

**MASARYKOVA UNIVERZITA**

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

**Moderní trendy v diagnostice a terapii  
metastatického renálního karcinomu**

**HABILITAČNÍ PRÁCE**  
komentovaný soubor prací

Poděkování:

Moc děkuji své manželce Ivaně a celé rodině za podporu a trpělivost, které mně poskytovali během této práce.

Děkuji dále mnoha svým kolegům za odborné a cenné rady, spolupráci, bez kterých by se tato práce neobešla. Velké díky patří především jmenovitě doc. RNDr. Ondřejovi Slabému, Ph. D., doc. MUDr. Markovi Svobodovi, Ph. D., MUDr. Tomášovi Kazdovi, Ph. D., MUDr. Radkovi Lakomému, Ph.D., prof. MUDr. Rostislavovi Vyzulovi, Csc., a Mgr. Janě Lounové.

## Obsah

Abstrakt.....	5-7
1 Úvod.....	8
2 Epidemiologie metastatického renálního karcinomu .....	8-9
2.1 Vlastní příspěvek k problematice.....	10-11
3 Etiologie renálního karcinomu.....	11
3.1 Zevní rizikové faktory.....	11-12
3.2 Vnitřní rizikové faktory.....	12
4 Patogeneze renálního karcinomu.....	12
4.1 Syndromy spojené s renálním karcinomem.....	12-14
4.2 Sporadický renální karcinom.....	14
4.2.1 Poruchy genu <i>VHL</i> a jejich důsledky.....	14-16
4.2.2 Metastazování renálního karcinomu.....	16-17
4.2.3 Epigenetické ovlivnění exprese genů spojených se vznikem a progresí renálního karcinomu.....	17-19
4.2.4 Selhání imunitního dozoru.....	19-20
4.3 Vlastní příspěvek k problematice.....	20-21
5 Diagnostika renálního karcinomu, monitoring metastatického onemocnění.....	21
5.1 Klinické příznaky a laboratorní odběry.....	21
5.2 Zobrazovací metody.....	21-22
5.3 Histopatologická diagnostika a staging.....	22
5.3.1 Histopatologické podtypy.....	22-23
5.3.2 TNM klasifikace.....	23-24
5.4 Moderní trendy v laboratorní diagnostice.....	24-25

5.4.1	Vyšetření periferní krve (sérové biomarkery).....	25-26
5.4.2	Vyšetření moče (močové biomarkery).....	26-27
5.5	Monitorace metastatického renálního karcinomu.....	27
5.6	Vlastní příspěvek k problematice.....	27-28
6	Stanovení prognózy metastatického renálního karcinomu.....	28
6.1	Prognostické faktory a modely.....	28-30
6.2	Moderní trendy ve stanovení prognózy.....	30
6.2.1	Tkáňové biomarkery.....	30
6.2.2	Sérové biomarkery.....	31
6.2.3	Močové biomarkery.....	32
6.3	Vlastní příspěvek k problematice.....	32-33
7	Terapeutické možnosti metastatického renálního karcinomu.....	34
7.1	Současná léčba metastatického renálního karcinomu.....	34-35
7.1.1	Tyrozinkinázové inhibitory.....	35
7.1.2	mTOR inhibitory.....	36
7.1.3	Imunoterapie.....	36-37
7.1.4	Moderní trendy v léčbě.....	37-38
7.1.5	Predikce léčebné odpovědi.....	38-39
7.2	Vlastní příspěvek k problematice.....	39
7.2.1	Klinické studie a reálná praxe.....	39-48
7.2.2	Predikce léčebné odpovědi.....	48-49
8	Závěr.....	49
9	Citace.....	49-63
10	Seznam zkratk.....	63-65
11	Seznam příloh.....	65-67

**Abstrakt:**

V současné době jsme svědky značného pokroku v diagnostice i léčbě metastatického renálního karcinomu, nicméně toto onemocnění zůstává nadále nevléčitelné. V diagnostice se čím dál více uplatňují metody tzv. tekuté biopsie, kde se zkoumají markery tohoto onemocnění v periferní krvi či moči. Pokroky v léčbě cílenou terapií a imunoterapií pak významně prodlužují celkové přežití pacientů ve srovnání s dřívější léčbou cytokiny nebo chemoterapií. Metastatický renální karcinom se tak stává z původně fatálního onemocnění stavem chronickým.

V první části této habilitační práce jsme se soustředili na analýzy nových sérových či močových markerů, pomocí kterých můžeme upřesnit diagnózu a prognózu pacientů s metastatickým renálním karcinomem. Jedná se především o studie analyzující mikroRNA, jejich výsledky již nacházejí uplatnění v klinické praxi.

V druhé části této práce jsme pak validovali výsledky prospektivních randomizovaných studií s cílenou léčbou na pacientech s metastatickým renálním karcinomem z běžné klinické praxe. Toto téma je v současné době velmi aktuální z několika důvodů. Pacienti léčení v rámci prospektivních studií jsou většinou selektováni vstupními kritérii dané studie, počty odpovědí na léčbu, přežití pacientů a tolerance léčby se tak mohou lišit od pacientů běžné klinické praxe. Tito pacienti mohou mít řadu jiných neonkologických onemocnění s nutností jejich léčby (polypragmasie), častěji jsou i vyššího věku anebo by jejich laboratorní parametry neumožnily vstup do studie. Výsledky našich retrospektivních studií na specifických populacích pacientů (starší pacienti a pacienti s renální insuficiencí) pak pomáhají v reálné praxi klinikům ve správné indikaci a dávkování cílené léčby. Navíc se celosvětově stále více klade důraz na retrospektivní studie zkoumající účinnost nákladné terapie v běžné praxi, výsledky těchto prací by v budoucnu mohli změnit již schválené indikace určitého léku u konkrétního onemocnění.

Ve studiích analyzujících vliv dosažené odpovědi na cílenou léčbu (obzvláště kompletní remise) na přežití pacientů, jsme pak prokázali na celosvětově největším souboru pacientů, že je možné léčbu v určitém okamžiku přerušit, aniž by došlo k nežádoucímu ovlivnění přežívání pacientů.

Je k dispozici velmi málo prospektivních studií zkoumajících sekvenční terapii u pacientů s metastatickým renálním karcinomem, o to cennější jsou pak výsledky některých našich retrospektivních prací, kde jsme provedli analýzy účinnosti a bezpečnosti dvou nebo i tří po sobě následujících preparátů.

Cílené terapie je velmi nákladná, očekávané zavedení kombinací cílené terapie a moderní imunoterapie u pacientů s renálním karcinomem ještě dále zvýší nákladnost této léčby.

Potencionální prediktivní faktory by pak pomohli k přesnější indikaci této terapie a ke snížení počtu případných nežádoucích účinků, což by vedlo kromě jiného ke snížení výdajů ze strany plátců zdravotní péče. V našich studiích jsme prokázali signifikantní vliv některých nežádoucích účinků cílené terapie (hand-foot syndrom a vyrážka) na přežití pacientů. U některých mikroRNA byla validována jejich přímá prediktivní role při použití této léčby (miR-155 a miR-484). V budoucnosti pak očekáváme identifikaci a validaci dalších laboratorních biomarkerů, které umožní větší zpřesnění indikací nejen cílené terapie, ale i rychle nastupující imunoterapie checkpoint inhibitory.

Klíčová slova: metastatický renální karcinom, cílená terapie, imunoterapie, prognóza, predikce léčebné odpovědi

**Abstract:**

Significant advance in the diagnosis and treatment of metastatic renal cell carcinoma is observed during last years, however, this disease remains incurable. Methods of so-called fluid biopsy are being more often applied, where markers of this disease are examined in peripheral blood or urine. Overall survival of these patients is significantly increased thanks to advances in targeted therapy and immunotherapy comparing to previous cytokine or chemotherapy treatment. Thus, there is a paradigm shift of metastatic renal cell cancer from fatal disease into a chronic condition.

In the first part of this habilitation thesis, we focused on the analysis of new serum or urinary markers, which can be used to better specify the diagnosis and prognosis of patients with metastatic renal cell carcinoma. These are primarily microRNA analyzes whose results are already being used in clinical practice.

In the second part of our work, we validated the results of prospective randomized trials with targeted treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma from common clinical practice. This approach is currently very topical for several reasons. Patients treated in prospective studies are mostly selected by the initial inclusion criteria of the study. The numbers of treatment responses, patient survival and treatment tolerance may differ from those of real-world clinical practice. These patients may have a number of other neonatal diseases requiring their treatment (polypragmasia), they are older, or their laboratory parameters do not allow entry into the study. The results of our retrospective studies in specific patient populations (elderly patients and patients with renal insufficiency) then help clinicians in the appropriate practice and indication and dosing of targeted therapy. In addition, more and more attention is being paid to a retrospective studies on the effectiveness of costly therapy in common practice worldwide; the results of these analyzes

could change the already approved indications of a particular drug for a particular disease in the future.

On the worldwide largest patient population study that analyzed the effect of the response to targeted therapy (especially complete remission) on patient survival, we have demonstrated that treatment can be discontinued at some point (date of complete response) without adversely affecting survival of patients. There are very few prospective studies of sequential therapy available in patients with metastatic renal cell carcinoma, the more valuable are the results of some of our retrospective work, where we performed analyzes of the efficacy and safety of two or three consecutive drugs. Targeted therapy is very costly, the expected introduction of combined targeted therapy and immunotherapy in patients with renal carcinoma will further increase the economy burden. Potential predictive factors would then help to more accurately indicate this therapy and reduce the number of potential side effects, which a consequent financial savings. In our studies, we have shown a significant correlation between some type of the adverse effects (post targeted therapy hand-foot syndrome and rash) and patient survival. For some of the microRNAs, their direct predictive role was validated with this treatment (miR-155 and miR-484). In the future, we expect the identification and validation of other laboratory biomarkers, which will allow for greater refinement of the indications not only of targeted therapy, but also of fast growing immunotherapy of checkpoint inhibitors.

Keywords: metastatic renal cell carcinoma, targeted therapy, immunotherapy, prognosis, prediction of treatment

## 1 Úvod

Renální karcinom je onemocnění nesmírně heterogenní a komplexní. Metastatický renální karcinom patří stále mezi nevléčitelné choroby a to i přes velké pokroky v diagnostice, predikci prognózy či léčebné odpovědi pacientů a v léčebných metodách. V diagnostice brzy bude mít čím dál větší roli tekutá biopsie a očekáváme, že k hodnocení úspěchů či neúspěchů léčby budeme používat markery periferní krve či moče. Taktéž se předpokládá, že léčba kombinovanou imunoterapií, nebo kombinací imunoterapie a cílené léčby změní charakter tohoto onemocnění z fatálního na chronické. Tyto kombinace jsou však finančně velmi nákladné, potencionální prediktivní faktory umožní, kromě úspory v nákladech na terapii, lépe cílit léčbu konkrétního pacienta a ušetřit ho i možných nežádoucích účinků.

Tato habilitační práce s názvem „Moderní trendy v diagnostice a terapii metastatického renálního karcinomu“ v zásadě navazuje na disertační práci autora „Prognostické a prediktivní faktory u karcinomů ledviny“, kterou autor obhájil v roce 2013. Došlo k jejímu podstatnému rozšíření především o validaci výsledků prospektivních studií pacientů s metastatickým renálním karcinomem na souborech pacientů běžné klinické praxe. Velmi cenné jsou též studie s mikroRNA, jejich výzkum nám pomáhá v dalším poznání patogeneze renálního karcinomu a snad i umožní lepší predikci léčby a odhad prognózy pacientů.

Habilitačná práce je členěna do kapitol začínajících epidemiologií, etiopatogenenezí a diagnostikou metastatického renálního karcinomu a končících odhadem prognózy, terapií a predikcí léčebné odpovědi pacientů. Na počátku každé kapitoly jsou uvedeny aktuální informace k danému tématu a poté vlastní příspěvky autora k dané problematice.

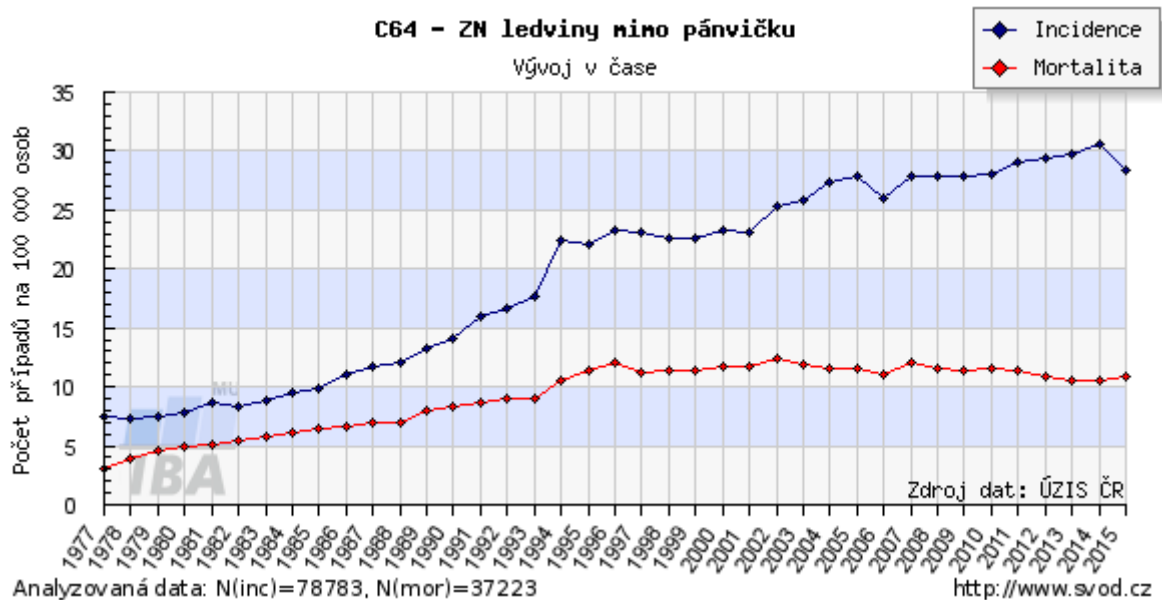
## 2 Epidemiologie metastatického renálního karcinomu

Zhoubné nádory ledvin patří mezi onemocnění s celosvětově rostoucí incidencí, na druhou stranu je mortalita ve vyspělých zemích stacionární, resp. mírně klesající. V roce 2015 byla incidence v České republice 28,34 případů na 100 000 obyvatel, mortalita pak byla 10,94 případů na 100 000 obyvatel (1) (obr.1). Česká republika má stále celosvětově nejvyšší incidenci renálního karcinomu (renal cell carcinoma, RCC) (2). Průměrný věk při diagnóze RCC byl v ČR 60 let (rok 2015), v posledních deseti letech docházelo k zvyšujícímu se záchytu onemocnění v I. stádiu (v roce 2015 přibližně 49% pacientů), zatímco ostatní stádia jsou diagnostikována v přibližně stejných incidencích (II. stádium- okolo 5% pacientů, III. stádium- přibližně 17% pacientů, IV. stádium- 15% pacientů, zbytek tvoří pacienti s neznámým stádiem onemocnění) (obr. 2) (1). V roce 2015 byla incidence RCC v České republice (ČR) 5. nejvyšší (pokud nepočítáme nemelanomové kožní zhoubné nádory) mezi ostatními malignitami, u mužů, resp. žen se jednalo o 4., resp. 5. nejčastější zhoubné onemocnění (1). V roce 2012 byl RCC ve světě 13. nejčastěji diagnostikované maligní onemocnění, u mužů, resp. žen se jednalo 9., resp. 16. nejčastější onkologické onemocnění (3). Incidence a

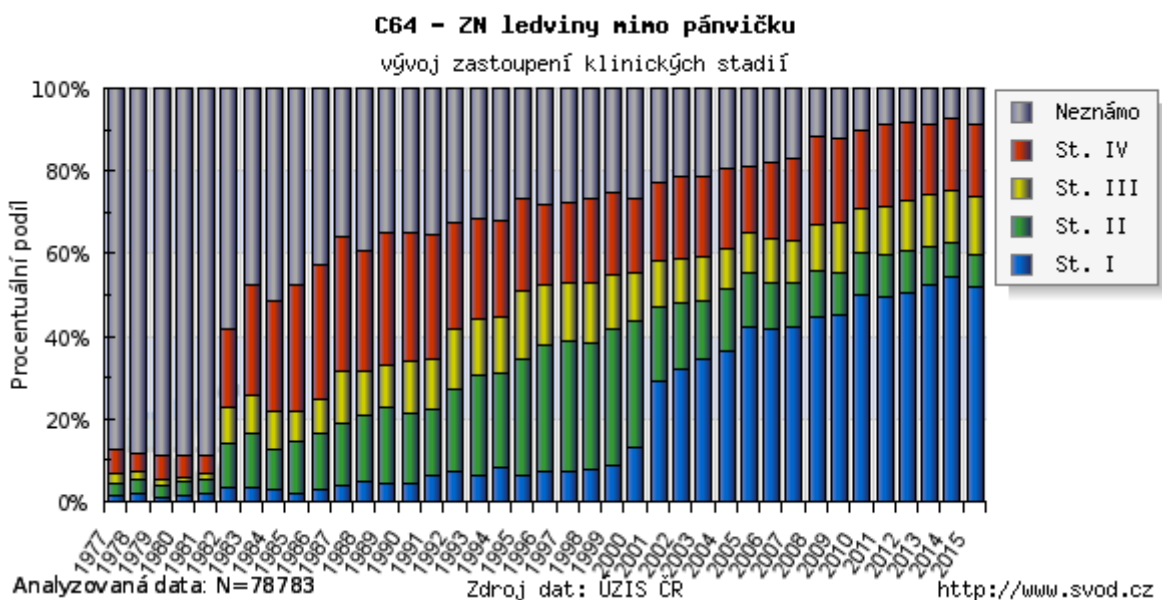


mortalita jsou stále nejvyšší v Evropě, Severní Americe a Austrálii, nejnižší jsou pak v Asii a Africe (2-4). Muži mají RCC častěji než ženy (přibližně 70% případů – muži, ženy 30% případů (5)). Klíčové však je, že procentuální zastoupení incidence IV. stádia onemocnění se dlouhodobě v ČR a celosvětově příliš nemění (obr.2).

Obr. 1: Incidence a mortalita RCC v ČR (1)



Obr. 2: Zastoupení incidence klinických stádií RCC (1)



## 2.1 Vlastní příspěvek k problematice

V rámci ČR vidíme mezikrajové rozdíly v incidenci RCC, například nejvyšší incidence je tradičně v kraji Plzeňském (v roce 2015 incidence, resp. mortalita- 40,47, resp. 18,24 případů na 100 000 obyvatel, IV. stádium onemocnění bylo zastoupeno ve 14,2% případů), nejnižší pak byla v kraji Libereckém (v roce 2015 21,86, resp. 11,84 případů na 100 000 obyvatel, IV. stádium 24% případů). V Jihomoravském kraji pak byla v roce 2015 incidence, resp. mortalita 27,61, resp. 9,8 případů na 100 000 obyvatel (IV. stádium zastoupeno ve 14,5% případů) (1).

V naší práci „**Epidemiologická a klinicko-patologická charakteristika pacientů s renálním karcinomem: analýza 544 případů z jednoho centra** „ (viz příloha 11.1) (6) jsme zkoumali charakteristiku pacientů s RCC diagnostikovaných či léčených v Masarykově onkologickém ústavu (MOÚ) od roku 2003 do roku 2010. Incidenci (v této práci počítaná průměrem na sledované roky: 77,71 případů na rok) nelze chápat jako počet nově zjištěných případů, jednalo se totiž jak o nové případy, tak i o různě léčené pacienty, kteří se z rozličných důvodů dostali do MOÚ. Rozdělení pacientů do stádií však odpovídá výše uvedeným celostátním parametrům. Pacienti v prvním stádiu byli zastoupeni v 46,5% případů, ve II., III. a IV. stádiu pak ve 10,7%, 13,1% a 20%. Neznámé stádium vstupně při diagnóze se vyskytlo u 9,7% pacientů (6).

V jiné naší práci „**Patients with advanced and metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the Czech Republic: twenty cancer centres, six agents, one database**“ (11.2) (7) byla analyzována data z registru RenIS (The RenIS (REnAl Information System, <http://renis.registry.cz>), což je unikátní registr pacientů léčených cílenou terapií pro diseminovaný či lokálně inoperabilní renální karcinom (metastatic RCC, mRCC). Jeho výjimečnost je v tom, že obsahuje informace o přibližně 90-95% všech pacientů v ČR léčených cílenou terapií, máme tedy k dispozici data o vstupních charakteristikách pacientů (věk, váha, stádium onemocnění, histologický podtyp RCC, místa metastáz), výsledcích krevního obrazu a biochemickém rozboru krve před a při cílené léčbě, přesná data o době do progresu onemocnění (progression-free survival, PFS), celkovém přežití (overall survival, OS), počtu léčebných odpovědí (ORR, overall response-rate) včetně jejich typů (complete response- CR, partial response- PR, stable disease- SD, progressive disease- PD), sbírány jsou též údaje o toxicitě léčby. Data jsou anonymní a jsou dvakrát ročně aktualizována. Od roku 2006 do roku 2011 jsme v této práci analyzovali charakteristiky 1541 pacientů se započatou léčbou od roku 2006 do roku 2011. Kromě již výše zmíněných 20% iniciálně diagnostikovaných pacientů s mRCC musíme připočítat k našemu souboru i pacienty, u kterých došlo k relapsu onemocnění po radikálním výkonu, či metastazektomiích nebo i „pomalu progredující“ diseminované pacienty, kteří dospěli k cílené léčbě. Proto je třeba počet pacientů s nasazenou cílenou léčbou za sledované období 5ti let hodnotit velmi opatrně (průměrně 308/ročně), pacientů se vstupně diagnostikovaným mRCC a nasazenou cílenou léčbou bylo jen 44% z celého počtu všech nově léčených pacientů. Průměrný věk

pacientů s mRCC a nasazenou cílenou léčbou v registru RenIS byl 62 let, zatímco v celé populaci pacientů s mRCC (data z Národního onkologického registru, NOR) byl 67 let. Zaznamenán byl signifikantní rozdíl v procentuálním zastoupení pacientů starších 65ti let mezi populací pacientů s cílenou léčbou a celou populací pacientů s mRCC (26% vs. 58,3%,  $p < 0,05$ ). Tyto údaje svědčí o tom, že je cílené léčba častěji nasazována pacientům v nižším kalendářním věku. Dále jsme srovnávali počty odpovědí a doby přežití pacientů s mRCC na cílené terapie z registračních studií III. fáze s populací pacientů registru RenIS, výsledky budou zmíněny v další části této práce (7).

### **3 Etiologie renálního karcinomu**

Podobně jako u jiných onkologických onemocnění nejsou příčiny RCC známy. Obecně byly rozděleny etiologické faktory na zevní a vnitřní, i když řada faktorů zevních se prolíná s faktory vnitřními a obráceně. Vzhledem k tomu, že hlavním tématem habilitační práce je mRCC, budou známé etiologické faktory probrány jen velmi stručně, více se budeme věnovat patogenezi metastatického onemocnění.

#### **3.1 Zevní rizikové faktory**

##### **Demografické vlivy**

Demografické vlivy byly již částečně probrány v odstavcích o epidemiologii. O tom, proč existují tak velké mezistátní, ale i mezikrajové rozdíly v ČR lze jen spekulovat. Zde bychom připomněli disertační práci MUDr. Navrátilové, která zkoumala výskyt RCC v závislosti na životním stylu a pracovním prostředí. Autorka prokázala, že kromě, v dalším textu uvedených faktorů, existují ještě jiné zevní rizikové faktory zvyšující pravděpodobnost vzniku RCC – jedná se o obezitu v mladším věku, konzumaci alkoholu (destiláty u mužů, jakýkoliv alkohol u žen), abúzus analgetik u žen, prodělané záněty a koliky ledvin, hypertenzi, expozici emisím benzínových a naftových motorů, asfaltu a dýmu z černouhelného dehtu (8). Lze tedy předpokládat, že rostoucí hospodářský rozvoj regionu přinášející zvýšenou expozici zevním rizikovým faktorům je jednou z možných příčin narůstající incidence RCC. Taktéž bylo prokázáno v zemích s rozvinutou ekonomikou, že nižší socioekonomický status mužů a žen zvyšuje riziko RCC (tedy opět u jedinců s možnou vyšší expozicí výše uvedeným rizikovým faktorům) (9). Otázkou však zůstává, proč právě ČR je na prvním místě v incidenci celosvětově. Někdy prezentované tvrzení, že je to díky rozvinuté síti radiodiagnostických pracovišť (časté provádění ultrazvukových vyšetření), je jistě správné, ale jen částečně, nevysvětluje totiž mezikrajové rozdíly v incidenci, či rozdíly v incidenci v ČR a například (např.) v Německu.

##### **Kouření**

Kouření je jednoznačný rizikový faktor vzniku RCC. Předpokládá se, že cigarety působí negativně především prostřednictvím chemikálií v nich obsažených (např. benzopyreny), dále

mají kuřáci častěji arteriální hypertenzi a endoteliální dysfunkci s postižením ledvinových tubulů (10,11,12). Benzopyreny se podezřívají, že způsobují chromosomální alterace v lokusu 3p, který hraje velmi důležitou roli v etiopatogenezi RCC i jeho progresi (13). Kuřáci s méně než 10ti balíčko-roky mají o 7% zvýšené riziko vzniku RCC, kuřáci s 30-40ti balíčko-roky mají toto riziko zvýšené o 80% proti nekuřákům (14).

### **Obesita**

Zvýšený body mass index (BMI) je taktéž nezávislým rizikovým faktorem vzniku RCC, body mass index  $\geq 35$  kg/m<sup>2</sup> je spojen s vyšším rizikem vzniku RCC u mužů (odds ratio, OR 2,3) i u žen (OR 3,3). Přesný mechanismus patogeneze není znám, ale předpokládá se proonkogenní působení zvýšené exprese genů pro leptin a snížená aktivita signální dráhy pro adiponectin. Nově se intenzivně zkoumají dva proteiny (folliculin a TRC8), které ovlivňují syntézu tuků a proteinů. Signální dráhy folliculinu a TRC8 jsou úzce propojeny s drahami proteinů HIF1 a HIF2 $\alpha$  (15-17).

### **Arteriální hypertenze**

Arteriální hypertenze zvyšuje riziko RCC dvojnásobně, navíc se riziko zvyšuje při špatně kontrolované léčbě hypertenze a taktéž roste s dobou jejího trvání (po 25ti letech přítomnosti hypertenze dochází k dalšímu dvojnásobnému riziku RCC) (18). Role hypotenziv na riziko RCC je stále rozporuplná, některé studie neprokázaly vztah mezi užíváním hypotenziv a vznikem RCC, jiné prokázaly opak (diuretika) (19,20).

## **3.2 Vnitřní rizikové faktory**

Genetické poruchy a specifické syndromy budou více probrány v části patogeneze mRCC (kapitola 4).

## **4 Patogeneze renálního karcinomu**

Renální karcinom může vzniknout jakou součástí geneticky podmíněných onemocnění, nebo jako sporadická choroba. Odhaduje se, že geneticky podmíněný renální karcinom je zastoupen pouze v 3% všech případů RCC (21). Díky hereditárním onemocněním a jejich intenzivnímu výzkumu nyní již známe některé patogenetické pochody vedoucí jak ke vzniku renálního karcinomu, tak i jeho progresi a metastazování.

### **4.1 Syndromy spojené s renálním karcinomem**

#### **Von Hippel-Lindauova nemoc**

Toto onemocnění je dědičné autosomálně dominantně, incidence se pohybuje okolo 1 případů 36 000 porodů živě narozených dětí, penetrance onemocnění je okolo 90% do věku 65ti let. Typické pro toto onemocnění jsou výskyty mnohočetných hemangioblastomů mozku a míchy, retinální angiomatózy, cysty ledvin, slinivky břišní a nadvarlat, dále

feochromocytomy a mnohočetné, bilaterální RCC (často vznikají okolo 30-40ti let). Dle přítomnosti feochromocytomů se toto onemocnění ještě dále dělí na typy (typ 1, typ 2 s podtypy 2A-C, typ 3- ten je většinou bez výskytu RCC) (20,21). Příčina tohoto onemocnění bude probrána níže.

### **Syndrom Birt-Hogg-Dubé**

Jedná se o vzácné onemocnění, dědičnost je opět autosomálně dominantní. Pro toto onemocnění jsou charakteristické kožní nezhoubné nádory z vlasových folikulů, cysty v plicích s recidivujícím pneumotoraxem a RCC (nejčastěji chromofóbní RCC a onkocytomy). Příčinou tohoto syndromu je mutace tumor-supresorového genu pro folikulin (dříve *FLCN* gen, dnes *BHD* gen). Ani dnes není přesná role produktu tohoto genu známa, předpokládá se, že tento protein ovlivňuje dráhu mTOR (mTOR, mammalian target of rapamycin), dále zasahuje do biogeneze mitochondrií, ovlivňuje adhezi buněk, aktivaci lyzozomů a autofágii buněk (22). RCC je častěji u tohoto syndromu bilaterální, multifokální, muži jsou postiženi častěji než ženy (2-5x) (23).

### **Tuberozní skleróza (morbus Bourneville)**

Incidence tohoto onemocnění je 1 případ na 11 000 porodů. Choroba je dědičná autosomálně dominantně, nacházíme zde mnohočetné hamartomy, rhabdomyomy, angiomyliomy. RCC se nachází jen u 5% pacientů s tuberozní sklerózou, jsou však zastoupeny všechny podtypy RCC. Genetickým podkladem onemocnění jsou mutace v genech pro proteiny hamartin a tuberin (tumor-supresorové geny *TSC1* a *TSC2*). Jejich hlavní úlohy jsou ovlivnění buněčného metabolismu prostřednictvím dráhy mTOR, interference s buněčným dělením a diferenciací (prostřednictvím cyklin- dependentní kinázy 1, Cdk-1, a B-RAF kinázy) (24).

### **Hereditární forma papilárního karcinomu**

Opět se jedná o autosomálně dominantní onemocnění, podkladem je mutace protoonkogenu *MET* (gen pro mezenchymální epiteliální tranzici, mesenchymal epithelial transition), typický je výskyt papilárního karcinomu 1. typu, často bilaterálně a multifokálně (25,26). Produktem tohoto genu je transmembránový receptor pro HGF (HGF, hepatocyte growth factor). Zvýšená aktivita receptoru MET vede k supresi apoptózy, zvýšenému nádorovému růstu, akceleraci angiogeneze, invazivitě a metastazování (cestou signální dráhy VEGF- vascular endothelial growth factor). Taktéž se podílí na procesu epiteliálně-mezenchymální tranzice. Epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT) je proces, během něhož dochází k přeměně epiteliálních buněk v buňky mezenchymální, což má za následek ztrátu buněčného kontaktu, zvýšenou motilitu a invazivitu buněk (25). Pro doplnění uvádíme, že se podobně jako mutace genu *VHL* vyskytuje alterace genu *MET* i u sporadického RCC (27,28).

### **Hereditární leiomyomatóza**

Jedná se o další autosomálně dominantně dědičné onemocnění, u této choroby se vyskytují mnohočetné leiomyomy a leiomyosarkomy kůže, dělohy a RCC. Podtypem RCC je papilární karcinom 2. typu s velmi agresivním chováním a časným metastazováním. Podstatou je mutace tumor-supresorového genu *FH* pro fumarát hydratázu, která je důležitá v Krebsově cyklu. Při její snížené funkci dochází k nahromadění fumarátu v mitochondriích se zdánlivou hypoxií a spuštěním kaskády tvorby faktoru HIF (HIF, hypoxia inducible factor) se všemi důsledky uvedenými níže (26).

### **Syndrom familiárních feochromocytomů a paragangliomů**

Jedná se o velmi vzácná onemocnění, genetickou příčinou je mutace genu *SDHD*, kódující enzym sukcinátdehydrogenázu, která podobně jako fumarát hydratáza ovlivňuje Krebsův cyklus a nadměrnou tvorbu HIF faktoru, taktéž je ovlivněna negativně apoptóza (26,29). V rámci RCC nacházíme světlobuněčné podtypy RCC a chromofobní RCC (30).

## **4.2 Sporadický renální karcinom**

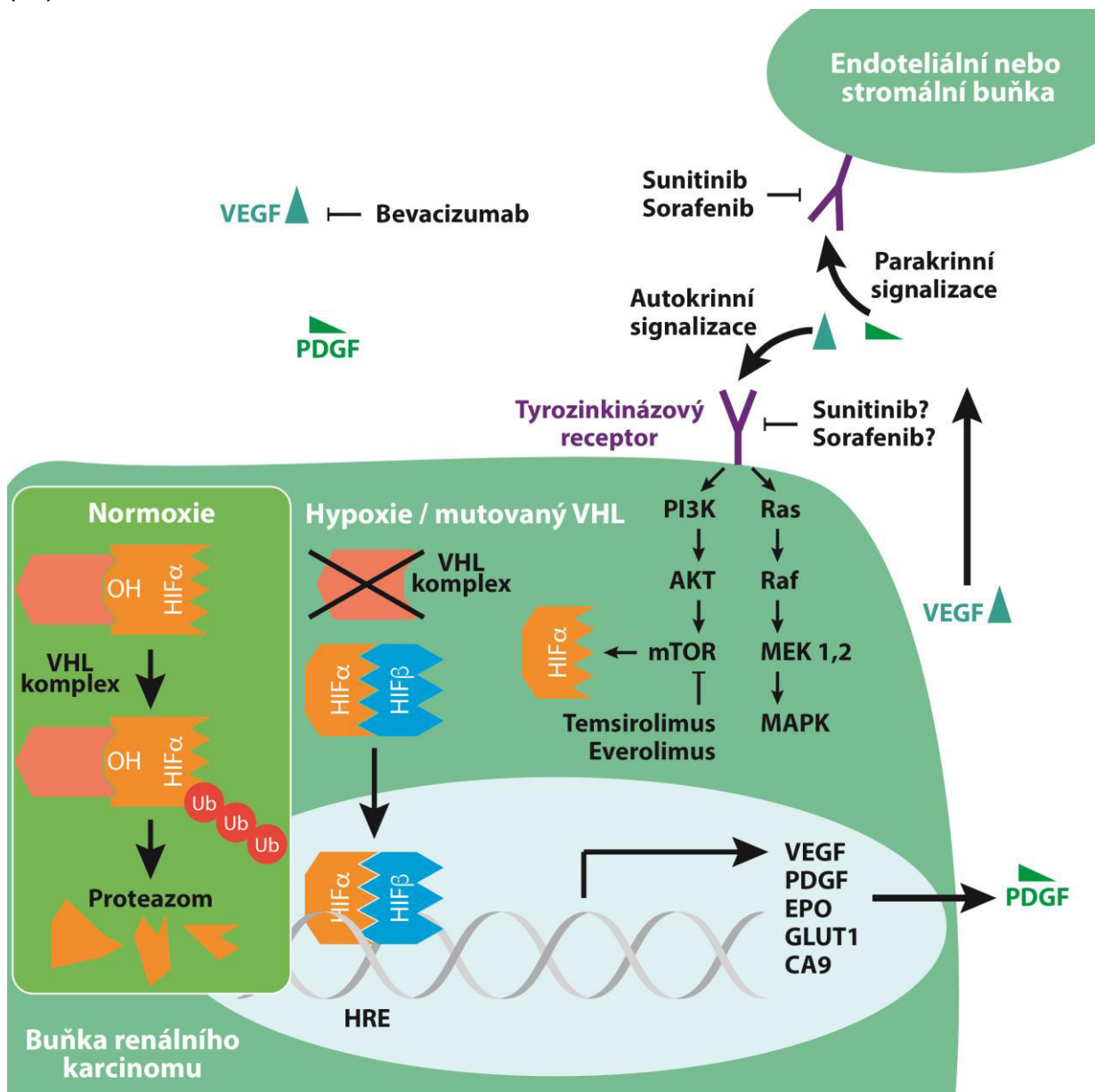
Nejčastější genetickou poruchou u pacientů se sporadickým RCC je poškození genu *VHL*. Typicky ho nacházíme u 75% pacientů se sporadickým světlobuněčným RCC. Dále jsou známé další geny (ať už protoonkogeny či tumor-supresorové geny) a jejich poruchy, které se podílí na patogenezi jak světlobuněčného RCC (CCRCC, clear-cell renal cell carcinoma), tak ale i nesvětlobuněčných RCC (non-CCRCC). Některé genetické odchylky s jejich důsledky byly zmíněny již u syndromů spojených s dědičným RCC (viz výše), další jsou intenzivně zkoumány (geny *PBRM1*, *BAP1*, *PTEN* a jiné). Ukazuje se, že poruchy těchto genů jsou důležité jak pro vznik nádorů, tak i pro jeho další progresi a metastazování (31). Klíčovými procesy ve vzniku a progresi RCC jsou děje spojené s hypoxií, angiogenezí, epitelálně-mezenchymální transicí, invazivitou a ztrátou adheze buněk, metastazováním. Kromě toho, že geny mohou být poškozeny mutacemi, víme, že jejich nadměrná či snížená exprese může být způsobena i epigeneticky (např. prostřednictvím mikroRNA) a velkou roli má též selhání imunitního dozoru.

### **4.2.1 Poruchy genu *VHL* a jejich důsledky**

Pro vznik sporadického světlobuněčného RCC je nutné poškození obou alel tumor-supresorového genu *VHL*. Toto poškození je dle odhadů přítomno až u 75% případů sporadického světlobuněčného RCC, v 50% se jedná o mutační změny, v 10-20% pak nacházíme epigenetické změny typu hypermetylace cytosinu a guaninu v DNA (DNA, deoxyribonukleová kyselina) (32). Gen *VHL* se nachází na krátkém raménku 3. chromozómu, každá somatická buňka nese dvě kopie tohoto genu. U *VHL* choroby je jedna kopie poškozena již v zárodečných buňkách, k manifestaci onemocnění dochází při poškození druhé alely (proto mají pacienti s *VHL* chorobou oproti pacientům se sporadickým renálním karcinomem nádory ledvin v nižším věku a jsou často multifokální a bilaterální) (32).

VHL protein je složen ze dvou funkčních domén ( $\alpha$  a  $\beta$ ) a je součástí multiproteinového komplexu, který má zásadní roli v degradaci faktorů HIF- $\alpha$  v proteazomu (HIF rodina má 3 členy, HIF-1, 2 a 3). Transkripční faktor HIF má dvě složky (opět  $\alpha$  a  $\beta$ ), členové rodiny  $\alpha$  jsou nestabilní a jejich hladina kolísá dle přítomnosti hladiny kyslíku v tkáních, členové rodiny  $\beta$  jsou stabilní a jejich hladina příliš nekolísá. Degradace HIF- $\alpha$  probíhá v proteasomu až po navázání ubiquitinu (degradační marker) za pomoci různých ligáz. Tuto ligázovou aktivitu má komplex proteinu VHL spolu s proteiny Elonginem B a C, CUL1 a Ring-box 1 proteinem. Ubiquitinace je možná až po hydroxylaci HIF. V normooxii je HIF hydroxylován, dochází tedy k vazbě komplexu proteinů s VHL a následné degradaci. V hypoxii nedochází k hydroxylaci HIF, ten pak nemůže být degradován. VHL protein kromě regulace hladiny HIF ovlivňuje buněčný cyklus, expresi metaloproteináz a jejich inhibitorů a stabilizuje mikrotubuly. HIF reguluje expresi genů ovlivňujících angiogenezi, buněčný metabolismus, proliferaci, adhezi buněk, chemotaxi a apoptózy. Jedná se o děje spjaté s progresí tumoru a jeho metastazováním. Zvýšená transkripce genů prostřednictvím HIF se týká především rodiny růstových faktorů pro endotelové buňky (vascular endothelial growth factor, VEGF), rodiny destičkového růstového faktoru (platelet-derived growth factor, PDGF) a rodiny transformujícího růstového faktoru (transforming growth factor, TGF). Tyto faktory se pak váží na své receptory (VEGF-R, PDGF-R a EGF-R) s tyrozinkinázovou aktivitou a aktivují nitrobuněčnou signální kaskádu vedoucí ke stimulaci angiogeneze a buněčného dělení či k inhibici apoptózy (pro rodinu faktorů TGF a PDGF jsou zásadní signální dráhy RAS-RAF-MEK-MAPK a JAK-STAT, pro rodinu VEGF pak navíc kaskáda PI3K-AKT-mTOR) (33-37). Ukazuje se, že HIF-2 působí velmi podobně jako HIF-1, ale jeho exprese je řízena jinými mechanismy než HIF-1. Bylo prokázáno, že se HIF-2 podílí, kromě vzniku RCC, i na patogenezi jiných nádorů (např. kolorektálního karcinomu), role HIF-3 stále není jasná (38). Vztah mezi HIF-1 a HIF-2 bude ještě stručně probrán v kapitole o metastazování RCC. Zjednodušený obrázek 3 zobrazuje signální dráhy RCC i jejich možné terapeutické ovlivnění (léčba bude předmětem dalšího textu).

Obr. 3: Schematické znázornění signálních drah RCC a jejich možné ovlivnění cílenou terapií (33)



#### 4.2.2 Metastazování renálního karcinomu

Přibližně 15% pacientů se světlobuněčným RCC má v době diagnózy vzdálené metastázy a u dalších přibližně 30% pacientů se metastázy v dalším průběhu onemocnění objeví (1). Některé patogenetické mechanismy metastazování byly již zmíněny v kapitole o genu *VHL*, nyní se pokusíme krátce vše shrnout a popsat i novější objevy o metastazování. Pro RCC jsou typické pozdní metastázy a jejich neobvyklé lokalizace. Je prokázáno, že ztráta funkce genu *VHL* s následnou aktivací HIF- $\alpha$  se značnou měrou podílí na metastazování, především pak



ovlivněním aktivity metaloproteináz, PAX2, CD10 a CXCR4. Neobvyklá lokalizace metastáz může být způsobena interakcí mezi chemokiny a jejich receptory, ať už na nádorových buňkách nebo cílových tkáních, za normálních okolností jsou tyto děje spojeny se inflamací a hojením ran. Předpokládá se, že zvýšená aktivace některých receptorů (např. CCR2) po navázání chemokinů (CCL2 a CCL7) zvyšuje permeabilitu cév (např. mozku), což usnadňuje extravazaci nádorových buněk do tkání. Velmi zajímavou je pak interakce mezi chemokinem CXCL12 a jeho receptorem CXCR4, ta je přímo aktivována cestou VHL/HIF- $\alpha$  a vede taktéž ke zvýšené permeabilitě hematoencefalické bariéry. Poměrně novým poznatkem je pak zjištění, že v průběhu progresu a metastazování dochází ke snížené expresi a aktivitě HIF-1 a zvýšené aktivitě HIF-2. Zdá se, že se jedná o důsledek působení ligázy HAF (hypoxia-associated factor), která cíleně degraduje HIF-1, ale nikoliv HIF-2. HIF-2 je naopak po interakci s HAF zvýšeně exprimována. Kromě HAF do křehké rovnováhy mezi HIF-1/2 zasahují některé miRNA (např. miR-30a-3p) a taktéž signální proteiny dráhy mTOR (např. AKT1, AKT2). Zdá se však, že samotná mutace genu *VHL* s následnou aktivací HIF nestačí k progresu a metastazování RCC, jsou nutné ještě další mutace jiných tumor-supresorových genů či protoonkogenů (p53, PTEN, TSC1, TSC2, MYC, AKT1, atd.). Dále ještě zmíníme, že ztráta funkce genu *VHL* vede k poruše funkce mikrotubulů nutných pro mitózu s následnou aneuploidií maligních buněk a k poruchám reparačních procesů poškozené DNA (cestou SOCS1), což následně vede k další akceleraci kancerogeneze s metastazováním (39).

