profit Foundation for Advanced Research (LUNA) Foundation: Chromophobe renal cell carcinoma (RCC): oncological outcomes and prognostic factors in a large multicentre series. *BJU Int* 110: 76–83, 2012.
- 50 Amin MB, Paner GP, Alvarado-Cabrero I, Young AN, Stricker HJ, Lyles RH and Moch H: Chromophobe Renal Cell Carcinoma: Histomorphologic Characteristics and Evaluation of Conventional Pathologic Prognostic Parameters in 145 Cases. *Am J Surg Pathol* 32, 2008.
- 51 Kuroda N, Tanaka A, Yamaguchi T, Kasahara K, Naruse K, Yamada Y, Hatanaka K, Shinohara N, Nagashima Y, Mikami S, Oya M, Hamashima T, Michal M and Hes O: Chromophobe renal cell

- carcinoma, oncocytic variant: a proposal of a new variant giving a critical diagnostic pitfall in diagnosing renal oncocytic tumors. *Med Mol Morphol* 46: 49–55, 2013.
- 52 Sperga M, Martinek P, Vanecek T, Grossmann P, Bauleth K, Perez-Montiel D, Alvarado-Cabrero I, Nevidovska K, Lietuvielis V, Hora M, Michal M, Petersson F, Kuroda N, Suster S, Branzovsky J and Hes O: Chromophobe renal cell carcinoma—chromosomal aberration variability and its relation to Paner grading system: an array CGH and FISH analysis of 37 cases. *Virchows Arch* 463: 563–573, 2013.
- 53 Paner GP, Amin MB, Alvarado-Cabrero I, Young AN, Stricker HJ, Moch H and Lyles RH: A Novel Tumor Grading Scheme for Chromophobe Renal Cell Carcinoma: Prognostic Utility and Comparison With Fuhrman Nuclear Grade. *Am J Surg Pathol* 34, 2010.
- 54 Foix MP, Dunatov A, Martinek P, Mundó EC, Suster S, Sperga M, Lopez JI, Ulamec M, Bulimbasic S, Montiel DP, Alaghebandan R, Peckova K, Pivovarcikova K, Ondrej D, Rotterova P, Skenderi F, Prochazkova K, Dusek M, Hora M, Michal M and Hes O: Morphological, immunohistochemical, and chromosomal analysis of multicystic chromophobe renal cell carcinoma, an architecturally unusual challenging variant. *Virchows Arch* 469: 669–678, 2016.
- 55 Kuroda N, Furuya M, Nagashima Y, Gotohda H, Kawakami F, Moritani S, Ota S, Hora M, Michal M, Hes O and Nakatani Y: Review of renal tumors associated with Birt-Hogg-Dubé syndrome with focus on clinical and pathobiological aspects. *Pol J Pathol* 65: 93–99, 2014.
- 56 Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, Matrosova V, Glenn G, Turner ML, Duray P, Merino M, Choyke P, Pavlovich CP, Sharma N, Walther M, Munroe D, Hill R, Maher E, Greenberg C, Lerman MI, Linehan WM, Zbar B and Schmidt LS: Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Cancer Cell* 2: 157–164.
- 57 Baba M, Hong S-B, Sharma N, Warren MB, Nickerson ML, Iwamatsu A, Esposito D, Gillette WK, Hopkins RF, Hartley JL, Furihata M, Oishi S, Zhen W, Burke TR, Linehan WM, Schmidt LS and Zbar B: Folliculin encoded by the BHD gene interacts with a binding protein, FNIP1, and AMPK, and is involved in AMPK and mTOR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15552–15557, 2006.
- 58 Pavlovich CP, Walther MM, Eyler RA, Hewitt SM, Zbar B, Linehan WM and Merino MJ: Renal Tumors in the Birt-Hogg-Dubé Syndrome. *Am J Surg Pathol* 26, 2002.
- 59 Toro JR, Wei M-H, Glenn GM, Weinreich M, Toure O, Vocke C, Turner M, Choyke P, Merino MJ, Pinto PA, Steinberg SM, Schmidt LS and Linehan WM: BHD mutations, clinical and molecular genetic investigations of Birt-Hogg-Dubé syndrome: a new series of 50 families and a review of published reports. *J Med Genet* 45: 321–331, 2008.
- 60 Davis CJJ, Mostofi FK and Sesterhenn IA: Renal Medullary Carcinoma The Seventh Sickle Cell Nephropathy. *Am J Surg Pathol* 19, 1995.
- 61 Nouh MAAM, Kuroda N, Yamashita M, Hayashida Y, Yano T, Minakuchi J, Taniguchi S, Nomura I, Inui M, Sugimoto M and Kakehi Y: Renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease: relationship between histological type and duration of dialysis. *BJU Int* 105: 620–627, 2010.
- 62 Tickoo SK, dePeralta-Venturina MN, Harik LR, Worcester HD, Salama ME, Young AN, Moch H and Amin MB: Spectrum of Epithelial Neoplasms in End-Stage Renal Disease: An Experience From 66 Tumor-Bearing Kidneys With Emphasis on Histologic Patterns Distinct From Those in Sporadic Adult Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 30, 2006.
- 63 Zhang Y, Yong X, Wu Q, Wang X, Zhang Q, Wu S and Yu D: Mucinous tubular and spindle cell carcinoma and solid variant papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic comparative analysis of four cases with similar molecular genetics datum. *Diagn Pathol* 9: 194, 2014.