#### **4.2.3 Epigenetické ovlivnění exprese genů spojených se vznikem a progresí renálního karcinomu**

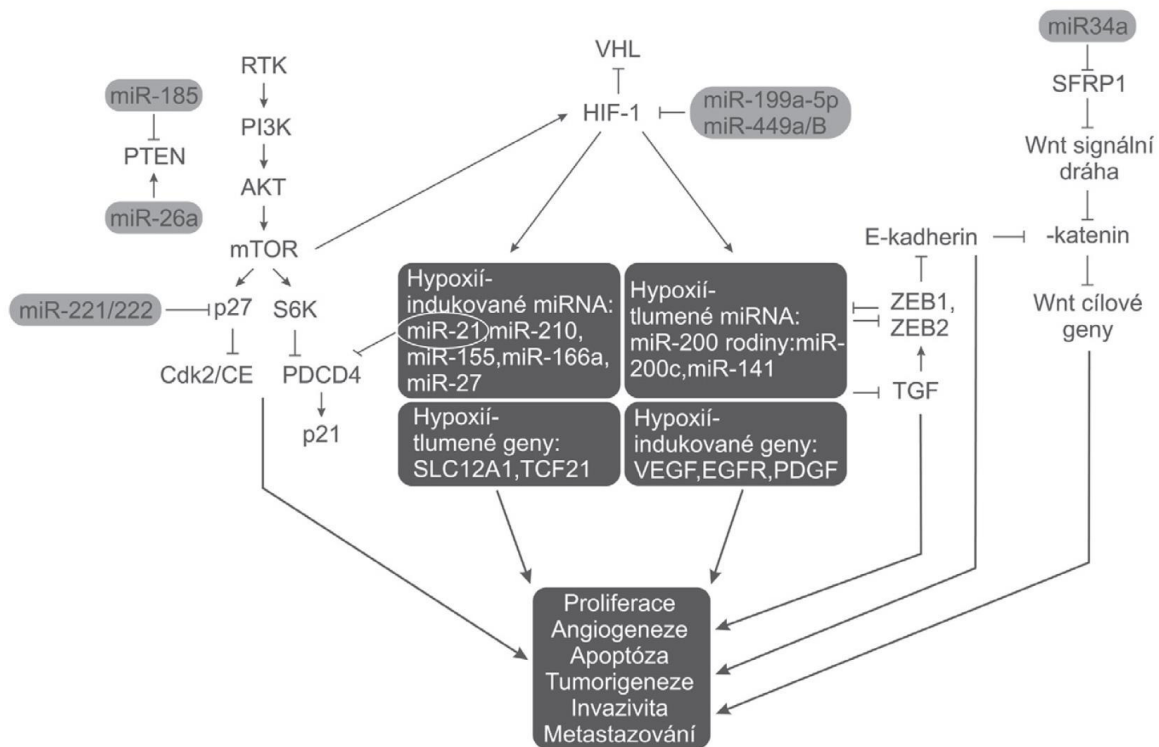
MikroRNA (miRNA) jsou malé nekódující molekuly jednořetězové RNA složené z 21-23 nukleotidů. Podílí se na ovlivňování exprese genů za fyziologických i patologických podmínek na post-transkripční úrovni. Vlastní vznik regulačních miRNA je velmi složitý (pri-miRNA $\rightarrow$ pre-miRNA $\rightarrow$ miRNA) a podléhá sofistikované regulaci. Regulační funkce miRNA je zprostředkována vazbou na mRNA (messengerová RNA, mRNA, tedy na úrovni translace). Vazba může být úplně komplementární, pak dochází k degradaci komplexu miRNA s mRNA katalyzovanou proteiny rodiny AGO (AGO, Argonautované proteiny), nebo je komplementarita neúplná (v živočišných buňkách častější případ) a dochází jen k inhibici translace. Ke složitosti regulačních mechanismů v buňkách jen zmíníme, že miRNA mohou též aktivovat translaci. Je prokázáno, že miRNA mají zásadní roli v regulaci procesů diferenciace, proliferace, apoptózy, ovlivňují taktéž imunitní systém a procesy spojené s maligní transformací a metastazováním. Jedna miRNA může negativně nebo pozitivně regulovat expresi mnoha genů (jak protoonkogenů, tak tumor-supresorových genů), ale i jejich transkripčních faktorů. Odhaduje se, že miRNA mohou ovlivňovat více než 1/2 kódujících genů. Důležité pro výzkum je i to, že miRNA tolik nepodléhají degradačním procesům (např. při fixaci formalinem) jako mRNA, navíc je lze i úspěšně detekovat

v periferní krvi. V procesu poznání karcinogeneze RCC ve vztahu k microRNA došlo poslední dobou k velkým pokrokům, i když řada mechanismů pro možné dvojí (proonkogenní a tumor-supresorové) působení jedné miRNA není zcela objasněna (40-42).

Ve vztahu k RCC rozdělujeme miRNA do tří velkých skupin dle jejich zapojení do určitého patogenetického procesu (43):

1. miRNA ovlivňující děje spojené s hypoxií
2. miRNA regulující EMT (epiteliální mezenchymální tranzici)
3. miRNA zasahující do procesů buněčné proliferace, angiogeneze a metastazování

Obr. 4: Schematické znázornění signálních drah RCC a jejich možné ovlivnění miRNA (43)



Do první skupiny řadíme především miR-210, která je nadměrně exprimována za hypoxických podmínek. Faktor HIF-1 $\alpha$  je silný pozitivní regulační faktor této miRNA, která pak inhibuje translaci faktoru GPD1L, který snižuje zpětně stabilitu HIF-1 $\alpha$ . Při inaktivaci miR-210 se snižuje buněčná proliferace, invazivita a metastazování v *in vitro* podmínkách (44). Navíc její zvýšená exprese byla prokázána v tumorech CCRCC s vyšším gradem a postižením uzlin (45). Další miRNA spojenou s hypoxií jsou např. miR-155, miR-21, miR-519 a jiné (43).

V druhé skupině jsou miRNA ovlivňující EMT, tedy přeměnu epiteliálních buněk v buňky mezenchymální, kdy dochází zjednodušeně řečeno ke snížené expresi E-cadherinu a zvýšení

produkcí vimentinu, což má za následek ztrátu adhezivity a zvýšenou motilitu buněk. Nejvíce prozkoumané jsou miR-141 a miR-200c (46).

Do třetí skupiny miRNA ovlivňující komplexní děje karcinogeneze RCC řadíme miR-185 (negativně ovlivňuje hladinu PTEN s následnou aktivací dráhy PI3K/AKT/mTOR), miR-26a (cílo- opět PTEN), miR-16 (ovlivňuje BCL-2) a miR-29c (regulující expresi proteinů extracelulární matrix) (43, 47).

Nynější výzkum je fokusován na stanovení hladin miRNA v periferní krvi, jejich analýzy ve vztahu k diagnostice, prognóze pacienta a predikci léčebné odpovědi. Kromě toho se předpokládá jejich využití jako markerů možného relapsu či progresu onemocnění. V budoucnu se možná dočkáme i využití miRNA jako terapeutických cílů.

#### **4.2.4 Selhání imunitního dozoru**

Víme, že na počátku maligního onemocnění je imunitní systém schopen nádorové buňky eliminovat, poté však dochází k tzv. ekvilibriu, kdy jednotlivé složky imunity jsou sice ještě schopny likvidovat nádorové buňky, ale ty jsou rychle nahrazovány jinými nádorovými buňkami a poté nastává období nádorového úniku (escape), kdy již imunitní systém není schopen kontrolovat zhoubné onemocnění (teorie 3E). Je dokumentováno, že nádorové buňky jsou „chudé“ na potenciální antigeny, zároveň ale dokážou produkovat řadu signálů inhibujících protinádorovou imunitní odpověď organismu. Nejvíce prozkoumané jsou signální regulační faktory CTLA-4 (CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) a PD-L1/L2 (PD-L, programmed death-ligand). Protein CTLA-4 je exprimován více na CD8+ T regulačních lymfocytech a váže se na receptory CD80 and CD86 na antigen předkládajících buňkách, jedna z jejich rolí je suprese imunitní reakce jako prevence autoimunitních dějů. Zvýšená exprese tohoto proteinu nastává po kontaktu T lymfocytů s antigenem. PD-1 protein (receptor) nacházíme na povrchu již aktivovaných CD8+ T lymfocytů, ligandy PD-L1 a L2 pak exprimují nádorové buňky, jakmile se navážou na PD-1 receptor dochází taktéž k supresi imunitní reakce (48). Tyto poznatky vedly k vývoji nové skupiny léků- tzv. checkpoint inhibitorů, které selektivně blokují některé z uvedených receptorů nebo ligandů. Z výše uvedeného vyplývá, že anti-CTLA-4 protilátky působí více centrálně a v časně fázi imunitní reakce, protilátky proti PD-1/PD-L1 pak působí více na periferiích (nádorové buňky) (49). Jsme tedy schopni při použití těchto léků „odbrzdit nádorem indukovanou supresi imunitní reakce.“ Z výše uvedeného však vyplývá nebezpečí vzniku autoimunitních nežádoucích účinků při používání checkpoint inhibitorů. O vzájemné provázanosti signální dráhy VEGF a imunitních mechanismů svědčí i práce popisující vztahy vysokých hladin VEGF na inhibici maturace dendritických buněk, indukci apoptózy CD8+ T lymfocytů a indukci aktivity T regulačních lymfocytů. VEGF se dále podílí na diferenciaci tumorem-asociovaných makrofágů, které cestou zvýšené produkce IL-10 a zpětně VEGF akcentují angiogenezi a pronádorovou imunomodulaci („immune editing“). Dále vysoké hladiny VEGF způsobují maturaci myeloidních supresorových buněk, které zhoršují funkci efektorových T-lymfocytů a

zvyšují aktivitu T reg buněk (regulační T lymfocyty s především imunosupresivním a proangiogenním vlivem) (50).

#### 4.3 Vlastní příspěvek k problematice

Genetické s epigenetickými změnami a selhání imunitního dozoru představují vzájemně provázané děje v karcinogenezi s řadou známých, ale bohužel i neznámých mechanismů. Této problematice se díky výjimečné spolupráci s výzkumnými skupinami doc. Slabého (z vědeckého centra CEITEC) a doc. Zdražilové Dubské (Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, RECAMO) v MOÚ věnujeme řadu let.

Ve spolupráci s týmem doc. Slabého tak vznikla kapitola v knize „ **MikroRNA v onkologii**“, podíleli jsme se na kapitole „**MirkoRNA u renálního karcinomu**“. V této kapitole jsme detailněji rozebrali jednotlivé miRNA a jejich ovlivňování vzniku a progresu RCC, včetně metastazování. Nastínili jsme zde možný budoucí vývoj v oblasti miRNA- možnosti predikce odpovědí na léčbu mRCC, výzkum miRNA jako markerů relapsu či progresu RCC a miRNA jako možné terapeutické cíle (43).

MiR-210 je hlavní miRNA regulující děje spojené s hypoxií. Zvýšená exprese této miRNA byla prokázána nejen u RCC, ale i u nádoru plic, prsu a jater (51). Vzájemný vztah mezi miR-210 a HIF byl již popsán výše, zde ještě doplníme, že tato miRNA reguluje expresi proteinu E2F (E2F, transcription factor 3), který představuje klíčového regulátora buněčného cyklu (52). V práci „**MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma**“ (příloha 11.3) (53) jsme zkoumali míru exprese miR-210 v nádorové tkáni RCC pacientů MOÚ a porovnávali jsme ji s nenádorovou renální tkání. V další části této práce jsme prováděli *in vitro* pokusy na nádorových liniích ACHN (mRCC) a CAKI-2 (RCC), do jejichž buněk byly přeneseny inhibitory miR-210. Poté jsme zkoumali viabilitu buněk (MTT testy), apoptózu (flowcytometricky Annexin V-FITC kit), ovlivnění buněčného cyklu (opět flowcytometricky), ovlivnění migračního potenciálu (technika scratch wound migration assay) a testy invazivity (xCELLigence). Prokázali jsme, že miR-210 je statisticky významně více exprimována v tkáních RCC než v renální nenádorové tkáni (více než 6x,  $p < 0,0001$ ). Při *in vitro* pokusech došlo po inhibici miR-210 ke statisticky významnému snížení viability buněk obou nádorových linií ( $p = 0,001$ ), snížil se i migrační ( $p = 0,04$ ) a invazivní ( $p = 0,015$ ) potenciál buněk linie ACHN (linie mRCC, linie CAKI-2 nemá metastatický původ). Dále u linie CAKI-2 došlo po transfekci inhibitorem miR-210 k akumulaci buněk ve fázi G2 buněčného cyklu a redukci buněk v S-fázi ( $p = 0,02$ ), u linie ACHN tento efekt nebyl pozorován. Navíc jsme potvrdili signifikantní snížení hladiny HIF-1 $\alpha$  v obou buněčných liniích po jejich transfekci anti-miR-210 (53).

Další naší prací je „**Imunoterapie zhoubného nádoru ledviny**“ (příloha 11.4) (54), ve které jsme po teoretickém úvodu věnovaném patogenezi mRCC popsali současné a budoucí možnosti léčby mRCC. Tyto novinky v léčbě budou popsány v další části této práce.

## **5 Diagnostika renálního karcinomu, monitoring metastatického onemocnění**

Podobně jako u jiných onkologických onemocnění i u RCC dochází k prudkému rozvoji různých technik zobrazovacích metod a molekulárních testů, které v budoucnosti umožní diagnostiku a odhad prognózy RCC např. z periferní krve (tekutá biopsie). Zvýšená dostupnost ultrazvukových vyšetření (UZ, ultrazvukové vyšetření) v rozvinutých zemích zřejmě stojí za příznivou změnou v proporcii diagnostiky pacientů s RCC v nižších stádiích (především I. stádium onemocnění) oproti pacientům ve vyšších stádiích. Moderní metody využití počítačové tomografie (CT, computed tomography) a magnetické rezonance (MRI, magnetic resonance imaging) pak zpřesňují staging onemocnění a vizualizaci vlastního nádoru či metastáz ve vztahu k okolí. V rámci tekuté biopsie nejsou, i přes značné pokroky, zatím známé dostatečně validní diagnostické a prognostické markery, který bychom mohli standardně používat.

### **5.1 Klinické příznaky a laboratorní odběry**

Metastatický renální karcinom je onemocnění velmi často asymptomatické, klasická interní triáda primárního tumoru (bolest v bedrech, hmatný tumor v břiše a hematurie) je dnes vzácný nález a je známkou agresivního onemocnění, téměř vždy metastatického (55). Někdy můžeme vidět u pacientů s mRCC obecné příznaky pokročilého maligního onemocnění (kašel, kachexie, otoky dolních končetin, bolesti, ascites aj.), paraneoplastické symptomy a syndromy (Staufferův syndrom, polyglobulie, zvýšená sedimentace) jsou přítomny u maximálně 30% pacientů s mRCC (56). V rámci laboratorní diagnostiky provádíme odběry krevního obrazu s diferenciálním rozpočtem, sedimentace (FW), koagulací, krevních iontů včetně kalcia, jaterních testů s laktátdehydrogenázou (LDH), azotémie a močového sedimentu. Vyšetření cytologie moče se provádí v indikovaných případech (podezření na uroteliální karcinom) (57). Moderní trendy v laboratorní diagnostice nádoru nebo relapsu budou probrány v další kapitole.

### **5.2 Zobrazovací metody**

Jak již bylo řečeno, podezření na RCC je nejčastěji stanoveno na základě UZ vyšetření, zlatým standardem pro stanovení diagnózy a rozsahu onemocnění je stále CT vyšetření, MRI vyšetření pak přináší doplňující informace o lokální pokročilosti nádoru a přítomnosti trombu v renální či portální žíle (57). Dle některých studií je 3-fázové spirální CT vyšetření vhodné pro určení rozsahu trombu v renálních žilách, MRI pak pro diagnostiku a rozsahu trombu v portální žíle a intrakardiálně (58). Intenzivní pokroky v radiodiagnostické technice rozšířily možnosti CT a MRI vyšetření. U CT se jedná u multidetektorové CT s velmi tenkou kolimací a multiplanární rekonstrukcí. U MRI se rychle rozvíjí funkční vyšetření, např. BOLD (Blood

Oxygenation Level Dependent), DWI (Diffusion Weighted Imaging a DCE (Dynamic Contrast Enhanced) (59). V budoucnu se též počítá s kombinací MRI s molekulárními probami (oxidy železa, nanomateriály) (60). Vyšetření pozitronovou emisní tomografií (PET) s fluorodeoxyglukózou (dnes již v kombinaci s CT nebo MRI) je v diagnostice RCC kontroverzní, je vysoce sensitivní pro diagnostiku metastáz, horší je to však u zobrazení primárního tumoru (57). Výhodou je však možné zobrazení metastáz v netypických lokalitách (svaly trupu, končetin) (61). Naděje se vkládají do PET/CT vyšetření s radioaktivně označeným girentuximabem (protilátka proti karbonické anhydráze IX, CAIX), přínosem bude zřejmě jak primární diagnostika (bez nutnosti biopsie), tak i stanovení rozsahu onemocnění, včetně míst a počtu metastáz. CAIX je totiž zvýšeně exprimována na buňkách RCC (62).

### 5.3 Histopatologická diagnostika a staging

#### 5.3.1 Histopatologické podtypy

Zhoubné nádory ledvin se rozdělují dle histopatologie do různých podtypů, obecně však platí, že RCC je nádor značně polymorfní, často se jedná o směs více různých nádorových podtypů a různých gradů. Nejčastějším histologickým podtypem je světlobuněčný renální karcinom (CCRCC)- tvoří 70-75% všech RCC, další podtypy (non-CCRCC) jsou vzácnější. Jedná se o papilární karcinom I. nebo II. typu (cca 10-15% všech nádorů ledvin), následuje chromofóbní karcinom (cca 5% RCC), ostatní (medulární karcinom a jiné) jsou raritní (63). Grade tumorů je zodpovědný za agresivitu nádorů, nejčastěji se užívalo stanovení dle Fuhrmanové, základem bylo především posuzování vzhledu jader buněk RCC (64). Do roku 2015 se používalo rozdělení na podtypy RCC dle WHO klasifikace z roku 2004 (65). Schematicky ji zde uvádíme (je stále hojně používána):

- Světlobuněčný karcinom
- Multilokulární cystický světlobuněčný karcinom
- Papilární karcinom
- Chromofóbní karcinom
- Karcinom ze sběrných kanálků (Belliniho karcinom)
- Medulární karcinom
- Karcinom s translokací Xp11
- Karcinom spojený s výskytem neuroblastomu
- Mucinózní tubulární a vřetenobuněčný karcinom
- Neklasifikovaný karcinom

Od roku 2016 byla zavedena nová klasifikace, která více reflektuje biologické chování a molekulární změny RCC, grading tumoru se stanovuje dle ISUP (International Society of Urological Pathology, ISUP), hodnotí se jak morfologie jader buněk, tak ale i přítomnost sarkomatoidních či rhabdoidních buněk, polymorfismy buněk aj. (66). Dělení na podtypy dle ISUP je následující (překlad ve spolupráci s prof. Hessem- FN Plzeň):

- Světlobuněčný renální karcinom

- Multilokulární cystická renální neoplázie nízkého maligního potenciálu
- Renální karcinom spojený s hereditární leiomyomatózou
- Papilární renální karcinom
- Chromofobocelulární renální karcinom
- Karcinom ze sběrných kanálků (Belliniho karcinom)
- Renální medulární karcinom
- Renální karcinom s translokací transkripčních genů rodiny MiT
- Renální karcinom s deficiencí sukcinát dehydrogenázy
- Mucinózní tubulární a vřetenobuněčný karcinom
- Tubulárně cystický renální karcinom
- Renální karcinom spojený se získanou cystózou ledvin
- Světlobuněčný papilární renální karcinom
- Neklasifikovatelný renální karcinom
- Papilární adenom
- Onkocytom

V rámci imunohistochemického vyšetření RCC je třeba dodat, že neexistuje jeden specifický marker pro tuto diagnózu. Měl by se proto v případě nejasností užívat panel protilátek, typicky nacházíme pozitivitu pro různé typy cytokeratinu, vimentin a glutation-S transferázu- $\alpha$  (67). Velké naděje se vkládají do CAIX (protilátka je girentuximab), který je nadměrně exprimován u CCRCC, určitou nevýhodou je však to, že je exprimován i v případech nenádorové hypoxie či nekrózy (exprese v těchto případech však není na rozdíl od RCC difúzní) (67).

Molekulárně-genetické analýzy prokazují mutace či metylace *VHL* genu (viz výše). Dále se zkoumá celá řada genů, jejichž mutace či amplifikace jsou zodpovědné za vyšší agresivitu a metastazování (např. *BAP1*- produkt tohoto genu degraduje ubiquitin, ten je nutný pro degradaci HIF, další jsou např. geny *PBRM1*, *NRF2* a jiné) (68). Obecně můžeme shrnout, že různé světlobuněčné renální karcinomy mají podobné mutační změny, na rozdíl od non-CCRCC, pro které je typický polymorfismus mutačních změn. U CCRCC je přibližně 630 genů zvýšeně a 720 sníženě exprimováno. Upregulaci vidíme především u genů spojených s hypoxií a angiogenenezí, zánětlivou odpovědí, stresem, invazivitou, adhezí a metastazováním (např. *Gal-1*, *14-3-3 zeta/delta*), downregulaci pak u genů spojených s oxidační redukcí, transportem bílkovin a iontů (*ATP1A1*) a odpovědí na stimuly (*HSP60*, *ATP1A1*, *PDZK1*) (69,70).

### 5.3.2 TNM klasifikace

V současné době platí 7. vydání TNM klasifikace z roku 2009 (korekce 2011), s určitým napětím očekáváme 8. vydání, které má platit od roku 2018, i když u RCC se předpokládá minimum nebo žádné změny. Přehled 7. vydání TNM klasifikace je v Tab. č. 1 (71).

Tab. 1: TNM klasifikace (7.vydání)

**TNM pro RCC, 2009**

<b>T</b>	primární nádor
<b>TX</b>	primární nádor nelze hodnotit
<b>T0</b>	bez známek primárního nádoru
<b>T1</b>	nejvýše 7 cm v největším rozměru, ohraničený na ledvinu
<b>T1a</b>	nádor 4 cm a méně
<b>T1b</b>	nádor větší než 4 cm, ne větší než 7 cm
<b>T2</b>	nádor větší než 7 cm v největším rozměru, ohraničený na ledvinu
<b>T2a</b>	nádor větší než 7 cm, ale ne větší než 10 cm, ohraničený na ledvinu
<b>T2b</b>	nádor větší než 10 cm, ohraničený na ledvinu
<b>T3</b>	nádor se šíří do velkých žil nebo postihuje perirenální tuk, nepřesahuje však Gerotovu fascii
<b>T3a</b>	nádor se šíří do <i>veny renalis</i> nebo do jejích segmentálních větví (stěna obsahuje svalovinu), nebo infiltruje perirenální tuk či peripelvicový tuk, nepřesahuje však Gerotovu fascii
<b>T3b</b>	nádor se šíří do dolní duté žíly pod bránicí
<b>T3c</b>	nádor se šíří do dolní duté žíly nad bránicí nebo infiltruje stěnu dolní duté žíly
<b>T4</b>	nádor se šíří přes Gerotovu fascii nebo infiltruje přilehlou nadledvinu
<b>N</b>	regionální mízní uzliny - hilové, břišní paraaortální a parakavální
<b>NX</b>	regionální mízní uzliny nelze hodnotit
<b>N0</b>	nejsou metastázy v regionálních mízních uzlinách
<b>N1</b>	metastáza v jedné nebo více regionálních mízních uzlinách
<b>N2</b>	korekce TNM z roku 2011 tuto položku vyřadila
<b>M</b>	vzdálené metastázy
<b>MX</b>	vzdálené metastázy nelze hodnotit
<b>M0</b>	nejsou vzdálené metastázy
<b>M1</b>	vzdálené metastázy

**Stádia dle TNM**

<b>Stádium I</b>	T1 N0 M0
<b>Stádium II</b>	T2 N0 M0
<b>Stádium III</b>	T3 N0 M0
	T1, T2, T3 N1 M0
<b>Stádium IV</b>	T4 jakékoliv N M0
	Jakékoliv T jakékoliv N M1

**G-Histopatologický grading**

<b>GX</b>	stupeň diferenciaci nelze hodnotit
<b>G1</b>	dobře diferencovaný
<b>G2</b>	středně diferencovaný
<b>G3-4</b>	nízce diferencovaný/nediferencovaný

**5.4 Moderní trendy v laboratorní diagnostice**

Jak již bylo řečeno, nemáme do dnešní doby dostatečně validní marker z periferní krve či moče, který bychom mohli využít pro diagnostiku RCC či pro prokázání relapsu/ progresu onemocnění. Přesto díky inovacím v molekulárně-genetické diagnostice můžeme popsat



několik velmi slibných molekul, které snad v budoucnu najdou své místo v diagnostice RCC. Didakticky rozdělíme tyto molekuly na dvě skupiny dle odběrové tekutiny (krev, moč), uvádíme jen velmi stručný přehled.

#### **5.4.1 Vyšetření periferní krve (sérové biomarkery)**

##### **TRAF-1 (Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 1)**

Tento adaptorový protein se účastní proliferace, diferenciaci a přežití buněk (působí antiapopticky), je součástí E3 ubiquitin ligásového komplexu (podílí se např. na ubiquitinizaci MAP3K14). V séru pacientů s RCC ve srovnání se zdravými kontrolami byla prokázána jeho signifikantně zvýšená hladina (72).

##### **Heat Shock Protein 27 (Hsp27)**

Hsp27 patří mezi tzv. chaperony, což jsou proteiny nutné k formaci terciární struktury jiných proteinů. Pro jejich správnou funkci je totiž nutná jak primární struktura, tak ale i jejich prostorové uspořádání. Poruchy v terciární struktuře proteinů mohou vést jak k jejich snížení, tak i ke zvýšené aktivitě. Tento chaperon je zvýšeně exprimován za stresových podmínek (hypoxie, zánět). Můžeme ho prokázat jak v séru, tak v moči u pacientů s RCC. Jeho hladina byla signifikantně vyšší než u zdravých kontrol (73).

##### **TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Factor)**

TRAIL řadíme k proteinům rodiny TNF. Je schopen vázat se na 5 různých receptorů, které mají agonistické (např. TRAIL-R1/DR4) nebo antagonistické funkce (např. TRAIL-R3/DcR1/TRID). Hlavní funkcí TRAIL je indukce procesu apoptózy. Hladina tohoto proteinu je v séru pacientů s RCC ve srovnání s kontrolami snižena a má dle některých prací i prognostický charakter (74).

##### **M-65**

M-65 je solubilní část cytokeratinu 18 a představuje degradační produkt apoptózy a/nebo nekrózy. Předpokládá se, že by v budoucnu mohl sloužit jako prognostický a prediktivní faktor různých solidních nádorových onemocnění a jejich odpovědi na léčbu. Dle některých studií je zvýšený v séru u pacientů s RCC a má snad taktéž i prognostickou váhu (75).

##### **PHD3 (Prolyl Hydroxylasa-3)**

Tato hydroxyláza je jednou z mnoha proteinů nutných k hydroxylaci HIF, který je pak následně rozpoznán komplexem VHL a degradován. Její zvýšené hladiny nacházíme opět u pacientů s RCC ve srovnání se zdravými kontrolami (76).

##### **MiR-378 a miR-210**

Role miR-210 jako hlavní miRNA spjaté s hypoxickými ději byla zmíněna výše, miR-378 taktéž velmi složitě (převážně pozitivně) reguluje procesy angiogeneze, invazivity a proliferace. Fedorko a kol. prokázali, že signifikantně zvýšené sérové hladiny obou těchto miRNA nacházíme u pacientů s RCC, k jejich poklesu dochází po operaci primárního tumoru a dokonce, že jejich hladiny pozitivně korelují se stádiem onemocnění a DFS (disease-free survival) (77).

### **Cirkulující nádorové buňky (CTC, circulating tumor cells)**

Cirkulující nádorové buňky mohou být jak známkami metastazování, tak se ale zkoumá jejich diagnostická hodnota u RCC (kromě další role v hodnocení léčebné odpovědi). Systém CELLSEARCH® byl vyvinut k detekci a měření CTC, u pacientů s RCC však zatím narážíme na obecně nižší expresi cytokeratinu (8, 18+ a/nebo 19+) buňkami RCC, který je systémem CELLSEARCH® kromě jiných antigenů (např. EpCAM) využíván k detekci CTC (78).

### **5.4.2 Vyšetření moče (močové biomarkery)**

#### **NMP-22 (Nuclear Matrix Proteins-22 )**

Tento komplex proteinů je součástí struktury buněčného jádra a je důležitý pro replikaci. Sérová vyšetření PSA a močového NMP-22 byly schváleny FDA k diagnostice nádorů prostaty. Ukazuje se však, že hladina NMP-22 je v moči zvýšená i u pacientů s RCC (79).

#### **NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin)**

NGAL chrání matrixovou metaloproteinázu 9 (MMP-9) před degradací a zvyšuje její aktivitu, následně pak dochází k zvýšení difúze a invazivitě buněk (zánětlivých nebo nádorových). Jeho zvýšené hladiny nacházíme dle některých studií v moči u pacientů s RCC, dokonce může být spojena s vyšším gradem onemocnění (80).

#### **KIM-1 ( Kidney Injury Molecule-1)**

KIM-1 patří mezi transmembránový protein, jeho exprese je zvýšeně exprimována v proximálním tubulu ledviny při akutních, ale i chronických ischemiích, nebo po toxickém insultu ledviny. Kromě toho však jeho zvýšené množství v moči může znamenat přítomnost RCC (81).

#### **AQP-1 (Aquaporin-1) a PLIN2 (Perilipin 2)**

I tyto proteiny jsou přítomny v moči pacientů s RCC, výhodou obou těchto markerů je především skutečnost, že nejsou ovlivněny jinými nenádorovými onemocněními ledvin (glomerulonefritidy, infekce a jiné). Mohou též být ve vztahu s velikostí a gradem tumorů (82).

#### **piR-823 (PIWI-interacting RNAs, piRNAs)**

Jedná se o regulační RNA ovlivňující PIWI proteiny, které mají roli v diferenciaci zárodečných a kmenových buněk. Dle studie lieva a kol. je exprese piR-823 (PIWI-interacting RNAs, piRNAs) signifikantně snižena v nádorové tkáni pacientů s RCC při srovnání s nenádorovou renální tkání, koncentrace této piRNA v séru však není statisticky významně odlišná při srovnání pacientů s RCC a zdravých kontrol. Na druhou stranu však koncentrace piR-823 byla signifikantně vyšší v moči pacientů s RCC v porovnání se zdravými kontrolami ( $p=0,0157$ )(83).

### 5.5 Monitorace metastatického renálního karcinomu

Pacienti s mRCC se sledují na základě typu zvolené strategie léčby. Pokud se zvolí strategie watch and wait, je možné pacienta sledovat s frekvencí přešetření á 3-4 měsíce, po uplynutí dvou let je možné tento interval prodloužit na 6 měsíců i více (57). Jestliže pacienti dostávají cílenou léčbu nebo imunoterapii, provádíme přešetření příslušnými zobrazovacími metodami (nejčastěji CT vyšetření, možno však i MRI, PET/CT či UZ, není vyloučen ani prostý snímek plic) s frekvencí nejčastěji á 3 měsíce. Zatímco u cílené terapie musíme tuto léčbu při progresi onemocnění ukončit, u imunoterapie je vhodné provést kontrolní zobrazovací vyšetření k vyloučení pseudoprogrese onemocnění za 6-8 týdnů. Pokud se při tomto kontrolním vyšetření neprokáže další progrese onemocnění, je možné s imunoterapií pokračovat. Bylo totiž prokázáno, že tito pacienti z imunoterapie signifikantně benefitují ve srovnání s pacienty, kteří při první zjištěné progresi onemocnění v léčbě nepokračují (54,57,59). Validní laboratorní markery ke sledování účinnosti léčby mRCC nemáme k dispozici.

### 5.6 Vlastní příspěvek k problematice

Náš výzkum se soustředí především na miRNA a jejich regulátorů ve vztahu k diagnostice RCC, provádíme výzkum jak séra, tak také moče.

V první naší práci „**Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma**“ (příloha 11.5) (84) jsme zkoumali v první fázi studie expresní hladiny 667 miRNA v séru pacientů (pt) s RCC (15 pacientů) ve srovnání se zdravými kontrolami (12 pt), ve validační fázi studie jsem pak vybrané miRNA z první fáze analyzovali na větším souboru pacientů (RCC 90 pt, zdravé kontroly 35 pt). V první fázi jsme identifikovali celkem 30miRNA, který byly statisticky významně zvýšeně exprimovány v séru pacientů s RCC, 11 bylo sniženež exprimováno. Do druhé fáze jsme pak vybrali 3 miRNA k další analýze (miR-378, miR-451 a miR-150). Prokázali jsme, že miR-378 byla signifikantně zvýšeně exprimována u pt s RCC při srovnání se zdravými kontrolami ( $p=0,0003$ ), kdežto miR-451 byla sniženež exprimována u pt s RCC ( $p<0,0001$ ). Vyšetření sérových hladin těchto dvou miRNA je velmi slibné a předpokládá se jeho využití v budoucnosti (84).

V druhé naší práci „**Detection of let-7 miRNAs in urine supernatant as potential diagnostic approach in non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma**“ (příloha 11.6) (85) jsme analyzovali rodinu let-7 miRNA v močovém supernatantu. Zjistili jsme, že všichni členové

této rodiny miRNA (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e a let-7g) byly přítomny v moči v signifikantně zvýšených koncentracích ve srovnání se zdravými kontrolami. V následné ROC (Receiver Operating Characteristic) analýze jsme prokázali, že ze šesti členů rodiny let-7 miRNA je let-7a superiorní nad zbylými členy této rodiny k detekci RCC v moči a představuje tak další slibný marker v rámci neinvazivní diagnostiky (85).

## **6 Stanovení prognózy metastatického renálního karcinomu**

Prognostické faktory a z nich odvozené modely slouží k odhadu prognózy pacienta s mRCC a lepšímu cílení terapie, resp. u pacientů bez metastáz k přesnějšímu plánování vyšetření v rámci sledování. Jen zmíníme, že v rámci skupiny pacientů bez metastáz či bez lokálně pokročilého inoperabilního onemocnění využíváme nejčastěji dva systémy (UISS a SSIGN) (86,87). U pacientů s mRCC se používají různé prognostické systémy, do nedávné minulosti byl nejvíce užíván model dle MSKCC (Memorial Sloan Kettering Cancer Center), nově se však čím dále více užívá skorování dle IMDC (International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium)- viz dále. V budoucnu se však očekává začlenění především molekulárních prognostických faktorů do stávajících modelů. I přes veškeré nedokonalosti TNM klasifikace z roku 2009 a stanovení gradu nádorů dle Fuhrmanové stále platí, že tyto parametry jsou velmi úzce spjaté s prognózou pacientů s RCC (88,89).

### **6.1 Prognostické faktory a modely**

Motzer a kol. v roce 1999 představili prognostický model, který se týkal odhadu OS u pacientů s mRCC léčených IFN- $\alpha$ , tento model byl autorem aktualizován v roce 2002, 2004 a 2008 (rok 2008 byl érou cílené terapie, zde však stanovena pravděpodobnost 12ti měsíčního PFS) - jednotlivé faktory jsou v tab.č. 2 (90-93). Pacienti jsou dle počtu rizikových faktorů rozděleni do tří rizikových skupin (dobrá, střední a špatná prognostická skupina) s různými OS. V současné době se však častěji používá model dle IMDC, jednotlivé faktory tohoto modelu byly analyzovány na souboru pacientů léčených cílenou terapií a byly již mnohokrát externě validovány jak pro pacienty v první, tak ve vyšších liniích paliativní léčby, dokonce i pro pacienty s non-CCRCC- faktory. Odhady OS tohoto modelu jsou shrnuty v tab.č. 3 (94).

Tab.č. 2: Prognostické modely dle MSKCC 1999, 2002,2004 a 2008 (90-93):

MSKCC (1999), 3 skupiny (0...1+2...3 a více) (90)	MSKCC (2002), 3 skupiny (0...1+2...3 a více) (91)	MSKCC (2004), 3 skupiny (0...1...2 nebo 3 ) (93)	2008 pravděpodobnost 12-m PFS
KPS < 80%	KPS < 80%	KPS < 80%	ECOG PS 0 vs 1
			Hem < pod normu
Hem < pod normu	Hem < pod normu	Hem < pod normu	Kor.vápník> nad normu
			LDH>1,5xhorní hranice normy
Korig.vápník v séru> nad normu	Korig.vápník v séru> nad normu	Korig.vápník v séru> nad normu	Přít.nefrektomie
			Doba o diagnózy do léčby
LDH> 1,5 x horní hranice normy	LDH> 1,5 x horní hranice normy		Počet mts.míst
			Jaterní a/nebo plicní meta
Přítomnost či nepřítomnost nefrektomie	Doba od diagnózy do léčby IFN- α (< 1 rok)		Trombocytóza
			ALP > normu

Zkratky: MSKCC a LDH v textu; hem- hemoglobin, ECOG - Eastern Cooperative Oncology Group, PS- performance status, KPS- Karnofsky performance status

**Tab. č. 3: IMDC prognostický model (Heng a kol.) (94):**

Prognostické faktory	Rizikové skupiny	Medián OS	2 letý OS
1. KPS < 80% 2. Hem < norma 3. Korig.vápník v séru > nad normu	Skupina s dobrou prognózou (0 prognostických faktorů), 133 pt	nebyl dosažen	75%
4. Doba od diagnózy do léčby (< 1 rok) 5. Abs. počet neutrofilů > norma	Skupina se střední prognózou (1 nebo 2 faktory), 301pt	27 měsíců	53%
6. Trombocyty > norma	Skupina se špatnou prognózou (3a více faktorů), 152 pt	8,8 měsíců	7%

Z uvedených faktorů je patrné, že se jedná o klinické a laboratorní parametry pacientů s mRCC. Je pozoruhodné, jak tyto faktory (většinou jsou to známky agresivity onemocnění prostřednictvím prozánětlivého působení cytokinů a jiných stimulačních molekul) jsou validní v době imunoterapie a cílené terapie „šité“ na míru pacienta, bez ohledu na histologický podtyp RCC (39,95).

## 6.2 Moderní trendy ve stanovení prognózy

V zásadě se jedná o použití molekulárních tkáňových, sérových a močových faktorů, pomocí nich se snažíme upřesnit prognózu pacientů. Někteří autoři se snaží o jejich začleněných do výše uvedených prognostických modelů (96-98).

### 6.2.1 Tkáňové biomarkery

Vzhledem k významné roli porušené funkce proteinu VHL a z ní vyplývajících změn v hladinách HIF se předpokládalo, že míry exprese markerů těchto budou mít vztah k prognóze pacientů s RCC. Ukázalo se však, že studie zkoumající vliv přítomnosti poškozeného genu pro *VHL* jsou zatím rozporuplné, předpokládá se však, že jeho přítomnost znamená u pacientů s CCRCC v I.-III. stádiu prodloužení OS. Na druhou stranu je exprese HIF- $\alpha$  považována za jednoznačně negativní prognostický faktor u pacientů s CCRCC, OS je v mnoha studiích u pacientů s mRCC zkráceno při jeho vysoké expresi (99). Zvýšená exprese VEGF

bývá spojena s vyšším nukleárním gradem tumorů, zatímco u CCRCC studie neprokázaly jednoznačně vztah ke zkrácenému přežití, jiné je to u papilárního RCC, kde exprese VEGF byla pozitivně spojena s vyšším gradem nádorů, velikostí prima a hypervaskularitou (97). Role karbonické anhydrázy IX (CAIX) za hypoxických podmínek byla již zmíněna výše, je zajímavé, že její zvýšená přítomnost v tkáních RCC znamená, na rozdíl od jiných malignit, delší DFS a OS a vice versa u lokalizovaných nádorů. Pokud se u pacientů objeví metastázy RCC, dochází ke snížení exprese CAIX. V éře léčby pacientů s mRCC cytokiny (především IL-2) pak byla zvýšená exprese CAIX spojena s vyšším ORR (97, 100). Dalším zkoumaným markerem byl tumor-supresorový gen *p53*, při jeho zvýšené expresi se sice prodlužuje OS, ne však nádorově-specifická mortalita. Navíc jeho dynamika-zvyšující se exprese je signifikantně spojena s horší prognózou a vznikem metastáz (96, 97). Ligand B7-H1 je členem rodiny B7, tyto glykoproteiny mají velmi důležitou roli v modulaci imunitní odpovědi (ovlivněním T-buněk). Pacienti bez exprese B7-H1 měli signifikantně vyšší 5ti-leté nádorově specifické přežití a to i po adjustaci na TNM klasifikaci, grade tumorů a KI status (97). Protein p21 má důležitou regulační funkci v buněčném cyklu a apoptóze, u pacientů s lokalizovaným RCC byly jeho zvýšené hladiny spojené s delším přežitím, naopak u mRCC s kratším přežitím (97). Dále již jen zmíníme negativní prognostický vliv vysoké exprese genů pro Ki-67, MMP-2, MMP-9, vimentin, fascin, survivin, B7-H1 a například snížené exprese genu pro PTEN (99,101).

### 6.2.2 Sérové biomarkery

Potencionální prognostický význam sérových hladin TRAIL, M-65, miR-378 a miR210 byl již popsán výše, nyní ještě popíšeme další potencionální krevní/sérové faktory. Trombocytóza a neutrofilie jsou součástí prognostického modelu dle IMDC, oba jsou nezávislými prognostickými faktory zkracujícími OS pacientů s mRCC. Předpokládá se, že jejich množství je ovlivněno cytokiny, které přímo či nepřímo produkují nádorové buňky (94). Navíc je přítomnost neutrofilů intratumorálně spojena s kratším OS a nižším ORR (99). Vysoká hladina tohoto VEGF v periferní krvi byla v některých studiích spojena s kratším PFS a OS u pacientů s mRCC, i když jiné studie tyto závěry nepotvrdily. Předpokládá se i analytický problém, VEGF hladiny bývají totiž rozdílné v séru a plasmě (102-104). Sérový amyloid A je poměrně nespecifický marker (zvýšený je i u zánětů, poranění), zvýšené hladiny nacházíme u řady agresivních nádorových onemocnění, u RCC pacientů byla taktéž nalezena pozitivní korelace s kratším OS a jeho vysokou hladinou (105). Sérová a močová hladina CAIX koreluje s podtypy RCC (diference mezi CCRCC a non-CCRCC) a v některých studiích byl prokázán signifikantní stav mezi sérovou vysokou hladinou CAIX a zkráceným OS, vyšším stádiem onemocnění a větším primárním tumorem (106, 107). Jiné studie však tuto korelaci neprokázaly (108).

### 6.2.3 Močové markery

Možnost využití močových hladin NGAL, AQP-1, PLIN2, CAIX byla popsána v kapitole 5.4.2, z dalších jen uvedeme, že jsou v plánu studie k ověření prognostického vlivu močové hladiny NMP-22.

### 6.3 Vlastní příspěvek k problematice

V našich pracích jsme se soustředili na validaci známých prognostických faktorů a modelů na souboru pacientů s mRCC léčených v ČR, čerpali jsme jak z vlastního souboru pacientů v MOÚ, tak ale i z registru RenIS. V oblasti laboratorních markerů jsme pak analyzovali především korelace mezi hladinami různých miRNA a možnostech predikce mediánů PFS a OS.

V již zmíněné práci „**Epidemiologická a klinicko-patologická charakteristika pacientů s renálním karcinomem: analýza 544 případů z jednoho centra** „ (viz příloha 11.1.) (6) jsme při aplikaci IMDC prognostického modelu na pacientech s mRCC v MOÚ dosáhli podobných výsledků ohledně pravděpodobnosti 2-letého OS jako autoři tohoto modelu. V dobré prognostické skupině to bylo 76,1% (IMDC-75%) a ve střední pak 41,4% (IMDC- 53%) v rámci první linie léčby (6).

V práci „**Comparison of two prognostic models in patients with metastatic renal cancer treated with sunitinib: a retrospective, registry-based study**“ jsme na 495 pacientech léčených sunitinibem z registru RenIS porovnávali MSKCC prognostický model a IMDC model. Zjistili jsme, že oba modely jsou validní a použitelné na populaci našich pacientů. Model IMDC zpřesnil prognózu našich pacientů, více než 54% pt ze skupiny se špatnou prognózou a 20% pt ze skupiny se střední prognózou dle MSKCC byla překlasifikováno dle IMDC na skupiny s prognózou střední a dobrou. Po této změně se prodloužilo OS (v dobré prognostické, resp. střední prognostické skupině dle překlasifikovaného systému z MSKCC na IMDC: z 28,5 měsíce na 44,3 měsíce, resp. z 10,6 měsíců na 15,8 měsíce) (109).

Ve studii „**Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy**“ jsme prokázali, že zvýšená hladina miR-106b je typická pro tkáň RCC (ve srovnání s nenádorovou renální tkání, studie 38 pt) a navíc její zvýšená hladina signifikantně koreluje dobou do relapsu onemocnění (RFS, relaps free survival) ( $p=0,032$ ) (110). Tato miRNA tak představuje nadějný marker pro další výzkum v rámci odhadů prognózy pacientů s RCC.

V další podobné studii „**Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients**“ jsme analyzovali tkáň RCC pacientů bez relapsu RCC, s relapsem RCC a primárně metastatické pacienty (celkem 77 pt, bez relapsu-37 pt, s relapsem 22pt, s primárně mRCC-18 pt). Zjistili jsme, že statisticky významná korelace mezi RFS a snížené hladiny byla přítomna u těchto miRNA: miR-145 ( $p=0,05$ ), miR-126



( $p=0,015$ ) a miR-127-3p ( $p=0,014$ ). Hladiny těchto miRNA byly nejnižší u primárně metastazovaných pacientů (111). Spolu s miR-106b pak mohou být i tyto miRNA dále zkoumány v studiích jako slibné prognostické faktory umožňující např. přísnější follow-up pacientů po operaci RCC.

Role EMT v progresi a metastazování RCC byla již zmíněna. Je to nesmírně složitý děj s mnoha regulačními mechanismy. V práci „**Epithelial-mesenchymal transition-associated microRNA/mRNA signature is linked to metastasis and prognosis in clear-cell renal cell carcinoma**“ jsme analyzovali opět tkáň RCC (prima i metastázy, 230 pt), zkoumali jsme jak miRNA, tak ale i mRNA, které jsou spojeny s EMT. Studie byla rozdělena do tří fází (výzkumná, zkušební a validační), cílem bylo vytvořit prognostický model složený z různě exprimovaných miRNA a mRNA (up nebo down exprese). Výsledkem byl model složený z 5ti miRNA (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429 a miR-30a-3p; snížená exprese → horší prognóza) a 3 genů (CDH1, PAPSS2 a C3orf52; snížené exprese → horší prognóza), který umožnil rozdělení pacientů do skupiny nízkého a vysokého rizika se statisticky významně zkráceným OS ( $p<0,0032$ ), což v budoucnu opět může pomoci k modifikaci sledování pacientů po operaci RCC v rámci včasného podchycení relapsu (112). Na tuto práci jsme pak navázali výzkumem miR-429, která je zapojena do procesů EMT prostřednictvím především TGF- $\beta$ , který negativně ovlivňuje expresi E-cadherinu. Ztráta E-cadherinu je jedním z hlavních rysů EMT. V práci „**MiR-429 is linked to metastasis and poor prognosis in renal cell carcinoma by affecting epithelial-mesenchymal transition**“ byla její hladina snížena v tkáních RCC (prima i metastázy, dokonce v metastázách je více snížena než v primárním RCC) ve srovnání s nenádorovou renální tkání, a navíc její snížená hladina negativně koreluje se stádiem onemocnění (stádium I+II vs. III+IV.,  $p<0,0001$ ) a gradem dle Fuhrmanové (grade 1+2 vs. grade 3+4,  $p<0,0001$ ). Zvýšené hladiny této miRNA pak měli pacienti s delším DFS ( $p=0,0105$ ) a OS ( $p=0,002$ ). *In vitro* jsme pak prokázali, že renální nádorové buněčné linie 786-0 po transfekci miR-429 a následné aplikaci TGF- $\beta$  zvýšily hladiny E-cadherinu při srovnání s liniemi jen s TGF- $\beta$  ( $p<0,0001$ ) (113). Tedy i tato miRNA se jeví jako velmi nadějná pro další výzkum v rámci molekulárních prognostických faktorů.