- 64 Hes O, Hora M, Perez-Montiel DM, Suster S, Curík R, Sokol L, Ondic O, Mikuláščík J, Betlach J, Peychl L, Hrabal P, Kodet R, Straka L, Ferák I, Vrabec V and Michal M: Spindle and cuboidal renal cell carcinoma, a tumour having frequent association with nephrolithiasis: report of 11 cases including a case with hybrid conventional renal cell carcinoma/ spindle and cuboidal renal cell carcinoma components. *Histopathology* 41: 549–555, 2002.
- 65 Gill AJ, Hes O, Papathomas T, Šedivcová M, Tan PH, Agaimy A, Andresen PA, Kedziara A, Clarkson A, Toon CW, Sioson L, Watson N, Chou A, Paik J, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Benn DE,

- Hills K, Maclean F, Niemeijer ND, Vlatkovic L, Hartmann A, Corssmit EPM, van Leenders GJLH, Przybycin C, McKenney JK, Magi-Galluzzi C, Yilmaz A, Yu D, Nicoll KD, Yong JL, Sibony M, Yakirevich E, Fleming S, Chow CW, Miettinen M, Michal M and Trpkov K: Succinate Dehydrogenase (SDH)-deficient Renal Carcinoma: A Morphologically Distinct Entity: A Clinicopathologic Series of 36 Tumors From 27 Patients. *Am J Surg Pathol* 38, 2014.
- 66 Kim E, Wright MJ, Sioson L, Novos T, Gill AJ, Benn DE, White C, Dwight T and Clifton-Bligh RJ: Utility of the succinate: Fumarate ratio for assessing SDH dysfunction in different tumor types(). *Mol Genet Metab Rep* 10: 45–49, 2017.
- 67 Smith SC, Trpkov K, Chen Y-B, Mehra R, Sirohi D, Ohe C, Cani AK, Hovelson DH, Omata K, McHugh JB, Jochum W, Colecchia M, Amin M, Divatia MK, Hes O, Menon S, Werneck da Cunha I, Tripodi S, Brimo F, Gill AJ, Osunkoya AO, Magi-Galluzzi C, Sibony M, Williamson SR, Nesi G, Picken MM, Maclean F, Agaimy A, Cheng L, Epstein JI, Reuter VE, Tickoo SK, Tomlins SA and Amin MB: Tubulocystic Carcinoma of the Kidney With Poorly Differentiated Foci: A Frequent Morphologic Pattern of Fumarate Hydratase-deficient Renal Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 40, 2016.
- 68 Steiner P, Hora M, Stehlik J, Martinek P, Vanecek T, Petersson F, Michal M, Korabecna M, Travnicek I and Hes O: Tubulocystic renal cell carcinoma: is there a rational reason for targeted therapy using angiogenic inhibition? Analysis of seven cases. *Virchows Arch* 462: 183–192, 2013.
- 69 Davis IJ, Kim JJ, Oszolak F, Widlund HR, Rozenblatt-Rosen O, Granter SR, Du J, Fletcher JA, Denny CT, Lessnick SL, Linehan WM, Kung AL and Fisher DE: Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: Defining the MiT family of human cancers. *Cancer Cell* 9: 473–484.
- 70 Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R and Kirkali Z: 2004 WHO Classification of the Renal Tumors of the Adults. *Eur Urol* 49: 798–805, 2006.
- 71 Hora M, Üрге T, Trávníček I, Ferda J, Chudáček Z, Vaněček T, Michal M, Petersson F, Kuroda N and Hes O: MiT translocation renal cell carcinomas: two subgroups of tumours with translocations involving 6p21 [t (6; 11)] and Xp11.2 [t (X;1 or X or 17)]. *SpringerPlus* 3: 245, 2014.
- 72 Klatte T, Streubel B, Wrba F, Remzi M, Krammer B, de Martino M, Waldert M, Marberger M, Susani M and Haitel A: Renal Cell Carcinoma Associated With Transcription Factor E3 Expression and Xp11.2 Translocation: Incidence, Characteristics, and Prognosis. *Am J Clin Pathol* 137: 761–768, 2015.
- 73 Komai Y, Fujiwara M, Fujii Y, Mukai H, Yonese J, Kawakami S, Yamamoto S, Migita T, Ishikawa Y, Kurata M, Nakamura T and Fukui I: Adult Xp11 Translocation Renal Cell Carcinoma Diagnosed by Cytogenetics and Immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 15: 1170, 2009.
- 74 Argani P, Olgac S, Tickoo SK, Goldfischer M, Moch H, Chan DY, Eble JN, Bonsib SM, Jimeno M, Lloreta J, Billis A, Hicks J, De Marzo AM, Reuter VE and Ladanyi M: Xp11 Translocation Renal Cell Carcinoma in Adults: Expanded Clinical, Pathologic, and Genetic Spectrum. *Am J Surg Pathol* 31, 2007.
- 75 Xu Y, Rao Q, Xia Q, Shi S, Shi Q, Ma H, Lu Z, Chen H and Zhou X: TMED6-COG8 is a novel molecular marker of TFE3 translocation renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 2690–2699, 2015.
- 76 Hora M, Hes O, Üрге T, Eret V, Klečka J and Michal M: A distinctive translocation carcinoma of the kidney [“rosette-like forming,” t(6;11), HMB45-positive renal tumor]. *Int Urol Nephrol* 41: 553–557, 2009.
- 77 Argani P, Laé M, Hutchinson B, Reuter VE, Collins MH, Perentesis J, Tomaszewski JE, Brooks JSJ, Acs G, Bridge JA, Vargas SO, Davis IJ, Fisher DE and Ladanyi M: Renal Carcinomas With the t(6;11)(p21;q12): Clinicopathologic Features and Demonstration of the Specific Alpha-TFEB Gene Fusion by Immunohistochemistry, RT-PCR, and DNA PCR. *Am J Surg Pathol* 29, 2005.
- 78 Argani P: MiT family translocation renal cell carcinoma. *Semin Diagn Pathol* 32: 103–113.
- 79 Linehan WM, Pinto PA, Bratslavsky G, Pfaffenroth E, Merino M, Vocke CD, Toro JR, Bottaro D, Neckers L, Schmidt LS and Srinivasan R: Hereditary kidney cancer. *Cancer* 115: 2252–2261, 2009.
- 80 Hasumi H, Baba M, Hasumi Y, Furuya M and Yao M: Birt–Hogg–Dubé syndrome: Clinical and molecular aspects of recently identified kidney cancer syndrome. *Int J Urol* 23: 204–210, 2016.

- 81 Vaupel P and Mayer A: Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev* 26: 225–239, 2007.
- 82 Banumathy G and Cairns P: Signaling pathways in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther* 10: 658–664, 2010.
- 83 Pópulo H, Lopes JM and Soares P: The mTOR Signalling Pathway in Human Cancer. *Int J Mol Sci* 13: 1886–1918, 2012.
- 84 Armengol G, Rojo F, Castellví J, Iglesias C, Cuatrecasas M, Pons B, Baselga J and Ramón y Cajal S: 4E-Binding Protein 1: A Key Molecular “Funnel Factor” in Human Cancer with Clinical Implications. *Cancer Res* 67: 7551, 2007.
- 85 Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D, Valtorta E, Schiavo R, Buscarino M, Siravegna G, Bencardino K, Cercek A, Chen C-T, Veronese S, Zanon C, Sartore-Bianchi A, Gambacorta M, Gallicchio M, Vakiani E, Boscaro V, Medico E, Weiser M, Siena S, Di Nicolantonio F, Solit D and Bardelli A: Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 486: 532–536, 2012.
- 86 Gollob JA, Wilhelm S, Carter C and Kelley SL: Role of Raf Kinase in Cancer: Therapeutic Potential of Targeting the Raf/MEK/ERK Signal Transduction Pathway. *Semin Oncol* 33: 392–406.
- 87 Adnane L, Trail PA, Taylor I and Wilhelm SM: Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar®), a Dual-Action Inhibitor That Targets RAF/MEK/ERK Pathway in Tumor Cells and Tyrosine Kinases VEGFR/PDGFR in Tumor Vasculature. *In: Methods in Enzymology*. Academic Press, pp 597–612, 2006.
- 88 Reeves DJ and Liu CY: Treatment of metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 64, 2009.
- 89 Shang D, Yang P, Liu Y, Song J, Zhang F and Tian Y: Interferon- α Induces G1 Cell-Cycle Arrest in Renal Cell Carcinoma Cells Via Activation of Jak-Stat Signaling. *Cancer Invest* 29: 347–352, 2011.
- 90 Shang D, Liu Y, Ito N, Kamoto T and Ogawa O: Defective Jak–Stat activation in renal cell carcinoma is associated with interferon- α resistance. *Cancer Sci* 98: 1259–1264, 2007.
- 91 Bhagat TD, Zou Y, Huang S, Park J, Palmer MB, Hu C, Li W, Shenoy N, Giricz O, Choudhary G, Yu Y, Ko Y-A, Izquierdo MC, Park ASD, Vallumsetla N, Laurence R, Lopez R, Suzuki M, Pullman J, Kaner J, Gartrell B, Hakimi AA, Greally JM, Patel B, Benhadji K, Pradhan K, Verma A and Susztak K: Notch Pathway Is Activated via Genetic and Epigenetic Alterations and Is a Therapeutic Target in Clear Cell Renal Cancer. *J Biol Chem* 292: 837–846, 2017.
- 92 Naito S, Yokomizo A and Koga H: Mechanisms of drug resistance in chemotherapy for urogenital carcinoma. *Int J Urol* 6: 427–439, 1999.
- 93 Naito S, Sakamoto N, Kotoh S, Goto K, Matsumoto T and Kumazawa J: Expression of P-glycoprotein and multidrug resistance in renal cell carcinoma. *Eur Urol* 24, 1993.
- 94 Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Berg W, Amsterdam A and Ferrara J: Survival and Prognostic Stratification of 670 Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 17: 2530–2530, 1999.
- 95 Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, Russo P and Mazumdar M: Interferon-Alfa as a Comparative Treatment for Clinical Trials of New Therapies Against Advanced Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 20: 289–296, 2002.
- 96 Leibovich BC, Han K, Bui MHT, Pantuck AJ, Dorey FJ, Figlin RA and Belldegrun A: Scoring algorithm to predict survival after nephrectomy and immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 98: 2566–2575, 2003.
- 97 Sun M, Shariat SF, Cheng C, Ficarra V, Murai M, Oudard S, Pantuck AJ, Zigeuner R and Karakiewicz PI: Prognostic Factors and Predictive Models in Renal Cell Carcinoma: A Contemporary Review. *Eur Urol* 60: 644–661, 2011.
- 98 Atzpodiën J, Kirchner H, Jonas U, Bergmann L, Schott H, Heynemann H, Fornara P, Loening SA, Roigas J, Müller SC, Bodenstern H, Pomer S, Metzner B, Rebmann U, Oberneder R, Siebels M, Wandert T, Puchberger T and Reitz M: Interleukin-2- and Interferon Alfa-2a-Based Immunochemotherapy in Advanced Renal Cell Carcinoma: A Prospectively Randomized Trial of the

- German Cooperative Renal Carcinoma Chemoimmunotherapy Group (DGCIN). *J Clin Oncol* 22: 1188–1194, 2004.
- 99 Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L, Merseburger AS, Mulders P, Powles T, Staehler M, Volpe A and Bex A: EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update. *Eur Urol*.