Poslední prací, kde jsme zkoumali možné prognostické molekulární faktory, je „**Decreased expression levels of PIWIL1, PIWIL2, and PIWIL4 are associated with worse survival in renal cell carcinoma patients**“. Role proteinů PIWI byla již zmíněna výše, zde jen připomeneme, že patří do Argonautové rodiny a jsou schopné vázat piRNA (další regulační, nekódující RNA). Kromě toho, že jsme prokázali signifikantně nižší exprese proteinů PIWIL1 a piR-823 v nádorové tkáni oproti nenádorové renální tkáni ( $p<0,0001$  a  $p=0,0001$ ), tak jsme v další fázi této studie zjistili, že snížené exprese PIWIL1 ( $p=0,009$ ), PIWIL2 ( $p<0,0001$ ) a PIWIL4 ( $p=0,0065$ ) jsou spojeny s kratším OS a tedy horší prognózou pacientů s RCC. Exprese PIWIL2 a PIWIL4 se snižovala se zvyšujícím se gradem tumorů dle Fuhrmanové. Z uvedeného tedy vyplývá, že hladina rodiny proteinů PIWI je ve tkáních RCC snížena a tato suprese koreluje s agresivním chováním nádorů a horším přežíváním pacientů (114).

## 7 Terapeutické možnosti metastatického renálního karcinomu

Stále platí, že mRCC je onemocnění nevléčitelné, veškerá léčba je s paliativním záměrem. Pokud je toto onemocnění i ve fázi metastáz resektabilní, měla by se vždy zvážit metastazektomie. Je však nutno dodržovat kritéria, která se mírně liší dle různých odborných společností. V zásadě však platí, že by se tato operace měla doporučit pacientům s vizí totální resekce ložisek (RO resekce), při jejich omezeném počtu (liší se dle postižených orgánů), při postižení maximálně dvou orgánových systémů a u pacientů v dobrém klinickém stavu (KI 90-100%). Taktéž otázka cytoreduktivní nefrektomie není v éře moderní terapie mRCC stále vyjasněna, je třeba vyčkat výsledků prospektivních studií – SURTIME a CARMENA (115-116).

Až do roku 2005 byla systémová léčba mRCC vysoce paliativní s nízkým ORR, krátkými PFS a OS, u neúčinnějšího režimu dle Atzpodiena (kombinace cytokinů IL-2+ IFN- $\alpha$ -2a+ fluorouracil, někdy s retinoidy) se pohyboval ORR mezi 26-31% a pravděpodobnosti 2-letého, 5ti-letého a 13ti-letého přežití byly 45%, 16% a 9% (117). Režim to byl však velmi toxický, jen málo pacientů ho podstoupilo v dávkách uvedených v Atzpodienově studii. Pomocí vysokodávkovaného IL-2 (v minulosti používaný v Severní Americe) se u 5-10% pt dosáhlo dlouhodobé odpovědi trvající po mnoho let (medián RFS byl 54 měsíců u pacientů, kteří dosáhli CR a PR), režim se však v dnešní době, především pro toxicitu, považuje za obsoletní (118). Zlomem v léčbě mRCC se stal v ČR rok 2006, kdy jsme mohli začít používat standardně cílenou terapii- tyrozinkinázové inhibitory a mTOR inhibitory, které jsou schopny jak zvýšit ORR, tak i prodloužit PFS a OS našich pacientů ve srovnání s cytokiny.

### 7.1 Současná léčba metastatického renálního karcinomu

V současné době máme v ČR standardně k dispozici pro pacienty s mRCC v rámci první linie léčby tyto tyrozinkinázové inhibitory ovlivňující především signální kaskádu VEGF: sunitinib, pazopanib a dnes již málo indikovaný sorafenib. Kombinace bevacizumabu s IFN- $\alpha$  je taktéž málo používaná pro nutnost intravenozního (resp. subkutánního) podání a pro vyšší cenu této léčby. U pacientů ve špatné prognostické skupině dle MSKCC 2002 (nebo lépe dle Hudese 2007) je pak indikován mTOR inhibitor temsirolimus. V druhé linii paliativní léčby používáme standardně everolimus (mTOR inhibitor) nebo axitinib (tyrozinkinázový inhibitor) či sunitinib. Od roku 2017 máme již standardně dostupný k léčbě pro tyto pacienty checkpoint inhibitor nivolumab. Pokud je pacient v klinickém stavu umožňujícím podání třetí linie léčby, zvažujeme everolimus, nivolumab a sorafenib (po schválení léčby plátcem péče). Úhradu nového tyrozinkinázového inhibitoru kabozantinibu (2. linie léčby) teprve očekáváme (květen 2018). O tom, který z preparátů použijeme u konkrétního pacienta, rozhodují klinický stav a laboratorní parametry pacienta, jeho interkurence a přání (dle různého profilu nežádoucích účinků), možnosti potencionální operability ložisek, zkušenosti pracoviště a dostupnost studií s novými léky (účast pacienta v klinickém trialu není chybou v jakékoliv fázi mRCC). Cílená terapie by tak měla být především „šitá“ na míru konkrétního pacienta, je

nutné též dodržovat aktuální doporučení onkologických společností a podmínky plátce zdravotní péče (119-120).

### 7.1.1 Tyrozinkinázové inhibitory

Prvním preparátem ze skupiny TKI, který jsme měli v ČR k dispozici, byl sunitinib. Standardně je dostupný pro pacienty v dobré či střední prognostické skupině dle MSKCC v ČR od roku 2007. Jeho schválení bylo na základě studie III.fáze porovnávající účinnost sunitinibu u 750 pacientů s mRCC v první linii paliativní léčby proti IFN- $\alpha$ . Ve studii byl povolen cross-over, mediány PFS byly pak u sunitinibu vs. IFN- $\alpha$  11 měsíců vs. 5 měsíců ( $p < 0,001$ ), ORR pak 47% vs. 12% ( $p < 0,001$ ) a mediány OS pak 26,4 měsíců vs. 21,8 měsíce ( $p = 0,049$ ). Nebyly zaznamenány rozdíly v PFS a OS mezi testovanými preparáty u pacientů ve špatné prognostické skupině dle MSKCC (zde bylo však jen 48 pt). Sunitinib se tak na dlouho dobu stal zlatým standardem v léčbě mRCC (121).

Druhým TKI k dispozici byl od roku 2007 sorafenib, který se nyní již v léčbě mRCC nepoužívá, proto ho jen okrajově zmiňujeme bez bližšího komentáře.

V roce 2010 jsme pak mohli použít k léčbě pacientů s mRCC v dobré a střední prognostické skupině pazopanib, který získal svojí registraci na základě studie III.fáze, kde došlo ke srovnání pazopanibu vs. placebo jak u pacientů předléčených cytokiny, tak i u nepředléčených pacientů. Cross-over byl i v této studii povolen. Mediány PFS a OS byly u pazopanibu vs. placebo nepředléčených pacientů 9,2 měsíce vs. 4,2 měsíce ( $p < 0,0001$ ) a 22,9 měsíce a 20,5 měsíců ( $p = 0,224$ ), ORR byl pak 30% vs. 3% ( $p < 0,001$ ) (122). O tom, který z preparátů se má preferovat u pacientů v první linii léčby (sunitinib vs. pazopanib, sun vs. paz) se vedli dlouhodobé spory, data z prospektivních i retrospektivních studií však ukázala, že oba preparáty jsou ohledně účinnosti (ORR, PFS a OS) plně ekvivalentní, rozdíly jsou pouze v toxicitě. Tedy o indikaci daného preparátu by pak mělo být rozhodnuto na základě interkurencí pacienta, jeho stavu a přání, místem metastáz atd. (123).

Další možností léčby pacientů s mRCC je kombinace bevacizumabu s IFN- $\alpha$ , která prokázala svojí účinnost ve dvou prospektivních studiích III.fáze. Vyšší cena této kombinace a nutnost intravenózní aplikace bevacizumabu (resp. podkožní u IFN- $\alpha$ ) s nutností častějších návštěv pacientů v nemocničním zařízení však způsobily minimální indikování této terapie (123-125).

Ve druhé linii paliativní léčby můžeme, kromě níže uvedeného everolimu, použít axitinib, což je TKI „druhé generace“. Jeho registrace proběhla na základě studie AXIS, kde byl komparován se sorafenibem u pacientů s mRCC po selhání první linie léčby (sun, bev+IFN- $\alpha$ , temsirolimus nebo cytokiny). Do studie bylo zařazeno celkem 723 pacientů, mediány PFS a OS axitinibu vs. sorafenibu byly 6,7 měsíce vs. 4,7 měsíce ( $p < 0,0001$ ) a 20,1 měsíce vs. 19,2 měsíce ( $p = 0,3744$ ), ORR pak byly 19,4% vs. 9,4% ( $p = 0,0001$ ) (126).

### 7.1.2 mTOR inhibitory

V první linii léčby u pacientů ve špatné prognostické skupině dle Hudese se dle indikačních omezení plátce používá temsirolimus a to na základě registrační studie III.fáze, kde se porovnával temsirolimus samotný vs. temsirolimus v kombinaci s IFN- $\alpha$  vs. samotný IFN- $\alpha$ . Do studie bylo zařazeno celkem 623 pacientů, prokázalo se, že temsirolimus statisticky významně prodlužuje PFS a OS ve srovnání s IFN- $\alpha$  (PFS- 5,5 měsíce vs. 3,1 měsíce a OS- 10,9 měsíce vs. 7,3 měsíce) a stal se tak standardem v ČR pro pacienty ve špatné prognostické skupině (127). Postupem doby se ukázalo, že u této prognosticky nepříznivé skupiny jsou účinné i pazopanib a sunitinib, ty však v této indikaci nemají v ČR úhradu ze zákonného zdravotního pojištění (57).

Everolimus je indikován pro pacienty ve druhé a vyšší linii cílené terapie na základě prospektivní randomizované studie fáze III RECORD-1, kdy byl srovnáván s placebem. Medián PFS byl v celé studiové populaci 4,9 měsíce u everolimu a 1,9 měsíce u placeba ( $p < 0,001$ ). Mediány OS pak byly 14,8 měsíce, resp. 14,4 měsíce- rozdíly nebyly statisticky významné ( $p = 0,162$ ; cross-over byl ve studii povolen, došlo k němu u 80% pacientů randomizovaných do ramene s placebem). Je potřeba si však uvědomit, že do studie byli zařazeni pacienti, kteří dostávali studiovou léčbu v 2. až 5.linii! Jen 89 pacientů (z celkových 410) dostalo everolimus v druhé linii léčby. Pacienti, kteří byli předlčeni jen jednou linií cílené terapie ze skupiny tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) faktoru VEGF, měli PFS 5,4 měsíce vs. 1,9 měsíce u placeba ( $p < 0,001$ ). ORR v této studii byly u everolimu 1,8% a DCR 68,2% (DCR- disease control rate=RR+SD), kdežto u placeba to bylo 0% a 32,4% (128).

Ve třetí linii léčby, kterou má jen 10-20% pacientů s mRCC, můžeme standardně indikovat everolimus či v indikovaných případech sorafenib, není ani vyloučena možnost reindukce již použitým TKI (po schválení plátcem zdravotní péče) (123).

Zjištění superiority určité sekvence léčby (tedy TKI-TKI-mTORi vs. TKI-mTORi-TKI) je předmětem mnoha studií, data jsou zatím nejednoznačná (129).

### 7.1.3 Imunoterapie

Od roku 2017 můžeme pro pacienty s mRCC ve druhé nebo třetí linii léčby po selhání dvou TKI (ne mTORi) standardně použít checkpoint inhibitor nivolumab. Registraci tento preparát získal na základě studie III. fáze (CHECKMATE-025), kde se srovnával nivolumab a everolimus u pacientů s mRCC v rámci druhé, nebo třetí linie léčby. Stratifikace pacientů (410 pt) proběhla dle prognostických skupin dle MSKCC (2004), geografického původu a počtu předchozích linií léčby. Celkové přežití v rámci 26 měsíčního follow-up v rameni s nivolumabem (nivo) bylo 26 měsíců, v rameni s everolimem (eve) pak 19,7 měsíce ( $p = 0,0006$ ), mediány PFS se nelišily (4,6 měsíců u nivo vs. 4,4 měsíce u everolimu;  $p = 0,11$ ). ORR byl statisticky signifikantně vyšší u nivo (25%) než u eve (5%) ( $p < 0,001$ ). Neprokázala se souvislost mezi OS a expresí PD-L1. Bylo však prokázáno, že medián OS pt léčených i přes

progresi onemocnění je signifikantně delší než u pacientů neléčených přes progresi onemocnění: 28,1 měsíce vs. 15 měsíců ( $p < 0,001$ ). Pravděpodobnosti jedno a dvou letého přežití pacientů ve studii CHECKMATE- 025 jsou 76% a 52% (u eve 67% a 42%) (54).

#### 7.1.4 Moderní trendy v léčbě

Tuto kapitolu uměle rozdělíme na dvě části, v první části zmíníme novinku v cílené terapii inhibující různé kinázy signálních drah, v druhé pak kombinace cílené terapie s imunoterapií.

Z mnoha nadějných preparátů ze skupiny cílené léčby, které se nyní zkouší v léčbě u mRCC (dovitinib, foretinib, sapaniserb, serabesilip) popíšeme kabozantinib, který již získal registraci v Evropské unii pro pacienty s mRCC ve druhé a třetí linii paliativní léčby, na úhradu v ČR stále čekáme. Jedná se o nový tyrozinkinázový inhibitor, který však, kromě mnoha kináz signální dráhy VEGF, inhibuje také dráhy AXL a MET. V nedávných studiích bylo prokázáno, že zvýšenou expresí genů AXL a MET nacházíme u pacientů ve špatné prognostické skupině dle MSKCC, ale též k ní dochází pod vlivem dlouhodobé léčby sunitinibem a může tak být důvodem sekundární rezistence na tento lék. Jedná se tedy o alternativní dráhy, kterými nádorová tkáň překonává lékem navozenou inhibici receptoru pro VEGF. Na xenograftech tkání rezistentních na sunitinib byla opakovaně prokázána zvýšená exprese AXL a MET při srovnání s xenografy citlivých na sunitinib. Vše je zřejmě řízeno nekodujícími sekvencemi RNA (130). Kabozantinib prokázal svoji účinnost ve studii III.fáze (METEOR), kde se srovnala účinnost a bezpečnost tohoto preparátu s everolimem. Většina pacientů měla jednu předchozí linii léčby VEGFRi- 71% pt, 29% mělo dvě a více linií léčby. Mediány PFS byly u kabozantinibu 7,4 měsíce, u everolimu 3,9 měsíce ( $p < 0,001$ ), mediány OS pak byly 21,4 měsíce vs. 16,5 měsíce ( $p = 0,00026$ ). U kabozantinibu a everolimu nebyla zaznamenána ani jedna CR, PR pak dosáhlo 24% pt vs. 4% pt, SD byla zaznamenána u 63% pt vs. 63% pt. Kabozantinib byl účinný napříč rizikovými skupinami pacientů dle MSKCC, bez ohledu na lokalizaci metastáz (efektivní i u pt s kostními metastázami- prognosticky nepříznivý faktor) (131). Z výše uvedených dat se nabízela možnost studie kabozantinibu v první linii mRCC, první data pak přinesla studie CABOSUN. Kabozantinib byl porovnáván se sunitinibem v rámci první linie léčby u pacientů ve špatné a střední prognostické skupině. Kabozantinib při srovnání se sunitinibem signifikantně prodloužil PFS (8,2 měsíce vs. 5,6 měsíce,  $p = 0,012$ ) a ORR byl také vyšší u pacientů s kabozantinibem (20% vs. 9%). Mediány OS pak byly 26,2 měsíce vs. 21,2 měsíce- zatím bez statisticky významného rozdílu při mediánu sledování 20,8 měsíce ( $p = 0,29$ ) (132). Jednalo se o studii II. fáze, uvidíme tedy, zda v budoucnu pronikne tento lék s naprosto jedinečným mechanismem účinku i do první linie léčby.

Imunoterapie checkpoint inhibitory v současné době proniká prakticky do všech onkologických diagnóz, zkouší se jak v paliativních režimech, tak i v adjuvantních. U mRCC se testuje především kombinace různých checkpoint inhibitorů (nivolumab a ipilimumab), ale i kombinace anti-PD-1/PD-L1 protilátek s cílenou terapií. Níže popíšeme jen nejnadějnější kombinace, které se nyní zkouší ve studiích různých fází u pacientů s mRCC.

Kombinace nivolumabu a ipilimumabu prokázala svojí účinnost ve studii I.fáze (CHECKMATE 016), proto byla tato kombinace porovnávána ve studii III.fáze se sunitinibem (CHECKMATE 214) u 550 pacientů s mRCC v první linii léčby. U pacientů ve střední nebo špatné prognostické skupině (dle IMDC) byl ORR 41,6% u kombinace vs. 26,5% u sunitinibu ( $p < 0,0001$ ), mediány PFS pak byly 11,6 měsíce vs. 8,4 měsíce ( $p = 0,03$ ) a medián OS pak nebyl zatím dosažen u kombinace vs. 26,0 měsíce ( $p < 0,0001$ ) u sunitinibu. Ve studii se dále prokázalo, že kombinace není účinnější než sunitinib u dobré prognostické skupiny pacientů a že kombinace je účinnější, pokud je přítomna zvýšená exprese PD-L1  $\geq 1\%$  (133-134).

Další nadějnou kombinací je bevacizumab s atezolizumabem, ve studii fáze II (IMMOTION 150) došlo ke srovnání atezolizumabu (atezo) v monoterapii vs. atezolizumabu v kombinaci s bevacizumabem vs. sunitinibu u 305 nepředléčených pacientů s mRCC. Mediány PFS byly u kombinace atezo+bev vs. sunitinib 11,7 měsíce vs. 8,4 měsíce ( $p = 0,982$ ), ORR 32% vs. 29%. U pacientů s expresí PD-L1  $\geq 1\%$  pak byly mediány PFS 14,7 měsíce vs. 7,8 měsíce ( $p = 0,095$ ), ORR však byl 46% vs. 27%. Při srovnání pacientů s expresí PD-L1  $\geq 10\%$  bylo HR pro PFS v ramenech bev+atezo vs. sunitinib 0,23. Kombinace atezo+bev vs. sunitinib je nyní zkoumána ve studii III. fáze u nepředléčených pacientů s mRCC (IMMOTION 151, NCT02420821) (54). Axitinib s anti-PD-1 protilátkou pembrolizumabem byly testovány ve studii fáze I u 52 nepředléčených pacientů s mRCC. CR byla dosažena u 5,8% pt, PR mělo 65,4% pt, SD pak 19,2% pt, kontrola onemocnění byla tedy přibližně 90%! Opět v současné době probíhá studie III. fáze porovnávající účinnost sunitinibu vs. axitinibu+pembrolizumabu u nepředléčených pt s mRCC (KYENOTE-426, NCT02853331). Další kombinaci představuje axitinib s avelumabem (humánní anti-PD-L1 protilátka)- studie JAVELIN Renal 100 (NCT02493751, fáze I). Do studie bylo zařazeno 55 nepředléčených pt s mRCC: CR byla dosažena u 5,5% pt, PR u 52,7% pt, SD pak u 20% pt, progresse onemocnění byla přítomna u 18,2% pt, tedy kontroly onemocnění dosáhlo 78,2% pt. Odpovědi byly opět dlouhodobé, zvýšená exprese PD-L1  $\geq 1\%$  nebo  $\geq 5\%$  ale neměla vliv na počet odpovědí. Na základě těchto dat nyní taktéž probíhá studie fáze III, srovnává se sunitinib s avelumabem+axitinibem (JAVELIN Renal 101, NCT02684006). Velmi nadějně se jeví též studie kombinující kabozantinib + nivolumab s/nebo bez ipilimumabu (NCT02496208), dále lenvatinib + pembrolizumab. Lenvatinib+pembrolizumab ve studii fáze Ib/II dosáhly u pacientů s předléčeným mRCC 100% kontroly onemocnění, z toho 50% pt mělo PR. Nyní běží studie III. fáze testující kombinaci lenvatinib+pembro vs. sunitinib vs. lenvatinib+everolimus u nepředléčených pacientů s mRCC (NCT02811861) (135-137).

Je samozřejmě otázkou, zda výše uvedené kombinace najdou uplatnění v klinické praxi, nezmínili jsme totiž jejich poměrně velkou toxicitu a finanční nákladnost.

### **7.1.5 Predikce léčebné odpovědi**

Bohužel v současné době nemáme jediný dostatečně validní prediktivní faktor v rámci léčby mRCC. Výsledky studií zkoumající různé laboratorní a histopatologické markery jsou většinou

rozporuplné, klinické a laboratorní markery (nejčastěji nežádoucí účinky léčby) představují velmi dobré vodítko pro další vedení léčby, ale odhad jejich vzniku před nasazením léčby není samozřejmě možný, tedy se nejedná o skutečné prediktivní faktory (sloužící k rozhodnutí, zda a kterou léčbu nasadit u konkrétního pacienta).

Z mnoha zkoumaných sérových a/nebo tkáňových prediktivních faktorů zmíníme expresi PD-L1 v nádorové tkáni. Výše uvedené studie (v odstavci o moderních trendech léčby) sice přinesly rozporuplné výsledky ve statistické významnosti vztahu míry exprese PD-L1 a predikce odpovědi na léčbu checkpoint inhibitory, přesto často pozorujeme zvýšení ORR a prodloužení PFS s OS u pacientů s mRCC a vyšší expresí PD-L1 (PD-L1 exprese  $\geq 1\%$ , nejvíce pak u  $\geq 5\%$ ) v mnoha klinických trialech (IMMOTION, JAVELIN, CHECKMATE 214) (54). Problémy zřejmě přináší technika a kvantifikace vyšetření exprese PD-L1, svojí roli má i lokalizace vyšetřované části nádorové tkáně, např. primum vs. metastáza, lokalita v primu (RCC je silně heterogenní) a metastáze (uzlina- okraj nádorové uzliny vs. její centrum) (138). Další laboratorní a histopatologické parametry, jako např. hladina (a změny) VEGF, HIF- $\alpha$ , IL-8, osteopontinu a HGF, prokázaly v některých studiích, že mají určité prediktivní hodnoty, do běžné praxe se však nedostaly (139).

Nežádoucí účinky cílené léčby jako např. výskyt arteriální hypertenze, hypothyreózy, leukopenie či hand-foot syndrom mají prokazatelně u různých preparátů prediktivní význam (140-145). Problémem je, že se jedná o prediktivní faktory vyskytující se až po nasazení léčby, tedy neumožňují odhady efektivity léčby u určitých pacientů před jejím zahájením. Na druhou stranu se jedná o velmi jednoduchá vodítka, jak moc být intenzivní v léčbě těchto nežádoucích účinků a „udržení“ pacienta na léčbě daným preparátem ve vyšších dávkách.

## **7.2 Vlastní příspěvek k problematice**

V našich analýzách jsme se soustředili na validaci klinických výstupů (efektivita léčby, toxicita, atd.) z nejrůznějších studií (prospektivních i retrospektivních) na běžné populaci pacientů v ČR, zkoumali jsme jak neselektovanou populaci pacientů s mRCC, tak i specifické skupiny pacientů (starší pacienti, s renální insuficiencí). Díky registru RenIS jsme měli mimořádnou možnost retrospektivního testování účinnosti jednotlivých preparátů a jejich nejrůznějších sekvencí, efektů léčby ve vztahu k přežití v různých liniích terapie a ověření účinnosti prognostických modelů v éře cílené terapie na velkých počtech pacientů. Zkoumali jsme i případné vztahy nežádoucích účinků léčby a přežití. Díky spolupráci s vědeckým centrem CEITEC jsme provedli analýzu hladin miRNA a predikci léčebné odpovědi.

### **7.2.1 Klinické studie a reálná praxe**

Prospektivní studie jsou pro klinickou praxi nenahraditelné, úspěch studií III. fáze často vede k registraci preparátu s jeho následným používáním v reálné praxi. Problémem je však studiová populace pacientů, vstupní kritéria studií vedou velmi často k selekci pacientů, náročnost studie (vyšší počty návštěv v nemocničním zařízení, častější odběry, atd.) pak

může i u lékaře řešícího studii způsobit vyřazení pacienta ze screeningu pro předpokládanou sníženou compliance. Ve vyspělých zemích se jen 2% pacientů s onkologickým onemocněním dostane do klinických studií. Navíc současná terapie TKI pacientů s mRCC je lépe tolerována než chemoterapie, což v běžné praxi vede k její častější indikaci i u pacientů starších, s více interkurencemi a např. i s více pokročilým onemocněním (146). V roce 2015 byla publikována velmi zajímavá studie, popisující rozdíly pacientů s mRCC z „běžné praxe“ proti pacientům, kteří se zúčastnili registračních studií TKI a mTORi. Prokázalo se, že pacienti z běžné praxe jsou proti studiovým pacientům starší průměrně o 4,1 roku ( $p < 0,001$ ), mají vyšší pravděpodobnost 3 a více metastatických míst (17,1% vs. 10,1%) a jejich ECOG je častěji zhoršený (to znamená ECOG  $> 1$ , 11,1% vs. 0,6%,  $p < 0,001$ ). Dále bylo zjištěno, že pacienti z běžné praxe byli častěji ve špatné prognostické skupině dle MSKCC (7,4% vs. 2,9%,  $p < 0,001$ ) a méně často v dobré prognostické skupině (43,8% vs. 30,6%,  $p < 0,001$ ) (147). Z uvedeného vyplývá, že jsou dvě možnosti jak ověřit účinnost nových preparátů na běžné populaci onkologických pacientů. První je „změkčení“ vstupních kritérií studií (což ale není v praxi možné), druhou je pečlivý sběr dat o pacientech z běžné klinické praxe léčených moderní terapií a jejich následná analýza a hodnocení (což je náš přístup).

V naší již zmíněné práci „ **Patients with advanced and metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the Czech Republic: twenty cancer centres, six agents, one database**“ (příloha 11.2) (7) jsme kromě jiného provedli srovnání mediánů PFS pacientů s mRCC z klinické praxe (zdroj dat: registr RenIS, jednalo se o pacienty léčené od roku 2007 do roku 2011 (7)). V tabulce číslo 4 jsou výsledky naší studie (uvádíme však výsledky dvou nejčastěji používaných preparátů- sunitinibu a pazopanibu). Ukázalo se, že mediány PFS neselektované populace jsou velmi podobné jako v registračních studiích, u sunitinibu jsme ještě provedli dopočet OS a ORR a i tyto byly velmi podobné jako v registrační studii. V podobně koncipované práci jsme ještě analyzovali efektivitu a toxicitu pazopanibu, opět na neselektované populaci pacientů s mRCC (zdroj dat: registr RenIS), jednalo se o práci „**Pazopanib for Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Registry-based Analysis of 426 Patients**“ (příloha 11.7, tab.č. 4) (148). Zatímco mediány PFS v naší a registrační studii jsou podobné, medián OS byl v běžné populaci delší. Na druhou stranu v jiné studii III. fáze s pazopanibem (COMPARZ) byl medián OS 28,4 měsíce, což se více blíží našemu OS (33,2 měsíce) (149). Závěrem můžeme tedy konstatovat, že efektivita sunitinibu a pazopanibu u pacientů v běžné klinické praxi jsou přinejmenším srovnatelné jako s pacienty z prospektivních studií III.fáze. Zde ještě dodáme, že jsme v našich studiích zkoumali i toxicitu léčby, zde však narážíme na možnou podhlášenost v registru, na druhou stranu jsme nezaznamenali větší počty závažné (stupeň 3 anebo 4 dle CTCAE, Common Terminology Criteria for Adverse Events) či neočekávatelné toxicity (7,148, 150). Dalším výstupem obou našich studií je průkaz lepšího přežívání pacientů při cílené léčbě, pokud jí předcházela nefrektomie (7,148).



**Tab.č. 4: Srovnání mediánů PFS, OS a ORR z RenIS a z registračních studií (7, 121-122, 148):**

	Mediány PFS RenIS (7, 148)	Mediány OS RenIS (7, 148)	ORR RenIS (7, 148)	Mediány PFS registrační studie (121-122)	Mediány OS registrační studie (121-122)	ORR registrační studie (121-122)
<b>Sunitinib</b>	<b>10,0 m</b>	<b>28,5 m</b>	<b>27,1%</b>	<b>11,0 m</b>	<b>26,4 m</b>	<b>47%</b>
<b>Pazopanib</b>	<b>12,9 m</b>	<b>33,2 m</b>	<b>22,5%</b>	<b>9,2 m</b>	<b>22,9 m</b>	<b>30%</b>

m- měsíce, ostatní zkratky v textu

Druhá linie paliativní léčby taktéž doznala za posledních 10 let velkých změn, před rokem 2006 prakticky neexistovala, v současné době máme standardně tři (everolimus, axitinib a nivolumab) a brzy očekáváme čtyři léčebné možnosti (kabozantinib). Bylo opakovaně prokázáno, že z původních 100% pacientů majících první linii léčby, se dostane k druhé resp. ke třetí linii léčby jen 50% resp. 10-25% z nich (151). Je zřejmé, že studioví pacienti ve studiích zkoumajících preparáty ve vyšších liniích jsou velmi selektováni, proto nás zajímalo jejich srovnání s běžnou populací.

V první naší práci „**Efficacy of everolimus in second- and third-line therapy for metastatic renal cell carcinoma: a registry-based analysis**“ (příloha 11.8) (151) jsme prokázali, že mediány PFS u everolimu podaného v druhé (po jednom TKI) nebo třetí linii léčby (po dvou TKI) jsou v populaci pacientů z RenIS stejné (6,1 měsíce) a jsou tak plně srovnatelné s registrační studií RECORD-1 (PFS po jednom TKI 5,4 měsíce, po dvou TKI 4,0 měsíce) (151, 128). Taktéž jsme prokázali, že medián PFS TKI v první linii (cut-off 10 měsíců) statisticky významně ovlivňuje medián PFS everolimu v druhé linii ( $p=0,019$ ), tato souvislost se však neprokázala u PFS everolimu ve třetí linii léčby ( $p=0,426$ ). Jak se očekávalo, prokázali jsme signifikantní vztah mezi PFS a OS everolimu ve druhé i třetí linii léčby (např. pokud byl PFS everolimu ve třetí linii léčby  $\geq 6$  měsíců, byl OS 29,9 měsíce, pokud byl  $< 6$  měsíců pak OS byl pouze 8,2 měsíce,  $p < 0,001$ ) (151). PFS se tak z tohoto pohledu jeví jako hodnotný primární cíl (endpoint) pro studie zkoumající vyšší linie paliativní léčby mRCC.

Další naší prací byla „**Efficacy and tolerability of axitinib in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Comparison of Czech clinical registry and AXIS trial data**“ publikována formou posteru na konferenci ESMO 2015 (ESMO, European Society for Medical Oncology) (152). Jednalo se opět o retrospektivní analýzu pacientů z RenIS zkoumající PFS a ORR axitinibu po selhání sunitinibu. Medián PFS byl 6,2 měsíce, ORR 15%. V registrační studii AXIS byly medián PFS 4,7 měsíce a ORR 19,4%, lepší výsledky PFS mohou být způsobeny delším intervalem v přeshetřeních v běžné praxi, medián OS nebyl v naší práci pro krátký follow-up hodnocen (126, 152).

Poslední prací, kterou bychom v rámci druhé linie paliativní léčby zmínili, je „**Utilization and efficacy of second-line targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma: data from a national registry**“, kde jsme provedli analýzu efektivity různých preparátů (everolimus, sunitinib a sorafenib) podávaných u pacientů v ČR s mRCC (153). Zjistili jsem, že nejsou rozdíly v mediánech PFS a OS u výše uvedených preparátů (viz tab.5) a že existuje statisticky významná korelace mezi PFS TKI v první linii a OS v druhé linii jen u everolimu, ne u sunitinibu a sorafenibu (cut-off PFS první linie 9 měsíců,  $p < 0,001$ ). Taktéž jsme prokázali pozitivní vztah mezi PFS první linie a PFS druhé linie opět jen u everolimu ( $p < 0,001$ ). Dále jsme validovali MSKCC kritéria a IMDC kritéria pro naši kohortu pacientů. Ukázalo se, že tyto prognostické modely jsou použitelné i v druhé linii léčby (153). V tabulce číslo 5 jsou uvedeny PFS, OS a ORR zkoumaných preparátů se srovnáním s prospektivními studiemi (RECORD-1, SWITCH-1 a RECORD-3)(128, 154, 155). Výsledky ukazují, že nejsou velké rozdíly v přežívání a efektivitě léčby mezi studiovými a nestudiovými pacienty.

**Tab.č. 5: Srovnání mediánů PFS, OS a ORR z RenIS a z prospektivních studií (128, 153-155):**

	ORR RenIS (153)	ORR prospektivní studie (128, 154)	Mediány PFS RenIS (153)	Mediány PFS prospektivní studie (128, 154)	Mediány OS RenIS (153)	Mediány OS prospektivní studie (155, 154)
<b>Everolimus</b>	<b>6,7%</b>	<b>1,8%</b>	<b>6,3m</b>	<b>5,4m</b>	<b>37,2m*</b>	<b>29,5m</b>
<b>Sunitinib</b>	<b>9,9%</b>	<b>17%</b>	<b>5,8m</b>	<b>5,4m</b>	<b>31,8m<sup>1</sup></b>	<b>31,5m</b>
<b>Sorafenib</b>	<b>12,1%</b>	<b>6,6%</b>	<b>5,7m</b>	<b>2,8m</b>	<b>32,7m<sup>2</sup></b>	<b>30,2m</b>

m- měsíce, \* výsledek sekvence jen sun-eve!, <sup>1</sup> výsledek jen sekvence sor-sun!, <sup>2</sup> výsledek jen sekvence sun- sor!, ostatní zkratky v textu

Sekvence léčby třemi preparáty, resp. pořadí léčby (TKI-mTORi-TKI vs. TKI-TKI-mTORi), byla a je stále předmětem mnoha bouřlivých diskuzí. V budoucnu se situace stane mnohem komplikovanější s rychlým nástupem imunoterapie a nových kombinací léčby. Některé naše práce, týkající se analýz sekvence, byly již zmíněny výše. Studie, kde jsme provedli analýzu sekvencí tří preparátů byla již citovaná: „**Efficacy of everolimus in second- and third-line therapy for metastatic renal cell carcinoma: a registry-based analysis**“ (příloha 11.8) (151). Velmi zajímavými výstupy zde byly mediány totálního PFS u pacientů se sekvencí TKI-TKI-mTORi, resp. TKI-mTORi-TKI, jednalo se o 28,3 měsíce, resp. 31,3 měsíce ( $p=0,16$ ) a následné výsledky mediánů OS u pacientů, kteří byli schopni dostat 3 linie léčby: 44,4 měsíce vs. 58,7 měsíce (!) ( $p=0,52$ ). Je samozřejmě otázkou, na kolik se na těchto výborných výsledcích účastní i vlastní biologie nádorů (řada pacientů v této kohortě má velmi dlouhý OS po progresi na třetí linii léčby, aniž by dostali další linii terapie). Závěrem naší práce bylo, že

nejsou statisticky významné rozdíly v přežití pacientů užívajících sekvenci TKI-TKI-mTORi nebo TKI-mTORi-TKI. Naproti tomu studie Iacovelliho a kol. přinesla poněkud rozdílné výsledky (156). Ukázalo se, že medián OS byl statisticky významně prodloužen ve skupině pacientů dostávající sekvenci TKI→TKI→mTOR oproti pacientům s TKI→mTOR→TKI (50,7 měsíce proti 37,8 měsíce,  $p = 0,004$ ), rozdíly v celkovém PFS však nedosáhly potřebné hladiny významnosti (36,5 měsíce vs. 29,3 měsíce,  $p=0,059$ ) (156). U interpretací všech retrospektivních studií je třeba opatrnosti, například Iacovelliho studie trpí časovým biasem (systémová chyba), everolimus byl v Itálii dostupný teprve od roku 2010. K everolimu se tak dostali i dlouho přežívající pacienti na sekvenci TKI→TKI. Pokud však došlo u pacientů s TKI→TKI k progresi onemocnění před rokem 2010, nebyli tito pacienti do studie zařazeni. Srovnání výsledků naší studie a Iacovelliho uvádíme v tab.č. 6 (151, 156).

**Tab.č. 6: Srovnání mediánů PFS, OS a ORR z RenIS a ze studie Iacovelliho (151,156):**

	Medián tPFS RenIS (151)	Medián tPFS Iacovelli a kol. (156)	Medián tOS RenIS (151)	Medián tOS Iacovelli a kol. (156)
<b>TKI-TKI-mTORi</b>	<b>28,3m</b>	<b>36,5m</b>	<b>44,4m</b>	<b>50,7m</b>
<b>TKI-mTORi-TKI</b>	<b>31,3m</b>	<b>29,3m</b>	<b>58,7m</b>	<b>37,8m</b>

m- měsíce, t-totální, ostatní zkratky v textu

Dosažení kompletní remise při léčbě diseminovaného onkologického onemocnění je vždy velkým úspěchem, který však trvá různě dlouhou dobu a u žádné diagnózy není jasné, jak v těchto případech postupovat, tedy zda je možné léčbu přerušit, nebo zda je nutné se stávající léčbou pokračovat. U mRCC není taktéž v době užívání TKI zřejmé, zda je možné v případě CR terapii přerušit a pacienta ušetřit nežádoucích účinků léčby bez rizika následné akcelerace onemocnění. Tuto situaci jsme analyzovali v práci „**Outcomes for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Achieving a Complete Response on Targeted Therapy: A Registry-based Analysis**“ (příloha 11.9) (157). Jednalo se o analýzu 100 pacientů z registru RenIS (celkem 2803 pacientů v době analýzy, tedy CR u 3,6% z nich), kteří při léčbě inhibitory VEGF (nejčastěji sunitinibem, další léčbou byly sorafenib, pazopanib a bevacizumab s IFN- $\alpha$ ) dosáhli kompletní remise, pacienti s CR dosaženou operací byly z naší studie vyloučeni. Zjistili jsme, že medián dosažení CR byl 10,1 měsíce, medián PFS od začátku léčby byl pak 3,8 roku a 5ti-letý OS 85%. Dále jsme zkoumali, zda přerušení léčby do 1 měsíce od dosažení CR má vztah na PFS a OS ve srovnání s pacienty, kteří pokračovali v zavedené terapii. Nenašli jsme rozdíly v PFS a OS u pacientů s pokračující léčbou a s přerušenu léčbou (95% CI rozdílu v 2-letého OS po CR byl 13-19%,  $p=0,3$ ; 95% CI rozdílu v 2-letém PFS po CR 29%-17%,  $p=0,7$ ). Zajímavé bylo, že jsme neprokázali vztah mezi PFS a OS a vstupním skorováním dle MSKCC (dobrá vs. střední/špatná prognostická skupina,  $p=0,6$  a  $p=0,4$ ). Závěrem můžeme konstatovat, že přerušení léčby po dosažení CR (v naší studii s mediánem 10 měsíců) není

chybou, přežívání pacientů se nezmění a především umožní rekonvalescenci pacientů po náročné léčbě TKI, i když jednoznačně by se tento závěr prokázal jen v prospektivní studii. Dále jsme zkoumali, jaké jsou výsledky přežití pacientů s přerušenu léčbou při zjištěné progresi onemocnění, 14 pacientů mělo zaznamenanou progresi (4 pt dostali opět sunitinib, 10 pt jinou léčbu) a jejich další PFS pak byl 14,5 měsíce, což je při srovnání s PFS pacientů bez dosažené CR 2-3 násobek (!). Náš soubor pacientů s CR byl jeden z největších celosvětově, limitacemi naší práce pak jsou retrospektivních charakter studie s možným bias, řada pacientů navíc přerušila léčbu po stanoveném intervalu 1 měsíce od dosažené CR, což mohlo ovlivnit naše výsledky (157).

Podobnou studií je pak „**Outcomes of Patients With Long-Term Treatment Response to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy for Metastatic Renal Cell Cancer.**“ (příloha 11.10) (158). Analyzovali jsme 219 pacientů z registru RenIS, kteří byli léčeni nejméně 24 měsíců jedním preparátem (nejčastěji sunitinib, méně pak sorafenib a pazopanib). Zjistili jsme, že medián PFS těchto pacientů v první linii léčby je 39,7 měsíce, medián OS pak 79,1 měsíce a pravděpodobnost 5ti-letého OS 62,1%. Zjistili jsme, že jsou přítomny statisticky významné rozdíly v PFS a OS mezi pacienty, kteří dosáhli CR a PR/SD ( $p < 0,001$  a  $p < 0,009$ ). Pacienti s CR mají oproti pacientům s PR/SD jednoznačně lepší prognózu a jsme tak ve shodě s podobnou již publikovanou prací (159). Ukázalo se totiž, že pacienti s PR/SD progredují ve větších počtech krátce po 24 měsících od počátku terapie, přerušeni léčby v této skupině bylo totiž majoritně pro progresi onemocnění, kdežto ve skupině s CR bylo důvodem přerušeni léčby právě dosažení kompletní remise (158).

Problematiku prognostický modelů a některé naše práce na toto téma jsme zmínili v jiných odstavcích (5.1.1. a 5.2) (6, 109). Zde zopakujeme, že se v současné době stále nejvíce používá prognostický model MSKCC 2002 a IMDC (90,94). Model IMDC Heng a kol. publikovali v roce 2009 a do roku 2013 nebyl externě validován, v tomto roce ho však ti samí autoři ověřili na jiném souboru pacientů než v roce 2009 (160). V rámci MOÚ jsme pak provedli validaci tohoto moderního prognostického souboru na menším počtu pacientů (6, odstavec 5.2) a v roce 2014 jsme zkoumali tento model a jiné klinické prognostické faktory na souboru pacientů z RenIS, jednalo se o práci „**Clinical and laboratory prognostic factors in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib and sorafenib after progression on cytokines** „ (příloha 11.11) (161). Celkem jsme IMDC model a jiné klinické faktory testovali na 319 pacientech léčených sunitinibem nebo sorafenibem v rámci první linie léčby (v současné době se léčba cytokiny nepovažuje za linii paliativní léčby). Prokázali jsme statisticky významnou korelaci mezi neutrofilii, elevací LDH, ECOG  $\geq 2$  a dobou od diagnózy do započeti léčby TKI  $< 1$  rok a krátkým OS.S krátkým PFS měli signifikantní vztah tyto faktory: doba od diagnózy do započeti léčby TKI  $< 1$  rok, ECOG  $\geq 2$  a elevace LDH. V tab.č.7 je pak srovnání přežívání ve studii IMDC a v naše souboru, výsledky jsou obdobné, menší rozdíly mohou být způsobeny zřejmě tím, že v naší kohortě pacientů byli všichni po léčbě cytokiny (v IMDC to byla jen třetina pt) a rozdílnými počty pacientů ve studii (RenIS vs.

IMDC: 319 pt vs. 645 pt). Naše studie naznačuje, že snížení počtu 6 rizikových faktorů z IMDC modelu na 4 je možné (94,161).