- 100 Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, Russo P, Berg WJ and Metz EM: Effect of Cytokine Therapy on Survival for Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 18: 1928–1935, 2000.
- 101 Heng DYC, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, Eigl BJ, Ruether JD, Cheng T, North S, Venner P, Knox JJ, Chi KN, Kollmannsberger C, McDermott DF, Oh WK, Atkins MB, Bukowski RM, Rini BI and Choueiri TK: Prognostic Factors for Overall Survival in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With Vascular Endothelial Growth Factor–Targeted Agents: Results From a Large, Multicenter Study. *J Clin Oncol* 27: 5794–5799, 2009.
- 102 Heng DYC, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, Mackenzie M, Wood L, Donskov F, Tan M-H, Rha S-Y, Agarwal N, Kollmannsberger C, Rini BI and Choueiri TK: External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *Lancet Oncol* 14: 141–148, 2013.
- 103 Modrá kniha České onkologické společnosti. Brno, Masarykův onkologický ústav, 2016.
- 104 Coppin C, Porzsolt F, Autenrieth M, Kumpf J, Coldman A and Wilt T: Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004.
- 105 IntronA 3MIU/0,5ml. Souhrn údajů o přípravku.
- 106 Cella D, Li JZ, Cappelleri JC, Bushmakina A, Charbonneau C, Kim ST, Chen I and Motzer RJ: Quality of Life in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With Sunitinib or Interferon Alfa: Results From a Phase III Randomized Trial. *J Clin Oncol* 26: 3763–3769, 2008.
- 107 Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay J-O, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A and Moore N: Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *The Lancet* 370: 2103–2111.
- 108 Molina AM and Motzer RJ: Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: Today and Tomorrow. *The Oncologist* 16: 45–50, 2011.
- 109 Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM and Figlin RA: Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 356: 115–124, 2007.
- 110 Porta C, Gore ME, Rini BI, Escudier B, Hariharan S, Charles LP, Yang L, DeAnnuntis L and Motzer RJ: Long-term Safety of Sunitinib in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*.
- 111 Fishman MN, Tomshine J, Fulp WJ and Foreman PK: A Systematic Review of the Efficacy and Safety Experience Reported for Sorafenib in Advanced Renal Cell Carcinoma (RCC) in the Post-Approval Setting. *PLoS ONE* 10: e0120877, 2015.
- 112 Sutent 50mg. Souhrn údajů o přípravku.
- 113 Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R and Bukowski RM: Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 356: 125–134, 2007.
- 114 Hutson TE, Escudier B, Esteban E, Bjarnason GA, Lim HY, Pittman KB, Senico P, Niethammer A, Lu DR, Hariharan S and Motzer RJ: Randomized Phase III Trial of Temsirolimus Versus Sorafenib As Second-Line Therapy After Sunitinib in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 32: 760–767, 2014.
- 115 Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, Ginsberg MS, Kim ST, Baum CM, DePrimo SE, Li JZ, Bello CL, Theuer CP, George DJ and Rini BI: Activity of SU11248, a Multitargeted Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Platelet-Derived Growth Factor Receptor, in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 24: 16–24, 2006.

- 116 Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Pili R, Bjarnason GA, Garcia-del-Muro X, Sosman JA, Solska E, Wilding G, Thompson JA, Kim ST, Chen I, Huang X and Figlin RA: Overall Survival and Updated Results for Sunitinib Compared With Interferon Alfa in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 27: 3584–3590, 2009.
- 117 Sternberg CN, Hawkins RE, Wagstaff J, Salman P, Mardiak J, Barrios CH, Zarba JJ, Gladkov OA, Lee E, Szczylik C, McCann L, Rubin SD, Chen M and Davis ID: A randomised, double-blind phase III study of pazopanib in patients with advanced and/or metastatic renal cell carcinoma: Final overall survival results and safety update. *Eur J Cancer* 49: 1287–1296.
- 118 Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, Reeves J, Hawkins R, Guo J, Nathan P, Staehler M, de Souza P, Merchan JR, Boleti E, Fife K, Jin J, Jones R, Uemura H, De Giorgi U, Harmenberg U, Wang J, Sternberg CN, Deen K, McCann L, Hackshaw MD, Crescenzo R, Pandite LN and Choueiri TK: Pazopanib versus Sunitinib in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 369: 722–731, 2013.
- 119 Escudier B, Porta C, Bono P, Powles T, Eisen T, Sternberg CN, Gschwend JE, De Giorgi U, Parikh O, Hawkins R, Sevin E, Négrier S, Khan S, Diaz J, Redhu S, Mehmud F and Cella D: Randomized, Controlled, Double-Blind, Cross-Over Trial Assessing Treatment Preference for Pazopanib Versus Sunitinib in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma: PISCES Study. *J Clin Oncol* 32: 1412–1418, 2014.
- 120 Rini BI, Escudier B, Tomczak P, Kaprin A, Szczylik C, Hutson TE, Michaelson MD, Gorbunova VA, Gore ME, Rusakov IG, Negrier S, Ou Y-C, Castellano D, Lim HY, Uemura H, Tarazi J, Cella D, Chen C, Rosbrook B, Kim S and Motzer RJ: Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *The Lancet* 378: 1931–1939.
- 121 Motzer RJ, Hutson TE, Glen H, Michaelson MD, Molina A, Eisen T, Jassem J, Zolnierek J, Maroto JP, Mellado B, Melichar B, Tomasek J, Kremer A, Kim H-J, Wood K, Dutcus C and Larkin J: Lenvatinib, everolimus, and the combination in patients with metastatic renal cell carcinoma: a randomised, phase 2, open-label, multicentre trial. *Lancet Oncol* 16: 1473–1482.
- 122 Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, Grünwald V, Thompson JA, Figlin RA, Hollaender N, Kay A, Ravaud A and Group for the R-1 S: Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 116: 4256–4265, 2010.
- 123 Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IGH, Barbarash O, Gokmen E, O’Toole T, Lustgarten S, Moore L and Motzer RJ: Temsirolimus, Interferon Alfa, or Both for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 356: 2271–2281, 2007.
- 124 Sunshine J and Taube JM: PD-1/PD-L1 inhibitors. *Cancer • Immunomodulation* 23: 32–38, 2015.
- 125 Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, Sosman JA, Procopio G, Plimack ER, Castellano D, Choueiri TK, Gurney H, Donskov F, Bono P, Wagstaff J, Gauler TC, Ueda T, Tomita Y, Schutz FA, Kollmannsberger C, Larkin J, Ravaud A, Simon JS, Xu L-A, Waxman IM and Sharma P: Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*, 2015.
- 126 Hodi FS, Hwu W-J, Kefford R, Weber JS, Daud A, Hamid O, Patnaik A, Ribas A, Robert C, Gangadhar TC, Joshua AM, Hersey P, Dronca R, Joseph R, Hille D, Xue D, Li XN, Kang SP, Ebbinghaus S, Perrone A and Wolchok JD: Evaluation of Immune-Related Response Criteria and RECIST v1.1 in Patients With Advanced Melanoma Treated With Pembrolizumab. *J Clin Oncol* 34: 1510–1517, 2016.
- 127 Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM and Sznol M: Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N Engl J Med* 366: 2443–2454, 2012.
- 128 Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, Vaishampayan UN, Drabkin HA, George S, Logan TF, Margolin KA, Plimack ER, Lambert AM, Waxman IM and Hammers

- HJ: Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *J Clin Oncol*, 2014.
- 129 Powles T, Staehler M, Ljungberg B, Bensalah K, Canfield SE, Dabestani S, Giles R, Hofmann F, Hora M, Kuczyk MA, Lam T, Marconi L, Merseburger AS, Volpe A and Bex A: Updated EAU Guidelines for Clear Cell Renal Cancer Patients Who Fail VEGF Targeted Therapy. *Eur Urol* 69: 4–6, 2016.
- 130 Motzer RJ, Bukowski RM, Figlin RA, Hutson TE, Michaelson MD, Kim ST, Baum CM and Kattan MW: Prognostic nomogram for sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 113: 1552–1558, 2008.
- 131 Karakiewicz PI, Sun M, Bellmunt J, Sneller V and Escudier B: Prediction of Progression-Free Survival Rates After Bevacizumab Plus Interferon Versus Interferon Alone in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Comparison of a Nomogram to the Motzer Criteria. *Eur Urol* 60: 48–56, 2011.
- 132 Gontero P, Sun M, Antonelli A, Bertini R, Carini M, Carmignani G, Longo N, Martorana G, Minervini A, Mirone V, Morgia G, Novara G, Oderda M, Simeone C, Simonato A, Siracusano S, Tizzani A, Volpe A, Karakiewicz P and Ficarra V: External validation of the preoperative Karakiewicz nomogram in a large multicentre series of patients with renal cell carcinoma. *World J Urol* 31: 1285–1290, 2013.
- 133 Yao M, Yoshida M, Kishida T, Nakaigawa N, Baba M, Kobayashi K, Miura T, Moriyama M, Nagashima Y, Nakatani Y, Kubota Y and Kondo K: VHL Tumor Suppressor Gene Alterations Associated With Good Prognosis in Sporadic Clear-Cell Renal Carcinoma. *JNCI J Natl Cancer Inst* 94: 1569–1575, 2002.
- 134 Patard J-J, Fergelot P, Karakiewicz PI, Klatte T, Trinh Q-D, Rioux-Leclercq N, Said JW, Belldegrun AS and Pantuck AJ: Low CAIX expression and absence of VHL gene mutation are associated with tumor aggressiveness and poor survival of clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer* 123: 395–400, 2008.
- 135 Schraml P, Struckmann K, Hatz F, Sonnet S, Kully C, Gasser T, Sauter G, Mihatsch MJ and Moch H: VHL mutations and their correlation with tumour cell proliferation, microvessel density, and patient prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *J Pathol* 196: 186–193, 2002.
- 136 Rini BI, Jaeger E, Weinberg V, Sein N, Chew K, Fong K, Simko J, Small EJ and Waldman FM: Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and Von Hippel-Lindau gene status. *BJU Int* 98: 756–762, 2006.
- 137 Patard J-J, Rioux-Leclercq N, Masson D, Zerrouki S, Jouan F, Collet N, Dubourg C, Lobel B, Denis M and Fergelot P: Absence of VHL gene alteration and high VEGF expression are associated with tumour aggressiveness and poor survival of renal-cell carcinoma. *Br J Cancer* 101: 1417–1424, 2009.
- 138 Ke Q and Costa M: Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol* 70: 1469, 2006.
- 139 Eisengart LJ, MacVicar GR and Yang XJ: Predictors of Response to Targeted Therapy in Renal Cell Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 136: 490–495, 2012.
- 140 Wiesener MS, Münchenhagen PM, Berger I, Morgan NV, Roigas J, Schwiertz A, Jürgensen JS, Gruber G, Maxwell PH, Löning SA, Frei U, Maher ER, Gröne H-J and Eckardt K-U: Constitutive Activation of Hypoxia-inducible Genes Related to Overexpression of Hypoxia-inducible Factor-1 α in Clear Cell Renal Carcinomas. *Cancer Res* 61: 5215, 2001.
- 141 Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Vasko J and Ljungberg B: The Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Is a Favorable Independent Prognostic Factor in Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 1129–1135, 2005.