**Tab.č. 7: Srovnání mediánů OS a pravděpodobnosti 2-letého OS z MOÚ, RenIS a IMDC v rámci dobré, střední a špatné prognostické skupiny(6, 161, 94, 160):**

	Mediány OS RenIS (161)	Mediány OS IMDC (94, 160)	Mediány OS MOÚ (6)	2-leté OS RenIS (161)	2-leté OS IMDC (94)	2-leté OS MOÚ (6)
<b>Dobrá prognostická skupina</b>	<b>36,1m</b>	<b>43,2m*</b>	-	<b>76,6%</b>	<b>75,0%</b>	<b>76,1%</b>
<b>Střední prognostická skupina</b>	<b>21,1m</b>	<b>27,0m</b>	-	<b>44,8%</b>	<b>53,0%</b>	<b>41,4%</b>
<b>Špatná prognostická skupina</b>	<b>11,8m</b>	<b>8,8m</b>	-	<b>21,3%</b>	<b>7,0%</b>	-

\* čerpáno z externí validace (160), m- měsíce, ostatní zkratky v textu

Pacienti s mRCC jsou velmi často vyššího věku, medián věku pacientů s mRCC a nasazenou cílenou terapií je 62 let (7). Tito pacienti mají velmi často více interkurencí s jejich nutnou léčbou (lékové interakce). Zajímalo nás tedy, zda je cílená terapie efektivní a bezpečná i ve specifických populacích pacientů, především pak u pacientů s renální insuficiencí (až 80% pt s mRCC je po nefrektomii) a u starších pacientů. Analýzu pacientů s renální insuficiencí jsme opět provedli z registru RenIS v práci „**Efficacy of sunitinib in patients with metastatic or unresectable renal cell carcinoma and renal insufficiency**“ (příloha 11.12) (162). Do retrospektivní studie jsme zařadili celkem 790 pacientů léčených sunitinibem, z toho 22, 234 a 534 pacientů mělo závažnou (poměr glomerulární filtrace-GFR- <30 ml/min/1,73m<sup>2</sup>), střední (GFR 30-60ml/min/1,73m<sup>2</sup>) a mírnou poruchu renální funkce nebo byli bez poruchy renálních funkcí (GFR > 60ml/min/1,73m<sup>2</sup>). Mediány PFS, resp. OS, byly v těchto skupinách 5,3 měsíce, 8,1 měsíce a 11,3 měsíce ( $p=0,244$ ), resp. 26,3 měsíce, 21,2 měsíce a 26,3 měsíců ( $p=0,443$ ). ORR pak byly 22,7%, 25,2% a 23,6% ( $p=0,880$ ). Signifikantní však byly rozdíly v mediánu trvání léčby: 5,0 měsíce, 6,0 měsíce a 9,2 měsíce ( $p=0,007$ ). Nebyly hlášeny výjimečné nežádoucí účinky léčby nebo zvýšené počty toxicit závažného stupně (stupně 3+4 dle CTCAE v 3.0) v rizikových skupinách pacientů, ale léčba byla ve skupinách se závažnou a střední renální insuficiencí (RI, renální insuficience) častěji ukončována pro nežádoucí účinky

ve srovnání se skupinou s mírnou poruchou renální funkce (resp. i normální). Z uvedeného můžeme usuzovat, že kratší doba podávání sunitinibu (vedoucí zřejmě ke kratšímu PFS) byla způsobena opatrností kliniků u této rizikové skupiny, pokud se vyskytly nežádoucí účinky, kdy častěji než redukcí dávky provedli vysazení léku. Navíc ve skupině se závažnou vs. střední vs. mírnou poruchou renálních funkcí byla iniciálně podána snížená dávka sunitinibu v následujících procentech: 45,5 vs. 28,2% vs. 16,1%. O tom, že se vyšší dávky sunitinibu ani u pacientů se závažnou poruchou renálních funkcí nemusíme obávat, svědčí i to, že 12 pacientů (50% pt) iniciálně dostalo 50 mg a nebyla zaznamenána toxicita stupně 4 a jen jeden pacient měl stupeň 3 toxicity. V naší práci jsme tedy prokázali, že sunitinib je účinný a bezpečný i u pacientů se závažnou poruchou renálních funkcí, pokud je léčba vedena na pracovištích s dostatečnými zkušenostmi a pacienti jsou častěji monitorováni (162). V tab.č. 8 jsme shrnuli naše výsledky PFS, OS a ORR a srovnali jsme je s výsledky z jiných studií pacientů s renální insuficiencí, též jsme uvedli i výsledky z registrační studie sunitinibu (163,164, 121).

**Tab.č. 8: Srovnání mediánů PFS, OS a ORR z RenIS a prací Khan a kol., Kim a kol. a registrační studie sunitinibu- Motzer a kol.(162, 163, 164, 121):**

	RenIS: 790 pt (162)			Khan et al. : 39 pt (163)*	Kim et al.: 34 pt (164)*	Motzer et al.: 750 pt (121)
	Závažná RI: 22 pt	Střední RI: 234 pt	Mírné RI nebo normál. ren.funkce: 534 pt			
<b>Mediány PFS</b>	<b>5,3m</b>	<b>8,1m</b>	<b>11,3m</b>	<b>8,4m</b>	<b>12,2m</b>	<b>11,0m</b>
<b>Mediány OS</b>	<b>26,3m</b>	<b>21,2m</b>	<b>26,3m</b>	-	<b>26,3m</b>	<b>26,4m</b>
<b>ORR</b>	<b>22,5%</b>	<b>25,2%</b>	<b>23,6%</b>	<b>24%</b>	-	<b>47%</b>

m- měsíce, ostatní zkratky v textu, \* RI definována jako clearance kreatininu <60ml/min/1,73m<sup>2</sup>

Analýzu léčby pacientů ve vyšším věku jsme zpracovali ve studii „**Efficacy of Sunitinib in Elderly Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Data from Real-World Clinical Practice**“ (příloha 11.13) (165). Do této retrospektivní studie jsme zařadili 299 pacientů ≥70 let a 1016 pacientů <70 let s mRCC léčených v první linii sunitinibem. Mediány PFS, resp. OS byly v těchto skupinách 8,8 měsíce a 10,8 měsíce ( $p=0,321$ ), resp. 26,3 měsíce a 31,9 měsíce

( $p=0,044$ ). Při mnohorozměrné analýze jsme neprokázali signifikantní vztah vyššího věku s PFS, ale s OS ano ( $p=0,019$ ). Statisticky významné rozdíly byly přítomny v rozdílu podání iniciační dávky sunitinibu 50 mg a době trvání léčby mezi oběma testovanými skupinami, 59% pacientů  $\geq 70$  let dostalo iniciačně dávku 50 mg, resp. 79% pacientů ve skupině  $< 70$  let ( $p < 0,001$ ) a medián trvání léčby byl 5,6 měsíce, resp. 8,5 měsíce ( $p=0,018$ ). Delší byl též interval mezi zjištěnou diagnózou a nasazení léčby TKI: 17,4 měsíce vs. 7,9 měsíce ( $p < 0,001$ ), což lze vysvětlit tím, že u starších pacientů klinici častěji volili strategii watch and wait, ale i možným vyšším počtem pacientů s metachronními metastázami ve skupině starších pacientů. V našem souboru mělo 42,7% pt  $\geq 70$  let vs. 48,6% pt  $< 70$  let při nasazení léčby metastatické onemocnění v době diagnózy, což je naopak oproti situaci zjištěné v roce 2013 z celého registru RenIS, kde 20% pacientů  $\geq 70$  let mělo synchronní metastázy v době diagnózy proti 15% pacientům  $< 70$  let (4). Ve skupině pacientů s vyšším věkem byla léčba častěji přerušena pro nežádoucí účinky ve srovnání s pacienty  $< 70$  let (19% vs. 9%,  $p < 0,001$ ). Počty a závažnost nežádoucích účinků se nelišily mezi oběma skupinami, musíme zde však připustit možnou podhlášenost nežádoucích účinků nižších stupňů v registru RenIS. Můžeme tedy hypotetizovat, že kumulace toxicit nižších stupňů u starších pacientů vedla častěji k ukončení léčby a nižší dávkové intenzitě s následným ovlivněním OS. Druhá a vyšší linie paliativní léčby byla méně indikována u starších pacientů naší studie, což také mohlo ovlivnit kratší OS v této skupině (165). V registrační studii sunitinibu bylo jen 13% pacientů  $\geq 70$  let, sice byla provedena subanalýza pacientů  $\geq 65$  let, publikovány byly však jen ORR a DCR v této skupině pacientů (18% a 34%), data o PFS a OS nejsou k dispozici, o to cennější pro běžnou praxi jsou retrospektivní studie, včetně naší práce (121,165). V největší prospektivní studii (Gore a kol.) zkoumající 4 543 pacientů s mRCC z programů s otevřeným přístupem k léčbě sunitinibem byl medián PFS ve skupině pacientů  $\geq 65$  let (celkem 1 485 pacientů) 10,1 měsíce a u všech pacientů 9,4 měsíce, medián OS pak 18,1 měsíce a 18,7 měsíce, ORR byly pak 16% v obou skupinách (166). V tab.č. 9 jsou výsledky naší studie, registrační studie a výsledky práce Gore a kol. Závěrem můžeme konstatovat, že naše výsledky jsou podobné s jinými publikovanými pracemi, léčba sunitinibem u starších pacientů je bezpečná, při indikaci této léčby by se měl zvažovat stav pacienta a ne jeho kalendářní věk.

**Tab.č. 9: Srovnání mediánů PFS, OS a ORR z RenIS, registrační studie sunitinibu- Motzer a práce Gore a kol. (165, 121, 166):**

	RenIS (165)		Gore a kol. (166)		Motzer a kol. (121)
	Pt ≥70 let	Pt < 70 let	Pt ≥65 let	Pt < 65 let	
<b>Mediány PFS</b>	<b>8,8m</b>	<b>10,8m</b>	<b>10,1m</b>	<b>9,4m</b>	<b>11,0m</b>
<b>Mediány OS</b>	<b>26,3m</b>	<b>31,9m</b>	<b>18,1</b>	<b>18,7m</b>	<b>26,4m</b>
<b>ORR</b>	<b>23,6%</b>	<b>28,1%</b>	<b>16%</b>	<b>16%</b>	<b>47%</b>

m- měsíce, ostatní zkratky v textu

### 7.2.2 Predikce léčebné odpovědi

Jak již bylo řečeno, v současné době nemáme dostatečně validní klinický, nebo laboratorní marker predikce léčebné odpovědi. V našich studiích jsme se soustředili na případný vztah mezi léčebnou odpovědí a výskytem nežádoucích účinků, dále na výzkum exprese různých miRNA taktéž ve vztahu k predikci léčby.

První prací je „**Skin toxicity and efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: a national registry-based study**“ (příloha 11.14) (167). Zdrojem dat byl opět registr RenIS, analyzovali jsme vztahy mezi hand-foot syndromem jakéhokoliv stupně (HF syndrom), vyrážkou stupně 3+4 dle CTCAE 3.0 a přežitím u pacientů léčených pro mRCC sunitinibem (705 pt) a sorafenibem (365 pt). Prokázali jsme statisticky významný vztah mezi kožní toxicitou a PFS, resp. OS pouze u sunitinibu, u sorafenibu jsme tuto korelaci neprokázali. Mediány PFS, resp. OS u pacientů léčených sunitinibem s vs. bez kožní toxicity byly 20,8 měsíce vs. 11,1 měsíce ( $p=0,007$ ), resp. 43,0 měsíce vs. 31,0 měsíce ( $p=0,027$ ). Vztah mezi OS a kožní toxicitou sunitinibu byl potvrzen i v mnohorozměrné analýze (167). Výskyt kožní toxicity je tak poměrně jednoduchým parametrem k posouzení účinnosti léčby, její včasná a účinná léčba pomáhá k dodržení potřebné léčebné dávkové intenzity s následným zlepšením přežití pacientů.

V další naší práci „**miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib**“ (příloha 11.15) (168) jsme provedli analýzu hladin miRNA v nádorových tkáních 79 pacientů léčených sunitinibem a korelovali jsme je s dobou do progresu onemocnění (TTP, time to progression). V profilovací fázi studie



byly testovány různé miRNA na souboru 8 responderů (trvající CR, nebo PR a SD v průběhu 9ti měsíců) a 8 nonresponderů (zjištěna PD) na sunitinib, ve validační fázi byly pak vybrané miRNA analyzovány na souboru 44 respondérů a 19 nonrespondérů. Zjistili jsme, že snížená hladina miR-155 je signifikantně spojena s delším TTP (medián TTP 12,8 měsíce vs. 5,8 měsíce u vysokých hladin,  $p=0,0092$ ), totéž platí i pro miR-484 (TTP 8,9 měsíce vs. 5,8 měsíce,  $p=0,0296$ ). Zatímco role miR-484 v patogenezi mRCC není zcela jasná, zvýšená hladina miR-155 snižuje expresi VHL tumor-supresorů (např. různých ligáz účastnících se degradace HIF proteinů) a působí tak proonkogeně.(43). Tyto dvě miRNA se tak mohou stát slibnými prediktivními faktory, v budoucnu však bude nutná validace našich výsledků.

## 8 Závěr

Incidence renálního karcinomu je v ČR nejvyšší celosvětově. Metastatický renální karcinom je nevléčitelné onemocnění, současné prognostické modely umožňují odhad přežití pacienta a lépe cílit systémovou léčbu. Randomizované klinické studie jsou v onkologické praxi nenahraditelné, ale studiové populace pacientů jsou často vysoce selektované, proto jsou retrospektivní studie s pacienty z běžné klinické praxe nesmírně důležité. Závěry těchto retrospektivních prací mají praktické dopady při léčbě nestudiových pacientů různého věku a s různými komorbiditami. Dostatečně validní prediktivní faktory léčby mRCC nejsou do dnešní doby známé, přesto existují studie s velmi nadějnými markery periferní krve či moče, které by v budoucnu mohli být implementovány do běžné klinické praxe. Terapeuticky úspěšné kombinace moderní imunoterapie a cílené léčby, jejichž příchod do klinické praxe se brzy očekává, jsou finančně velmi nákladné. Prediktivní faktory této léčby by pak mohli přinést, kromě výrazného zlepšení přežití pacientů s mRCC, snížení nákladů na léčbu a eliminaci závažných, v některých případech i fatálních nežádoucích účinků této terapie.

## 9 Citace

1. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2017-11-27]. Dostupný z WWW: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
2. International Agency for Research on Cancer [online]. 2013 [cit. 2017-11-21]. Dostupné z: <http://www.iarc.fr/>.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan;68(1):7-30.

5. Siegel R, Ward E, Brawley O, et al. Cancer statistics, 2011: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011; 61:212.
6. Poprach A, Lakomý R, Selingerová I, et al.. Epidemiologická a klinicko-patologická charakteristika pacientů s renálním karcinomem: analýza 544 případů z jednoho centra. *Klin Onkol*. 2013;26(2):114-123.
7. Poprach A, Bortlíček Z, Büchler T, Melichar B, Lakomý R, Vyzula R, Brabec P, Svoboda M, Dušek L, Gregor J. Patients with advanced and metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the Czech Republic: twenty cancer centres, six agents, one database. *Med Oncol*. 2012 Dec;29(5):3314-20.
8. Navrátilová M. Epidemiologická studie výskytu zhoubných nádorů ledvin v závislosti na životním stylu a pracovním prostředí.. Brno; 2007. Disertační práce (Ph. D.). Masarykova universita. Lékařská fakulta. Ústav preventivního lékařství. 2007-09-13.
9. Mellempgaard A, Engholm G, McLaughlin JK, et al. Risk factors for renal cell carcinoma in Denmark. I. Role of socioeconomic status, tobacco use, beverages, and family history. *Cancer Causes Control*. 1994 Mar;5(2):105-13.
10. Tsivian M, Moreira D M, Caso J R, Mouraviev V, Polascik T J. Cigarette smoking is associated with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2011;29(15):2027–2031
11. Orth S R. Cigarette smoking: an important renal risk factor—far beyond carcinogenesis. *Tob Induc Dis*. 2002;1(2):137–155.
12. Clague J, Shao L, Lin J. et al. Sensitivity to NNKOAc is associated with renal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):706–710.
13. Zhu Y, Horikawa Y, Yang H, Wood C G, Habuchi T, Wu X. BPDE induced lymphocytic chromosome 3p deletions may predict renal cell carcinoma risk. *J Urol*. 2008;179(6):2416–2421.
14. Chow W H, Dong L M, Devesa S S. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol*. 2010;7(5):245–257.
15. Drabkin HA, Gemmill RM. Obesity, cholesterol, and clear-cell renal cell carcinoma (RCC). *Adv Cancer Res*. 2010;107:39-56.
16. Häggström C, Rapp K, Stocks T. et al. Metabolic factors associated with risk of renal cell carcinoma. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e57475.

17. Bergstrom A, Hsieh CC, Lindblad P, et al. Obesity and renal cell carcinoma - a quantitative review. *Br J Cancer*. 2001;85(7):984-990.
18. Colt J S, Schwartz K, Graubard B I. et al. Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans. *Epidemiology*. 2011;22(6):797–804.
19. Weikert S, Boeing H, Pischon T, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*. 2008;167:438-446.
20. McLaughlin JK, Lindblad P, Mellemegaard A, et al. International renal-cell cancer study. VIII. Role of diuretics, other anti-hypertensive medications and hypertension. *Int J Cancer*. 1995;61:194-98.
21. Kim JJ, Rini BI, Hansel DE. Von Hippel Lindau syndrome. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010;685:228-49.
21. Calzada MJ. Von Hippel-Lindau syndrome: molecular mechanisms of the disease. *Clin Transl Oncol*. 2010 Mar;12(3):160-5.
22. Schmidt LS, Linehan WM. FLCN: The causative gene for Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Gene*. 2018 Jan 15;640:28-42.
23. Linehan WM, Pinto PA, Bratslavsky G, et al. Hereditary kidney cancer: unique opportunity for disease-based therapy. *Cancer*. 2009 May 15;115(10 Suppl):2252-61.
24. Rosset C, Netto CBO, Ashton-Prolla P. TSC1 and TSC2 gene mutations and their implications for treatment in Tuberous Sclerosis Complex: a review. *Genetics and Molecular Biology*. 2017;40(1):69-79.
25. Schmidt L, Junker K, Nakaigawa N, et al. Novel mutations of the MET proto-oncogenin papillary renal carcinomas. *Oncogene*. 1999;18:2343-50.
26. Haas NB, Nathanson KL. Hereditary Renal Cancer Syndromes. *Advances in chronic kidney disease*. 2014;21(1):10.1053/j.ackd.2013.10.001
27. Graveel CR, Tolbert D, Vande Woude GF. MET: a critical player in tumorigenesis and therapeutic target. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jul 1;5(7). pii: a009209.
28. Zhou L, Liu XD, Sun M, et al. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2016 May;35(21):2687-97.
29. Lefebvre M, Foulkes WD. Pheochromocytoma and paraganglioma syndromes: genetics and management update. *Current Oncology*. 2014;21(1):e8-e17. doi:10.3747/co.21.1579.

30. Linehan WM, Pinto PA, Bratslavsky G, et al. Hereditary kidney cancer: unique opportunity for disease-based therapy. *Cancer*. 2009 May 15;115(10 Suppl):2252-61.
31. The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma *Nature*. 2013;499(7456):43-49.
32. Calzada MJ. Von Hippel-Lindau syndrome: molecular mechanisms of the disease. *Clin Transl Oncol*. 2010 Mar;12(3):160-5.
33. Patel NS, Muneer A, Blick C, et al. Targeting vascular endothelial growth factor in renal cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2009;30(5-6):292-9.
34. Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL Gene Mutation in Human Cancer. *J Clin Oncol*. 2004; 22:4991-5004.
35. Pause A, Lee S, Worell RA, et al. The von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene product forms a stable complex with human CUL-2, a member of the Cdc53 family of proteins. *Proc Natl Sci USA*. 1997;94:2156-61.
36. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1). *Molecular Pharmacology*. 2006;70(5):1469-80.
37. Koul H, Huh JS, Rove KO, et al. Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review. *Am J Cancer Res*. 2011;1(2):240-54.
38. Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other? *Vascul Pharmacol*. 2012 May-Jun;56(5-6):245-51.
39. Frew IJ1, Moch H. A clearer view of the molecular complexity of clear cell renal cell carcinoma. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:263-89.
40. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136:642-655.
41. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010;11:597-610.
42. Mortensen RD, Serra M, Steitz JA, et al. Posttranscriptional activation of gene expression in *Xenopus laevis* oocytes by microRNA-protein complexes (microRNPs). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:8281-86.
43. Redová M, Poprach A. MikroRNA u renálního karcinomu. In: Slabý O, Svoboda M. *MikroRNA v onkologii*. Prague (CZ): Galén; 2012, p. 183-195. Czech.

44. Valera VA, Walter BA, Linehan WM, et al. Regulatory Effects of microRNA-92 (miR-92) on VHL gene expression and the hypoxic activation of miR-210 in clear cell renal cell carcinoma. *J Cancer*. 2011;2:515-26.
45. Neal CS, Michael MZ, Rawlings, LH, et al. The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer. *BMC Med*. 2010 Oct 21;8:64.
46. Peng X, Guo W, Liu T, et al. Identification of miRs-143 and -145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT. *PLoS One*. 2011;6(5):e20341.
47. Cimmino A, Calin GA, Fabbri, et al. MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13944-9.
48. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:16-25.
49. Botta GP, Granowicz E, Costantini C. Advances on immunotherapy in genitourinary and renal cell carcinoma. *Transl Cancer Res*. 2017 Feb;6(1):17-29.
50. Santoni M, Berardi R, Amantini C, et al. Role of natural and adaptive immunity in renal cell carcinoma response to VEGFR-TKIs and mTOR inhibitor. *Int J Cancer*. 2014 Jun 15;134(12):2772-7.
51. Chow TF, Youssef YM, Lianidou E, et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis. *Clin Biochem*. 2010;43:150-8.
52. Lopes-Ramos CM, Barros BP, Koyama FC, et al. E2F1 somatic mutation within miRNA target site impairs gene regulation in colorectal cancer. *PLoS One*. 2017 Jul 13;12(7):e0181153.
53. Redova M, Poprach A, Besse A, et al. MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2013 Feb;34(1):481-91.
54. Poprach A, Lakomý R, Büchler T. Imunoterapie zhoubného nádoru ledviny. *Klin Onkol* 2017; 30(S3): 55-61.
55. Lee CT, Katz J, Fearn PA, et al. Mode of presentation of renal cell carcinoma provides prognostic information. *Urol Oncol*. 2002 Jul-Aug;7(4):135-40.
56. Kim HL, Beldegrun AS, Freitas DG, et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol*. 2003 Nov;170(5):1742-6.

57. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2016 Sep;27(suppl 5):v58-v68.
58. Khan I, Beksac AT, Paulucci DJ, et al. Differences in Renal Tumor Size Measurements for Computed Tomography Versus Magnetic Resonance Imaging: Implications for Patients on Active Surveillance. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A*. 2017 Aug 11. [Epub ahead of print].
59. Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, et al. EAU guidelines on renal cell carcinoma: 2014 update. *Eur Urol*. 2015 May;67(5):913-24.
60. McCann TE, Kosaka N, Turkbey B, et al. Molecular imaging of tumor invasion and metastases: the role of MRI. *NMR Biomed*. 2011 Jul;24(6):561-8.
61. Aurangabadkar H, Ali Z. Unusual metastatic sites from renal cell carcinoma detected by 18F-FDG PET/CT scan. *Clin Nucl Med*. 2013 Dec;38(12):e471-3.
62. Gofrit ON, Orevi M. Diagnostic Challenges of Kidney Cancer: A Systematic Review of the Role of Positron Emission Tomography-Computerized Tomography. *J Urol*. 2016 Sep;196(3):648-57.
63. McLaughlin JK, Lipworth L, Tarone RE. Epidemiologic aspects of renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2006 Oct. 33(5):527-33.
64. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1982 Oct;6(7):655-63.
65. Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, et al. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol*. 2006 May;49(5):798-805.
66. Moch H, Cubilla AL, Humphrey PA, et al. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *Eur Urol*. 2016 Jul;70(1):93-105.
67. Goyal R, Gersbach E, Yang XJ, et al. Differential diagnosis of renal tumors with clear cytoplasm: clinical relevance of renal tumor subclassification in the era of targeted therapies and personalized medicine. *Arch Pathol Lab Med*. 2013 Apr;137(4):467-80.
68. Piva F, Santoni M, Matrana MR, et al. BAP1, PBRM1 and SETD2 in clear-cell renal cell carcinoma: molecular diagnostics and possible targets for personalized therapies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2015;15(9):1201-10.
69. Wozniak MB, Le Calvez-Kelm F, Abedi-Ardekani B, et al. Integrative genome-wide gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma in Czech Republic and in the United States. *PLoS One*. 2013;8(3):e57886.

70. Zhang D, Zhang P, Yang P, et al. Downregulation of ATP1A1 promotes cancer development in renal cell carcinoma. *Clinical Proteomics*. 2017;14:15.
71. Sobin LH, Gospodariwicz M, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. 7th ed. Wiley-Blackwell; 2009. 257 p.
72. Rajandram R, Yap NY, Pailoor J, et al. Tumour necrosis factor receptor-associated factor-1 (TRAF-1) expression is increased in renal cell carcinoma patient serum but decreased in cancer tissue compared with normal: potential biomarker significance. *Pathology*. 2014 Oct;46(6):518-22.
73. White NM, Masui O, Desouza LV, et al. Quantitative proteomic analysis reveals potential diagnostic markers and pathways involved in pathogenesis of renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2014 Jan 30;5(2):506-18.
74. Toiyama D, Takaha N1, Shinnoh M, et al. Significance of serum tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand as a prognostic biomarker for renal cell carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2013 Jan;1(1):69-74.
75. Yildiz I, Sen F, Kilic L, et al. Serum M65 as a biomarker for metastatic renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2013 Sep;11(3):290-6.
76. Tanaka T, Kitamura H, Torigoe T, et al. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 May;137(5):789-94.
77. Fedorko M, Stanik M, Iliev R, et al. Combination of MiR-378 and MiR-210 Serum Levels Enables Sensitive Detection of Renal Cell Carcinoma. Pichler M, ed. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(10):23382-23389.
78. Gradilone A, Iacovelli R, Cortesi E, et al. Circulating tumor cells and "suspicious objects" evaluated through CellSearch® in metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2011 Dec;31(12):4219-21.
79. Kaya K, Ayan S, Gokce G, et al. Urinary nuclear matrix protein 22 for diagnosis of renal cell carcinoma. *Scand J Urol Nephrol*. 2005;39(1):25-9.
80. Di Carlo A. Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their complex MMP-9/NGAL in sera and urine of patients with kidney tumors. *Oncol Lett*. 2013 May;5(5):1677-1681.

81. Morrissey JJ, London AN, Lambert MC, et al. Sensitivity and specificity of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 for the diagnosis of renal cell carcinoma. *Am J Nephrol*. 2011;34(5):391-8.
82. Morrissey JJ, London AN, Luo J, et al. Urinary biomarkers for the early diagnosis of kidney cancer. *Mayo Clin Proc*. 2010 May;85(5):413-21.
83. Iliev R, Fedorko M, Machackova T, et al. Expression Levels of PIWI-interacting RNA, piR-823, Are Deregulated in Tumor Tissue, Blood Serum and Urine of Patients with Renal Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2016 Dec;36(12):6419-6423.
84. Redova M, Poprach A, Nekvindova J, et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med*. 2012 Mar 22;10:55.
85. Fedorko M, Juracek J, Stanik M, et al. Detection of let-7 miRNAs in urine supernatant as potential diagnostic approach in non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Biochimica Medica*. 2017;27(2):411-417.
86. Leibovich BC, Blute ML, Cheville JC, et al. Prediction of progression after radical nephrectomy for patients with clear cell renal cell carcinoma: a stratification tool for prospective clinical trials. *Cancer* 2003; 97: 1663–1671.
87. Zisman A, Pantuck AJ, Dorey F et al. Improved prognostication of renal cell carcinoma using an integrated staging system. *J Clin Oncol* 2001; 19:1649-1657.
88. Billia M, Volpe A, Terrone C. The current TNM staging system of renal cell carcinoma: are further improvements needed? *Arch. Esp. Urol*. 2011;64(10):929-936.
89. Ficarra V, Righetti R, Martignoni G, et al. Prognostic value of renal cell carcinoma nuclear grading: multivariate analysis of 333 cases. *Urol Int*. 2001;67(2):130-4.
90. Motzer RJ, Mazumdar M, Bacik J, et al. Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 1999;17:2530-40.
91. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA, et al. Interferon-alfa as a komparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2002;20:289–96.
92. Motzer RJ, Bacik J, Schwartz LH, et al. Prognostic factors for survival in previously treated patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2004;22:454-63.
93. Motzer RJ, Bukowski RM, Figlin RA, et al. Prognostic nomogram for sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer*. 2008 Oct 1;113(7):1552-8.



94. Heng DY, Xie W, Regan MM, et al. 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*. 2009 Dec 1;27(34):5794-9.
95. Kroeger N, Xie W, Lee J-L, et al. Metastatic non-clear cell renal cell carcinoma treated with targeted therapy agents: characterization of survival outcome and application of the International mRCC Database Consortium criteria. *Cancer* 2013;119:2999–3006.
96. Morshaeuser L, May M, Burger M, et al. p53-expression in patients with renal cell carcinoma correlates with a higher probability of disease progression and increased cancer-specific mortality after surgery but does not enhance the predictive accuracy of robust outcome models. *Urol Oncol*. 2017 Dec 5. pii: S1078-1439(17)30596-3.
97. Gimenez SE, Secasan C, Raman JD. Prognostic markers and targeted therapies for renal cell carcinoma. *Future Oncol*. 2009 Mar;5(2):197-205.
98. Parker AS, Leibovich BC, Lohse CM, et al. Development and evaluation of BioScore: a biomarker panel to enhance prognostic algorithms for clear cell renal cell carcinoma. *Cancer* 2009;115:2092–103.
99. Sun M, Shariat SF, Cheng C, et al. Prognostic factors and predictive models in renal cell carcinoma: a contemporary review. *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4):644-61.
100. Koul H, Huh JS, Rove KO, et al. Molecular aspects of renal cell carcinoma: a review. *Am J Cancer Res*. 2011;1(2):240-254.
101. Krambeck AE, Dong H, Thompson RH, et al. Survivin and b7-h1 are collaborative predictors of survival and represent potential therapeutic targets for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007 Mar 15;13(6):1749-56.
102. Negrier S, Perol D, Menetrier-Caux C, et al. Interleukin-6, interleukin-10, and vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: prognostic value of interleukin-6—from the Groupe Francais d'Immunotherapie. *J Clin Oncol* 2004;22:2371–8.
103. Schips L, Dalpiaz O, Lipsky K, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and endostatin in renal cell carcinoma patients compared to a control group. *Eur Urol* 2007;51:168–74.
104. Shariat S, Anwuri V, Lamb D, et al. Association of preoperative plasma levels of vascular endothelial growth factor and soluble vascular cell adhesion molecule-1 with lymph node status and biochemical progression after radical prostatectomy. *J Clin Oncol* 2004;22:1655–63.

105. Junker K, von Eggeling F, Muller J, et al. Identification of biomarkers and therapeutic targets for renal cell cancer using ProteinChip technology. *Urologe A* 2006;45:305–6, 8, 210–2.
106. Zavada J, Zavadova Z, Zatovicova M, et al. Soluble form of carbonic anhydrase IX (CA IX) in the serum and urine of renal carcinoma patients. *Br J Cancer* 2003;89:1067–71.
107. Takacova M, Bartosova M, Skvarkova L, et al. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma. *Oncology Letters*. 2013;5(1):191-197.
108. McKiernan JM, Buttyan R, Bander NH, et al. The detection of renal carcinoma cells in the peripheral blood with an enhanced reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for MN/CA9. *Cancer* 1999;86:492–7.
109. Kubackova K, Melichar B, Bortlicek Z, et al. Comparison of Two Prognostic Models in Patients with Metastatic Renal Cancer Treated with Sunitinib: a Retrospective, Registry-Based Study. *Target Oncol*. 2015 Dec;10(4):557-63.
110. Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, et al. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Jul 7;29:90.
111. Slaby O, Redova M, Poprach A, et al. Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Jul;51(7):707-16.
112. Mlcochova H, Machackova T, Rabien A, et al. Epithelial-mesenchymal transition-associated microRNA/mRNA signature is linked to metastasis and prognosis in clear-cell renal cell carcinoma. *Sci Rep*. 2016 Aug 23;6:31852.
113. Machackova T, Mlcochova H, Stanik M, et al. MiR-429 is linked to metastasis and poor prognosis in renal cell carcinoma by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Tumour Biol*. 2016 Sep;37(11):14653-14658.
114. Iliev R, Stanik M, Fedorko M, et al. Decreased expression levels of PIWIL1, PIWIL2, and PIWIL4 are associated with worse survival in renal cell carcinoma patients. *Onco Targets Ther*. 2016 Jan 8;9:217-222.
115. Tosco L, Van Poppel H, Frea B, et al. Survival and impact of clinical prognostic factors in surgically treated metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2013; 63: 646-652.

116. Bex A. Integrating metastasectomy and stereotaxic radiosurgery in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. *EJC Supplements* 2013; 2: 192-203.
117. Atzpodien J, Kirchner H, Jonas U, et al. 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). *Journal of Clinical Oncology* 2004 22:7, 1188-1194.
118. McDermott DF, Regan MM, Clark JI, et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 1;23(1):133-41.
119. Poprach A, Lakomý R. Renální karcinom a imunoterapie. *Onkologie* 2016; 10(6): 251–255.
120. Modrá kniha České onkologické společnosti, 24. aktualizace (1-2018), platnost od 1. 3. 2018. Česká onkologická společnost ČLS JEP, Česká republika [citováno 1. dubna 2018]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/diagnostika-a-lecba/modra-kniha-cos/aktualni-vydani-modre-knihy/23-21-zhoubny-novotvar-ledviny-c64/>.
121. Motzer R, Hutson T, Tomczak P, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2009 27: 3584–3590.
122. Sternberg CN, Hawkins RE, Wagstaff J, et al. 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.* 2013 Apr;49(6):1287-96.
123. Poprach A, Lakomý R, Büchler T. Renální karcinom. In: Büchler T et al. Speciální onkologie. Praha. Maxdorf s.r.o., 2017, s. 97-102.
124. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet.* 2007 Dec 22;370(9605):2103-11.
125. Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206. *J Clin Oncol.* 2010 May 1;28(13):2137-43.
126. Rini BI, Escudier B, Tomczak P, et al. Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. *Lancet.* 2011 Dec 3;378(9807):1931-9.

127. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007 May 31;356(22):2271-81.
128. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: final results and analysis of prognostic factors. *Cancer*. 2010 Sep 15; 116(18): 4256–4265.
129. Buchler T, Bortlicek Z, Poprach A, et al. Efficacy of everolimus in second- and third-line therapy for metastatic renal cell carcinoma: a registry-based analysis. *Urol Oncol*. 2014 Jul;32(5):569-75.
130. Zhou L, Liu XD, Sun M, et al. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2016 May;35(21):2687-97.
131. Choueiri TK, Escudier B, Powles T, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016 Jul;17(7):917-27.
132. Choueiri TK, Hessel C, Halabi S, et al. Progression-free survival (PFS) by independent review and updated overall survival (OS) results from Alliance A031203 trial (CABOSUN): Cabozantinib versus sunitinib as initial targeted therapy for patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC). In: Proceedings from the 2017 ESMO Congress; September 8-12, 2017; Madrid, Spain. Abstract LBA38.
133. Hammers HJ, Plimack ER, Infante JR et al. Safety and Efficacy of Nivolumab in Combination With Ipilimumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma: The CheckMate 016 Study. *J Clin Oncol*. 2017 Jul 5;JCO2016721985.
134. Escudier B, Tannir N, McDermott DF, et al: CheckMate 214: Efficacy and safety of nivolumab + ipilimumab v sunitinib for treatment-naïve advanced or metastatic renal cell carcinoma, including IMDC risk and PD-L1 expression subgroups. ESMO 2017 Congress. Abstract LBA5. Presented September 10, 2017.
135. Atkins MB, Plimack ER, Puzanov I, et al. Axitinib in combination with pembrolizumab in patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (aRCC): Preliminary safety and efficacy results. *Annals of Oncology*, 2016;27:266-95.
136. Choueiri TK, Larkin J, Oya M, et al. First-line avelumab + axitinib therapy in patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (aRCC): Results from a phase Ib trial. *Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 4504).

137. Taylor M, Dutcus CE, Schmidt E, et al. A phase 1b trial of lenvatinib (LEN) plus pembrolizumab (PEM) in patients with selected solid tumors. *Annals of Oncology* (2016) 27 (6): 266-295.
138. Kleinovink JW, Marijt KA, Schoonderwoerd MJA, et al. PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy. *Oncoimmunology*. 2017 Feb 21;6(4):e1294299.
139. Funakoshi T, Lee CH, Hsieh JJ. A systematic review of predictive and prognostic biomarkers for VEGF-targeted therapy in renal cell carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2014 May;40(4):533-47.
140. Rini BI, Halabi S, Rosenberg JE, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206. *J Clin Oncol*. 2010 May 1;28(13):2137-43.
141. Rixe O, Dutcher J, Motzer R, et al. Diastolic blood pressure (dbP) and pharmacokinetics (PK) as predictors of axitinib efficacy in metastatic renal cell cancer (mRCC). *J Clin Oncol*. 2009;27(15 suppl):245 [abstract 5045].
142. Bono P, Rautiola J, Utriainen T, et al. Hypertension as predictor of sunitinib treatment outcome in metastatic renal cell carcinoma. *Acta Oncol*. 2011 May;50(4):569-73.
143. Riesenbeck LM, Bierer S, Hoffmeister I, et al. Hypothyroidism correlates with a better prognosis in metastatic renal cancer patients treated with sorafenib or sunitinib. *World J Urol* 29:807-813, 2011.
144. Puzanov I, Michaelson MD, Cohen DP, et al. Evaluation of hand-foot syndrome (HFS) as a potential biomarker of sunitinib (SU) efficacy in patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) and gastrointestinal stromal tumor (GIST). *J Clin Oncol*. 2011; 29(suppl): abstr. e21113.
145. Fujita T, Wakatabe Y, Matsumoto K, et al. Leukopenia as a biomarker of sunitinib outcome in advanced renal cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2014 Jul;34(7):3781-7.
146. Murthy VH, Krumholz HM, Gross CP. Participation in cancer clinical trials: race-, sex-, and age-based disparities. *JAMA*. 2004 Jun 9;291(22):2720-6.
147. Mitchell AP, Harrison MR, Walker MS, et al. Clinical Trial Participants With Metastatic Renal Cell Carcinoma Differ From Patients Treated in Real-World Practice. *J Oncol Pract*. 2015 Nov;11(6):491-7.

148. Poprach A, Fiala O, Chloupkova R, et al. Pazopanib for Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Registry-based Analysis of 426 Patients. *Anticancer Res.* 2018 Jan;38(1):449-456.
149. Motzer RJ, Hutson TE, Cella D, et al. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 369:722-731, 2013.
150. Trotti A, Colevas AD, Setser A, et al. CTCAE v3.0: development of a comprehensive grading system for the adverse effects of cancer treatment. *Semin Radiat Oncol.* 2003;13(3):176-181.
151. Buchler T, Bortlicek Z, Poprach A, et al. Czech Renal Cancer Cooperative Group. Efficacy of everolimus in second- and third-line therapy for metastatic renal cell carcinoma:a registry-based analysis. *Urol Oncol.* 2014 Jul;32(5):569-75.
152. Melichar B, Poprach A, Kubackova K, et al. Efficacy and tolerability of axitinib in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Comparison of Czech clinical registry and AXIS trial data. 2015 Sep; 51(3):S516.
153. Lakomý R, Poprach A, Bortlicek Z, et al. Utilization and efficacy of second-line targeted therapy in metastatic renal cell carcinoma: data from a national registry. *BMC Cancer.* 2017 17:880.
154. Eichelberg C, Vervenne WL, De Santis M, et al. SWITCH: A Randomised, Sequential, Open-label Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Sorafenib-sunitinib Versus Sunitinib-sorafenib in the Treatment of Metastatic Renal Cell Cancer. *Eur Urol.* 2015 Nov;68(5):837-47.
155. Knox JJ, Barrios CH, Kim TM, et al. Final overall survival analysis for the phase II RECORD-3 study of first-line everolimus followed by sunitinib versus first-line sunitinib followed by everolimus in metastatic RCC. *Ann Oncol.* 2017 Jun 1;28(6):1339-1345.
156. Iacovelli R, Carteni G, Sternberg CN, et al. Clinical outcomes in patients receiving three lines of targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma: results from a large patient cohort. *Eur J Cancer.* 2013 Jun;49(9):2134-42.
157. Buchler T, Bortlicek Z, Poprach A, et al. Outcomes for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Achieving a Complete Response on Targeted Therapy: A Registry-based Analysis. *Eur Urol.* 2016 Sep;70(3):469-75.
158. Buchler T, Poprach A, Bortlicek Z, et al. Outcomes of Patients With Long-Term Treatment Response to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy for Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin Genitourin Cancer.* 2017 Jun 29. pii: S1558-7673(17)30185-4.

159. Molina AM, Jia X, Feldman DR, et al. Long-term response to sunitinib therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2013 Sep;11(3):297-302.
160. Heng DY, Xie W, Regan MM, et al. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: a population-based study. *Lancet Oncol*. 2013 Feb;14(2):141-8.
161. Poprach A, Pavlik T, Melichar B, et al. Clinical and laboratory prognostic factors in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib and sorafenib after progression on cytokines. *Urol Oncol*. 2014 May;32(4):488-95.
162. Poprach A, Bortlicek Z, et al. Efficacy of sunitinib in patients with metastatic or unresectable renal cell carcinoma and renal insufficiency. *Eur J Cancer*. 2015 Mar;51(4):507-13.
163. Khan G, Golshayan A, Elson P, et al. Sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma patients with renal insufficiency. *Ann Oncol*. 2010 Aug;21(8):1618-22.
164. Kim KH, Kim HY, Kim HR, et al. Efficacy and toxicity of sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma with renal insufficiency. *Eur J Cancer*. 2014 Mar;50(4):746-752.
165. Poprach A, Lakomy R, Bortlicek Z, et al. Efficacy of Sunitinib in Elderly Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Data from Real-World Clinical Practice. *Drugs Aging*. 2016 Sep;33(9):655-63.
166. Gore ME, Szczylik C, Porta C, et al. Final results from the large sunitinib global expanded-access trial in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2015 Jun 30;113(1):12-19.
167. Poprach A, Pavlik T, Melichar B, et al. Skin toxicity and efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: a national registry-based study. *Ann Oncol*. 2012 Dec;23(12):3137-43.

## 10 Seznam zkratek:

Atezo	atezolizumab
Bev	bevacizumab
BMI	body mass index
CAIX	karbonická anhydráza
CCRCC	clear-cell renal cell carcinoma
Cdk-1	cyklin- dependentní kináza 1
CR	complete response

CT	computed tomography
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
ČR	Česká republika
DCR	disease control rate
DFS	disease-free survival
DNA	deoxyribonukleová kyselina
E2F	transcription factor 3
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EMT	epiteliálně-mezenchymální tranzice
ESMO	European Society for Medical Oncology
Eve	everolimus
HF syndrom	hand-foot syndrom
HGF	hepatocyte growth factor
HIF	hypoxia inducible factor
HR	hazard ratio
IMDC	International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium
ISUP	International Society of Urological Pathology
KPS,KI	Karnofsky performance status
LDH	laktátdehydrogenáza
MET	mesenchymal epithelial transition
miRNA	mikroRNA
MOÚ	Masarykův onkologický ústav
MRI	magnetic resonance imaging
MSKCC	Memorial Sloan Kettering Cancer Center
Např	například
Nivo	nivolumab
non-CCRCC	non clear-cell renal cell carcinoma
NOR	Národní onkologický registr
mRCC	metastatic renal cell carcinoma
mTOR	mammalian target of rapamycin
Obr	Obrázek
OR	ods ratio
OS	overall survival
Paz	pazopanib
PD	progressive disease
PD-L	programmed death-ligand
PET	pozitronová emisní tomografie
PFS	progression-free survival
PDGF	platelet-derived growth factor
PR	partial response
PS	Performance Status
Pt	pacienti
RCC	renal cell carcinoma
Resp	respektive



RFS	relaps-free survival
ROC	Receiver Operating Characteristic
ORR	overall response-rate
SD	stable disease
Sun	sunitinib
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
UZ	ultrazvukové vyšetření
VEFG	vascular vascular endotelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau
Vs	versus

## 11 Seznam příloh

### Příloha 1:

Poprach A, Lakomý R, Selingerová I, Dolečková B, Bílek O, Slabý O, Hežová R, Fabián P, Staník M, Pavlík T, Bortlíček Z, Mlčochová H, Tkáč D, Vyzula R, Kiss I, Kocák I, Kocáková I, Svoboda M. Epidemiologická a klinicko-patologická charakteristika pacientů s renálním karcinomem: analýza 544 případů z jednoho centra. *Klin Onkol.* 2013;26(2):114-123.

### Příloha 2:

Poprach A, Bortlíček Z, Büchler T, Melichar B, Lakomý R, Vyzula R, Brabec P, Svoboda M, Dušek L, Gregor J. Patients with advanced and metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the Czech Republic: twenty cancer centres, six agents, one database. *Med Oncol.* 2012 Dec;29(5):3314-20.

### Příloha 3:

Redova M, Poprach A, Besse A, Iliev R, Nekvindova J, Lakomy R, Radova L, Svoboda M, Dolezel J, Vyzula R, Slaby O. MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2013 Feb;34(1):481-91.

### Příloha 4:

Poprach A, Lakomý R, Büchler T. Imunoterapie zhoubného nádoru ledviny. *Klin Onkol* 2017; 30(S3): 55-61.

### Příloha 5:

Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula R, Slaby O. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med.* 2012 Mar 22;10:55.

### Příloha 6:

Fedorko M, Juracek J, Stanik M, Svoboda M, Poprach A, Buchler T, Pacik D, Dolezel J, Slaby O. Detection of let-7 miRNAs in urine supernatant as potential diagnostic approach in non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma. *Biochem Med (Zagreb)*. 2017 Jun 15;27(2):411-417.

Příloha 7:

Poprach A, Fiala O, Chloupkova R, Melichar B, Lakomy R, Petrakova K, Zemanova M, Kopeckova K, Slaby O, Studentova H, Kopecký J, Kiss I, Finek J, Dusek L, Buchler T. . Pazopanib for Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Registry-based Analysis of 426 Patients. *Anticancer Res*. 2018 Jan;38(1):449-456.