- 142 Lidgren A, Hedberg Y, Grankvist K, Rasmuson T, Bergh A and Ljungberg B: Hypoxia-Inducible Factor 1 α Expression in Renal Cell Carcinoma Analyzed by Tissue Microarray. *Eur Urol Goes Platin* 50: 1272–1277, 2006.

- 143 Klatte T, Seligson DB, Riggs SB, Leppert JT, Berkman MK, Kleid MD, Yu H, Kabbinavar FF, Pantuck AJ and Belldegrun AS: Hypoxia-Inducible Factor 1 α in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 7388, 2007.
- 144 Patel SA and Simon MC: Biology of Hypoxia-Inducible Factor-2 α in Development and Disease. *Cell Death Differ* 15: 628–634, 2008.
- 145 Choueiri TK, Fay AP, Gagnon R, Lin Y, Bahamon B, Brown V, Rosenberg JE, Hutson TE, Baker-Neblett KL, Carpenter C, Liu Y, Pandite L and Signoretti S: The role of aberrant VHL/HIF pathway elements in predicting clinical outcome to pazopanib therapy in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19: 5218–5226, 2013.
- 146 Toschi A, Lee E, Gadir N, Ohh M and Foster DA: Differential Dependence of Hypoxia-inducible Factors 1 α and 2 α on mTORC1 and mTORC2. *J Biol Chem* 283: 34495–34499, 2008.
- 147 Gordan JD, Lal P, Dondeti VR, Letrero R, Parekh KN, Oquendo CE, Greenberg RA, Flaherty KT, Rathmell WK, Keith B, Simon MC and Nathanson KL: HIF- α effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell* 14: 435–446, 2008.
- 148 NA XI, WU G, RYAN CK, SCHOEN SR, di' SANTAGNESE PA and MESSING EM: Overproduction of Vascular Endothelial Growth Factor Related to von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Mutations and Hypoxia-Inducible Factor-1 α Expression in Renal Cell Carcinomas. Part 1 2 170: 588–592, 2003.
- 149 Paradis V, Ben Lagha N, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, Benoît G, Jardin A and Bedossa P: Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch* 436: 351–356, 2000.
- 150 Rioux-Leclercq N, Fergelot P, Zerrouki S, Leray E, Jouan F, Bellaud P, Epstein JI and Patard J-J: Plasma level and tissue expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma: a prospective study of 50 cases. *Hum Pathol* 38: 1489–1495.
- 151 Phuoc NB, Ehara H, Gotoh T, Nakano M, Kamei S, Deguchi T and Hirose Y: Prognostic value of the co-expression of carbonic anhydrase IX and vascular endothelial growth factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 20: 525–530, 2008.
- 152 Liang Y-X, He H-C, Han Z, Bi X-C, Dai Q-S, Ye Y-K, Qin W-J, Zeng G-H, ZHU G, XU C-L and Zhong W: CD147 and VEGF Expression in Advanced Renal Cell Carcinoma and Their Prognostic Value. *Cancer Invest* 27: 788–793, 2009.
- 153 Osman WM and Youssef NS: Combined use of COX-1 and VEGF immunohistochemistry refines the histopathologic prognosis of renal cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 8165–8177, 2015.
- 154 Scartozzi M, Bianconi M, Faloppi L, Loretelli C, Bittoni A, Del Prete M, Giampieri R, Maccaroni E, Nicoletti S, Burattini L, Minardi D, Muzzonigro G, Montironi R and Cascinu S: VEGF and VEGFR polymorphisms affect clinical outcome in advanced renal cell carcinoma patients receiving first-line sunitinib. *Br J Cancer* 108: 1126–1132, 2013.
- 155 Bianconi M, Scartozzi M, Faloppi L, Giampieri R, Maccaroni E, Bittoni A, Del Prete M, Loretelli C, Belvederesi L, Conti A, Minardi D, Burattini L, Montironi R and Cascinu S: The role of tumor vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) polymorphisms in the prediction of clinical outcome for patients with advanced renal cell carcinoma receiving first-line sunitinib. *J Clin Oncol* 30: 380–380, 2012.
- 156 Garcia-Donas J, Esteban E, Leandro-García LJ, Castellano DE, del Alba AG, Climent MA, Arranz JA, Gallardo E, Puente J, Bellmunt J, Mellado B, Martínez E, Moreno F, Font A, Robledo M and Rodríguez-Antona C: Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study. *Lancet Oncol* 12: 1143–1150.
- 157 You D, Song SH, Cho YM, Lee J-L, Jeong IG, Song C, Hong JH, Kim C-S and Ahn H: Predictive role of tissue-based molecular markers in patients treated with sunitinib for metastatic renal cell carcinoma. *World J Urol* 33: 111–118, 2015.

- 158 Måseide K, Kandel RA, Bell RS, Catton CN, O'Sullivan B, Wunder JS, Pintilie M, Hedley D and Hill RP: Carbonic Anhydrase IX as a Marker for Poor Prognosis in Soft Tissue Sarcoma. *Clin Cancer Res* 10: 4464–4471, 2004.
- 159 Driessen A, Landuyt W, Pastorekova S, Moons J, Goethals L, Haustermans K, Naftoux P, Penninckx F, Geboes K, Lerut T and Ectors N: Expression of Carbonic Anhydrase IX (CA IX), a Hypoxia-Related Protein, Rather Than Vascular-Endothelial Growth Factor (VEGF), a Pro-Angiogenic Factor, Correlates With an Extremely Poor Prognosis in Esophageal and Gastric Adenocarcinomas. *Ann Surg* 243: 334–340, 2006.
- 160 Bui MHT, Seligson D, Han K, Pantuck AJ, Dorey FJ, Huang Y, Horvath S, Leibovich BC, Chopra S, Liao S-Y, Stanbridge E, Lerman MI, Palotie A, Figlin RA and Belldegrun AS: Carbonic Anhydrase IX Is an Independent Predictor of Survival in Advanced Renal Clear Cell Carcinoma: Implications for Prognosis and Therapy. *Clin Cancer Res* 9: 802–811, 2003.
- 161 Choueiri TK, Regan MM, Rosenberg JE, Oh WK, Clement J, Amato AM, McDermott D, Cho DC, Atkins MB and Signoretti S: Carbonic anhydrase IX and pathological features as predictors of outcome in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma receiving vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *BJU Int* 106: 772–778, 2010.
- 162 Chaux A, Schultz L, Albadine R, Hicks J, Kim JJ, Allaf ME, Carducci MA, Rodriguez R, Hammers H-J, Argani P, Reuter VE and Netto GJ: Immunoexpression status and prognostic value of mammalian target of rapamycin and hypoxia-induced pathway members in papillary cell renal cell carcinomas(). *Hum Pathol* 43: 2129–2137, 2012.
- 163 Schultz L, Chaux A, Albadine R, Hicks J, Kim JJ, De Marzo AM, Allaf ME, Carducci MA, Rodriguez R, Hammers H-J, Argani P, Reuter VE and Netto GJ: Immunoexpression Status and Prognostic Value of mTOR and Hypoxia-induced Pathway Members in Primary and Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Am J Surg Pathol* 35: 1549–1556, 2011.
- 164 Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, O'Toole T, Gibbons J, Belldegrun AS and Figlin RA: Prognostic relevance of the mTOR pathway in renal cell carcinoma. *Cancer* 109: 2257–2267, 2007.
- 165 Cho D, Signoretti S, Dabora S, Regan M, Seeley A, Mariotti M, Youmans A, Polivy A, Mandato L, McDermott D, Stanbridge E and Atkins M: Potential Histologic and Molecular Predictors of Response to Temsirolimus in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 5: 379–385.
- 166 Abou Youssif TM, Tanguay S, Alam-Fahmy M, Koumakpayi IH and Sircar K: EXPRESSION OF PI3K/AKT/mTOR PATHWAY IN RENAL CELL CARCINOMA METASTASES: CORRELATION WITH PATHOLOGIC FINDINGS AND SURVIVAL. *J Urol* 179: 210.
- 167 Velickovic M, Delahunt B, McIver B and Grebe SKG: Intragenic PTEN/MMAC1 Loss of Heterozygosity in Conventional (Clear-Cell) Renal Cell Carcinoma is Associated with Poor Patient Prognosis. *Mod Pathol* 15: 479–485.
- 168 Merseburger AS, Hennenlotter J, Kuehs U, Simon P, Kruck S, Koch E, Stenzl A and Kuczyk MA: Activation of PI3K Is Associated with Reduced Survival in Renal Cell Carcinoma. *Urol Int* 80: 372–377, 2008.
- 169 Figlin RA, de Souza P, McDermott D, Dutcher JP, Berkenblit A, Thiele A, Krygowski M, Strahs A, Feingold J, Boni J and Hudes G: Analysis of PTEN and HIF-1 α and correlation with efficacy in patients with advanced renal cell carcinoma treated with temsirolimus versus interferon- α . *Cancer* 115: 3651–3660, 2009.
- 170 Paule B, Bastien L, Deslandes E, Cussenot O, Podgorniak M-P, Allory Y, Naïmi B, Porcher R, de La Taille A, Menashi S, Calvo F and Mourah S: Soluble Isoforms of Vascular Endothelial Growth Factor Are Predictors of Response to Sunitinib in Metastatic Renal Cell Carcinomas. *PLoS ONE* 5: e10715, 2010.
- 171 Niers TMH, Richel DJ, Meijers JCM and Schlingemann RO: Vascular Endothelial Growth Factor in the Circulation in Cancer Patients May Not Be a Relevant Biomarker. *PLoS ONE* 6: e19873, 2011.

- 172 Závada J, Zavadová Z, Zat'ovičová M, Hyršl L and Kawaciuk I: Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer* 89: 1067–1071, 2003.
- 173 Zhou GX, Ireland J, Rayman P, Finke J and Zhou M: Quantification of Carbonic Anhydrase IX Expression in Serum and Tissue of Renal Cell Carcinoma Patients Using Enzyme-linked Immunosorbent Assay: Prognostic and Diagnostic Potentials. *Urology* 75: 257–261.
- 174 Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C and Tostain J: Serum Carbonic Anhydrase 9 Level is Associated With Postoperative Recurrence of Conventional Renal Cell Cancer. *J Urol* 180: 510–514.
- 175 Porta C, Paglino C, De Amici M, Quaglini S, Sacchi L, Imarisio I and Canipari C: Predictive value of baseline serum vascular endothelial growth factor and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in advanced kidney cancer patients receiving sunitinib. *Kidney Int* 77: 809–815.
- 176 Barresi V, Ieni A, Bolignano D, Magno C, Buemi M and Barresi G: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin immunoexpression in renal tumors: Correlation with histotype and histological grade. *Oncol Rep* 24: 305–310, 2010.
- 177 Steffens S, Köhler A, Rudolph R, Eggers H, Seidel C, Janssen M, Wegener G, Schrader M, Kuczyk MA and Schrader AJ: Validation of CRP as prognostic marker for renal cell carcinoma in a large series of patients. *BMC Cancer* 12: 399–399, 2012.
- 178 Choueiri TK, Garcia JA, Elson P, Khasawneh M, Usman S, Golshayan AR, Baz RC, Wood L, Rini BI and Bukowski RM: Clinical factors associated with outcome in patients with metastatic clear-cell renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Cancer* 110: 543–550, 2007.