Příloha 8:

Buchler T, Bortlicek Z, Poprach A, Kubackova K, Kiss I, Zemanova M, Fiala O, Dusek L, Vyzula R, Melichar B; Czech Renal Cancer Cooperative Group. Efficacy of everolimus in second- and third-line therapy for metastatic renal cell carcinoma: a registry-based analysis. *Urol Oncol*. 2014 Jul;32(5):569-75.

Příloha 9:

Buchler T, Bortlicek Z, Poprach A, Pavlik T, Veskrnova V, Honzirkova M, Zemanova M, Fiala O, Kubackova K, Slaby O, Svoboda M, Vyzula R, Dusek L, Melichar B. Outcomes for Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma Achieving a Complete Response on Targeted Therapy: A Registry-based Analysis. *Eur Urol*. 2016 Sep;70(3):469-75.

Příloha 10:

Buchler T, Poprach A, Bortlicek Z, Lakomy R, Chloupková R, Vyzula R, Zemanova M, Kopeckova K, Svoboda M, Slaby O, Kiss I, Studentova H, Hornova J, Fiala O, Kopecky J, Finek J, Dusek L, Melichar B. Outcomes of Patients With Long-Term Treatment Response to Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy for Metastatic Renal Cell Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2017 Jun 29. pii: S1558-7673(17)30185-4.

Příloha 11:

Poprach A, Pavlik T, Melichar B, Kubackova K, Bortlicek Z, Svoboda M, Lakomy R, Vyzula R, Kiss I, Dusek L, Buchler T; Czech Renal Cancer Cooperative Group. Clinical and laboratory prognostic factors in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib and sorafenib after progression on cytokines. *Urol Oncol*. 2014 May;32(4):488-95.

Příloha 12:

Poprach A, Bortlicek Z, Melichar B, Lakomy R, Svoboda M, Kiss I, Zemanova M, Fiala O, Kubackova K, Coufal O, Pavlik T, Dusek L, Vyzula R, Buchler T. Efficacy of sunitinib in patients

with metastatic or unresectable renal cell carcinoma and renal insufficiency. *Eur J Cancer*. 2015 Mar;51(4):507-13.

Příloha 13:

Poprach A, Lakomy R, Bortlicek Z, Melichar B, Pavlik T, Slaby O, Vyzula R, Svoboda M, Kiss I, Studentova H, Zemanova M, Fiala O, Kubackova K, Dusek L, Hornova J, Buchler T. Efficacy of Sunitinib in Elderly Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Data from Real-World Clinical Practice. *Drugs Aging*. 2016 Sep;33(9):655-63.

Příloha 14:

Poprach A, Pavlik T, Melichar B, Puzanov I, Dusek L, Bortlicek Z, Vyzula R, Abrahamova J, Buchler T. Czech Renal Cancer Cooperative Group. Skin toxicity and efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: a national registry-based study. *Ann Oncol*. 2012 Dec;23(12):3137-43.

Příloha 15:

Merhautova J, Hezova R, Poprach A, Kovarikova A, Radova L, Svoboda M, Vyzula R, Demlova R, Slaby O. miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib. *Biomed Res Int*. 2015;2015:941980.

# Výsledky terapie metastatického renálního karcinomu lékem everolimus – analýza údajů z klinického registru RENIS

## Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Everolimus – Data from the RENIS Clinical Registry

Büchler T.<sup>1</sup>, Dušek L.<sup>2</sup>, Fínek J.<sup>3</sup>, Poprach A.<sup>4</sup>, Budňáková D.<sup>2</sup>, Kandrnal V.<sup>2</sup>, Jarkovský J.<sup>2</sup>, Bortlíček Z.<sup>2</sup>, Klimeš D.<sup>2</sup>, Abrahámová J.<sup>1</sup>, Vyzula R.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Onkologické oddělení, Fakultní Thomayerova nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha

<sup>2</sup>Institut biostatistiky a analýz, Lékařská a Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

<sup>3</sup>Radioterapeutické a onkologické oddělení, Fakultní nemocnice Plzeň

<sup>4</sup>Klinika komplexní onkologické péče, Masarykův onkologický ústav, Brno

### Souhrn

Everolimus je perorální inhibitor kinázy mTOR indikovaný k léčbě metastatického renálního karcinomu (mRCC) s progresí během terapie cílené na vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) nebo po ní. Cílem naší práce bylo retrospektivně zhodnotit výsledky terapie lékem everolimus v České republice podle údajů z klinického registru RENIS. Nalezli jsme hodnotitelné údaje o 78 pacientech. Medián přežití bez progresce od zahájení terapie everolimem byl 7 měsíců (95% interval spolehlivosti 2–12 měsíců). Parciální remise nebo stabilizace onemocnění dosáhlo 69 % pacientů. Toxicita terapie byla predikovatelná a závažné nežádoucí účinky se vyskytly jen u 6 % nemocných, nejčastěji šlo o pneumotoxicitu. Léčbou everolimem lze tedy dosáhnout významného klinického prospěchu v populaci těžce předlčených pacientů s mRCC po selhání terapie cílené na VEGF.

### Klíčová slova

everolimus – renální karcinom – terapie

### Summary

Everolimus is an oral mTOR kinase inhibitor approved for the treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) progressing during or after treatment with vascular endothelial growth factor (VEGF)-targeted agents. Using the national RENIS clinical registry, we have retrospectively analysed outcomes of patients treated for mRCC with everolimus. A total of 78 patients were evaluable. Median progression-free survival from the start of everolimus therapy was 7 months (95% confidence interval 2–12 months). Partial response or stable disease was achieved in 69% of patients. Treatment toxicity was predictable and serious adverse events occurred in only 6% of patients the most common being respiratory toxicity. Everolimus therapy provides significant clinical benefit for heavily pretreated mRCC patients after failure of VEGF-targeted therapy

### Key words

everolimus – renal cell carcinoma – therapy

Autorský tým deklaroval podporu od společnosti Novartis.

The team of authors declares a support of Novartis.

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.



MUDr. Tomáš Büchler, Ph.D.

Fakultní Thomayerova nemocnice

Vídeňská 800

140 59 Praha 4

e-mail: tomas.buchler@ftn.cz

Obdrženo/Submitted: 14. 6. 2011

Přijato/Accepted: 18. 7. 2011

## Úvod

V terapii metastatického renálního karcinomu (mRCC) bylo v posledních pěti letech dosaženo významného pokroku. U nádoru dříve považovaného za rezistentní vůči systémové léčbě byla prokázána účinnost řady cílených léků zaměřených na ovlivnění metabolických kaskád spojených zejména s vaskulárním endoteliálním růstovým faktorem (VEGF) a centrální regulační molekulou mTOR (*mammalian target of rapamycin*).

Everolimus je perorálním inhibitorem kinázy mTOR s antiangiogenními a antiproliferačními účinky. V randomizované studii RECORD-1 byla prokázána jeho

účinnost a bezpečnost v léčbě mRCC s progresí na sunitinibu, sorafenibu či sekvenci těchto tyrozinkinázových inhibitorů (TKI) [1]. V současnosti je everolimus jediným lékem s prokázaným účinkem v této indikaci. V Evropské unii byl everolimus (Afinitor, Novartis) zaregistrován pro léčbu mRCC v roce 2009 [2] a rozhodnutí o jeho úhradě z veřejného zdravotního pojištění v České republice platí od podzimu 2010.

Cílem naší práce je poskytnout přehled o dosavadních výsledcích terapie everolimem a srovnat výsledky dosažované v České republice s výsledky registrační studie RECORD-1.

## Pacienti a metody

Pacienti s mRCC byli léčeni everolimem v 13 komplexních onkologických centrech. Údaje o jejich základních charakteristikách, průběhu a výsledcích terapie byly získány z klinické databáze RENIS a hodnoceny retrospektivně. Uzávěrka dat byla 10. 4. 2011.

Everolimus byl podáván v dávce 10 mg denně (s možností redukce dávky na 5 mg denně) do progresu nebo limitující toxicity. Restaging byl prováděn dle zvyklostí jednotlivých pracovišť, obvykle však jednou za 3 měsíce nebo při klinických známkách progresu. Léčebná odpověď byla hodnocena standardně podle systému RECIST. Přežití bez progresu (PFS) a celkové přežití (OS) pacientů léčených everolimem bylo odhadováno podle Kaplan-Meierova modelu. V popisu základních charakteristik souboru pacientů a toxicity bylo využito sumární statistiky.

## Výsledky

### Základní charakteristiky pacientů

V registru RENIS byly k datu analýzy údaje o 1 331 pacientech léčených cílenými léky pro mRCC, z toho 78 pacientů bylo léčeno everolimem. Základní charakteristiky pacientů jsou shrnuty v tab. 1. Všichni pacienti byli předléčeni sorafenibem, sunitinibem nebo oběma léky. U 65/78 (83 %) byla důvodem k ukončení terapie TKI progresu.

### Průběh terapie a nežádoucí účinky

Počáteční dávka everolimu byla 10 mg u 73 pacientů (94 %) a 5 mg u 5 pacientů (6 %). U 4 pacientů (5 %) byla dávka léku během terapie snížena z 10 mg na 5 mg denně pro nežádoucí účinky. K datu analýzy ukončilo terapii 28/78 pacientů (36 %), z toho 21 (75 %) pro progresu. U 3 pacientů (11 %) byla terapie ukončena pro nežádoucí účinek, u 1 pacienta (4 %) na přání pacienta a u 2 pacientů (7 %) pro těžkou infekci. V jednom případě nebyl důvod ukončení terapie uveden. Medián doby léčby u 28 nemocných s ukončenou terapií byl 2,8 měsíce (rozsah 1–13 měsíců). K datu analýzy žije 66 pacientů (85 %), 10 nemocných (13 %) zemřelo a o osudu 2 pacientů nebyly známy další informace. Výskyt nežádoucích účinků shrnuje tab. 2. Celkem bylo zaznamenáno 23 nežádoucích pří-

Tab. 1. Základní charakteristiky pacientů.

<b>Parametr</b>	
<b>muži/ženy, n (%)</b>	47 (60 %) / 31 (40 %)
<b>věk v době zahájení terapie everolimem</b> medián (rozsah), roky	62 (28–76)
<b>grade primárního nádoru, n (%)</b>	
G1	4 (5 %)
G2	27 (35 %)
G3-4	30 (39 %)
neznámo	17 (22 %)
<b>histologie, n (%)</b>	
světlobuněčný karcinom	75 (96 %)
papilární karcinom	3 (4 %)
<b>výkonnostní stav (WHO) v době zahájení terapie everolimem*, n (%)</b>	
0	18 (38 %)
1	28 (58 %)
2	2 (4 %)
<b>metastatické lokalizace, n (%)</b>	
plicí	53 (68 %)
lymfatické uzliny	25 (32 %)
kosti	19 (24 %)
játra	17 (22 %)
mozek	2 (3 %)
jiné	23 (29 %)
bez metastáz (lokálně pokročilý nádor)	4 (5 %)
<b>nefrektomie před zahájením cílené léčby, n (%)</b>	71 (91 %)
<b>imunoterapie před zahájením cílené léčby, n (%)</b>	53 (68 %)
<b>předchozí cílená terapie, n (%)</b>	
sunitinib	26 (33 %)
sorafenib	17 (22 %)
sunitinib-sorafenib	22 (28 %)
sorafenib-sunitinib	12 (15 %)
sorafenib-sunitinib-temsirolimus	1 (1,3 %)

\*údaj je znám pouze pro 48 pacientů

**Tab. 2. Počet pacientů s jednotlivými typy nežádoucích příhod a jejich procento v celkovém souboru 78 pacientů.**

Nežádoucí účinek	Závažný	Celkem
dýchací	3 (4 %)*	5 (6 %)*
kožní	–	3 (4 %)
hematologický	–	2 (3 %)
metabolický	1 (1 %)	2 (3 %)
únava	–	2 (3 %)
hypertenze	–	1 (1 %)
kardiovaskulární	1 (1 %)	1 (1 %)
kožní – HFSR	–	1 (1 %)
průjem	–	1 (1 %)
jiný	1 (1 %)	4 (5 %)

\*U jednoho pacienta se vyskytly dvě respirační nežádoucí příhody, vždy s jiným datem výskytu.

**Tab. 3. Souhrn výsledků léčby.**

<b>přežití bez progresy</b>	medián 7 měsíců (95% IS 2–12 měsíců)
<b>celkové přežití</b>	medián dosud nedosažen
<b>nejlepší dosažená odpověď*</b>	
CR	0 (0 %)
PR	1 (2 %)
SD	32 (67 %)
CR+PR+SD	33 (69 %)
progrese	15 (31 %)

\*údaje jsou dostupné pouze pro 48 nemocných

hod u 14 pacientů (18 %), z toho 6 nežádoucích příhod u 5 pacientů (6 %) bylo hodnoceno jako závažné.

#### Výsledky terapie

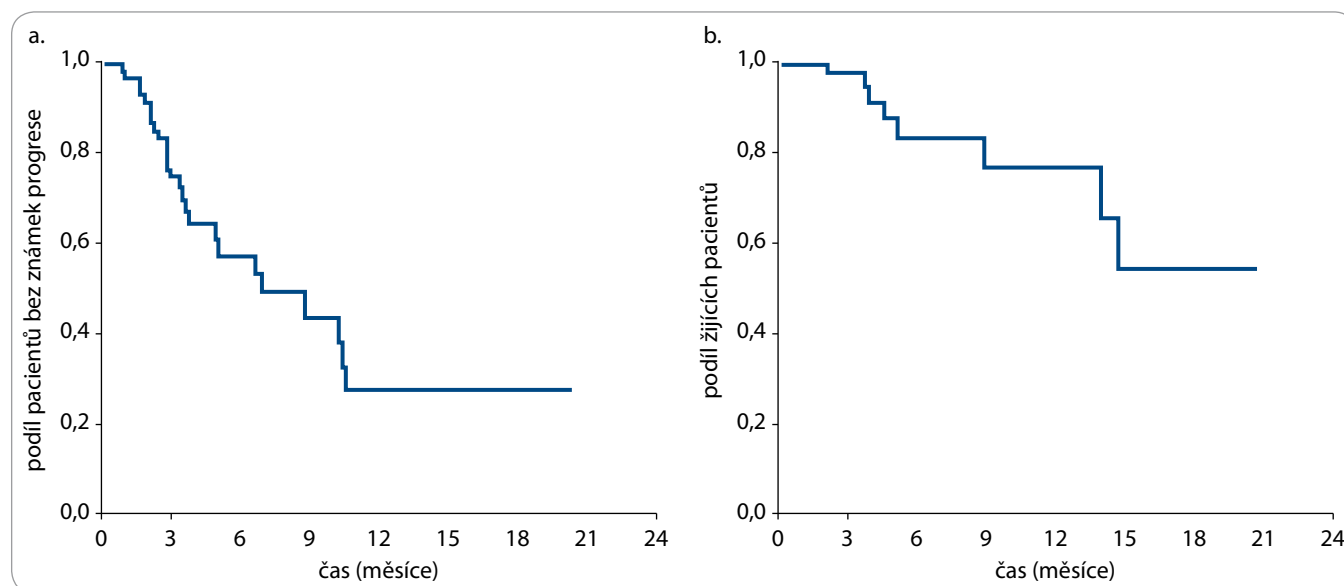
Přehled výsledků terapie je uveden v tab. 3, na obr. 1 jsou zobrazeny křivky pro OS (a) a PFS (b). Podle očekávání nebylo dosaženo kompletních remisí. Prospěch z léčby (tj. procento CR + PR + SD) mělo 69 % nemocných léčených everolimem. V jednom roce od zahájení terapie everolimem přežívalo bez progresy 27 % pacientů (95% IS 9–46 %) a celkem přežívalo 78 % nemocných (95% IS 60–95 %).

#### Diskuze

Česká republika má ze zatím neobjasněných důvodů nejvyšší incidenci karcinomu ledviny na světě. Incidence renálního karcinomu u nás v roce 2007 byla 27/100 000 obyvatel při mortalitě 12/100 000 obyvatel [3]. Asi u 25–30 % pacientů s renálním karcinomem jsou metastázy zjevné již v době diagnózy, u dalších 20–30 % pacientů s nepokročilým nádorem dojde ke generalizaci po nefrektomii.

Everolimus je lékem s mnoha klinickými aplikacemi. Kromě léčby mRCC se používá jako imunosupresivum při orgánových transplantacích a pro zlep-

šení průchodnosti stentů v kardiologii [4]. K jeho registraci v léčbě mRCC vedly výsledky randomizované studie RECORD-1, v níž byl everolimus srovnáván s placebem u nemocných po selhání sorafenibu, sunitinibu nebo obou těchto TKI. Celkem 416 pacientů bylo randomizováno v poměru 2 : 1 do ramene s everolimem v dávce 10 mg/den (n = 277) nebo do ramene s placebem (n = 139). Studie byla dvojitě zaslepená a jejím hlavním cílem bylo prokázat rozdíl v PFS a ověřit bezpečnost terapie [1,5]. Podle hodnocení nezávislého panelu dosáhl medián PFS 4,9 měsíce (everolimus) ve srovnání s 1,9 měsíce (pla-



Obr. 1. Kaplan-Meierovy křivky pro přežití bez progresy (a) a celkové přežití (b) pacientů z registru RENIS léčených everolimem.

cebo). Léčba everolimem snížila riziko progresu o 67 % ( $p < 0,001$ ). U 64 % nemocných se podařilo dosáhnout kontroly nemoci (PR + SD). Rozdíl v OS nebyl statisticky významný (14,8 měsíce versus 14,4 měsíce,  $p = 0,162$ ), ale tento výsledek mohl být významně ovlivněn překřížením ramen – až 80 % pacientů randomizovaných původně k placebu dostalo při progresi everolimem.

Nezávislémi prognostickými faktory spojenými s kratším OS byly horší výkonostní stav pacientů (*performance status*, PS), hyperkalcemie, anémie a předchozí léčba sunitinibem [5]. Nebyl zaznamenán významný rozdíl v kvalitě života mezi pacienty léčenými everolimem a placebem [6].

Ve srovnání se studií RECORD-1 měli naši pacienti o něco lepší PS (100 % Karnofsky, 28 % ve studii RECORD-1 vs 38 % PS 0 RENIS). Procento nemocných po nefrektomii bylo podobné (97 % RECORD-1 vs 91 % RENIS). Téměř polovina našich pacientů byla předléčena sunitinibem i sorafenibem (44 %), zatímco ve studii RECORD-1 bylo těchto pacientů jen 26 %. Již samotná schopnost podstoupit sekvenční léčbu přitom pravděpodobně koreluje s relativně dlouhým přežitím u mRCC [7]. Dalším potenciálně důležitým rozdílem byla skutečnost, že 17 % pacientů v našem souboru neukončilo předchozí terapii TKI pro progresi, nýbrž

z jiných důvodů (zpravidla pro toxicitu). Ve studii RECORD-1 byla naproti tomu progresu na TKI jednou ze základních podmínek pro zařazení pacientů. Tyto rozdíly mohou být příčinou relativně lepšího PFS v našem retrospektivním souboru ve srovnání se studií RECORD-1. Procento nemocných s prospěchem z léčby (CR + PR + SD) je v našem souboru prakticky stejné jako v randomizované studii (69 % vs 64 %). Samozřejmě, počet nemocných v registru RENIS je dosud relativně malý a doba jejich léčeni krátká.

Závažnými nežádoucími příhodami u pacientů léčených everolimem ve studii RECORD-1 byly zejména infekce (incidence 10 %), dušnost (7 %) a únava (5 %) [5]. Symptomatická pneumonitida se vyskytuje u asi 10 % pacientů léčených everolimem (u přibližně 4 % dosahuje stupně 3, tj. interferuje s běžnými aktivitami a/nebo vyžaduje oxygenoterapii). Ve většině případů jsou klinické projevy pneumotoxicity everolimu reverzibilní po redukci dávky nebo přerušení terapie. Radiologické známky plicní toxicity se objevují dokonce až u 40 % pacientů léčených everolimem [8]. Respirační nežádoucí příhody byly zaznamenány i v našem souboru u 5/78 pacientů (6 %), z toho u 3 (4 %) nemocných byly hodnoceny jako závažné. Údaje o infekčních komplikacích léčby nebylo možné z registru RENIS zjistit.

Podle první analýzy nemocných s mRCC z registru RENIS dosahuje tedy everolimem i mimo klinickou studii dobrého efektu při přijatelné tolerabilitě. Klinického prospěchu z léčby bylo dosaženo u téměř 70 % těžce předléčených nemocných s mRCC.

## Literatura

1. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S et al. Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. *Lancet* 2008; 372(9637): 449–456.
2. Afinitor – souhrn informací o přípravku. Poslední aktualizace 17. 05. 2010. European Medicines Agency. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/cs\\_CZ/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/001038/WC500022814.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/001038/WC500022814.pdf).
3. Dušek L, Mužik J, Gelnarová E et al. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin Onkol* 2010; 23(5): 311–324.
4. Gabardi S, Baroletti SA. Everolimus: a proliferation signal inhibitor with clinical applications in organ transplantation, oncology, and cardiology. *Pharmacotherapy* 2010; 30(10): 1044–1056.
5. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: final results and analysis of prognostic factors. *Cancer* 2010; 116(18): 4256–4265.
6. Beaumont JL, Butt Z, Baladi J et al. Patient-reported outcomes in a phase III study of everolimus versus placebo in patients with metastatic carcinoma of the kidney that has progressed on vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy. *Oncologist* 2011; 16(5): 632–640.
7. Buchler T, Klapka R, Melichar B et al. Sunitinib followed by sorafenib or vice versa for metastatic renal cell carcinoma – data from the Czech registry. *Ann Oncol*. 2011. Epub ahead of print.
8. White DA, Camus P, Endo M et al. Noninfectious pneumonitis after everolimus therapy for advanced renal cell carcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(3): 396–403.

# Patients with advanced and metastatic renal cell carcinoma treated with targeted therapy in the Czech Republic: twenty cancer centres, six agents, one database

Alexandr Poprach · Zbyněk Bortlíček · Tomáš Büchler · Bohuslav Melichar ·  
Radek Lakomý · Rostislav Vyzula · Petr Brabec · Marek Svoboda ·  
Ladislav Dušek · Jakub Gregor

Received: 20 March 2012 / Accepted: 14 June 2012  
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

**Abstract** The incidence and mortality of renal cell carcinoma (RCC) in the Czech Republic are among the highest in the world. Several targeted agents have been recently approved for the treatment of advanced/metastatic RCC. Objective: Presentation of a national clinical database for monitoring and assessment of patients with advanced/metastatic RCC treated with targeted therapy. The RenIS (RENal Information System, <http://renis.registry.cz>) registry is a non-interventional post-registration database of epidemiological and clinical data of patients with RCC treated with targeted therapies in the Czech Republic. Twenty cancer centres eligible for targeted therapy administration participate in the project. As of November 2011, six agents were approved and reimbursed from public health insurance, including bevacizumab, everolimus, pazopanib, sorafenib, sunitinib, and temsirolimus. As of 10 October 2011, 1,541 patients with valid records were entered into the database. Comparison with population-based data from the Czech National Cancer

Registry revealed that RCC patients treated with targeted therapy are significantly younger (median age at diagnosis 59 vs. 66 years). Most RenIS registry patients were treated with sorafenib and sunitinib, many patients sequentially with both agents. Over 10 % of patients were also treated with everolimus in the second or third line. Progression-free survival times achieved were comparable to phase III clinical trials. The RenIS registry has become an important tool and source of information for the management of cancer care and clinical practice, providing comprehensive data on monitoring and assessment of RCC targeted therapy on a national level.

**Keywords** Renal cell carcinoma · Targeted therapy · Clinical registry · Cancer care · Database · Population-based data

## Introduction

The incidence and mortality of renal cell carcinoma (RCC) in the Czech Republic are among the highest in the world [1], with 27.14 new cases and 11.13 deaths per 100,000 persons per year [2, 3]. The disease is more frequent in men, who contribute 63 % to the total incidence. Almost 40 % of RCCs are diagnosed at advanced or metastatic stage.

Systemic treatment of advanced and metastatic RCC using immunotherapy (interleukin-2 and/or interferon alpha) was effective only in a minority of patients and was accompanied by substantial toxicity. Development and introduction into the clinical practice of targeted therapies, that is new agents with significantly higher specificity for particular cancer-related pathways, have improved survival of patients with advanced RCC, generally with a lower rate of adverse effects. Several targeted agents have been

---

A. Poprach · R. Lakomý · R. Vyzula · M. Svoboda  
Department of Complex Oncology Care,  
Masaryk Memorial Cancer Institute, Žlutý kopec 7,  
656 53 Brno, Czech Republic

Z. Bortlíček · P. Brabec · L. Dušek · J. Gregor (✉)  
Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University,  
Kamenice 126/3, 625 00 Brno, Czech Republic  
e-mail: [gregor@iba.muni.cz](mailto:gregor@iba.muni.cz)

T. Büchler  
Department of Oncology, First Faculty of Medicine,  
Thomayer Hospital and Charles University, Vídeňská 800,  
140 59 Prague, Czech Republic

B. Melichar  
Department of Oncology, Palacký University Medical School  
and Teaching Hospital Olomouc, I. P. Pavlova 185/6,  
779 00 Olomouc, Czech Republic



recently approved for treatment by US and European authorities, including drugs targeting vascular endothelial growth factor (VEGF) and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways; clinical trials with these agents have been recently reviewed elsewhere [4].

Targeted therapy has been available for Czech patients with advanced RCC since 2006 when sunitinib and sorafenib were approved. As of November 2011, six agents were approved and reimbursed from public health insurance, including bevacizumab, everolimus, pazopanib, sorafenib, sunitinib, and temsirolimus. Treatment with these drugs is restricted to twenty specialised cancer centres that agreed to enter all patients into the RenIS registry. Patient characteristics and treatment course and outcomes are monitored by means of an observational clinical database established by the national expert panel of the Czech Oncological Society (COS).

Since treatment with most of the targeted agents was introduced only recently, currently there are only limited published data on the use of these drugs in the routine clinical practice, particularly in sequence. The PREDICT study was a non-interventional study monitoring safety and outcomes of sorafenib [5]. Other authors have reported results of various therapy sequences after failure of the first-line setting of a particular targeted therapy [6–11], including data from the Czech database described here [12].

In the present paper, we aim to describe the Czech patient cohort from the epidemiological perspective based on the data from the clinical registry that allows the monitoring and assessment of the advanced RCC treatment by different targeted agents in clinical practice.

## Patients and methods

The clinical registry RenIS (RENal Information System, <http://renis.registry.cz>) is a non-interventional post-registration database of epidemiological and clinical data of patients with renal cell carcinoma treated with targeted therapies in the Czech Republic. All six targeted anticancer agents currently registered for the treatment of metastatic RCC have been included (bevacizumab, everolimus, pazopanib, sorafenib, sunitinib, and temsirolimus). The project was initiated in June 2007. Collected data allow for monitoring of patients' epidemiological characteristics, treatment regimens, therapeutic responses, modelling of risk factors for survival, and detailed analysis of adverse effects. Data collection system is primarily oriented on the treatment of advanced/metastatic disease, but it also contains the necessary information related to the primary tumour.

Data on individual patients and their treatment are entered into the database by the twenty cancer centres providing specialised cancer care including targeted therapy. This means that, with the exception of few patients enrolled into the clinical trials, all RCC patients receiving targeted therapy in the Czech Republic are registered in the database. The limited number of involved healthcare facilities allows for accurate and reliable data collection and assessment of treatment results and safety. All patient data are fully anonymised and remain an intellectual property of the appropriate centre. Publication of data must be approved by the project board.

The technological base of the project is provided by the Institute for Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno. The database system was originally based on a modified version of TrialDB system [13], which has been subsequently customised for the collection of specific clinical data of the RenIS project. The database is implemented online and uses internet and database technologies featuring multilevel architecture (client–web server–database server). All submitted data are collected in a central server, where they are safely stored in a database administered in the ORACLE 11g system. The registry is accessible via internet from any PC equipped with one of the recent versions of MS Internet Explorer or Mozilla Firefox, which support encrypted communication with a 128-bit SSL protocol. Access to the database is protected by a hierarchical system of access rights.

The Kaplan–Meier method was used for survival analysis. Overall survival was calculated as the time from the first targeted therapy initiation until death from any cause. Progression-free survival was calculated as the time from the particular targeted therapy initiation until progression or death from any cause. Statistical differences in age distribution were assessed using the two-sample *t* test.

## Results

Data export for this study was carried out on 10 October 2011. As of this date, the registry contained records on 1,567 patients with advanced or metastatic RCC treated with targeted therapy. Information on the date of diagnosis or the start of targeted therapy was not available in 26 patients; these were excluded from subsequent analysis. Therefore, the analysis was performed on data of 1,541 patients.

The largest proportion of patients was diagnosed with RCC between 55 and 59 years of age (21.2 %) and started targeted therapy at the age between 60 and 64 years (21.8 %). Mean age of patients at time of diagnosis and targeted therapy initiation was 59 and 62 years, respectively. There were significantly more men than women (70 % and 30 %, respectively), corresponding to overall

distribution of RCC in Czech population. Clear-cell RCC was the most frequent morphological type (94.7 %), followed by papillary carcinoma (4.1 %). Other types occurred rarely. A detailed description of the patient cohort is shown in Table 1.

Whole population-based data on cancer epidemiology were obtained from the Czech National Cancer Registry (CNCR) accessible online via the web portal SVOD [2]. To compare the population-based data with those from the RenIS registry, a cohort of patients, who were diagnosed in clinical stage IV or experienced disease recurrence in the period of 2006–2008, was analysed. This group is clinically similar to the group of RCC patients who are indicated for

targeted therapy and thus recorded in the registry. The analysis revealed that the most frequent age category at diagnosis was 60–64 years (17.6 %), but in contrast to the RenIS cohort, there was a much higher proportion of patients diagnosed in age over 65 years ( $p < 0.05$ ) (Fig. 1). This difference documents that the targeted therapy tends to be administered to younger RCC patients. Most patients in the RenIS registry have received prior cytokine therapy.

The registry design allows for comprehensive monitoring of various types of targeted therapy and their sequences in individual patients, including dose modifications, adherence to guidelines, and assessment of therapy results. Therapy sequences recorded in the registry are shown in Fig. 2. Because sunitinib and sorafenib were the first two targeted therapies for RCC in the Czech Republic, it is not surprising that most of the RenIS registry patients were treated by these two drugs, either alone or in sequence. Over 10 % of patients were also treated by everolimus in the second or third line. Bevacizumab and temsirolimus were administered rarely. Pazopanib was approved for reimbursement under the Czech healthcare system in 2011, not allowing sufficient follow-up at the time in the present registry analysis.

The median overall survival of all patients in the registry from the first targeted therapy initiation was 26.9 months (Fig. 3). Progression-free survival measured from the particular targeted therapy initiation is shown in Table 2. Toxicity and safety were also recorded during the treatment. Most of the adverse effects recorded were skin, gastrointestinal, haematological, and cardiovascular toxicities (Table 3). Overall toxicity profiles corresponded to those in registration studies and the respective summary of product characteristics of the targeted agents.

## Discussion

The RenIS registry is providing a large amount of data that may be used in the management of cancer care and clinical practice. It has become an important tool for physicians, researchers, managers, and healthcare payers. Information on patient characteristics and treatment can be obtained, including ECOG performance status, weight loss, laboratory tests, histology, staging, sequence of treatments, treatment outcomes, and disease course. Each recurrence or progression is linked with relevant clinical data. This allows a number of analyses, for example assessment of therapy sequences [12], comparison of accepted MSKCC prognostic criteria with new prognostic and predictive factors (thrombocytosis, neutrophilia, and others), impact of any treatments given before targeted therapy such as nephrectomy or immunotherapy, and many more.

Since the RenIS cohort includes patients with different characteristics, baseline status, and therapy sequences and

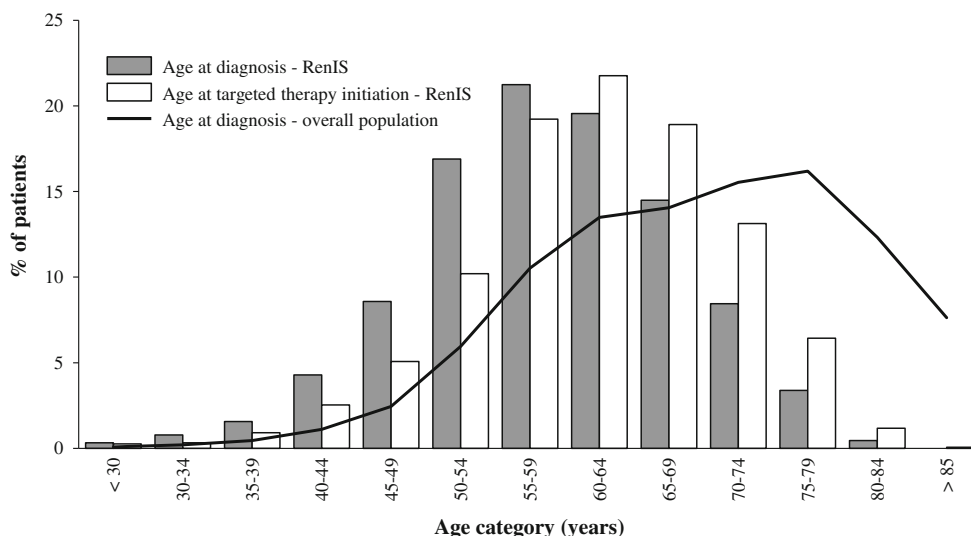
**Table 1** Basic characteristics of the patient cohort

Number of records (patients)	1,567	
Number of valid records (patients)	1,541	
Age of patients	RenIS	Overall population*
Age at diagnosis (mean/median)	59/59 years	67/67 years
Age at targeted therapy initiation (mean/median)	62/62 years	–
Proportion of patients diagnosed in age over 65 years (%)	26.7	58.3
Gender (number, %)		
Males	1,087 (70.5)	
Females	454 (29.5)	
Disease status at diagnosis (number, %)		
Localised/locally advanced	678 (44.0)	
Metastatic	685 (44.4)	
Unknown/not stated	178 (11.6)	
Morphology (number, %)		
Clear cell	1,460 (94.7)	
Papillary	63 (4.1)	
Chromophobe	9 (0.6)	
Collecting duct	3 (0.2)	
Unknown/not stated	6 (0.4)	
Preceding surgery** (number, %)		
Nephrectomy	1,279 (83.0)	
Partial nephrectomy	38 (2.5)	
Other type of surgery	359 (23.3)	
No surgery	144 (9.3)	
Preceding palliative radiotherapy (number, %)		
Yes	323 (21.0)	
No	1,218 (79.0)	
Preceding immunotherapy		
Yes	947 (61.5)	
No	594 (38.5)	

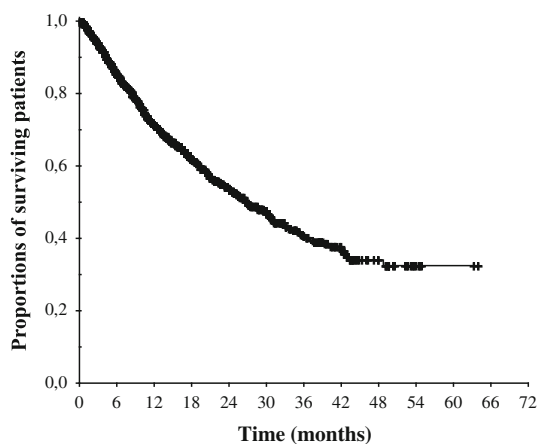
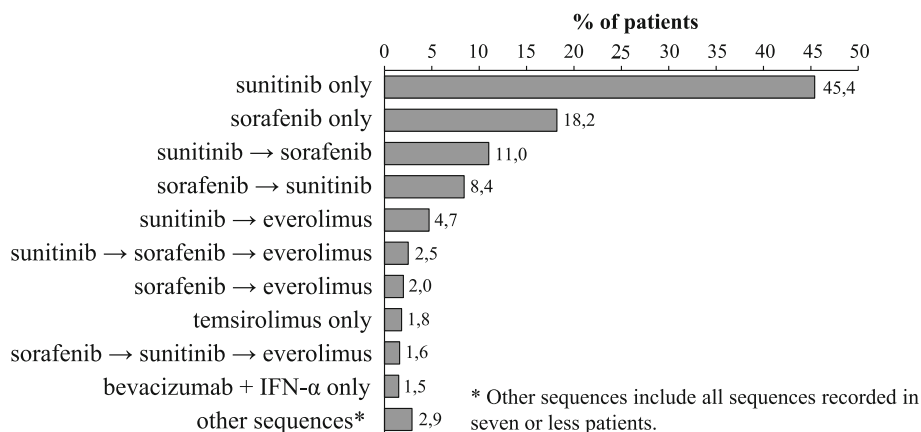
\* Stage IV and recurrences in the period of 2006–2008

\*\* One patient may undergo more surgical procedures

**Fig. 1** Age distribution of patients in the RenIS registry and overall population (stage IV and recurrences in the period of 2006–2008; data source: Czech National Cancer Registry)



**Fig. 2** Sequences of targeted therapies recorded in the RenIS registry



**Fig. 3** Overall survival of patients with advanced RCC treated with targeted therapy

the drugs are administered in different treatment lines, it may be difficult to compare the results with published clinical trials, which are usually focused on one medication and are based on strict inclusion/exclusion criteria. It

should also be noted that the number of patients treated with bevacizumab and temsirolimus included in the present analysis is relatively low. However, it is evident that the progression-free survival reached in the RenIS registry patients was comparable with that in phase III clinical trials [14–18].

Clear-cell RCC comprises approximately 70–75 % of all renal cell carcinomas, followed by papillary (10 %), chromophobe (5 %), and further histological subtypes [19]. Proportion of the histological subtypes was different in the RenIS registry, as almost 95 % of tumours fall into the clear-cell subtype. This difference again illustrates the fact that the registry is treatment-oriented and includes information only on patients receiving targeted agents. On the other hand, it reflects the real-life clinical practice and allows for detailed monitoring and assessment of the targeted therapy administration and results.

Data are entered into the registry on a continuous basis, and detailed analyses are performed twice per year. Recent information on therapy and response, best achieved response and its duration are therefore available and up to

**Table 2** Progression-free survival of patients since initiation of the particular targeted therapy and its comparison with clinical trials

Therapy	PFS—RenIS Median (95 % CI) Number of patients	PFS—clinical trials (months)	Reference
Bevacizumab (combined with interferon alpha)	15.2 months* (7.6; 22.9) <i>N</i> = 37 patients	10.2	Escudier et al. 2007 [14]
Everolimus	4.8 months (3.6; 6.1) <i>N</i> = 175 patients	4.9	Motzer et al. 2010 [15]
Sorafenib	6.9 months (6.1; 7.7) <i>N</i> = 698 patients	5.5	Escudier et al. 2007 [16]
Sunitinib	10.0 months (9.0; 11.1) <i>N</i> = 1,162 patients	11.0	Motzer et al. 2007 [17]
Temsirolimus	4.1 months (3.2; 5.1) <i>N</i> = 46 patients	5.5	Hudes et al. 2007 [18]

\* A pilot analysis performed with a low number of patients with short follow-up. Please note a broad 95 % confidence interval

**Table 3** Overview of adverse events (AE) recorded in the registry

Therapy	Most frequent AE (% of patients)	% of patients without AE
Bevacizumab ( <i>N</i> = 38 patients)	Cardiovascular (7.9 %) Skin (5.3 %)	76.3
Everolimus ( <i>N</i> = 179 patients)	Skin (5.6 %) Haematological (4.5 %) Metabolic 5 (2.8 %)	77.7
Sorafenib ( <i>N</i> = 704 patients)	Skin (30.0 %) Gastrointestinal (14.8 %) Cardiovascular (5.5 %)	51.1
Sunitinib ( <i>N</i> = 1,174 patients)	Haematological (12.1 %) Gastrointestinal (11.6 %) Skin (11.2 %)	61.3
Temsirolimus ( <i>N</i> = 46 patients)	Skin (10.9 %) Gastrointestinal (6.5 %)	69.6

date. The median overall survival from the first targeted therapy initiation was 26.9 months. This value reflects treatment with various targeted agents and their sequences and is not informative about survival of all patients with stage IV or inoperable recurrence in the Czech Republic,

because many of these patients did not receive any targeted therapy due to different reasons.

When comparing epidemiological data from the RenIS registry with other studies or databases, some differences were found. In contrast to the population-based data from the Czech National Cancer Registry, age distribution of patients with advanced RCC was shifted to lower age groups (median age at diagnosis 59 vs. 66 years, most frequent age category 55–59 vs. 75–79 years). This demonstrates that the targeted therapy is more commonly administered to younger patients. Several factors may be suggested to explain the difference in age structure between the overall population of RCC patients and those treated with targeted therapy. While the age itself is not a contraindication for targeted therapies, elderly patients are more likely present with significant comorbidities and/or poor performance status that makes them ineligible for targeted agents. Additional socio-economic factors cannot be excluded, but currently available data are not sufficient to draw any definite conclusions on their impact.

Introduction of a number of targeted agents and their use in different sequences have led to more frequent use of progression-free survival instead of overall survival when evaluating the benefits of a particular therapy. Moreover, patients in clinical trials often cross over from one treatment group to another. Progression-free survival observed in patients included in the RenIS database is comparable not only to the results of large phase III clinical trials [14–18], but also to retrospective studies on patients pretreated with different targeted therapies [6, 8, 9, 20–22].

The patients included in the RenIS database have been treated with targeted agents outside of clinical trials. Therefore, the physicians are not limited by additional requirements given by clinical trial criteria, and the overall treatment schedule corresponds to common clinical practice better than clinical trials. This results in a significantly higher heterogeneity of collected clinical data. Nevertheless, the RenIS registry design enables retrospective monitoring and assessment of all sequentially administered therapies. Continuous data collection from a network of twenty cancer centres requires careful project management to ensure comparability and completeness of patient records. Therefore, the data undergo thorough validation prior to processing and analysis. When these necessary procedures are in place, clinical registries represent an indispensable source of information extending those obtained in clinical trials and are a valuable tool for epidemiologists, clinicians, managers, and healthcare payers involved not only in cancer care, but in the whole healthcare system. Due to standardised parametric data collection system, they may also provide easily accessible information for international comparisons or serve as integral part of international clinical studies and research.

In conclusion, the RenIS registry provides an important tool for monitoring the administration of targeted therapy on a national level. The comparable outcomes of patients in the RenIS registry and prospective clinical trials indicate that in the Czech Republic, a careful patient selection is taking place for targeted therapy of metastatic RCC.

**Acknowledgments** Authors would like to thank all cancer centres involved in data collection for the RenIS registry: University Hospital Brno—Otakar Bednařík, MD; St. Ann's University Hospital, Brno—Jana Katolická, MD, PhD; Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno—prof. Rostislav Vyzula, MD, PhD; Hospital České Budějovice—Václav Janovský, MD, Alena Šínáková, MD; University Hospital Hradec Králové—prof. Jiří Petera, MD, PhD, assoc.prof. Josef Dvořák, MD, PhD; Hospital Chomutov—Martina Chodacká, MD; Hospital Jihlava—Lubomír Slavíček, MD, Věra Benešová, MD; Regional Hospital Liberec—Jiří Bartoš, MD, MBA, Věra Hejzlarová, MD; Hospital and Health Centre in Nový Jičín—assoc. prof. Renata Soumarová, MD, PhD, MBA, Josef Gruna, MD; University Hospital Olomouc—prof. Bohuslav Melichar, MD, PhD, Petr Beneš, MD, PhD; University Hospital Ostrava—David Feltl, MD, PhD, Martina Vybíralová, MD; Regional Hospital Pardubice—assoc. prof. Jaroslav Vaňásek, MD, PhD, Iveta Kolářová, MD; University Hospital Plzeň—assoc. prof. Jindřich Fínek, MD, PhD, Vladimíra Arnetová, MD; Hospital Na Bulovce, Prague—Vladimíra Stáhalová, MD; Hospital Na Homolce, Prague—Martin Šafanda, MD, PhD; General University Hospital in Prague—prof. Luboš Petruželka, MD, PhD; University Hospital Motol, Prague—Jana Prausová, MD, PhD, Stanislav Batko, MD; Thomayer Hospital, Prague—prof. Jitka Abrahámová, MD, PhD; Masaryk Hospital in Usti nad Labem—Milan Lysý, MD, David Šulc, MD; T. Baťa Regional Hospital, Zlín—Milan Kohoutek, MD, Alena Jakšičová, MD. This work was supported by the Project MZ0MOU2005 of the Czech Ministry of Health. The RenIS registry is supported by research grants from Novartis, Pfiizer, Bayer, Roche, and GlaxoSmithKline.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase no. 10 (online). International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. Epidemiology of malignant tumours in the Czech Republic (online). Masaryk University, Czech Republic. 2005. Available from: <http://www.svod.cz>. Version 7.0 [2007], ISSN 1802-8861.
3. Dušek L, Mužík J, Gelnarová E, Fínek J, Vyzula R, Abrahámová J. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic (in Czech). *Klin Onkol*. 2010;23(5):311-24.
4. Coppin C, Kollmannsberger C, Le L, Porzolt F, Wilt TJ. Targeted therapy for advanced renal cell cancer (RCC): a Cochrane systematic review of published randomised trials. *BJU Int*. 2011;108(10):1556-63.
5. Jäger D, Ma J, Korbenfeld E, Zemanová M, Leonhartsberger N, Stauch K, et al. PREDICT (Patient Characteristics in REnal Cell Carcinoma and Daily PractiCe Treatment With Sorafenib) non-interventional study—final report. *Eur J Cancer*. 2011;47(1):S520.
6. Rini BI, Michaelson MD, Rosenberg JE, Bukowski RM, Sosman JA, Stadler WM, et al. Antitumor activity and biomarker analysis of sunitinib in patients with bevacizumab refractory metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2008;26(22):3743-8.
7. Di Lorenzo G, Buonerba C, Federico P, Rescigno P, Milella M, Ortega C, et al. Third-line sorafenib after sequential therapy with sunitinib and mTOR inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2010;58(6):906-11.
8. Garcia JA, Hutson TE, Elson P, Cowey CL, Gilligan T, Nemeč C, et al. Sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma refractory to either sunitinib or bevacizumab. *Cancer*. 2010;116(23):5383-90.
9. Grünwald V, Seidel C, Fenner M, Ganser A, Busch J, Weikert S. Treatment of everolimus-resistant metastatic renal cell carcinoma with VEGF-targeted therapies. *Br J Cancer*. 2011;105(11):1635-9.
10. Grünwald V, Weikert S, Seidel C, Busch J, Johannsen A, Fenner M, et al. Efficacy of sunitinib re-exposure after failure of an mTOR inhibitor in patients with metastatic RCC. *Onkologie*. 2011;34(6):310-4.
11. Bergmann L, Kube U, Kindler M, Koepke T, Steiner G, Janssen J, et al. A noninterventional study of everolimus in metastatic renal cell cancer after use of one VEGFR-TKI: results of a pre-planned interim analysis of a prospective study. American Society of Clinical Oncology (ASCO) annual meeting; 3-7 June 2011; Chicago, Illinois, USA.
12. Büchler T, Klapka R, Melichar B, Brabec P, Dušek L, Vyzula R, et al. Sunitinib followed by sorafenib or vice versa for metastatic renal cell carcinoma—data from the Czech registry. *Ann Oncol*. 2012;23(2):395-401.
13. Nadkarni PM, Brandt C, Frawley S, Sayward FG, Einbinder R, Zelterman D, et al. Managing attribute—value clinical trials data using the ACT/DB client-server database system. *J Am Med Inf Assoc*. 1998;5(2):139-51.
14. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, et al. AVOREN trial investigators. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007;370(9605):2103-11.
15. Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, Bracarda S, et al. Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma final results and analysis of prognostic factors. *Cancer*. 2010;116(18):4256-65.
16. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(2):125-34.
17. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(2):115-24.
18. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, et al. Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(22):2271-81.
19. Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs. Lyon: IARC Press; 2004.
20. Vickers MM, Choueiri TK, Rogers M, Percy A, Finch D, Zama I, et al. Clinical outcome in metastatic renal cell carcinoma patients after failure of initial vascular endothelial growth factor-targeted therapy. *Urology*. 2010;76(2):430-4.
21. Heng DY, Mackenzie MJ, Vaishampayan UN, Bjarnason GA, Knox JJ, Tan MH, et al. Primary anti-vascular endothelial growth factor (VEGF)-refractory metastatic renal cell carcinoma: clinical

- characteristics, risk factors, and subsequent therapy. *Ann Oncol*. Nov 5 2011 [Epub ahead of print].
22. Busch J, Seidel C, Kempkensteffen C, Johannsen M, Wolff I, Hinz S, et al. Sequence therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: comparison of common targeted treatment options following failure of receptor tyrosine kinase inhibitors. *Eur Urol*. 2011;60(6):1163–70.