- 179 Brookman-May S, May M, Ficarra V, Kainz MC, Kampel-Kettner K, Kohlschreiber S, Wenzl V, Schneider M, Burger M, Wieland WF, Otto W, Tilki D, Gilfrich C, Hohenfellner M, Pahernik S, Chromecki TF, Stief C and Zigeuner R: Does preoperative platelet count and thrombocytosis play a prognostic role in patients undergoing nephrectomy for renal cell carcinoma? Results of a comprehensive retrospective series. *World J Urol* 31: 1309–1316, 2013.
- 180 Mancuso P, Burlini A, Pruneri G, Goldhirsch A, Martinelli G and Bertolini F: Resting and activated endothelial cells are increased in the peripheral blood of cancer patients. *Blood* 97: 3658, 2001.
- 181 Ronzoni M, Manzoni M, Mariucci S, Loupakis F, Brugnattelli S, Bencardino K, Rovati B, Tinelli C, Falcone A, Villa E and Danova M: Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as predictive markers of clinical response to bevacizumab-based first-line treatment in advanced colorectal cancer patients. *Ann Oncol* 21: 2382–2389, 2010.
- 182 Gruenwald V, Beutel G, Schuch-Jantsch S, Reuter C, Ivanyi P, Ganser A and Haubitz M: Circulating endothelial cells are an early predictor in renal cell carcinoma for tumor response to sunitinib. *BMC Cancer* 10: 695–695, 2010.
- 183 Farace F, Gross-Goupil M, Tournay E, Taylor M, Vimond N, Jacques N, Billiot F, Mauguén A, Hill C and Escudier B: Levels of circulating CD45(dim)CD34(+)VEGFR2(+) progenitor cells correlate with outcome in metastatic renal cell carcinoma patients treated with tyrosine kinase inhibitors. *Br J Cancer* 104: 1144–1150, 2011.
- 184 Farace F, Massard C, Borghi E, Bidart J-M and Soria J-C: Vascular disrupting therapy-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells. *Ann Oncol* 18: 1421–1422, 2007.
- 185 Prior C, Perez-Gracia JL, Garcia-Donas J, Rodriguez-Antona C, Gुरुceaga E, Esteban E, Suarez C, Castellano D, del Alba AG, Lozano MD, Carles J, Climent MA, Arranz JA, Gallardo E, Puente J, Bellmunt J, Gurrpide A, Lopez-Picazo JM, Hernandez AG, Mellado B, Martínez E, Moreno F, Font A and Calvo A: Identification of Tissue microRNAs Predictive of Sunitinib Activity in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE* 9: e86263, 2014.
- 186 Lukamowicz-Rajska M, Mittmann C, Prummer M, Zhong Q, Bedke J, Hennenlotter J, Stenzl A, Mischo A, Bihl S, Schmidinger M, Vogl U, Blume I, Karlo C, Schraml P and Moch H: MiR-99b-5p expression and response to tyrosine kinase inhibitor treatment in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget* Vol 7 No 48, 2016.

- 187 Khella HWZ, Butz H, Ding Q, Rotondo F, Evans KR, Kupchak P, Dharsee M, Latif A, Pasic MD, Lianidou E, Bjarnason GA and Yousef GM: miR-221/222 Are Involved in Response to Sunitinib Treatment in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Mol Ther* 23: 1748–1758, 2015.
- 188 Kaya K, Ayan S, Gokce G, Kilicarslan H, Yildiz E and Gultekin EY: Urinary nuclear matrix protein 22 for diagnosis of renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 39: 25–29, 2005.
- 189 Morrissey JJ, London AN, Luo J and Kharasch ED: Urinary Biomarkers for the Early Diagnosis of Kidney Cancer. *Mayo Clin Proc* 85: 413–421, 2010.
- 190 Rini BI, Cohen DP, Lu DR, Chen I, Hariharan S, Gore ME, Figlin RA, Baum MS and Motzer RJ: Hypertension as a Biomarker of Efficacy in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated With Sunitinib. *JNCI J Natl Cancer Inst* 103: 763–773, 2011.
- 191 Nakaigawa N, Kondo K, Tateishi U, Minamimoto R, Kaneta T, Namura K, Ueno D, Kobayashi K, Kishida T, Ikeda I, Hasumi H, Makiyama K, Kubota Y, Inoue T and Yao M: FDG PET/CT as a prognostic biomarker in the era of molecular-targeting therapies: max SUVmax predicts survival of patients with advanced renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 16: 67, 2016.
- 192 Ueno D, Yao M, Tateishi U, Minamimoto R, Makiyama K, Hayashi N, Sano F, Murakami T, Kishida T, Miura T, Kobayashi K, Noguchi S, Ikeda I, Ohgo Y, Inoue T, Kubota Y and Nakaigawa N: Early assessment by FDG-PET/CT of patients with advanced renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors is predictive of disease course. *BMC Cancer* 12: 162–162, 2012.
- 193 Horn KP, Yap JT, Agarwal N, Morton KA, Kadmas DJ, Beardmore B, Butterfield RI, Boucher K and Hoffman JM: FDG and FLT-PET for Early measurement of response to 37.5 mg daily sunitinib therapy in metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Imaging* 15: 15, 2015.
- 194 Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D and Verweij J: New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45: 228–247.

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. Milanu Horovi za vedení při přípravě projektu a disertační práce. Děkuji také své rodině za svatou trpělivost.

Ivan Trávníček

Tato práce byla podpořena projektem NT 12010-5/ 2011 a MZ ČR RVO (Fakultní nemocnice Plzeň – FNPI, 00669806)