# MiR-210 expression in tumor tissue and in vitro effects of its silencing in renal cell carcinoma

Martina Redova · Alexandr Poprach · Andrej Besse · Robert Iliev · Jana Nekvindova · Radek Lakomy · Lenka Radova · Marek Svoboda · Jan Dolezel · Rostislav Vyzula · Ondrej Slaby

Received: 8 August 2012 / Accepted: 24 October 2012 / Published online: 13 November 2012  
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2012

**Abstract** Renal cell carcinoma (RCC) is the most common neoplasm of adult kidney accounting for about 3 % of adult malignancies. MicroRNAs (miRNAs) are a class of naturally occurring, short non-coding RNAs that regulate gene expression at the post-transcriptional level. We determined global miRNA expression profiles of RCC and parallel renal parenchyma

tissues by using quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction-based TaqMan low-density arrays. Afterward, we validated the difference in miR-210 expression levels on the larger group of RCC patients (35 RCC versus 10 non-tumorous parenchyma samples). Functional in vitro experiments were performed on ACHN and CAKI-2 RCC cell lines transfected with miRNA-210 inhibitor. Cell viability, apoptosis, cell cycle, scratch wound migration assay, and invasion assay (xCELLigence) were performed. We have identified original ccRCC-specific miRNA signature in clinical samples (73 miRNAs were significantly downregulated and five miRNAs upregulated ( $P < 0.003$ )). Increased expression levels of miR-210 in RCC tumor tissue were independently validated. We observed decreased viability of ACHN and CAKI-2 cells and accumulation of CAKI-2 in G2 phase of cell cycle after silencing of miR-210 expression. Downregulation of miR-210 also reduced the migratory and invasive potential of ACHN metastatic RCC cells. Moreover, we showed downregulation of *HIF1a* protein in both cell lines after miR-210 silencing indicating participation of miR-210 in hypoxic processes of RCC not only through regulation of its target mRNAs but also by indirect regulation of *HIF1a*. To our knowledge, this is the first report to show miR-210 regulatory effects on cell migration, invasive potential, and *HIF1a* protein in RCC cells.

Martina Redova and Alexandr Poprach contributed equally to this work.

M. Redova · A. Poprach · R. Lakomy · M. Svoboda · R. Vyzula · O. Slaby (✉)  
Department of Comprehensive Cancer Care,  
Masaryk Memorial Cancer Institute,  
Zlutý kopec 7,  
656 53 Brno, Czech Republic  
e-mail: on.slaby@gmail.com

J. Dolezel  
Department of Oncology, Masaryk Memorial Cancer Institute,  
Zlutý kopec 7,  
Brno, Czech Republic

M. Redova · A. Besse · R. Iliev · O. Slaby  
Central European Institute of Technology, Masaryk University,  
Kamenice 5,  
Brno, Czech Republic

J. Nekvindova  
Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics,  
Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Hradec Kralove,  
Charles University,  
Hradec Kralove, Czech Republic

L. Radova  
Laboratory of Experimental Medicine,  
Institute of Molecular and Translational Medicine,  
Faculty of Medicine and Dentistry,  
Palacky University and Palacky University affiliated Hospital  
Olomouc,  
Brno, Czech Republic

**Keywords** Renal cell carcinoma · MicroRNA · MiR-210 · ACHN · CAKI-2 · Proliferation · Invasiveness

## Background

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for approximately 3 % of cancers in adults and 85 % of all primary malignant kidney tumors with the highest mortality rate at over 40 %.

Renal tumors are commonly asymptomatic in early stages, and although surgical resection remains the best therapy for RCC, after the curative nephrectomy, 20–40 % patients will develop recurrence [1]. An urgent need of finding new reliable biomarkers enabling early diagnosis of asymptomatic disease and relevant assessment of the metastatic potential of primary tumor in each individual patient leading to personalized therapy is emphasized.

MicroRNAs (miRNAs) are important regulators of gene expression that control both physiological and pathological processes, comprising an abundant class of endogenous, small noncoding RNAs, 18–25 nucleotides in length that repress protein translation through binding to target mRNAs. Bioinformatic studies have estimated that miRNAs may regulate up to a half of all human genes and that each miRNA may control hundreds of target genes [2].

Profiling studies have clearly established that miRNAs play important regulatory roles in such basic biological processes as development, cellular differentiation, proliferation, and apoptosis that affect such major biological systems as stemness, immunity, and cancer [3, 4]. MiRNAs have been shown to be differentially expressed in a variety of cancers, including RCC. Among commonly downregulated miRNAs in RCC belong miR-141 and miR-200c which indicated tumor suppressive activity. On other hand, oncogenic miR-155, miR-21 with a role in promoting tumor growth, cell invasion, and metastasis, miR-34a associated with cell proliferation in an oxidative stress-induced rat renal carcinogenesis model, miR-221/222 known to repress the expression of cell cycle regulator p27 (Kip1), and hypoxia-inducible miR-210 with known anti-proliferative potential are known to be significantly upregulated in RCC [5–7]. Upregulation of hypoxia-related miR-210 has been well-documented also in lung, prostate, and liver cancer [5]. MiR-210 serves as a powerful prognostic biomarker in breast cancer [8]. It has been also proven that, among others, miR-210 is a downstream effector molecule of the HIF-induced hypoxia response. Mutations of the *VHL* gene or even its loss will lead to a downstream signaling cascade of events that trigger hypoxia-like cellular processes under normal oxygen status and cause an increase in cellular proliferation leading to cancer progression [5], and increased expression of miR-210 under hypoxic conditions has been described [9]. MiR-210 function in hypoxia is believed to be a down-stream molecule of *HIF1a*. Furthermore, miR-210 could also link hypoxia and cell cycle in cancer by its regulation of E2F transcription factor 3 (*E2F3*), a key protein in cell cycle [8]. Although the processes are closely related, there are several studies focusing on miR-210 functioning in the context of hypoxia and only a limited number of relevant studies investigating roles of miR-210 in the proliferation and invasiveness.

We performed a global miRNA profiling study using TaqMan low-density arrays platform to screen for miRNAs differentially expressed in RCC tumors versus their matched renal parenchyma. Subsequently, we used miR-210 inhibitor to transiently knockdown miR-210 in CAKI-2 and ACHN RCC cell lines in order to evaluate the role of miR-210 in cell viability, apoptosis, cell cycle, migration, and invasivity. We have evaluated also effects of miR-210 silencing on *HIF1a* protein.

## Materials and methods

### Study population

Thirty-five patients (19 men, 16 women) diagnosed for renal cell carcinoma with clear cell histology at Masaryk Memorial Cancer Institute (Brno, Czech Republic) between 2003 and 2008 were included in this study. All subjects were of the same ethnicity (Caucasian). Clinico-pathologic characteristics including age, sex, tumor stage, and grade at the time of resection were recorded and summarized in Table 1. The study has been approved by the local ethical committee.

### Tissue sample preparation and miRNA isolation

Thirty-five samples of tumoral tissue and ten samples of non-neoplastic renal parenchyma were collected under supervision of an experienced pathologist before any treatment and stored in liquid nitrogen. Afterward, tissue samples were homogenized (Retch MM301), and total RNA enriched for small RNAs was isolated using *mirVana*

**Table 1** Summary of renal cell carcinoma patients characteristics

Factor	Profiling phase		Validation phase	
	Patients	Controls	Patients	Controls
Age				
Mean	59	59	65	59
Range	35–80	35–80	35–80	35–80
Sex				
Male	5	5	19	6
Female	4	4	16	4
Stage				
T1 (a, b)	2		14	
T2 (a, b)	0		4	
T3 (a, b)	7		17	
Fuhrman grade				
G1	1		5	
G2	5		20	
G3	3		8	
G4	0		2	



miRNA Isolation Kit (Ambion, USA). Concentration and purity of RNA were determined spectrophotometrically by measuring its optical density ( $A_{260/280} > 2.0$ ;  $A_{260/230} > 1.8$ ) using a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA), and RNA integrity was measured by Agilent 2100 Bioanalyzer using Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, USA). The samples were either stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  or further processed.

#### TaqMan low-density arrays

To identify differentially expressed miRNAs from the two pooled samples (nine tumor tissue samples and nine matched non-tumorous renal parenchyma samples), TaqMan low-density arrays (TLDA) were performed in exploratory phase of the study. In brief, 35 ng of total RNA was reverse-transcribed into complementary DNA (cDNA) by the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit and Megaplex RT set pool A and B version 2.0 (Applied Biosystems, CA, USA) and loaded into TaqMan Array Human MicroRNA A+B Cards Set v2.0 (Applied Biosystems) enabling simultaneous quantitation of 667 human miRNAs. TaqMan MicroRNA Assays and analysis were performed on the ABI 7900HT Instrument (Applied Biosystems). All procedures were performed according to the standard manufacturers' protocols. Quantitative miRNA expression data were acquired and normalized by use of ABI 7900HT SDS software (Applied Biosystems).

#### Quantitative real-time PCR

For further validation, miR-210 was selected according to significance of the difference in TLDA analysis and its biological plausibility. cDNA was synthesized from total RNA using miRNA-specific primers according to the TaqMan MicroRNA Assay protocol (Applied Biosystems). For RT reactions, 10 ng of RNA sample, 50 nM of stem-loop RT primer,  $1\times$  RT buffer, 0.25 mM each of dNTPs,  $3.33\text{ U}\mu\text{l}^{-1}$  multiScribe reverse transcriptase, and  $0.25\text{ U}\mu\text{l}^{-1}$  RNase inhibitor (supplied in TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems) were used. Reaction mixtures (15  $\mu\text{l}$ ) were incubated for 30 min at  $16\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 min at  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 5 min at  $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and then held at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed using the Applied Biosystems 7500 Instrument. The 20- $\mu\text{l}$  PCR reaction mixture included 1.33  $\mu\text{l}$  of RT product,  $1\times$  TaqMan (NoUmpErase UNG) Universal PCR Master Mix, and 1  $\mu\text{l}$  of primer and probe mix of the TaqMan MicroRNA Assay kit (Applied Biosystems). Reactions were incubated in a 96-well optical plate at  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 2 min,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles at  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 15 s, and  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 10 min. All reactions were run in duplicate, and average threshold cycle and SD values were calculated.

#### Cell cultures and growth conditions

The human metastatic renal adenocarcinoma cell line ACHN and human Caucasian kidney carcinoma CAKI-2 cell line were obtained from the European Collection of Cell Cultures. Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS),  $100\text{ }\mu\text{gml}^{-1}$  penicillin,  $100\text{ }\mu\text{gml}^{-1}$  streptomycin, 0.1 mM non-essential amino acids, 2 mM L-glutamin, and 1 mM sodium pyruvate (all purchased from Invitrogen, Gibco) in 10 %  $\text{CO}_2$  at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### Transfection of ACHN and CAKI-2 cells, RNA extraction, and qRT-PCR analysis

Cells were transfected with 50 nM anti-miR<sup>TM</sup> miRNA-210 inhibitor (anti-miR-210, Applied Biosystems) or 50 nM anti-miR<sup>TM</sup> negative control (Applied Biosystems) and equimolar concentration of Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Transfected cells were harvested after 24 h, and total RNA enriched for small RNAs was isolated using *mir*-Vana miRNA Isolation Kit (Ambion) according to manufacturer's recommendation. Concentration and purity of RNA were determined; reverse transcription and quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) were performed according to the TaqMan MicroRNA Assay and TaqMan Small RNA assay protocols as described previously. MiR-210 expression was normalized to RNU48, and expression data were subsequently analyzed by the  $2^{-\Delta\text{Ct}}$  method. We evaluated also miR-210 levels in negative control cells in comparison to non-transfected cells and observed non-significant changes which were lower than 5 %. Experiments were run in three independent repeats.

#### MTT assay

Cell viability of transfected cells was measured by the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2 H-tetrazolium bromide assay (MTT, Sigma Aldrich). ACHN and CAKI-2 cells were seeded in 96-well plate at a density of  $1\times 10^3$  cells per well 24 h prior to transfection with 50 nM anti-miR-210 or anti-miR<sup>TM</sup> negative control. Following 48 h incubation, 20  $\mu\text{l}$  of  $5\text{ mgml}^{-1}$  MTT solution in phosphate-buffered saline (PBS) was added to each well, and plates were incubated for 3 h at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The precipitate was solubilized in 100 % DMSO (200  $\mu\text{l}$  per well), and absorbance was measured on ELISA Multi-detection Microplate Reader (BIO-TEK, USA) at 570 nm and 650 nm (background) wavelength. Experiments were run in three independent repeats in triplicate.

### Detection of apoptosis

ACHN and CAKI-2 cells were seeded in six-well plate at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well, incubated for 24 h, and then transfected with 50 nM anti-miR-210 or anti-miR<sup>TM</sup> negative control. Cells were trypsinized 48 h after the transfection, and apoptosis measurement was performed using Annexin V-FITC kit (Miltenyi Biotec Inc., USA) according to the manufacturer's recommendation. Experiments were run in three independent repeats in triplicate.

### Cell cycle analysis

ACHN and CAKI-2 cells were transfected with 50 nM anti-miR-210 or anti-miR<sup>TM</sup> negative control in 60 mm plates at a density of  $1 \times 10^6$  cells per well and incubated for 48 h. Cells were trypsinized and fixed with 70 % ethanol. Subsequently, cells were washed in PBS and treated with  $0.1 \text{ mg ml}^{-1}$  RNase for 30 min at 37 °C. Finally,  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  propidium iodide was added, and cells were incubated 10 min at room temperature. Cell cycle analysis was performed using a BD FACS Canto II (BD Bioscience, USA). The data were analyzed by FlowJo v 7.2.2. Experiments were run in three independent repeats in triplicate.

### Scratch wound migration assay

Cell migration assay was performed only on ACHN cell line due to its metastatic renal adenocarcinoma origin. ACHN cells were seeded in 24-well plate at a density of  $1 \times 10^5$  cells per well 24 h before the transfection with 50 nM anti-miR-210 or anti-miR<sup>TM</sup> negative control. The cell monolayer was wounded with a sterile pipette tip 24 h after the transfection and then rinsed with PBS to remove cellular debris. Subsequently, the fresh medium was added. The migration was measured at times 0 and 12 h post-wounding using a microscope Olympus CKX-41( $\times 10$ ) and camera Olympus SP-350. Images were analyzed by the Tscratch software (CSE, Switzerland). Experiments were run in three independent repeats in triplicate.

### Cell invasivity assay by xCELLigence

Cell invasivity assay was performed only on ACHN cell line due to its metastatic renal adenocarcinoma origin. ACHN cells were seeded on 24-well plates ( $1 \times 10^5$  cells per well) 24 h prior to transfection with 50 nM anti-miR-210 or anti-miR<sup>TM</sup> negative control. After 24 h incubation, cells were harvested and seeded on 16-well CIM-plates (CIM-Plate 16, Roche) pre-coated with ( $0.5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) matrigel (BD Bioscience). Cells ( $10^4$  cells per well) in DMEM supplemented with 1 % FBS were seeded in the upper chamber; DMEM supplemented with 10 % FBS was used as a chemoattractant, and real-time

cell analysis was performed using xCELLigence software (Roche). Experiment was performed in four independent repetitions in duplicate.

### Western blotting

Cells were lysed in Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) supplemented with a protease inhibitor complete EDTA-free (Roche). Protein concentration was measured using BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, MA, USA). Cell lysates (50  $\mu\text{g}$ ) were electrophoresed on 10–20 % polyacrylamide gels (Bio-Rad) and transferred to polyvinylidene difluoride membrane (BioRad, Germany). The membranes were blocked with PBS containing 5 % skim milk and 0.1 % Tween-20 and then incubated with the primary antibody. Mouse monoclonal antibody to HIF1alpha was purchased from Abcam (ab1). The membranes were incubated after washing with HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA) and analyzed using ECL-Plus (GE Healthcare, Amersham, UK).

### Statistical methods

Analysis of the real-time PCR data was performed using the SDS 2.0.1 software (Applied Biosystems) (settings: automatic baseline, threshold 0.2). According to manufacturer's recommendations, small nucleolar RNA, C/D box 48 (SNORD48), formerly known as RNU48 has been chosen as references for normalization of miRNA expression levels. The relative expression levels of target miRNAs were determined by the equation  $2^{-\Delta C_T}$ , in which  $\Delta C_T$  were calculated as follows— $\Delta C_T = C_{T \text{ miR-of-interest}} - C_{T \text{ ref}}$ . Relative miRNA levels were then calculated with the RQ Manager 1.2. Normalized expression data from exploratory phase of the study were statistically evaluated in environment of statistical language R by use of Bioconductor package and LIMMA approach combined with hierarchical clustering [10]. Normalized miR-210 expression data were statistically analyzed with MedCalc software version 11.2.1. *P* values of less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical differences between expression levels in paired ccRCC tissue and adjacent non-tumorous renal parenchyma samples were evaluated by non-parametric Mann–Whitney *U* test.

## Results

Different miRNA expression profiles in renal cell carcinoma and adjacent non-tumorous tissue samples and miR-210 increased expression in clinical samples

We performed miRNA expression profiling using real-time PCR-based miRNAs expression profiling arrays as

a strategy for effective identification of RCC-associated miRNAs in tissue samples. We determined the miRNA expression profile of 667 miRNAs in tumor tissues of nine patients with diagnosed RCC and their adjacent non-tumorous renal parenchyma using TaqMan low-density array technology; the miRNA expression levels were normalized to SNORD48, formerly known as RNU48; the mean expression levels were calculated and data analyzed by use of the microarray biostatistical approaches. We observed 78 miRNAs differentially expressed between RCC tumor tissue and adjacent normal renal parenchyma ( $P \leq 0.0003$ ). A global trend of decrease in miRNAs expression levels was evident; 73 miRNAs were downregulated in RCC tissue, and only five miRNAs were upregulated (Table 2). Based on unsupervised hierarchical clustering, we were able to identify 54 miRNAs discriminating between RCC tissue and adjacent non-tumorous renal parenchyma ( $P < 0.0001$ ; Fig. 1), of which upregulated miR-210 (FC = 5.9905;  $P = 0.0008$ ) was chosen for further experiments

according to the previous reports, significance of the difference, and biological relevance. We further analyzed expression levels of miR-210 in 35 tissue samples of RCC and ten non-tumorous renal parenchyma samples by qRT-PCR. To determine the difference between two groups, we performed non-parametric Mann–Whitney *U* test and confirmed significantly increased miR-210 expression level in RCC tissue samples ( $P < 0.0001$ ) if compared with non-tumorous renal parenchyma (Fig. 2).

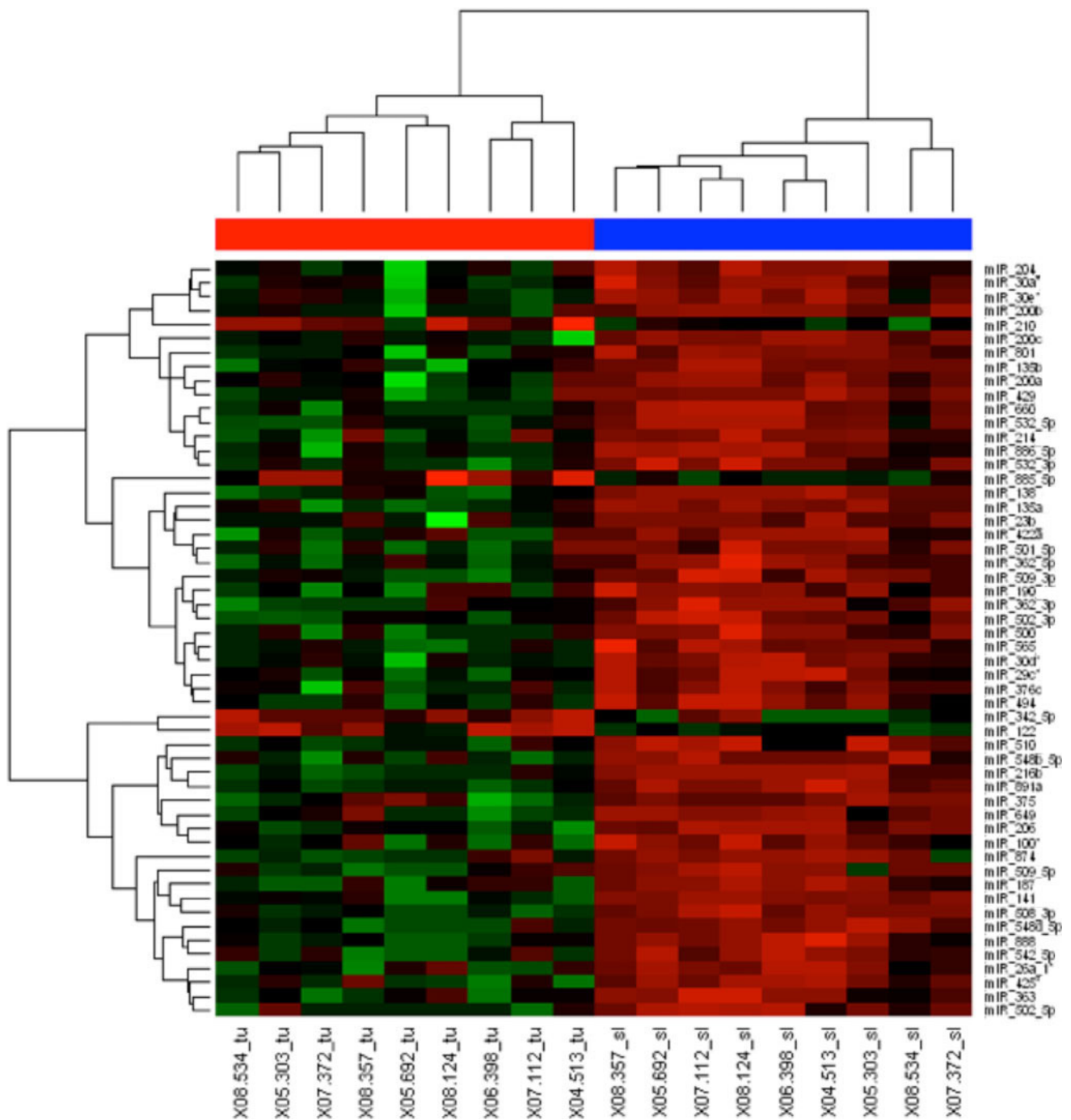
#### Determination of transfection efficacy

The transfection of miR-210 inhibitor was optimized in order to validate miR-210 effects on cell viability, apoptosis, cell cycle, migration, and invasive potential in ACHN and CAKI-2 renal cell lines. ACHN and CAKI-2 cells were transfected using Lipofectamine2000, and the transfection efficacy was determined by TaqMan real-time PCR 24 h after

**Table 2** MiRNAs differentially expressed in paired samples of renal cell carcinoma tissue and adjacent non-tumorous renal parenchyma ( $P < 0.003$ )

miRNA	FC	Pvalue	miRNA	FC	Pvalue	miRNA	FC	Pvalue
miR-891a	0.0075	<0.0001	miR-30d*	0.2248	0.0001	miR-190	0.2427	0.0008
miR-508-3p	0.0069	<0.0001	miR-502-3p	0.3066	0.0001	miR-210	5.9905	0.0008
miR-216b	0.0138	<0.0001	miR-502-5p	0.2239	0.0001	miR-125a-3p	0.2451	0.0010
miR-138	0.0096	<0.0001	miR-30a*	0.2123	0.0001	miR-598	0.2848	0.0011
miR-141	0.0140	<0.0001	miR-425*	0.2228	0.0001	miR-218	0.1668	0.0011
miR-548d-5p	0.0450	<0.0001	miR-874	0.0047	0.0001	miR-30a	0.2271	0.0012
miR-206	0.0945	<0.0001	miR-885-5p	21.3755	0.0002	miR-199a-5p	0.0794	0.0013
miR-135a	0.0330	<0.0001	miR-886-5p	0.2260	0.0002	miR-30b	0.3576	0.0014
miR-200c	0.0130	<0.0001	miR-532-3p	0.2857	0.0002	miR-203	0.2235	0.0015
miR-509-3p	0.0882	<0.0001	miR-30e*	0.2081	0.0002	miR-136*	0.0886	0.0017
miR-888	0.0400	<0.0001	miR-500	0.2843	0.0002	miR-509-3-5p	0.0317	0.0017
miR-801	0.0262	<0.0001	miR-509-5p	0.0220	0.0002	miR-30e	0.2855	0.0018
miR-548b-5p	0.0481	<0.0001	miR-362-5p	0.2829	0.0002	miR-324-5p	0.3043	0.0018
miR-429	0.1051	<0.0001	miR-200a	0.1535	0.0003	miR-29c	0.3592	0.0019
miR-510	0.0212	<0.0001	miR-204	0.1316	0.0003	miR-335	0.2095	0.0019
miR-200b	0.1428	<0.0001	miR-363	0.2084	0.0003	miR-708	0.2827	0.0020
miR-660	0.2250	<0.0001	miR-376c	0.1687	0.0003	miR-30c	0.3500	0.0020
miR-565	0.1935	<0.0001	miR-375	0.0560	0.0004	miR-29a	0.3867	0.0021
miR-187	0.0277	<0.0001	miR-100*	0.1548	0.0005	miR-423-5p	0.0911	0.0024
miR-649	0.0364	<0.0001	miR-26a-1*	0.2274	0.0005	miR-378	0.3057	0.0024
miR-532-5p	0.1768	<0.0001	miR-29c*	0.3330	0.0006	miR-30d	0.2939	0.0026
miR-135b	0.1544	<0.0001	miR-23b	0.1382	0.0006	miR-934	0.1341	0.0028
miR-494	0.1215	<0.0001	miR-501-5p	0.2803	0.0006	miR-200b*	0.2997	0.0028
miR-542-5p	0.0483	0.0001	miR-342-5p	7.1530	0.0006	miR-638	0.2583	0.0030
miR-362-3p	0.2094	0.0001	miR-422a	0.2084	0.0006	miR-155	4.5701	0.0030
miR-122	43.3545	0.0001	miR-214	0.2420	0.0007	miR-335*	0.2862	0.0030

FC fold change



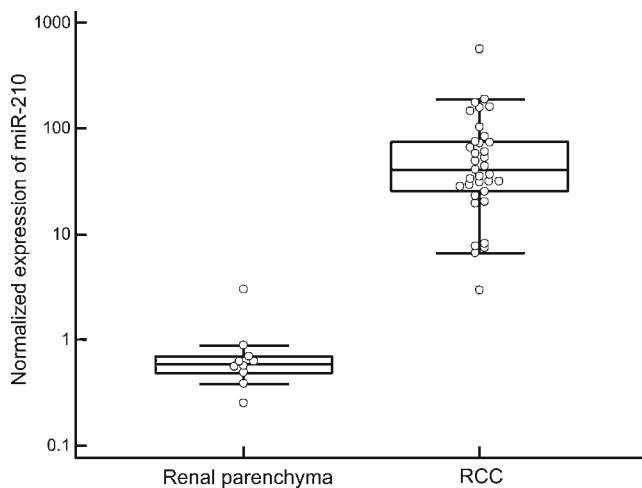
**Fig. 1** Hierarchical clustering of renal cell carcinoma (RCC) tissue and non-tumorous renal parenchyma tissue in nine paired samples according to 54 differentially expressed miRNAs ( $P < 0.0001$ ).

*Red bar* indicates RCC tumor tissue; *blue bar* indicates renal parenchyma; *green color* indicates decreased expression of particular miRNAs; *red* indicates increased miRNA expression

transfection. Real-time PCR analysis has proved that expression levels of miR-210 significantly decreased to  $9.1 \% \pm 3.7 \%$  ( $n=3$ ,  $P < 0.001$ ) in ACHN cells and to  $4.6 \% \pm 0.1 \%$  ( $n=3$ ,  $P < 0.001$ ) in CAKI-2 cells transfected with 50 nM anti-miR-210 compared with negative control (Fig. 3a).

Effects of miR-210 inhibition on cell viability, apoptosis, cell cycle, migration, and invasivity in ACHN and CAKI-2 cells

To evaluate the effect of miR-210 on cell viability, ACHN and CAKI-2 cell lines were transfected with 50 nM anti-



**Fig. 2** Increased expression levels of miR-210 in 35 ccRCC tissue samples and ten samples of non-tumorous renal parenchyma ( $P < 0.0001$ , Mann–Whitney  $U$  test)

miR-210 or anti-miR<sup>TM</sup> negative control, and MTT-assay was performed 48 h after transfection. We observed decrease in cell viability by  $24.1 \pm 3.3 \%$  ( $n = 3$ ,  $P < 0.0005$ ) in ACHN cells and by  $28.4 \pm 5.4 \%$  ( $n = 3$ ,  $P = 0.001$ ) in CAKI-2 cells in anti-miR-210 transfected cells (Fig. 3b).

Consequently, we performed Annexin V assay to evaluate the effect of miR-210 on the apoptotic rate in both anti-miR-210 and anti-miR<sup>TM</sup> negative control transfected cells but did not observe any significant effect of anti-miR-210 transfection on apoptotic rate in ACHN and CAKI-2 cells.

Furthermore, we examined the effect of miR-210 silencing on cell cycle. ACHN and CAKI-2 cells transfected with 50 nM anti-miR-210 were incubated for 48 h, subsequently stained with propidium iodide, and analyzed by flow cytometry. In CAKI-2 cells with silenced miR-210 expression, we observed significantly higher amount of CAKI-2 cells in G2-phase and reduced S-phase cells proportion ( $P = 0.02$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 3c). In ACHN cell line, we did not observe any significant change in cell cycle progression.

Cell migration and invasivity assays were performed only on ACHN cell line due to its metastatic renal adenocarcinoma origin. ACHN cells were transfected with miR-210 inhibitor, and subsequently, scratch wound migration assay was performed. There was an observable trend of cell migration potential decrease by 5 % at the time period of 48 h after transfection ( $P = 0.04$ ,  $n = 3$ ) (Fig. 3d). Furthermore, using a real-time impedance-based invasion assay (xCELLigence), we have shown that miR-210 silencing significantly reduced invasive potential of ACHN metastatic renal adenocarcinoma cells in matrigel bioassays by 22.55 % ( $P = 0.015$ ,  $n = 4$ ) (Fig. 3e).

#### Effect of miR-210 inhibition on HIF1- $\alpha$ levels in ACHN and CAKI-2 cells

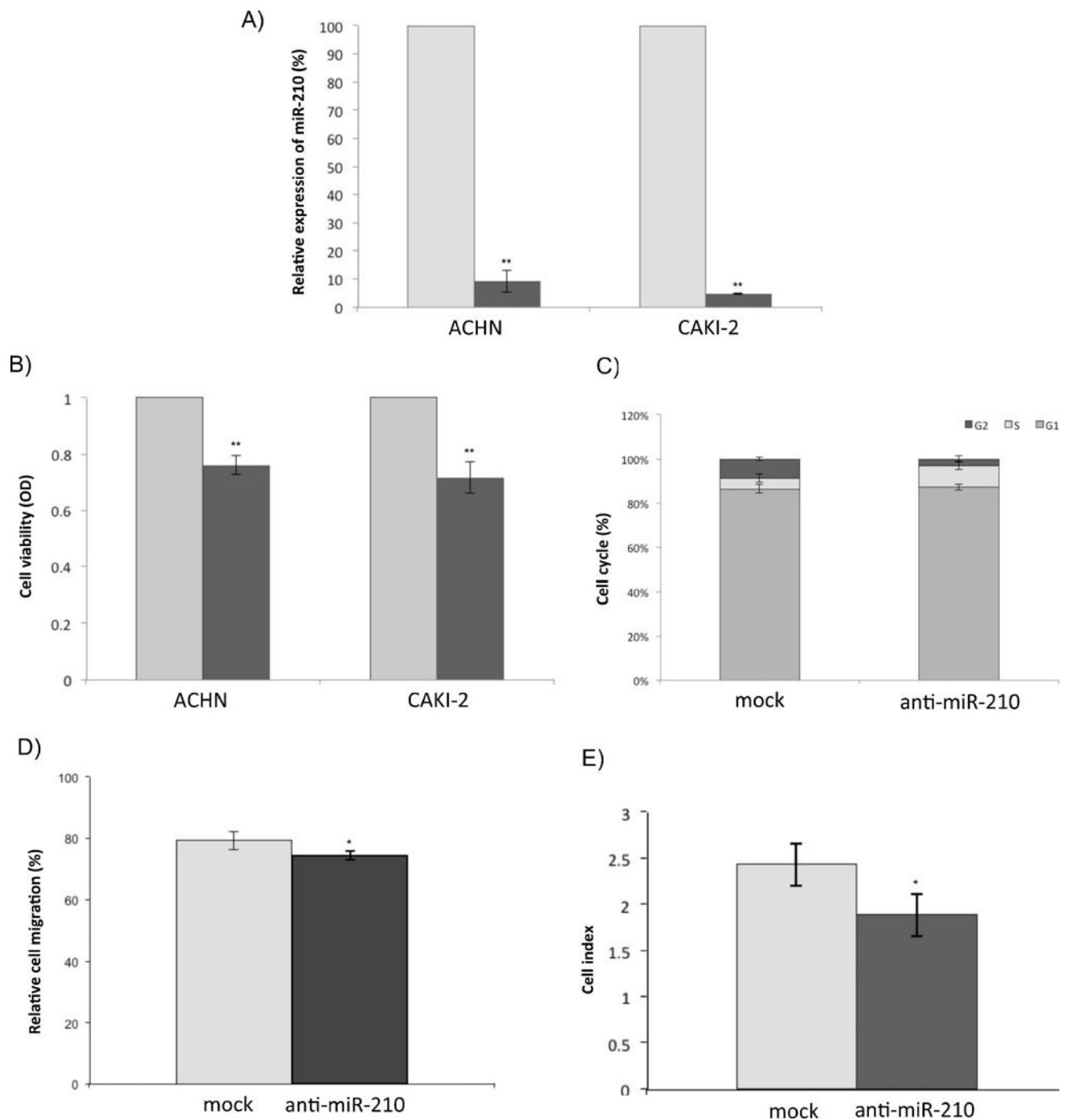
To evaluate the effect of miR-210 on *HIF1 $\alpha$*  protein level, ACHN and CAKI-2 cell lines were transfected with 50 nM anti-miR-210 or anti-miR<sup>TM</sup> negative control, and Western blot analysis was performed in duplicate 48 h after transfection. In both cell lines was observed significant decrease in *HIF1 $\alpha$*  protein level (see Fig. 4b).

#### Discussion

In this study, we performed a qRT-PCR-based miRNA expression arrays which allowed us to identify the specific profile of miRNAs differentially expressed in RCC with clear cell histology and matched renal parenchyma clinical samples. Although RCC is characterized by high incidence and the highest mortality rate at over 40 %, the definite pathogenic mechanisms underlying RCC have not been clearly elucidated yet. Mutated or abnormally expressed miRNAs have been identified as both oncogenes and tumor suppressors in various human cancers, including RCC [7, 11, 12].

We have confirmed a general trend of decrease in miRNAs expression in tumor tissue. Among the most consistently downregulated miRNAs in RCC tissue, these could be mentioned: (1) miR-200 family members (including miR-200c, miR-141, miR-200a, miR-200b, and miR-429) relevant to the process of epithelial-to-mesenchymal transition [6, 13]; (2) miR-206 previously reported to promote tumor cell apoptosis via targeting key components in apoptotic signal transduction pathways [13, 14]; (3) miR-30 family (miR-30a, miR-30b, and miR-30c) and miR-29a assumed as potential biomarkers for metastasis prediction [15]; (4) miR-422 regulating expression of CYP7A1, which plays a critical role in regulation of bile acid synthesis in the liver [16]; and (5) miR-506 family members (miR-508-3p, miR-509-3p, miR-509-5p, miR-509-3-5p, and miR-510) which are tandemly clustered in the same genomic region, Xq27.3, and which target core genes involved in multiple key pathways, as predicted by miRanda and miRNome (miR-508-3p  $\rightarrow$  *LDHA*, miR-509-3p  $\rightarrow$  *HK1*) [14], could be mentioned.

On the contrary, we have identified five upregulated miRNAs ( $P \leq 0.003$ ). We found miR-122 to be the most predominantly upregulated miRNA in RCC tissue samples (more than 40-fold) if compared with non-tumorous renal parenchyma. Conversely, there are many studies demonstrating miR-122 to be significantly downregulated in hepatocellular carcinoma (HCC) and proposing miR-122 as a liver-specific miRNA [17]. MiR-885-5p, upregulated more than 20-fold in RCC tissue samples, has been previously

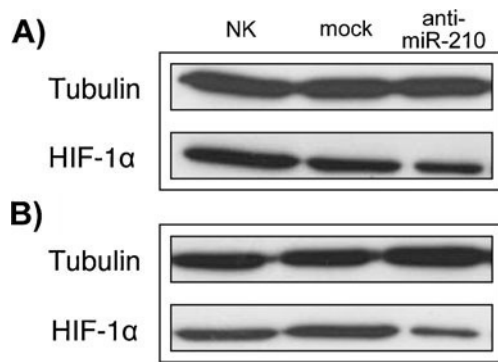


**Fig. 3** In vitro functional characterization of miR-210. **a** Suppression of miR-210 expression by anti-miR-210 in ACHN and CAKI-2 cells. **b** Significant decrease in viability of ACHN ( $P=0.0005$ ,  $n=3$ ) and CAKI-2 ( $P=0.0018$ ,  $n=3$ ) cells transfected with anti-miR-210. Cell viability was measured by MTT-assay 48 h after transfection. *OD* optical density. **c** Effects of miR-210 silencing on CAKI-2 cell cycle distribution. A significantly higher amount of CAKI-2 cells in G2-phase was observed 48 h after anti-miR-210 transfection ( $P<0.0001$ ,  $n=3$ ). **d** Effect of anti-miR-210 transfection on ACHN cell migration

ability; scratch wound migration assay. There was an observable trend of reduced ACHN relative cell migration 48 h after anti-miR-210 transfection ( $P=0.043$ ,  $n=3$ ). **e** Effect of miR-210 silencing on ACHN cell invasivity. There was observable decrease in ACHN cell invasivity potential 48 h after anti-miR-210 transfection ( $P=0.015$ ,  $n=4$ ). *Pale* indicates anti-miR negative control (mock) transfected cells; *dark grey* indicates anti-miR-210 transfected cells (\**t*test significant at  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ )

reported to be significantly elevated in sera of HCC patients, indicating its potential role as a novel complementary

biomarker for the detection and assessment of liver pathologies [18]. We also described miR-342-5p upregulated more



**Fig. 4** Suppression of *HIF1α* levels through miR-210 silencing (**a** CAKI-2 cells, **b** ACHN cells)

than sevenfold. This is in agreement with a study of Garzon and co-workers who found miR-342 upregulated in acute promyelocytic leukemia patients and cell lines during all-trans-retinoic acid treatment [19] and Lowery and co-workers who described increased expression of miR-342 in ER and HER2/neu-positive luminal B breast cancer, thus being therapeutically challenging in these tumors [20]. More than fourfold over-expressed miR-155, previously reported to be upregulated in RCC tissue, is located to the chromosome 21 and influence the glycine amidinotransferase metabolic pathway [21, 22]. Furthermore, performing a preliminary analysis, White and co-workers showed that miR-155 expression is correlated with RCC tumor size [23]. Taken together, miR-155 is assumed to be an oncogenic miRNA in RCC pathogenesis.

Based on biological relevance [7] and significance of the difference in TLDA analysis, we have chosen miR-210 for further validation and in vitro studies. We described miR-210 being upregulated almost sixfold in RCC tissue samples by TLDA. Increased miR-210 expression was successfully validated in 35 tissue samples of ccRCC and ten samples of non-tumorous renal parenchyma by qRT-PCR. MiR-210 is an evolutionary conserved and well-established HIF-responsive “hypoxamir,” i.e., miRNA that can be induced under hypoxic conditions in many solid cancers in a *HIF-1α*- and *VHL*-dependent manner [14]. It has been previously documented that clear cell RCC, either in sporadic or hereditary form, shows significantly higher levels of miR-210 if compared with other histological subtypes, and furthermore, increased miR-210 levels were also seen in higher-grade tumors of lesions with lymph node metastasis [24].

Regarding the assumed miR-210 role as a key player in every step of RCC pathogenesis and beside miR-210 role as a “master miRNA” relevant for the control of diverse functions in the hypoxic state, it has been previously proven that miR-210-modulated genes are associated with RNA and DNA processing, binding, and repair, with cytoplasmic and nuclear trafficking, mitochondrial function, metabolism, cell cycle control and proliferation, apoptosis and cell

survival, differentiation, and development [25]. Based on these findings, we have investigated cell viability, cell cycle, apoptosis, migration, and invasiveness potential in renal cell carcinoma cell lines ACHN and CAKI-2 with transiently silenced miR-210.

We observed decreased cell viability in both cell lines transfected with miR-210 inhibitor and accumulation of CAKI-2 cells with silenced miR-210 in G2 phase of cell cycle. This is contradictory to findings of Nakada and co-workers who, although expecting an effect of miR-210 suppression on cell viability and cell cycle progression, did not observe any significant changes in neither the cell viability nor the cell cycle profile [26]. However, it has been previously reported that miR-210 could induce cell-type-specific control of proliferation. In certain transformed cells, inhibition of the *c-Myc* antagonist and miR-210 confirmed direct target, MAX-binding protein (*MNT*), was demonstrated as functionally important in controlling cell cycle through reciprocal upregulation of *c-Myc* activity. Increased miR-210 expression in various tumors could lead, through targeting *E2F3* and *ACVR1b* (activin receptor 1b), to activation of G1/S cell cycle progression and increased cellular proliferation [8]. In other tumor types, depending on the contextual cues, miR-210 could target different set of mRNAs such as *HOXA3* and *HOXA9* and contribute to cell proliferation reduction [25]. MiR-210 role as a tumor proliferation regulator was described also in both ER-positive and ER-negative breast cancer [27].

Employing scratch wound migration assay and a real-time impedance-based invasion assay in ACHN cell line, which is of metastatic renal adenocarcinoma origin, we have shown that both migration and invasion potentials in ACHN cells with transiently silenced miR-210 were reduced. This is in agreement with results of Zhang and co-workers who described on 786-O renal cancer cell line that miR-210 over-expression, and *MNT* knockdown lead to upregulation of a set of genes not upregulated by *MYC* with functions linked to invasion and cell-motility, thereby influencing the metastatic potential of cancer cells [28]. Also, Rothé and co-workers described decrease in cell migration in ER-negative highly proliferating, migrating, and invading MDA-MB-231 cells with exogenously repressed miR-210 expression [27]. Moreover, based on the premise that miR-210 over-expression in normoxic endothelial cells stimulated the vascular endothelial growth factor (VEGF)-driven cell migration, Fasanaro and co-workers have shown that miR-210 blockade via anti-miRNA transfection decreased cell migration in response to VEGF [29]. As recent studies have rapidly and decisively demonstrated the unique, robust, and complex nature of miR-210, set of transcripts which are mechanistically linked to the process of migration and invasion of transformed cells was described, namely *P4HB* (prolyl 4-hydroxylase, beta polypeptide), *PTPN1* (protein

tyrosine phosphatase, non-receptor type 1), *MDGAI* (MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1), and *CLASP2* (cytoplasmic linker associated protein 2) [25].

In our study, we have also tried to figure mechanistic link between miR-210 deregulation and observed functional effects on RCC cell lines. Recent study by Kelly et al. (2011) described a hypoxia-induced positive feedback loop promoting *HIF1a* stability through mir-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein [30]. Induction of miR-210 expression through *HIF1a* led to increase of *HIF1a* levels through regulation of *HIF1a* repressors by miR-210 [30]. We hypothesize that higher levels of miR-210 observed in RCC tissue are not only the consequence of *HIF1a* hyper-activation but also partly its cause. To support this hypothesis, we performed analysis of *HIF1a* protein in Caki-2 and ACHN cell lines after silencing of miR-210, and we have observed significant downregulation of *HIF1a* protein in both cell lines (Fig. 4a, b). According to this observation, we suppose that participation of miR-210 in hypoxia and hypoxia-associated processes in RCC is not only through regulation of its target mRNAs but also by indirect regulation of *HIF1a*.

These findings enrich our understanding of miR-210 pleiotropic nature beside its functions as down-stream molecule of *HIF1a*, but further studies regarding the precise identification of deregulated molecules and description of their complex interactions is required to elucidate miRNAs and miR-210 functioning in the pathophysiological processes in RCC.

**Acknowledgment** This work was supported by grant IGA NT/13547 of the Czech Ministry of Health, by Institutional Resources for Supporting the Research Organization provided by the Czech Ministry of Health in 2012 to Masaryk Memorial Cancer Institute, by The Ministry of Education, Youth and Sports for the project BBMRI CZ (LM2010004), and by the project “CEITEC—Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

**Conflicts of interest** None.

## References

- Campbell SC, Novick AC, Bukowski RM. Renal tumors. In: Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, et al., editors. *Campbell-Wals Urology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 1567–637.
- Croce CM. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet*. 2009;10:704–14.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136:642–55.
- Winter J, Diederichs S. MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol*. 2011;676:3–22.
- Chow TF, Youssef YM, Lianidou E, Romaschin AD, Honey RJ, Stewart R, et al. Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis. *Clin Biochem*. 2010;43:150–8.
- Nakada C, Matsuura K, Tsukamoto Y, Tanigawa M, Yoshimoto T, Narimatsu T, et al. Genome-wide microRNA expression profiling in renal cell carcinoma: significant down-regulation of miR-141 and miR-200c. *J Pathol*. 2008;216:418–27.
- Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, Svoboda M, Poprach A, Fabian P, et al. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:90.
- Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, et al. MiR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther*. 2008;7:255–64.
- White NM, Youssef GM. MicroRNAs: exploring a new dimension in the pathogenesis of kidney cancer. *BMC Med*. 2010;8:65.
- Reimers M, Carey VJ. Bioconductor: an open source framework for bioinformatics and computational biology. *Methods Enzymol*. 2006;411:119–34.
- Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer*. 2009;8:102.
- Redova M, Svoboda M, Slaby O. MicroRNAs and their target gene networks in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;405:153–6.
- Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res*. 2007;67:976–83.
- Zhou L, Chen J, Li Z, Li X, Hu X, Huang Y, et al. Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: microRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2010;5:e15224.
- Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, Posorski N, Steiner T, Wunderlich H, et al. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World Urol*. 2011;29:367–73.
- Song KH, Li T, Owsley E, Chiang JY. A putative role of micro RNA in regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase expression in human hepatocytes. *J Lipid Res*. 2010;51:2223–33.
- Xu Y, Xia F, Ma L, Shan J, Shen J, Yang Z, et al. MicroRNA-122 sensitizes HCC cancer cells to adriamycin and vincristine through modulating expression of MDR and inducing cell cycle arrest. *Cancer Lett*. 2011;310:160–9.
- Gui J, Tian Y, Wen X, Zhang W, Zhang P, Gao J. Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin Sci (Lond)*. 2011;120:183–93.
- Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Visentini M, Aqeilan R, Cimmino A, et al. MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 2007;26:4148–57.
- Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, et al. MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2009;11:R27.
- Huang Y, Dai Y, Yang J, Chen T, Yin Y, Tang M, et al. Microarray analysis of microRNA expression in renal clear cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol*. 2009;35:1119–23.
- Seliger B, Jasinski S, Dressler SP, Marincola FM, Recktenwald CV, Wang E, Lichtenfels R. Linkage of microRNA and proteome-based profiling data sets: a perspective for the prioritization of candidate biomarkers in renal cell carcinoma? *J Proteome Res*. 2011;10:191–9.
- White NM, Bao TT, Grigull J, Youssef YM, Gargis A, Diamandis M, et al. miRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation. *J Urol*. 2011;186:1077–83.



24. Valera VA, Walter BA, Linehan WM, Merino MJ. Regulatory effects of microRNA-92 (miR-92) on VHL gene expression and the hypoxic activation of miR-210 in clear cell renal cell carcinoma. *J Cancer*. 2011;2:515–26.
25. Chan SY, Loscalzo J. MicroRNA-210: a unique and pleiotropic hypoxamir. *Cell Cycle*. 2011;9:1072–83.
26. Nakada C, Tsukamoto Y, Matsuura K, Nguyen TL, Hijiya N, Uchida T, et al. Overexpression of miR-210, a downstream target of HIF1 $\alpha$ , causes centrosome amplification in renal carcinoma cells. *J Pathol*. 2011;224:280–8.
27. Rothé F, Ignatiadis M, Chaboteaux C, Haibe-Kains B, Kheddoumi N, Majjaj S, et al. Global microRNA expression profiling identifies MiR-210 associated with tumor proliferation, invasion and poor clinical outcome in breast cancer. *PLoS One*. 2011;6:e20980.
28. Zhang Z, Sun H, Dai H, Walsh RM, Imakura M, Schelter J, et al. MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. *Cell Cycle*. 2009;8:2756–68.
29. Fasanaro P, D'Alessandra Y, Di Stefano V, Melchionna R, Romani S, Pompilio G. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3. *J Biol Chem*. 2008;283:15878–83.
30. Kelly TJ, Souza AL, Clish CB, Puigserver P. A hypoxia-induced positive feedback loop promotes hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  stability through miR-210 suppression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like. *Mol Cell Biol*. 2011;31:2696–706.

# Imunoterapie zhoubného nádoru ledviny

## Immunotherapy of Renal Cell Carcinoma

Poprach A.<sup>1</sup>, Lakomý R.<sup>1</sup>, Büchler T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika komplexní onkologické péče a Masarykův onkologický ústav, Brno

<sup>2</sup>Onkologická klinika 1. LF UK a Thomayerova nemocnice, Praha

### Souhrn

Léčba metastatického renálního karcinomu je stále paliativní. Cílená terapie v porovnání s cytokiny a chemoterapií dosahuje vyššího počtu odpovědí, prodlužuje celkové přežití a přežití do progresu onemocnění. Checkpoint inhibitory patří mezi novinky v léčbě pacientů s renálním karcinomem, především anti-PD-1 protilátky již prokázaly svoji účinnost u těchto pacientů a brzy budou dostupné pacientům ve 2. anebo 3. linii paliativní léčby (nivolumab). V tomto článku zmíníme recentní data z aktuálních studií s cytokiny, protinádorovými vakcínami, ipilimumabem a nivolumabem. Nově se zkouší v mnoha studiích kombinace jak checkpoint inhibitorů s cílenou terapií, tak i anti-PD-1(-L1) protilátek s anti-CTLA-4 protilátkami (ipilimumab). Výsledky těchto studií jsou velmi povzbudivé, limitující však bývá toxicita (především u kombinace anti-PD-1 a anti-CTLA-4 protilátek) a cena této terapie. Obzvláště léčba kombinací bevacizumabu s atezolizumabem, axitinibu s pembrolizumabem nebo avelumabem, lenvatinibu s pembrolizumabem a nivolumabu s ipilimumabem (studie fáze I, II, někdy III) je vysoce účinná a odpovědi jsou dlouhodobé. U některých kombinací se počet odpovědí pohybuje mezi 70 a 100 %. Validní prediktivní markery na tuto léčbu zatím nemáme (i když na nich výzkumníci intenzivně pracují), pro výběr pacientů k imunoterapii se stále používají prognostické modely dle Henga či Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC). Jisté však je to, že imunoterapie bude mít své místo v léčbě pacientů s renálním karcinomem, i když je potřeba zodpovědět ještě hodně otázek.

### Klíčová slova

renální karcinom – imunoterapie – checkpoint inhibitory – cílená terapie

### Summary

Treatment of renal cell carcinoma is still palliative. Targeted therapy increases response rates and prolongs overall survival and progression-free survival compared with cytokines and chemotherapy. Checkpoint inhibitors constitute the up-date of therapeutic approaches, and anti-PD-1 antibody, one checkpoint inhibitor, is now well established as a second and/or third palliative treatment for patients with renal cell carcinoma. In this study, we present the latest data from current studies on cytokines, cancer vaccines, ipilimumab, and nivolumab. The therapeutic efficacies of combinations such as targeted therapy with immune checkpoint inhibitors and anti-CTLA-4 with anti PD-1(-L1) have been reported in many studies. Preliminary results are encouraging but the high toxicities and elevated cost are limiting. Treatments with combinations of bevacizumab and atezolizumab, axitinib and pembrolizumab or avelumab, lenvatinib and pembrolizumab, and nivolumab and ipilimumab (results from study phase I, II, and sometimes III) are reported to be highly effective and to result in long-lasting responses with response-rates of 70–100%. So far, valid predictors for these therapies have not been forthcoming, but considerable work is being exerted in this area. Heng and Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) models are still being used to select patients for immunotherapy. Immunotherapy will definitely continue to play an important role in the treatment of patients with renal cell carcinoma; however, many questions remain.

### Key words

renal cell carcinoma – immunotherapy – checkpoint inhibitors – target therapy

Podpořeno MZ ČR – RVO (MOÚ, 00209805)

Supported by MH CZ – DRO (MMCI, 00209805)

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. P03-15-34 678A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

This work was supported by program of the Czech Ministry of Health No. P03-15-34 678A.

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

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

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

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



MUDr. Alexandr Poprach, Ph.D.

Klinika komplexní onkologické péče

Masarykův onkologický ústav

Žlutý kopec 7

656 53 Brno

e-mail: poprach@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 16. 8. 2017

Přijato/Accepted: 7. 9. 2017

doi: 10.14735/amko20173555

## Úvod

V léčbě metastatického renálního karcinomu (metastatic renal cell carcinoma – mRCC) se podobně jako u jiných onkologických diagnóz čím dál více uplatňuje moderní imunoterapie. Společně s cíle- nou terapií tvoří dva základní pilíře léčby mRCC. Bohužel se však jedná o léčbu prodlužující život, stále nemůžeme mluvit o úplném vyléčení pacientů, i když některá data ze studií kombinujících cíle- nou terapii a moderní imunoterapii (tzv. check- point inhibitory) dávají určitou naději na dlouhodobou kompletní remisi onemoc- nění (complete remission – CR) (podobně jako to vidíme u pacientů s maligním mel- lanomem (malignant melanoma – MM)). Incidence renálního karcinomu v ČR je nej- vyšší celosvětově, má stále rostoucí ten- denci, v roce 2014 to bylo 30,03 případu na 100 000 obyvatel. Mortalita v ČR stag- nuje, resp. mírně klesá, v roce 2014 byla 11,1 případu na 100 000 obyvatel [1].

Jak již bylo řečeno, pro pacienty s mRCC máme dvě skupiny léčiv. Cílená terapie přinesla ve srovnání s konvenční chemoterapií a imunoterapií cytokiny (interferon  $\alpha$  – IFN- $\alpha$ , interleukin-2 – IL-2) prodloužení doby do progresse onemoc- nění (progression-free survival – PFS), celkového přežití (overall survival – OS), navíc došlo ke zvýšení počtu odpovědí na léčbu (response rate – RR). Léky této skupiny můžeme zjednodušeně rozdělit do dvou podskupin, v první máme inhi- bitory různých kináz receptorů souvise- jící s drahou vaskulárního endotelového růstového faktoru (vascular endothelial growth factor – VEGF), ve druhé pod- skupině pak jsou tzv. mTOR inhibitory (mammalian target of rapamycin). Uka- zuje se, že > 80 % pacientů se sporadic- kým RCC má přítomnou dysfunkci genu Von-Hippel Lindau (VHL), nejčastěji se jedná o poruchu způsobenou určitou mutací vlastního genu či hypermetylací jeho promotoru (epigenetická změna). Pokud jsou proteiny VHL nefunkční, ne- dochází k degradaci hypoxií indukovaného faktoru 1- $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  – HIF-1 $\alpha$ ) v proteazomu. HIF reguluje expresi genů účastnících se procesu angiogeneze, buněčného me- tabolizmu, proliferace, signalizace, che- motaxe či apoptózy. Jedná se přede- vším o geny VEGF, rodiny destičkového

růstového faktoru (platelet-derived growth factor – PDGF) a rodiny transfor- mujícího růstového faktoru (transform- ing growth factor – TGF) [2]. Prokázalo se též, že inaktivace *VHL* genu způsobuje zvýšenou expresi genů *MET* a *AXL*. Zvýšené hladiny proteinu MET pak nacházíme u pacientů ve špatné prognos- tické skupině dle MSKCC 2002, ale též k ní dochází pod vlivem dlouhodobé léčby sunitinibem (může tak být důvo- dem sekundární rezistence na tento lék), podobné výsledky platí i pro zvýšenou expresi genu *AXL* [3,4]. Ligandem pro- teinu MET je hepatocytární růstový fak- tor (hepatocyte growth factor – HGF), zvýšená aktivita MET vede k supresi apo- ptózy, zvýšenému nádorovému růstu, akceleraci angiogeneze, invazivitě a me- tastazování [5]. Ligandem proteinu AXL je Gas6, po jejich vazbě dochází k urych- lení buněčného dělení a supresi apo- ptózy [6]. I proteinová kináza mTOR má velmi důležitou roli v procesech buněč- ného růstu, proliferace, angiogeneze a apoptózy. Pokud je nadměrně expri- mována či stimulována, může dojít k ak- celeraci karcinogeneze. Pomocí temsiro- limu či everolimu dochází k inhibici této serin-threoninové kinázy [7].

Do druhé skupiny léčiv (moderní imu- noterapie, tzv. checkpoint inhibitory) řadíme především anti-PD-1/-L1 (pro- grammed death – PD) protilátky a anti-CTLA-4 protilátky (cytotoxic T-lympho- cyte-associated antigen 4 – CTLA-4). Vývojově starší anti-CTLA-4 protilátky jsou založené na principu inhibice re- ceptoru CTLA-4. Receptor CTLA-4 po na- vázání ligandů CD80 a CD86 negativně ovlivňuje funkci T lymfocytů v interakci s antigeny nádorů či normálních tkání předkládaných dendritickými buňkami imunitního systému. Je-li však tento re- ceptor zablokovan léčebnou protilát- kou (nejčastěji ipilimumab), dochází k odblokování imunitní odpovědi [8]. Anti-PD-1/-L1 protilátky se vážou na re- ceptor či ligand receptoru PD-1, resp. PD-L1. Za normálních okolností inter- akce mezi receptorem PD-1 a jeho li- gandy (PD-L1 a PD-L2) tlumí imunitní odpověď na různé antigeny (např. mik- robiální nebo nádorové). PD-1 receptor je exprimován na aktivovaných T lymfo- cytech, ale i na B lymfocytech, dendritic-

kých buňkách a makrofázích. Nádorové buňky produkující PD-L1 ligand doká- žou tedy velmi účinně tlumit odpověď cytotoxických T lymfocytů na reakci vůči sobě samým [9].

Ukazuje se, že i cílená terapie má ur- čitý imunomodulační efekt. Data jsou zatím rozporuplná, i když se u kombi- nace s anti-CTLA-4 a anti-PD-1/-L1 pro- tilátkami předpokládá synergistický efekt. Bylo prokázáno, že stromální buňky RCC jsou velmi důležitým zdro- jem VEGF, který se pak podílí přímo či nepřímo na produkci dalších cytokinů způsobujících imunopresi nádorového mikroprostředí. Vysoké hladiny VEGF působí inhibici maturace dendritických buněk, indukci apoptózy CD8<sup>+</sup> T lym- focytů a indukci aktivity T regulačních lymfocytů. VEGF se dále podílí na dife- renciaci tumorem asociovaných mak- rofágů, které cestou zvýšené produkce IL-10 a zpětně VEGF akcentují angioge- nezi a pronádorovou imunomodulaci (immune editing). Dále vysoké hladiny VEGF způsobují maturaci myeloidních supresorových buněk, které zhoršují funkci efektorových T lymfocytů a zvy- šují aktivitu T regulačních buněk (regu- lační T lymfocyty s především immu- supresivním a proangiogenním vlivem). Tyrozin kinázové inhibitory (tyrosine kinase inhibitors – TKI) a mTOR inhibitory cestou zablokované funkce receptoru pro VEGF tyto nežádoucí děje inhibují. Sunitinib redukuje počty myeloidních supresorových buněk, při léčbě TKI do- chází ke zvýšené citlivosti nádorových buněk na působení NK buněk (natural killers) a snižují se počty T regulačních buněk, moduluje se též aktivita a efekti- vita T buněk. Rozdíly mezi jednotlivými TKI jsou zřejmě způsobeny selektivní ak- tivitou ke kinázám FLT3 (fms-related ty- rosine kinase 3) a c-kit [10].

V současné době máme v ČR stan- dardně k dispozici k 1. linii léčby pazo- panib, sunitinib a bevacizumab (s IFN- $\alpha$ ) pro pacienty v dobré a střední prognos- tické skupině dle MSKCC [11]. Pacientům ve špatné prognostické skupině mů- žeme nabídnout temsirolimus. Ve 2. linii pak používáme everolimus či axitinib, velmi nadějný kabozantinib (inhibitor jak VEGF dráhy, tak dráhy MET a AXL) zatím čeká na úhradu z veřejného pojiš-

tění. Ve 3. linii pak pacienty léčíme everolimem, kabozantinib zatím v této indikaci nemá úhradu [12]. Nivolumab je anti-PD-1 protilátka, který podobně jako kabozantinib stále čeká na úhradu z veřejného zdravotního pojištění. Předpokládá se, že bude hrazen ve 2. nebo 3. linii paliativní léčby mRCC po selhání inhibitorů VEGF či mTOR [12].

V tomto přehledu se budeme věnovat nejnovějším výsledkům studií samotné imunoterapie (vakcíny, checkpoint inhibitory), ale krátce uvedeme i výsledky studií kombinujících imunoterapii a cílenou terapii u pacientů s mRCC. Pro doplnění jen zmiňujeme, že již probíhají studie fáze III s moderní imunoterapií v adjuvantní nebo neoadjuvantní indikaci (např. NCT03024996, NCT03055013).

### Cytokiny

Cytokiny byly ještě před 10 lety běžně užívanými preparáty u pacientů s mRCC, ovšem s nejistými výsledky. Jednalo se především o IFN- $\alpha$  a IL-2. Samotný IFN- $\alpha$  dosáhl RR okolo 10–15 %, u pacientů se světlobuněčným RCC (clear cell renal cell carcinoma – CCRCC), po nefrektomii a jen s plicními metastázami to mohlo být až 30–37 %. PFS se však pohyboval okolo 5 měsíců a OS pak mezi 10 a 13 měsíci [11]. V současné době se léčba samotným IFN- $\alpha$  považuje za obsolentní, své uplatnění však nachází u kombinací s jinými preparáty (např. s bevacizumabem). IL-2 se podával v různých aplikačních formách (např. i inhalačně), v nízkých dávkách, však s efektem podobným jako u IFN- $\alpha$ . Jiná je situace u vysokodávkovaného IL-2 (high-dose IL-2 – HD), kde dochází přibližně u 5–10 % pacientů k dlouhotrvajícím odpovědím, např. pacienti s CR či částečnou odpovědí (partial response – PR) měli medián přežití bez relapsu (relaps-free survival – RFS) až 54 měsíců, RR se pak pohybuje okolo 15 %. Vysoká toxicita, cena této léčby, nutnost podávání za monitorace na JIP však prakticky znemožnily podávání této léčby v klinické praxi [13]. Na druhou stranu v roce 2015 publikoval McDermott prospektivní studii zkoumající efekt HD-IL-2 u předem vybraných pacientů s mRCC (jen s CCRCC a vysokou expresí karbonické anhydrázy-9), RR byl

25 %, medián OS pak 42,8 měsíce a PFS 4,2 měsíce [14]. Jen krátce se zmíníme o léčbě kombinující IFN- $\alpha$  s IL-2 a 5-flourouracilem (někdy navíc ještě přidány retinoidy, režim dle Atzpodiena). Tato kombinace se běžně používala do roku 2006 i v ČR, byla taktéž toxická, dle autora režimu se však RR pohybovala mezi 25 a 30 %, medián OS byl přes 20 měsíců, pravděpodobnost 2, 5 a 13letého přežití byla 45, 16 a 9 % [15].

### Vakcíny s protinádorovým účinkem

Vzhledem k výše zmíněným imunogenickým vlastnostem RCC se předpokládá i možný benefit z léčby protinádorovými vakcínami navozujícími specifickou imunitu. Výhodou je většinou nízká toxicita, léčebné efekty však zatím zůstávají za očekáváním.

Na tomto místě popíšeme studie dvou vakcín, první je IMA901. Tato vakcína je složena z devíti peptidů asociovaných s tumorem prezentovaných s HLA I. třídy (human leukocyte antigen) a jednoho peptidu prezentovaného s HLA II. třídy, které jsou více exprimovány na povrchu buněk RCC. Ve studii fáze III (IMPRINT) se podávala tato vakcína společně s granulocyty a makrofágy stimulujícím faktorem (GM-CSF), cyklofosfamidem a sunitinibem nepředléčeným pacientům s mRCC, v druhém rameni pacienti dostávali samotný sunitinib. Medián OS nebyl v rameni se sunitinibem dosažen během follow-up, v kombinaci to bylo 33,17 měsíce (HR 1,34; 95% CI 0,96–1,86;  $p = 0,087$ ). Tato studie tedy neprokázala benefit vakcíny na OS v kombinaci se sunitinibem [16]. Druhou vakcínou je pak AGS-003, která je odlišná od IMA901. Jedná se o dendritické buňky pacienta získané leukaferézou, do nichž se *ex vivo* inkorporují nádorové RNA (z pacientova nádoru) a syntetická RNA ligandu CD40. Při intradermální aplikaci vakcíny dochází k prezentaci pacientových nádorově specifických antigenů v asociaci s HLA I. třídy T lymfocytům ve spádové lymfatické uzlině, navíc kostimulační CD40 ligandy pak vazbou na receptory na povrchu CD8+ lymfocytů indukují produkci IL-12, který má další imunogenní efekt. Nadějně výsledky přinesla studie fáze II, kde byli touto vakcínou (v kombi-

naci se sunitinibem) léčení nepředléčení pacienti s mRCC ve střední nebo špatné prognostické skupině dle MSKCC 2002. Mediány PFS a OS byly v celé studiové skupině 11,2 a 30,2 měsíce. Kontrola onemocnění (CR + PR + SD) byla 62 % (CR 0 %, PR 43 %), 52 % pacientů žilo déle než 30 měsíců a 24 % pacientů pak bylo na živu > 5 let od vstupu do studie [17]. Studie fáze III s touto vakcínou (celkem bylo zařazeno 462 pacientů) však byla předčasně ukončena nezávislou komisí, neprokázal se totiž léčebný přínos vakcíny (ADAPT, NCT01582672).

### Nivolumab

Nivolumab je humánní protilátka proti receptoru PD-1. Vynikající výsledky tohoto léku ze studií fáze I a II vedly k provedení studie fáze III (CheckMate 025), ve které došlo ke srovnání nivolumabu a everolimu u pacientů s mRCC v rámci 2. nebo 3. linie léčby. Pacienti byli předléčení VEGF inhibitory, dávka nivolumabu byla 3 mg/kg à 14 dní (410 pacientů), everolimu pak 10 mg/denně (411 pacientů). Stratifikace pacientů proběhla dle prognostických skupin dle MSKCC (2004), geografického původu a počtu předchozích linií léčby. Primárním cílem bylo OS, sekundárními cíli pak PFS, RR, bezpečnost a vztah mezi expresí PD-L1 a OS. OS v rámci 26měsíčního follow-up v rameni s nivolumabem bylo 26 měsíců, v rameni s everolimem pak 19,7 měsíce (HR 0,73; 95% CI 0,61–0,88;  $p = 0,0006$ ), mediány PFS se nelišily (4,6 u nivolumabu vs. 4,4 měsíce u everolimu; HR 0,88; 95% CI 0,75–1,03;  $p = 0,11$ ). RR byl statisticky signifikantně vyšší u nivolumabu (25 %) než u everolimu (5 %) (HR 5,98; 95% CI 3,68–9,72;  $p < 0,001$ ). Neprokázala se souvislost mezi OS a expresí PD-L1. Taktéž toxicita byla nižší v rameni s nivolumabem vs. everolimem, toxicita stupně 3 + 4 se vyskytla u 19 % vs. 37 % pacientů [18]. V roce 2016 byla na konferenci ASCO prezentována data o přežití pacientů léčených i přes radiologickou progresi (celkem 153 pacientů). Prokázalo se, že medián OS pacientů léčených i přes progresi onemocnění je signifikantně delší než u pacientů neléčených přes progresi onemocnění – 28,1 vs. 15 měsíců (HR 0,41; 95% CI 0,29–0,57;  $p < 0,001$ ). Navíc 50 % pacientů léče-

Tab. 1 RR studie CheckMate 016.

Léčebná odpověď	Ramena studie počet pt (%)	
	N311 (47 pt)	N113 (47 pt)
RR	19 (40,4)	19 (40,4)
95% CI	26,4–55,7	26,4–55,7
CR	5 (10,6)	0 (0,0)
PR	14 (29,8)	19 (40,4)
SD	19 (40,4)	17 (36,2)
PD	8 (17,0)	7 (17,0)
Neurčeno	1 (2,1)	3 (6,4)

CR – kompletní odpověď, RR – počet odpovědí na léčbu, PR – částečná odpověď, SD – stabilní nemoc, PD – progresse

ných i přes progresi onemocnění dosáhlo při dalších přešetřeních regrese, u 14 % pacientů to bylo  $\geq 30\%$  zmenšení onemocnění [19]. Pravděpodobnost 1- a 2letého přežití pacientů ve studii CheckMate 025 je 76 % a 52 % (u everolimu 67 % a 42 %). Nivolumab je účinný napříč rizikovými skupinami pacientů, i když statisticky významný rozdíl v OS u nivolumabu ve srovnání s everolimem byl přítomen jen ve skupině pacientů se špatnou prognózou (mediány OS u nivolumabu a everolimu – 15,3 a 7,9 měsíce), v dobré (nedosaženo a 29 měsíců) a střední (21,8 a 18,4 měsíce) prognostické skupině nebyly rozdíly v OS statisticky významné, bez ohledu na předléčenost či místa metastáz [20]. V roce 2017 na ASCO konferenci skupina italských autorů prezentovala data přežití pacientů léčených nivolumabem v rámci expanded access program (EAP) – jednalo se o 389 pacientů, u 80 pacientů byl nivolumab podán v rámci 2. linie léčby, v rámci 3. a 4. linie pak nivolumab dostalo 137 a 170 pacientů. RR byl 22 % (téměř vše PR, jen 2 pacienti měli CR), u 31 % pacientů došlo ke stabilizaci onemocnění (stable disease – SD), 100 pacientů pokračovalo v léčbě i přes progresi onemocnění (25 pacientů mělo pak následně z léčby benefit – 6 pacientů dosáhlo následně PR, 19 pacientů SD). Medián PFS byl 4,6 měsíce, v rámci follow-up 9,2 měsíce byla pravděpodobnost 6- a 9měsíčního OS 80 % a 73 %, medián OS zatím nebyl dosažen. Opět bylo konstatováno, že z léčby

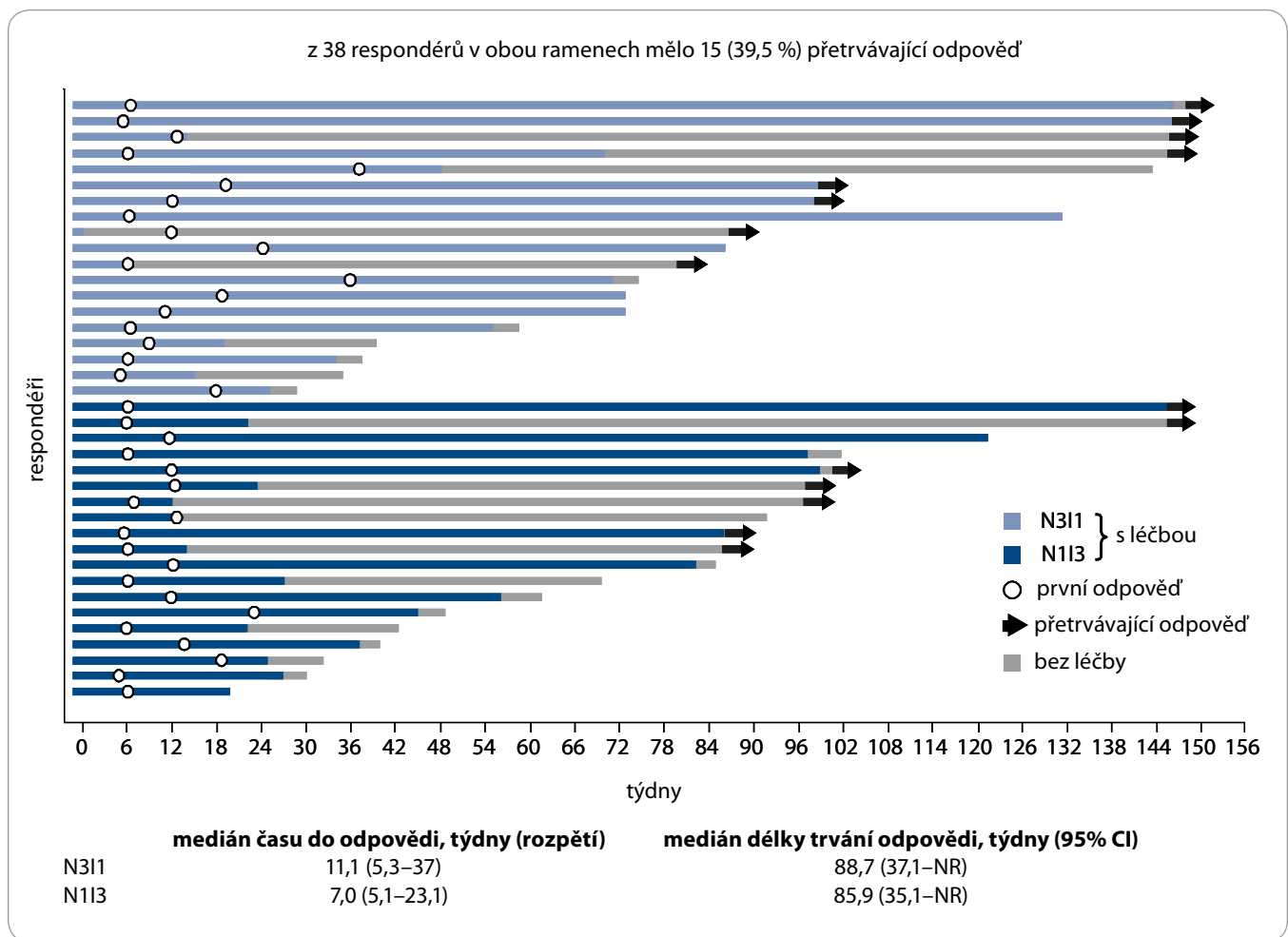
nivolumabem benefitují pacienti napříč různými rizikovými skupinami i pacienti s mozkovými anebo kostními metastázami, s nesvětlobuněčnou histologií a bez ohledu na linii léčby či vyšší věk ( $\geq 75$  let). Nejčastějšími nežádoucími účinky (adverse events – AE) byly únava, teplota a anorexie, toxicita stupně 3 + 4 byla zaznamenána jen u 7 % pacientů, nedošlo k žádnému úmrtí v souvislosti s léčbou [21].

### Ipilimumab

Tato protilátka proti CTLA-4 receptoru přinesla průlom v léčbě diseminovaného MM. U pacientů s mRCC se také zkoušela, ve studii fáze II však byl RR při „plné“ dávce 3 mg/kg jen přibližně 10 %, u dávky 3 mg/kg s následnou dávkou 1 mg/kg pak PR dosáhl jen jeden pacient z celkem 21 pacientů. Pokud pacienti měli imunitně podmíněné nežádoucí účinky (immune-related adverse events – irAE), byla i větší pravděpodobnost vyššího RR (s irAE byl RR 30 %, bez irAE 0 %) [22]. Jiná je situace u kombinace ipilimumab + nivolumab, která bude zmíněna níže. Pro přehlednost ještě zmíníme jinou anti-CTLA-4 protilátku – tremelimumab, který se ve studii fáze I zkoušel v kombinaci se sunitinibem u pacientů s mRCC. Studie však byla předčasně zastavena pro časně vyskyty renálních selhání, RR však byl až 43 % [23]. Nově se zkouší tremelimumab v neoadjuvantním podání v kombinaci s anti-PD-L1 protilátkou – durvalumabem (studie fáze I, NCT02762006).

### Kombinace nivolumab + ipilimumab

Kombinace anti-CTLA-4 protilátky s anti-PD-1 protilátkou představuje racionální snahu o ovlivnění imunitní odpovědi na různé úrovni. Poměrně nedávno prezentoval Hammers et al výsledky studie fáze I (CheckMate 016), šlo poměrně o složitou studii, kde se různě kombinoval nivolumab + ipilimumab v různých dávkách, kromě toho se zde ještě zkoušela kombinace nivolumab + TKI (pazopanib nebo sunitinib). Pacienti s předléčeným či nepředléčeným mRCC dostávali nivolumab 3 mg/kg + ipilimumab 1 mg/kg (N311), nebo nivolumab 1 mg/kg + ipilimumab 3 mg/kg (N113) anebo nivolumab 3 mg/kg + ipilimumab 3 mg/kg – první čtyři cykly à 3 týdny, poté pokračovali již jen v monoterapii nivolumabem 3 mg/kg à 2 týdny do progresse onemocnění či toxicity. Dlužno podotknout, že rameno s kombinací nivolumab 3 mg/kg + ipilimumab 3 mg/kg bylo předčasně uzavřeno pro toxicitu. Primárním cílem studie byla bezpečnost, sekundárními cíli pak RR, nejlepší léčebná odpověď (best overall response – BOR) (dle RECIST 1.1), trvání léčebné odpovědi (duration of response – DOR), doba do odpovědi a PFS. V rameni N311 bylo celkem 25 nepředléčených pacientů, v rameni N113 pak 21 pacientů. S léčbou spojené AE všech stupňů toxicity nastaly u 93,6 % studiových pacientů, z toho stupně 3 + 4 se vyskytly u 50 % pacientů. V rameni N311 se s léčbou spojená toxicita všech stupňů, resp. stupně 3 + 4, objevila zatím u 91,5 % pacientů (nejčastěji únava, kožní toxicita), resp. 38,3 % pacientů (elevace lipáz, hepatotoxicita), v rameni s N113 to bylo u 95,7 % pacientů (únava, kožní toxicita), resp. 61,7 % (elevace lipáz, gastrointestinální toxicita – průjem). Pokud se hodnotily závažné, s léčbou spojené AE všech stupňů (SAEs), v rameni N311 se vyskytly u 23,4 % pacientů (nejčastěji průjem a pyrexie), z toho stupně 3 + 4 byly přítomny u 19,1 % (průjmy 4,3 % pacientů), v rameni N113 to pak bylo u 34 % pacientů, nejčastěji kolitida, průjmy, hepatopatie (vše stupně 3 + 4, kromě jediného pacienta s průměrem stupně 2). Ze studiové populace pacientů dostalo



**Graf 1. Doba trvání léčebné odpovědi ve studii CheckMate 016 [9].**

NR – nedosaženo

61,7 % pacientů v rameni N311 imuno-modulační léčbu (nejčastěji kortikoidy) ke zvládnutí AE, v rameni N113 to bylo 83 % pacientů. V rámci mediánu follow-up 22,3 měsíce pak RR byly v obou ramenech 40,4 %, kontroly onemocnění (to je CR + PR + SD – DCR) byly 80,8 %, resp. 76,6 %. Pravděpodobnost 2letého OS byla v rameni N311, resp. N113, 67,3 %, resp. 69,6 %, pokračující odpovědi pak jsou přítomny u 42,1 %, resp. 36,8 % pacientů (tab. 1, graf 1). Mediány PFS jsou v rameni s N311 7,7 měsíce, u N113 9,4 měsíce [9].

S napětím pak očekáváme výsledky studie fáze III srovnávající kombinaci nivolumab + ipilimumab vs. sunitinib (CheckMate 214, NCT02231749), jejíž první výsledky budou zveřejněny ke konci roku 2017 či začátkem roku 2018.

### Kombinace bevacizumab + atezolizumab

Bevacizumab je humanizovaná protilátka proti VEGF, atezolizumab je humanizovaná protilátka proti PD-L1 ligandu. Bevacizumab je indikován u pacientů s mRCC v rámci 1. linie léčby v kombinaci s IFN- $\alpha$ . Dle našeho názoru se jedná o přinejmenším stejně účinnou léčbu v porovnání s TKI (sunitinib, pazopanib) používanými v rámci 1. linie. Cena této léčby v porovnání s jinými TKI a nutnost intravenózního podávání bevacizumabu (resp. podkožního u IFN- $\alpha$ ) jsou příčinami omezené indikace. O imunogenním efektu bevacizumabu (resp. inhibitorych VEGF kaskády) jsme se již zmínili v úvodu, zde jen doplníme, že bevacizumab zvyšuje počty periferních CD8+ T lymfocytů, intratumorových CD8+ T lymfocytů i Th1 lymfocytů a dále zvyšuje

produkcii IL-2 [24]. Společně s anti-PD-L1 protilátkou tak představují kombinaci, kdy kromě zablokování dráhy VEGF očekáváme též augmentaci protinádorové imunitní odpovědi. Ve studii fáze II (IMMOTION 150) došlo ke srovnání atezolizumabu v monoterapii (1 200 mg à 3 týdny) vs. atezolizumab (1 200 mg à 3 týdny) + bevacizumab (15 mg/kg à 3 týdny) vs. sunitinib (50 mg denně, režim 4 + 2) u 305 nepředléčených pacientů s mRCC. V roce 2017 byla publikována data v mediánu follow-up 20,7 měsíce. Mediány PFS byly u kombinace atezolizumab + bevacizumab vs. sunitinib 11,7 vs. 8,4 měsíce (HR 1,00; 95% CI 0,69–1,45;  $p = 0,982$  – tedy statisticky nevýznamný rozdíl), RR 32 vs. 29 %. U pacientů s expresí PD-L1  $\geq 1$  % pak byly mediány PFS 14,7 vs. 7,8 měsíce (HR 0,64; 95% CI 0,38–1,08;  $p = 0,095$ , tedy opět

statisticky nevýznamný rozdíl), RR 46 vs. 27 %. Při srovnání pacientů s expresí PD-L1  $\geq 10$  % bylo HR pro PFS v ramelech s kombinací bevacizumab + atezolizumab vs. sunitinib 0,23. Toxicita stupně 3 + 4 byla v rameni s kombinací atezolizumab + bevacizumab přítomna u 63 % pacientů (proteinurie, průjmy). Crossover je v této studii dovolen (78 % pacientů se sunitinibem již dostalo atezolizumab + bevacizumab) [25]. Kombinace atezolizumab + bevacizumab vs. sunitinib je nyní zkoumána ve studii fáze III u nepředlčených pacientů s mRCC (IMMOTION 151, NCT02420821).

### Kombinace bevacizumab + pembrolizumab

Pembrolizumab je humanizovaná protilátka proti PD-1 receptoru, který se nyní zkouší jak v monoterapii (KEYNOTE 427, NCT02853344), tak i v kombinaci s různými léky u pacientů s mRCC. Ve studii fáze Ib se podávala kombinace bevacizumab + pembrolizumab předlčeným pacientům s mRCC, zatím zde nebyla zaznamenána toxicita stupně 3 nebo 4, RR byl 71 % [26]. Nyní probíhá studie fáze II se stejnou kombinací léků (bevacizumab 15 mg/kg + pembrolizumab 200 mg à 3 týdny, NCT02348008).

### Kombinace nivolumab + pazopanib/sunitinib

Standardně používané léky v 1. linii byly zkoušeny ve studii fáze I u předlčených pacientů s mRCC v kombinaci s nivolumabem. Dávky nivolumabu byly 2 mg/kg (s eskalací na 5 mg/kg), sunitinib byl podáván ve vstupní dávce 50 mg (režim 4 + 2) a pazopanib v dávce 800 mg. Rameno s pazopanibem muselo být předčasně zastaveno pro jaterní toxicitu. Nicméně RR v rameni se sunitinibem, resp. pazopanibem byl 52, resp. 45 %, SD pak byla zaznamenána u 35 %, resp. 33 % pacientů. Toxicita stupně 3 + 4 byla zaznamenána u 73 % pacientů se sunitinibem (elevace ALT, hypertenze), resp. u 60 % v rameni s pazopanibem (elevace ALT/AST, únava). Je třeba podotknout, že autoři studie nyní testují podobnou studii s nižší dávkou pazopanibu [27]. Pro úplnost jen uvedeme, že byla též testována kombinace pazopanib (v různých dávkách, studie fáze I/II) + pembrolizumab u pacientů s mRCC – i přes povzbudivé výsledky v počtu odpovědí docházelo i v této studii k závažným AE (hepatotoxicita), které zřejmě neumožní další testování pazopanibu v kombinaci s checkpoint inhibitory v budoucnu [28].

### Kombinace axitinib + pembrolizumab/avelumab

Axitinib je TKI druhé generace užívaný u pacientů s mRCC ve 2. linii paliativní léčby. Kombinace axitinib + pembrolizumab (axitinib 5 mg 2× denně, pembrolizumab 2 mg/kg à 3 týdny) byla testována ve studii fáze I u 52 nepředlčených pacientů s mRCC. Kompletní remise byla dosažena u 5,8 % pacientů, PR mělo 65,4 % pacientů, SD pak 19,2 % pacientů, kontrola onemocnění byla tedy přibližně 90 %. Nejčastějšími AE všech stupňů byly průjem (80,8 % pacientů), únava (76,9 % pacientů) a chrapot (76,9 % pacientů), z AE stupně 3 se nejčastěji vyskytly hypertenze (17,3 % pacientů), průjem (9,6 % pacientů) a únava (5,8 % pacientů). Při zohlednění irAE měli pacienti nejčastěji průjem – 26,9 % pacientů (stupeň 3 – 7,7 % pacientů) a elevaci ALT – 13,5 % pacientů (stupeň 3 – 3,8 % pacientů). Jen dva pacienti měli toxicitu stupně 4 (hyperurikemie a dušnost), úmrtí související s léčbou nebylo ve studii zaznamenáno. Léčbu muselo přerušit jen devět pacientů z důvodů AE léčby, nebyl pozorován výraznější nárůst hepatopatie [29]. V současné době probíhá studie fáze III porovnávací účinnost sunitinibu vs. kombinace axitinib + pembrolizumab u nepředlčených pacientů s mRCC (KEYNOTE-426, NCT02853331).

Ve druhé studii fáze I byl axitinib kombinován s avelumabem (humánní anti-PD-L1 protilátka) – studie JAVELIN Renal 100 (NCT02493751). Do studie bylo zařazeno 55 nepředlčených pacientů s mRCC (axitinib 5 mg 2× denně, avelumab 10 mg/kg à 2 týdny). Na ASCO 2017 byly prezentovány předběžné výsledky studie – CR byla dosažena u 5,5 % pacientů, PR u 52,7 % pacientů, SD pak u 20 % pacientů, progresse onemocnění byla přítomna u 18,2 % pacientů (odpověď u dvou pacientů nebylo možné zhodnotit). Tedy kontroly onemocnění dosáhlo 78,2 % pacientů. Odpovědi jsou opět dlouhodobé, zvýšená exprese PD-L1  $\geq 1$  % nebo  $\geq 5$  % nemá vliv na počet odpovědí. Nejčastějšími AE byly průjem (všechny stupně 56,4 % pacientů, stupeň 3 – 3,6 % pacientů) a hypertenze (všechny stupně 47,3 % pacientů, stupeň 3 – 29,1 % pacientů). Toxicitu stupně 4 mělo 9,1 % pacientů, nejčastěji se jednalo o elevace lipáz (5,5 % pacientů), jeden pacient zemřel na myokarditidu. Z irAE (všechny stupně – 30,9 % pacientů) byla nejčastější porucha štítné žlázy (21,8 % pacientů), vyrážka (5,5 % pacientů) a hepatopatie (3,6 % pacientů), stupeň 3 toxicity byl zaznamenán u 5,5 % pacientů (nejčastěji hepatopatie), žádný pacient neměl toxicitu stupně 4, již zmíněná myokarditida s úmrtím se taktéž považuje za irAE [30]. Na základě těchto dat nyní taktéž probíhá studie fáze III, srovnává se sunitinib s kombinací avelumab + axitinib (JAVELIN Renal 101, NCT02684006).

**Další kombinace**  
Velmi nadějně se jeví též studie kombinující kabozantinib + nivolumab s/bez ipilimumabu (NCT02496208), dále lenvatinib + pembrolizumab. Lenvatinib + pembrolizumab ve studii fáze Ib/II dosáhly u pacientů s předlčeným mRCC 100% kontroly onemocnění, z toho 50 % pacientů mělo PR [31]. Nyní běží studie fáze III testující kombinaci lenvatinib + pembrolizumab vs. sunitinib vs. lenvatinib + everolimus u nepředlčených pacientů s mRCC (NCT02811861). Konečně poslední kombinací, kterou bychom chtěli představit, je pembrolizumab + ipilimumab (studie fáze I, KEYNOTE-029). Výzkum probíhá u předlčených pacientů s mRCC (pembrolizumab 2 mg/kg à 3 týdny – 1 dávka, ipilimumab 1 mg/kg à 3 týdny – 4 dávky) ve studii fáze I. Do studie bylo zařazeno 10 pacientů, 2 pacienti měli PR, 3 pak SD. S léčbou spojené AE všech stupňů se vyskytly u 7 pacientů, z toho stupně 3 + 4 byly přítomny u 5 pacientů (elevace lipáz). Medián DOR zatím nebyl dosažen [32].

### Další kombinace

**Závěr**  
V tomto stručném přehledu jsme se pokusili nastínit, jak dynamicky se rozvíjí

**léčba imunoterapií u pacientů s mRCC. Po 10 letech od příchodu TKI jsme svědky nástupu další vysoce účinné terapie. Dochází k vývoji nových checkpoint inhibitorů, zkouší se kombinace s mnoha TKI v různých složitých schématech. Bude zcela jistě nutné (už kvůli finanční nákladnosti, resp. neúnosnosti) pacienty stratifikovat (často zkoumaná exprese PD-L1 zatím nepřináší očekávané výsledky), nalezení prediktivních faktorů se stává nutností. Podobně jako u pacientů s MM stojíme před řadou otázek, např.:**

1. Je lepší podávat konkomitantní léčbu imunoterapií s TKI, nebo je lepší léčba sekvenční?
2. Jak léčit starší pacienty, kteří nám přibývají?
3. Co pacienti s mozkovými metastázami?
4. Má stále ještě smysl provádět paliativní nefrektomii nebo metastazektomie?
5. Pokud ano, kdy?
6. Má smysl provádět jiné lokální paliativní metody – radioterapii, kryoterapii (abskopální efekt)?
7. Má smysl adjuvantní léčba imunoterapií?
8. Co pacienti s nesvětlobuněčným mRCC?

Podobných otázek by se jistě našlo více, na řadu z nich snad odpoví právě probíhající studie, jejichž výsledky s napětím očekáváme.

## Literatura

1. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Masarykova univerzita [online]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>.
2. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1(HIF-1). *Mol Pharmacol* 2006; 70(5): 1469–1480. doi: 10.1124/mol.106.027029.
3. Gibney GT, Aziz SA, Camp RL et al. c-Met is a prognostic marker and potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol* 2013; 24(2): 343–349. doi: 10.1093/annonc/mds463.
4. Gustafsson A, Fritz HKM, Dahlbäck B. Gas6-Axl signaling in presence of Sunitinib is enhanced, diversified and sustained in renal tumor cells, resulting in tumor-progressive advantages. *Exp Cell Res* 2017; 355(1): 47–56. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.040.
5. Graveel CR, Tolbert D, Vande Woude GF. MET: a critical player in tumorigenesis and therapeutic target. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013; 5(7): a009209. doi: 10.1101/cshperspect.a009209.
6. Zhou L, Liu XD, Sun M et al. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene* 2016; 35(21): 2687–2697.
7. Študentová H, Melichar B. Nový mechanismus v léčbě karcinomu ledviny: m-TOR – nová cílová struktura. *Onkologie* 2010; 4(3): 185–188.
8. Hahn AW, Gill DM, Pal SK et al. The future of immune checkpoint cancer therapy after PD-1 and CTLA-4. *Immunotherapy* 2017; 9(8): 681–692. doi: 10.21217/imt-2017-0024.
9. Hammers HJ, Plimack ER, Infante JR et al. Safety and Efficacy of Nivolumab in Combination With Ipilimumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma: The CheckMate 016 Study. *J Clin Oncol* 2017; JCO2016721985. doi: 10.1200/JCO.2016.72.1985.
10. Santoni M, Berardi R, Amantini C et al. Role of natural and adaptive immunity in renal cell carcinoma response to VEGFR-TKIs and mTOR inhibitor. *Int J Cancer* 2014; 134(12): 2772–2777. doi: 10.1002/ijc.28503.
11. Motzer RJ, Bacik J, Murphy BA et al. Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2002; 20(1): 289–296. doi: 10.1200/JCO.2002.20.1.289.
12. Vyzula R, Adámková Krákorová D, Arenberger P (eds). *Zhoubný novotvar ledviny (C64)*. In: *Modrá kniha České onkologické společnosti*. 23. aktualizace. Brno: Masarykův onkologický ústav 2017: 116–119.
13. McDermott DF, Regan MM, Clark JI et al. Randomized phase III trial of high-dose interleukin-2 versus subcutaneous interleukin-2 and interferon in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23(1): 133–141. doi: 10.1200/JCO.2005.03.206.
14. McDermott DF, Cheng SC, Signoretti S et al. The high-dose aldesleukin „select” trial: a trial to prospectively validate predictive models of response to treatment in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21(3): 561–568. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1520.
15. Atzpodien J, Hoffmann R, Franke M et al. Thirteen-year, long-term efficacy of interferon 2alpha and interleukin 2-based home therapy in patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer* 2002; 95(5): 1045–1050. doi: 10.1002/cncr.10783.
16. Rini BI, Stenzl A, Zdrojowy R et al. IMA901, a multipolypeptide cancer vaccine, plus sunitinib versus sunitinib alone, as first-line therapy for advanced or metastatic renal cell carcinoma (IMPRINT): a multicentre, open-label, randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17(11): 1599–1611. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30408-9.
17. Amin A, Dudek AZ, Logan TF et al. Survival with AGS-003, an autologous dendritic cell-based immunotherapy, in combination with sunitinib in unfavorable risk patients with advanced renal cell carcinoma (RCC): Phase 2 study results. *J Immunother Cancer* 2015; 3: 14. doi: 10.1186/s40425-015-0055-3.
18. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* 2015; 373(19): 1803–1813. doi: 10.1056/NEJMoa1510665.
19. Escudier BJ, Motzer RJ, Sharma P et al. Treatment beyond progression with nivolumab (nivo) in patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (aRCC) in the phase III CheckMate 025 study. *J Clin Oncol* 2016; 34 (Suppl 15): abstr. 4509.
20. Escudier B, Sharma P, McDermott DF et al. CheckMate 025 Randomized Phase 3 Study: Outcomes by Key Baseline Factors and Prior Therapy for Nivolumab Versus Everolimus in Advanced Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol* 2017; pii: S0302-2838(17)30099-4. doi: 10.1016/j.eururo.2017.02.010.
21. Giorgi D, Scagliarini S, Basso U et al. Safety and efficacy of nivolumab for metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Real world data from an Italian expanded access program (EAP). *J Clin Oncol* 2017; 35 (Suppl 15): abstr. 4577.
22. Yang JC, Hughes M, Kammula U et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother* 2007; 30(8): 825–830. doi: 10.1097/JCI.0b013e318156e47e.
23. Rini BI, Stein M, Shannon P et al. Phase 1 dose-escalation trial of tremelimumab plus sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer* 2011; 117(4): 758–767. doi: 10.1002/cncr.25639.
24. Wallin JJ, Bendell JC, Funke R et al. Atezolizumab in combination with bevacizumab enhances antigen-specific T-cell migration in metastatic renal cell carcinoma. *Nat Commun* 2016; 7: 12624. doi: 10.1038/ncomms12624.
25. McDermott DF, Atkins MB, Motzer RJ et al. A phase II study of atezolizumab (atezo) with or without bevacizumab (bev) versus sunitinib (sun) in untreated metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients (pts). *J Clin Oncol* 2017; 35 (Suppl 6): abstr. 431.
26. Dudek AZ, Sica RA, Sidani A et al. Phase Ib study of pembrolizumab in combination with bevacizumab for the treatment of metastatic renal cell carcinoma: big ten cancer research consortium BTCRC-GU14-003. *J Clin Oncol* 2016; 34 (Suppl 2): abstr. 559.
27. Amin A, Plimack ER, Infante JR et al. Nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558, ONO-4538) in combination with sunitinib or pazopanib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2014; 32 (Suppl 5): abstr. 5010.
28. Chowdhury S, McDermott DF, Voss MH et al. A phase I/II study to assess the safety and efficacy of pazopanib (PAZ) and pembrolizumab (PEM) in patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (aRCC). *J Clin Oncol* 2017; 35 (Suppl): abstr. 4506.
29. Atkins MB, Plimack ER, Puzanov I et al. Axitinib in combination with pembrolizumab in patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (aRCC): Preliminary safety and efficacy results. *Ann Oncol* 2016; 27 (Suppl 6): 266–295. doi: 10.1093/annonc/mdw373.01.
30. Choueiri TK, Larkin J, Oya M et al. First-line avelumab + axitinib therapy in patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (aRCC): Results from a phase Ib trial. *Clin Oncol* 2017; 35 (Suppl): abstr. 4504.
31. Taylor M, Dutkus CE, Schmidt E et al. A phase 1b trial of lenvatinib (LEN) plus pembrolizumab (PEM) in patients with selected solid tumors. *Ann Oncol* 2016; 27(6): 266–295. doi: 10.1093/annonc/mdw373.04.
32. Choueiri TK, Hodi FS, Thompson JA et al. Pembrolizumab (pembro) plus low-dose ipilimumab (ipi) for patients (pts) with advanced renal cell carcinoma (RCC): Phase 1 KEYNOTE-029 study. *J Clin Oncol* 2017; 35 (Suppl 6): abstr. 510.



RESEARCH

Open Access

# Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma

Martina Redova<sup>1,2</sup>, Alexandr Poprach<sup>1</sup>, Jana Nekvindova<sup>3</sup>, Robert Iliev<sup>1</sup>, Lenka Radova<sup>4</sup>, Radek Lakomy<sup>1</sup>, Marek Svoboda<sup>1,2</sup>, Rostislav Vyzula<sup>1</sup> and Ondrej Slaby<sup>1,2\*</sup>

## Abstract

**Background:** There is no standard serum biomarker used for diagnosis or early detection of recurrence for renal cell carcinoma (RCC) patients. MicroRNAs (miRNAs) are abundant and highly stable in blood serum, and have been recently described as powerful circulating biomarkers in a wide range of solid cancers. Our aim was to identify miRNA signature that can distinguish the blood serum of RCC patients and matched healthy controls and validate identified miRNAs as potential biomarkers for RCC.

**Methods:** In the screening phase of the study, blood serum of 15 RCC patients and 12 matched healthy controls were analyzed by use of the TaqMan Low-Density Arrays enabling parallel identification of expression levels of 667 miRNAs through qRT-PCR-based approach. In the validation phase, identified miRNAs were further evaluated on the independent group of 90 RCC patients and 35 matched healthy controls by use of individual qRT-PCR assays and statistically evaluated.

**Results:** We identified 30 miRNAs differentially expressed between serum of RCC patients and healthy controls: 19 miRNAs were up-regulated and 11 miRNAs were down-regulated in RCC patients. MiR-378, miR-451 and miR-150 were further evaluated in the independent group of patients, and two of them were successfully validated: levels of miR-378 were increased ( $p = 0.0003$ , AUC = 0.71), miR-451 levels were decreased ( $p < 0.0001$ , AUC = 0.77) in serum of RCC patients. Combination of miR-378 and miR-451 enable identification of RCC serum with the sensitivity of 81%, specificity 83% and AUC = 0.86.

**Conclusions:** Circulating miRNAs in serum are promising biomarkers in RCC.

**Keywords:** Renal cell carcinoma, MicroRNA, Serum, Biomarker

## Background

Renal cell carcinoma (RCC) is the most common neoplasm of adult kidney accounting for about 3% of adult malignancies and having the highest mortality rate at over 40% [1,2]. Renal tumors are commonly asymptomatic in early stages and although surgical resection remains the best therapy for RCC, after the curative nephrectomy, 20-40% patients will develop recurrence. Unfortunately, there is no standard serum biomarker used for diagnosis or early detection of recurrence for RCC patients. Although several serum proteins that might be useful to detect the presence of advanced or

recurrent RCC have been reported [3], none indicated analytical sensitivity efficient enough for translation into standard of care management for RCC patients.

MicroRNAs (miRNAs) are a novel class of naturally occurring, short non-coding, single stranded RNAs, that regulate gene expression at the post-transcriptional level by binding to the untranslated region (3'UTR) of target mRNAs and causing translational inhibition and/or mRNA degradation [4]. Specific expression profiles of miRNAs have been shown in a variety of cancers, including RCC [4-6]. MiRNAs are highly stable and abundant in plasma, serum and other body fluids. Moreover, miRNA signatures in blood are similar in men and women, as well as individuals of different age [7]. These circulating miRNAs had shown great potential to serve as a novel biomarker for non-invasive diagnosis and

\* Correspondence: slaby@mou.cz

<sup>1</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, Department of Comprehensive Cancer Care, Zlutý kopec 7, Brno, Czech Republic  
Full list of author information is available at the end of the article

prognosis of plenty kinds of diseases, such as cancer, and even physiological conditions such as prenatal screening. Following the release from cells, circulating miRNAs originate from (i) microvesicles (released by exocytosis), (ii) exosomes (formed via invagination of the early endosome and released upon fusion of late endosome with plasma membrane), and (iii) apoptotic vesicles and/or senescent bodies [7-9].

Expression profiles of circulating miRNAs were extensively studied in (i) colorectal cancer (CRC) where authors found miR-29a and miR-92 plasma levels to differentiate between CRC patients and controls with sensitivity of 89% and specificity of 70% and also to be associated with clinical stage [10], (ii) in ovarian cancer where levels of miR-21, miR-92 and miR-93 were higher in 3 patients with normal CA-125 levels, a clinical biomarker of ovarian cancer [11], (iii) in breast cancer where it has been described that changes in the level of total RNA, miR-10b, miR-34a, and miR-155 correlated with the presence of overt metastases [12], (iv) in prostate cancer where serum miR-141 levels were found to distinguish metastatic prostate patients from age-matched controls [13]. Such studies have clearly proved the potential of circulating miRNAs in primary diagnostics as well as in follow-up for the early detection of disease progression. In case of RCC the only study was performed and circulating miR-1233 identified, but the analytical characteristics of this biomarker in the validation study were not convincing [14]. In our study we focused on the circulating miRNAs expression profiles in the serum samples of RCC patients aiming identification of new biomarkers for RCC.

## Materials and methods

### Study population

We collected serum samples from the group of patients diagnosed for RCC and undergoing radical nephrectomy at Masaryk Memorial Cancer Institute (MMCI; Brno, Czech Republic) between 2003 and 2008, and matched cancer-free blood donor volunteers recruited from the same institute with no previous history of any cancer. All subjects were of the same ethnicity (Caucasian). Clinical and pathological characteristics including age, gender, stage, and grade were recorded and they are summarized in Table 1. RCC serum samples were collected after signing an informed consent prior to surgery and stored at MMCI Bank of Biological Material. The study has been approved by the local Ethical Committee at Masaryk Memorial Cancer Institute (MMCI; Brno, Czech Republic).

### RNA isolation

Total RNA enriched for small RNAs was isolated using Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen, GmbH, Germany)

**Table 1 Patient characteristics**

	Exploratory phase		Validation phase	
	RCC	HC	RCC	HC
N	15	12	90	35
<b>Sex</b>				
male	10	10	56	26
female	5	2	34	9
<b>Age</b>				
median	62	61	66	63
range	53-73	54-69	36-85	51-70
<b>Histology</b>				
ccRCC	15		73	
pRCC	0		8	
chRCC	0		9	
<b>Pathological stage</b>				
pT1	6		50	
pT2	0		14	
pT3	9		23	
pT4	0		3	
vascular invasion	5		16	
lymph nodes metastasis	0		6	
distant metastasis	3		18	
<b>Fuhrman grade</b>				
G1	3		20	
G2	7		39	
G3	4		23	
G4	1		8	

*Abbreviations:* RCC, renal cell carcinoma; ccRCC, clear cell RCC; pRCC, papillary RCC; chRCC, chromophobe RCC

from 200 µL serum according to modified manufacturers' protocol. For each sample, to the 800 µl of QIAzol solution was added 1.25 µl 0.8 µg/µl MS2 RNA carrier (Roche, cat. No. 10165948001). The extracted RNA was eluted in 50 µL of preheated Elution Solution, and concentration and purity of RNA were determined spectrophotometrically by measuring its optical density (A260/280 > 2.0; A260/230 > 1.8) using NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). The samples were either stored at -80°C or further processed.

### TaqMan low density arrays - screening phase

In the screening phase, we performed TaqMan Low Density Arrays (TLDA) analysis to identify differentially expressed miRNAs from the two pooled serum samples (15 ccRCC patients vs. 12 healthy controls). In brief, 35 ng of total RNA was reverse-transcribed into cDNA by the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit and Megaplex RT set pool A and B version 2.0 (Applied Biosystems, CA, USA). To obtain sufficient amount of cDNA for TLDA analysis, pre-amplification step using TaqMan PreAmp MasterMix was added. The pre-amplified product was loaded into TaqMan Array Human

MicroRNA A + B Cards Set v2.0 (Applied Biosystems, CA, USA) enabling simultaneous quantitation of 667 human miRNAs. TaqMan MicroRNA Assays and analysis were performed on the ABI 7900HT Instrument (Applied Biosystems, CA, USA). All reactions were performed according to the standard manufacturers' protocols. Quantitative miRNAs expression data were acquired and normalized by use of ABI 7900HT SDS software (Applied Biosystems, CA, USA).

#### qRT-PCR - Validation phase

In validation phase of the study, candidate miRNAs identified by TLDA technology were further characterized. Complementary DNA (cDNA) was synthesised from total RNA using miRNA-specific primers according to the TaqMan MicroRNA Assay protocol (Applied Biosystems). For RT reactions 10 ng of RNA sample, 50 nM of stem-loop RT primer, 1 × RT buffer, 0.25 mM each of dNTPs, 3.33 U  $\mu\text{l}^{-1}$  MultiScribe reverse transcriptase and 0.25 U  $\mu\text{l}^{-1}$  RNase inhibitor (all from TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit, Applied Biosystems) was used. Reaction mixtures (15  $\mu\text{l}$ ) were incubated for 30 min at 16°C, 30 min at 42°C, 5 min at 85°C and then held at 4°C. qRT-PCR was performed using the Applied Biosystems 7500 instrument. The 20- $\mu\text{l}$  PCR reaction mixture included 1.33  $\mu\text{l}$  of RT product, 1 × TaqMan (AmpErase UNG) Universal PCR Master Mix and 1  $\mu\text{l}$  of primer and probe mix of the TaqMan MicroRNA Assay kit (Applied Biosystems). Reactions were incubated in a 96-well optical plate at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60°C for 10 min. All reactions were run in duplicate and average threshold cycle and SD values were calculated.

#### Statistical methods

In both phases, analysis of the qRT-PCR data was performed using the SDS 2.0.1 software (Applied Biosystems) (settings: automatic baseline, threshold 0.2). According to manufacturer's recommendations, miR-16 has been chosen as reference for normalization of miRNAs expression levels. The relative expression levels of target miRNAs were determined by the equation  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ , in which  $\Delta\text{Ct}$  were calculated as follows:  $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{miR-of-interest}} - \text{Ct}_{\text{miR-16}}$ . Relative miRNA levels were then calculated with the RQ Manager 1.2. Normalized expression data from screening phase of the study were statistically evaluated in environment of statistical language R by use of Bioconductor package and LIMMA approach combined with hierarchical clustering (HCL) [15]. Normalized expression data in validation phase were statistically analyzed with MedCalc software version 11.2.1. P-values of less than 0.05 were considered statistically significant. Statistical differences between

expression levels in RCC patients' and healthy controls' samples were evaluated by non-parametric Mann-Whitney U test. Sensitivity, specificity and area under curve (AUC) for serum microRNA levels were determined using Receiver Operator Characteristic (ROC) analysis.

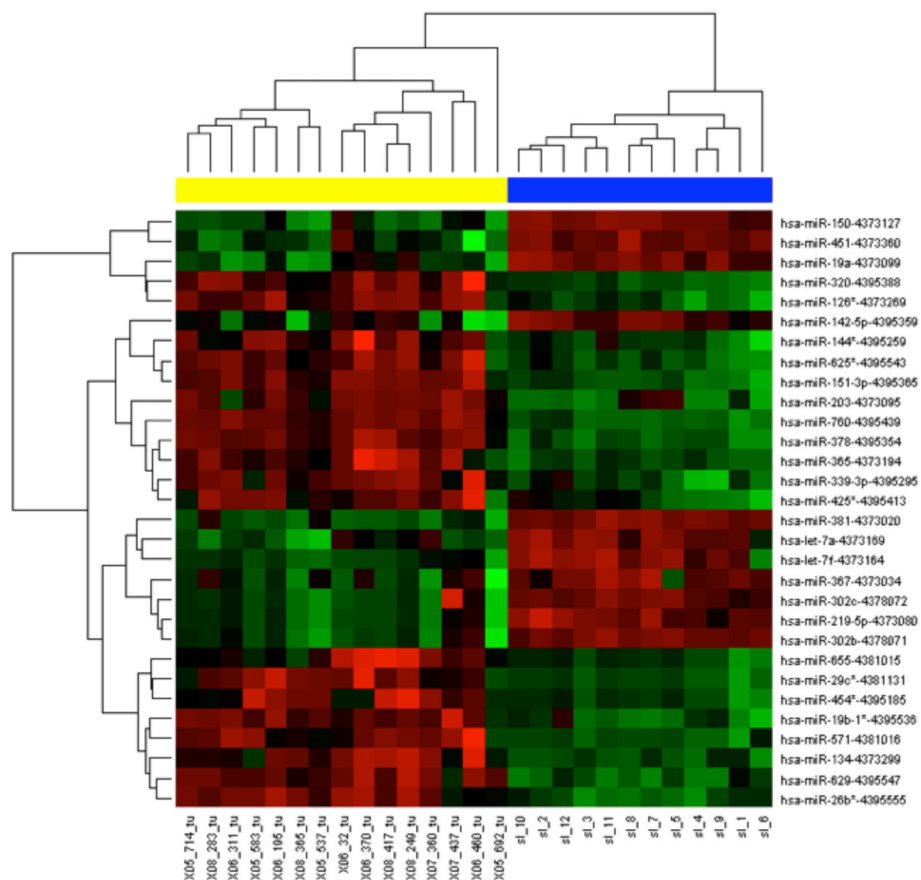
## Results

### Screening phase

In this biomarker discovery phase, a strategy for effective identification of RCC-associated miRNAs in serum was performed using qRT-PCR-based miRNAs expression profiling arrays. We determined the miRNA expression profile of 667 miRNAs in serum from ccRCC patients (n = 15) using TaqMan Low Density Arrays technology, and compared to the expression profile of healthy individuals (n = 12); the miRNA expression levels were normalized to miR-16, the mean expression levels were calculated and data analyzed by use of the microarray biostatistical approaches. We observed 30 miRNAs differentially expressed between serum of ccRCC patients and healthy controls: 19 miRNAs were up-regulated in ccRCC patients and 11 miRNAs were down-regulated (Figure 1, Table 2). Among them, up-regulated miR-378 (FC = 37.6,  $p < 0.000001$ ), and down-regulated miR-150 (FC = 0.02,  $p < 0.000001$ ) and miR-451 (FC = 0.2,  $p < 0.000001$ ) were proposed as putative biomarkers to the validation phase of the study, as significance of the difference (fold change, p-value), previous observations and biological plausibility (based on the PubMed hits when particular miRNA is combined with keyword "cancer"), and miRNAs with favorable expression levels (Ct > 30) were taken into account.

### Validation phase

To validate the 3 promising biomarkers identified in the screening phase, miR-378, miR-451 and miR-150, qRT-PCR assays were developed to quantify miRNAs in serum of RCC patients and healthy controls. The qRT-PCR was performed in the independent cohort of 90 RCC patients' and 35 healthy controls' serum samples. As the difference in miR-150 expression level between RCC and healthy controls serum did not reach statistical significance ( $p = 0.222$ ), miR-150 was excluded from further analysis. The expression of miR-378 serum level was significantly increased in patients with RCC compared to healthy controls ( $p = 0.0003$ ), and the expression level of miR-451 was significantly decreased in patients with RCC compared to healthy controls ( $p < 0.0001$ ), confirming the results of screening phase (Figure 2A-B, Table 3). Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis revealed that the serum levels of both miR-378 and miR-451 might serve as useful biomarkers for differentiating serum of patients with RCC from controls with AUC of 0.71 (95% CI, 0.62 to 0.79),



**Figure 1** Hierarchical clustergram iscriminating blood serum of RCC patients and healthy controls according to differentially expressed miRNAs (yellow color indicate serum samples of RCC patients, blue healthy controls,  $p < 0.0001$ ).

and 0.77 (95% CI, 0.69 to 0.84), respectively (Figure 2C-D). At the cut-off value of 0.02 for relative expression of miR-378 normalized to miR-16 levels, the sensitivity was 70% and the specificity was 60%. At the cut-off value of 2.0 for relative expression of miR-451 normalized to miR-16 levels, the sensitivity was 81% and the specificity was 77%. Multivariate logistic regression analysis showed that both miR-378 and miR-451 could serve as potential biomarkers for distinguishing between RCC and healthy controls, and even that their combination could improve the stratification power characterized with AUC of 0.86 and the sensitivity of 81% and specificity 83% (Figure 3).

Receiver operating characteristics (ROC) curve analysis using (C) serum miR-451 yielded an AUC of 0.77, sensitivity of 81%, and specificity of 77% in discriminating RCC and (D) serum miR-378 yielded AUC of 0.71, sensitivity of 70%, and specificity of 60% in discriminating RCC

## Discussion

Many recent studies have described miRNAs expression profile in RCC and adjacent non-tumoral tissue

confirming the different pattern. Although significant overlap between miRNAs identified by independent studies exist, regarding the number and type of up-/down-regulated miRNAs, data are in part conflicting [1,2,24,25]. Circulating miRNAs may possibly serve as a new class of powerful and non-invasive biomarkers for RCC patients. Regarding this hypothesis, we compared the miRNAs expression profiles of RCC patients' and healthy controls' serum samples. Based on the qRT-PCR arrays approach we were able to describe 30 differentially expressed miRNAs, 19 of these miRNAs were up-regulated and 11 were down-regulated. Such expression profile is a bit controversial, as the global miRNA down-regulation in RCC tissue samples has been repeatedly described [1-4]. The possible relation of miRNA levels between tissue and corresponding serum is still not clearly understood - some researchers postulate that circulating miRNAs may not always be directly associated with the changes occurring in tumor tissues but may also reflect indirect effects and could be secreted by non-tumoral cells. Also mechanisms were described how extracellular miRNAs can potentially interact with

**Table 2 MiRNAs differentially expressed between serum of ccRCC patients and healthy controls**

miRNA	Fold change	P-value	Probability, that gene is differentially expressed
hsa-miR-760	169.628	< 0.000001	100.000%
hsa-miR-381	0.002	< 0.000001	100.000%
<b>hsa-miR-378</b>	<b>37.596</b>	< 0.000001	<b>100.000%</b>
hsa-miR-151-3p	35.734	< 0.000001	100.000%
hsa-miR-629	45.790	< 0.000001	100.000%
<b>hsa-miR-150</b>	<b>0.020</b>	< 0.000001	<b>100.000%</b>
hsa-miR-219-5p	0.032	< 0.000001	99.999%
hsa-miR-26b*	41.191	< 0.000001	99.999%
hsa-miR-302b	0.057	< 0.000001	99.997%
hsa-miR-19b-1*	36.432	< 0.000001	99.994%
hsa-miR-126*	9.317	< 0.000001	99.972%
hsa-let-7f	0.011	< 0.000001	99.968%
hsa-miR-571	30.947	< 0.000001	99.978%
hsa-miR-29c*	23.842	< 0.000001	99.976%
hsa-miR-625*	13.286	< 0.000001	99.938%
hsa-let-7a	0.014	< 0.000001	99.922%
hsa-miR-134	40.828	< 0.000001	99.846%
hsa-miR-320	4.533	< 0.000001	99.811%
<b>hsa-miR-451</b>	<b>0.225</b>	< 0.000001	<b>99.723%</b>
hsa-miR-19a	0.261	< 0.000001	99.651%
hsa-miR-365	16.768	< 0.000001	99.642%
hsa-miR-339-3p	10.606	< 0.000001	99.524%
hsa-miR-203	79.565	< 0.000001	98.908%
hsa-miR-302c	0.044	< 0.000001	98.729%
hsa-miR-454*	11.965	< 0.000001	97.193%
hsa-miR-144*	6.425	< 0.000001	92.206%
hsa-miR-655	10.716	< 0.000001	84.080%
hsa-miR-367	0.133	< 0.000001	81.739%
hsa-miR-425*	6.666	< 0.0001	79.234%
hsa-miR-142-5p	0.136	< 0.0001	74.933%

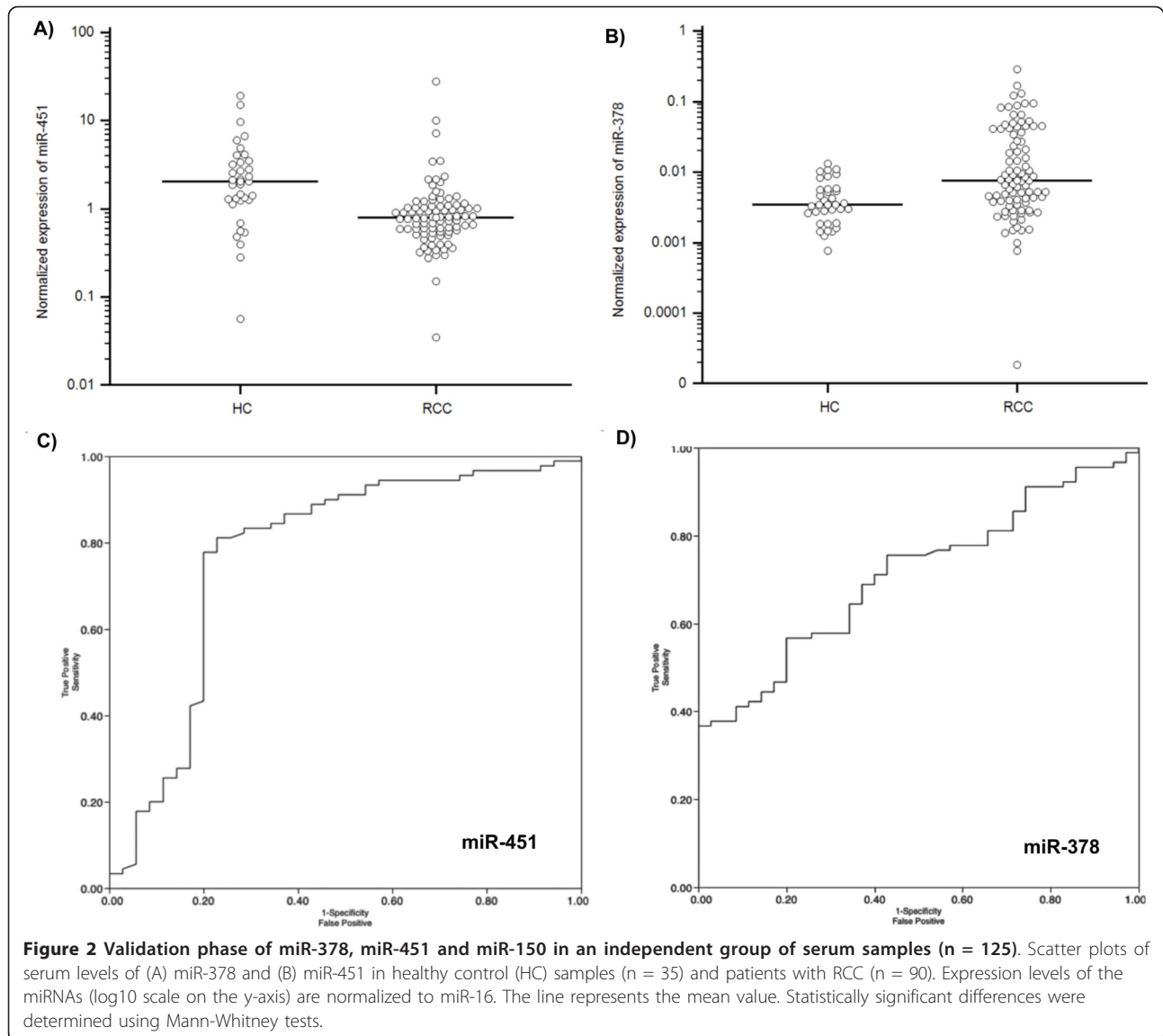
*Abbreviations:* miR, microRNA/miRNA; ccRCC, clear cell renal cell carcinoma

recipient cells via a number of different processes, including: direct fusion, internalization or receptor-mediated interactions. There are likely to be other mechanisms, especially for vesicle-free miRNAs, but all await further investigation to provide convincing evidence of their involvement in inter-cellular miRNA exchange [26,27]. However, this proposed potential of tumor cells to actively uptake miRNAs from circulation can partly explain the opposite trends of miRNA expression levels in tissue compared to blood serum. Several dysregulated miRNAs identified in our study have been described to have altered expression levels in plasma or serum of various cancers recently: up-regulated mir-425\* [28,29], let-7a [30] or let-7f [31].

In the validation phase of this study, we tested 3 candidate miRNAs (miR-378, miR-451, miR-150) in the independent cohort of RCC patients. The up-regulation of miR-378 and down-regulation of miR-451 expression levels between serum of RCC patients and healthy

controls reached statistical significance in validation study. Analytical characteristics of miR-378 (sensitivity of 70%, specificity of 60%) and miR-451 (sensitivity of 81%, specificity of 77%) proved that both miR-378 and miR-451 are potent in discriminating RCC from healthy control serum. Furthermore, combination of serum miR-378 and miR-451 levels, yielded sensitivity of 81% and specificity 83%, proved to be even more powerful discrimination tool. To our knowledge, the only study concerning circulating miRNAs in renal cell carcinoma identified circulating miR-1233 as a potential biomarker for RCC patients, but although they performed the validation phase on a large cohort of RCC patients from three different study centers, the diagnostic information was below their expectations (AUC of 0.588, sensitivity of 77%, specificity of 37.6%) [14].

Although our observations are promising, and miR-378/miR-451 analytical characteristics reached values for clinical utility, large-scale prospective studies aiming

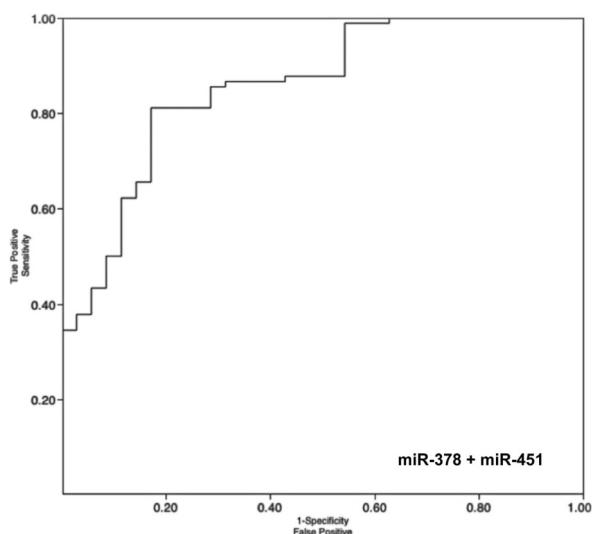


**Table 3** MiRNAs evaluated in the validation phase of study

miRNA	HC*	RCC*	p-value	Cancer association	Experimentally validated target
miR-378	0.004 0.002-0.006	0.008 0.004-0.037	0.0003	colorectal carcinoma [16,17], oral squamous cell carcinoma [18], laryngeal carcinoma [19]	SUFU, TUSC2, TOB2, CYP2E1
miR-451	2.067 1.250-3.480	0.802 0.055-1.091	0.0001	renal cell carcinoma [1], colorectal carcinoma [20], gastric cancer [20]	MMP2, MMP9, BCL2
miR-150	0.011 0.009-0.016	0.008 0.005-0.020	0.2222	gastric cancer [21], chronic myeloid leukemia [22], colorectal carcinoma [23]	HTT, MYB, EGFR2

Abbreviations: HC, healthy controls; RCC, renal cell carcinoma

\*expression levels are presented as medians and interquartile range



**Figure 3** ROC curve for combination of serum miR-378 and miR-451 yielded AUC of 0.86, the sensitivity of 81% and specificity of 83% in discriminating RCC.

their evaluation in the renal benign neoplasms and early stages of the RCC are necessary to validate them as biomarkers for early diagnosis, and the analysis of blood serum collections from each patient to evaluate miRNA biomarker dynamics are needed to prove their potential for early detection of relapse in RCC patients.

## Conclusions

There is no standard serum biomarker used for diagnosis or early detection of recurrence for renal cell carcinoma (RCC) patients. In our study, we identified 30 miRNAs differentially expressed between serum of RCC patients and healthy controls. MiR-378, miR-451 and miR-150 were further evaluated in the independent group of patients, and two of them were successfully validated: levels of miR-378 were increased, miR-451 levels were decreased in serum of RCC patients. Combination of miR-378 and miR-451 enable identification of RCC serum with the sensitivity of 81%, specificity 83% and AUC = 0.86. We believe, that circulating miRNAs in serum are promising biomarkers in RCC.

## Acknowledgements

This work was supported by grant IGA 10361-3/2009 of the Czech Ministry of Health, Project No. MZ0M0U2005 of the Czech Ministry of Health, by The Ministry of Education, Youth and Sports for the project BBMRI CZ (LM2010004), and by the project "CEITEC - Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068).

## Author details

<sup>1</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, Department of Comprehensive Cancer Care, Zlutý kopec 7, Brno, Czech Republic. <sup>2</sup>Central European Institute of Technology, Masaryk University, Kamenice 5, Brno, Czech Republic. <sup>3</sup>Institute of Clinical Biochemistry and Diagnostics, Faculty of Medicine and Faculty Hospital in Hradec Kralove, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic. <sup>4</sup>Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and

Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and Palacký University affiliated Hospital Olomouc, Brno, Czech Republic.

## Authors' contributions

OS, MS and RV contributed to the conception and design of the study. AP, RL and MS were responsible for recruiting/supplying patients for the study. JN, OS, RI and LR were all involved with the acquisition and interpretation/analysis of study data. All the authors contributed to drafting and reviewing the manuscript, and all the authors read and approved the final manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 27 December 2011 Accepted: 22 March 2012

Published: 22 March 2012

## References

1. Yi Z, Fu Y, Zhao S, Zhang X, Ma C: Differential expression of miRNA patterns in renal cell carcinoma and nontumorous tissues. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010, **136**:855-862.
2. Chow TF, Youssef YM, Lianidou E, Romaschin AD, Honey RJ, Stewart R, Pace KT, Youssef GM: Differential expression profiling of microRNAs and their potential involvement in renal cell carcinoma pathogenesis. *Clin Biochem* 2010, **43**:150-158.
3. Ljungberg B: Prognostic markers in renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol* 2007, **17**:303-308.
4. Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, Svoboda M, Poprach A, Fabian P, Kren L, Michalek J, Vyzula R: Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *J Exp Clin Cancer Res* 2010, **29**:90.
5. Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R: MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer* 2009, **8**:102.
6. Redova M, Svoboda M, Slaby O: MicroRNAs and their target gene networks in renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **405**:153-156.
7. Taylor DD, Gerdel-Taylor C: MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008, **110**:13-21.
8. Esquela-Kerscher A, Slack FJ: Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006, **6**:259-269.
9. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL:

- Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008, **141**:672-675.
10. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X: **Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer.** *Int J Cancer* 2010, **127**:118-126.
  11. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE: **The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform.** *Gynecol Oncol* 2009, **112**:55-59.
  12. Roth C, Rack B, Muller V, Janni W, Pantel K, Schwarzenbach H: **Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2010, **12**:R90.
  13. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M: **Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:10513-10518.
  14. Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, Herrmann E, Walgenbach-Brunagel G, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J: **MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels.** *PLoS One* 2011, **6**:e25787.
  15. Reimers M, Carey VJ: **Bioconductor: an open source framework for bioinformatics and computational biology.** *Methods Enzymol* 2006, **411**:119-134.
  16. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ: **Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening.** *Gut* 2009, **58**:1375-1381.
  17. Mosakhani N, Sarhadi VK, Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundstrom J, Ristamaki R, Osterlund P, Knuutila S: **MicroRNA profiling differentiates colorectal cancer according to KRAS status.** *Genes Chromosomes Cancer* 2012, **51**:1-9.
  18. Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A, Farinella F, Mazzotta M, Carinci F: **MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression.** *Int J Immunopathol Pharmacol* 2010, **23**:1229-1234.
  19. Wang P, Fu T, Wang X, Zhu W: **Primary, study of miRNA expression patterns in laryngeal carcinoma by microarray.** *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2010, **24**:535-538.
  20. Bandres E, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, Zarate R, Diaz-Gonzalez JA, Ramirez N, Sola JJ, Jimenez P, Rodriguez J, Garcia-Foncillas J: **microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells.** *Clin Cancer Res* 2009, **15**:2281-2290.
  21. Wu Q, Jin H, Yang Z, Luo G, Lu Y, Li K, Ren G, Su T, Pan Y, Feng B, Xue Z, Wang X, Fan D: **MIR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene EGR2.** *Biochem Biophys Res Commun* 2010, **392**:340-345.
  22. Flamant S, Ritchie W, Guilhot J, Holst J, Bonnet ML, Chomel JC, Guilhot F, Turhan AG, Rasko JE: **Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia.** *Haematologica* 2010, **95**:1325-1333.
  23. Ma Y, Zhang P, Wang F, Zhang H, Yang J, Peng J, Liu W, Qin H: **miR-150 as a potential biomarker associated with prognosis and therapeutic outcome in colorectal cancer.** *Gut* 2011, doi:10.1136/gutjnl-2011-301122.
  24. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM: **A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:2257-2261.
  25. Youssef YM, White NM, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, Evans A, Yousef GM: **Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature.** *Eur Urol* 2011, **59**:721-730.
  26. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, Chen Y, Xu L, Zen K, Zhang C, Shen H: **Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer.** *J Clin Oncol* 2010, **28**:1721-1726.
  27. Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N: **Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2011, **80**:193-208.
  28. Grinchuk OV, Jenjaroenpun P, Orlov YL, Zhou J, Kuznetsov VA: **Integrative analysis of the human cis-antisense gene pairs, miRNAs and their transcription regulation patterns.** *Nucleic Acids Res* 2010, **38**:534-547.
  29. Zhao H, Shen J, Medico L, Wang D, Ambrosone CB, Liu S: **A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer.** *PLoS One* 2010, **5**:e13735.
  30. Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E: **Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers.** *Br J Cancer* 2010, **102**:1174-1179.
  31. Silva J, Garcia V, Zaballos A, Provencio M, Lombardia L, Almonacid L, Garcia JM, Dominguez G, Pena C, Diaz R, Herrera M, Varela A, Bonilla F: **Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival.** *Eur Respir J* 2011, **37**:617-623.

doi:10.1186/1479-5876-10-55

**Cite this article as:** Redova et al.: Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine* 2012 **10**:55.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit





### Detection of let-7 miRNAs in urine supernatant as potential diagnostic approach in non-metastatic clear-cell renal cell carcinoma

Michal Fedorko<sup>1</sup>, Jaroslav Juracek<sup>2</sup>, Michal Stanik<sup>3</sup>, Marek Svoboda<sup>4</sup>, Alexandr Poprach<sup>4</sup>, Tomas Buchler<sup>5</sup>, Dalibor Pacik<sup>1</sup>, Jan Dolezel<sup>3</sup>, Ondrej Slaby<sup>\*2,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Urology, University Hospital Brno and Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Masaryk University, Central European Institute of Technology, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, Department of Urologic Oncology, Brno, Czech Republic

<sup>4</sup>Masaryk Memorial Cancer Institute, Department of Comprehensive Cancer Care, Brno, Czech Republic

<sup>5</sup>Department of Oncology, Thomayer Hospital and Charles University First Faculty of Medicine, Prague, Czech Republic

\*Corresponding author: on.slaby@gmail.com

#### Abstract

**Introduction:** Urinary microRNAs (miRNAs) are emerging as a clinically useful tool for early and non-invasive detection of various types of cancer. The aim of this study was to evaluate whether let-7 family miRNAs differ in their urinary concentrations between renal cell carcinoma (RCC) cases and healthy controls.

**Materials and methods:** In the case-control study, 69 non-metastatic clear-cell RCC patients and 36 gender/age-matched healthy controls were prospectively enrolled. Total RNA was purified from cell-free supernatant of the 105 first morning urine specimens. Let-7 family miRNAs were determined in cell-free supernatant using quantitative miRNA real-time reverse-transcription PCR and absolute quantification approach.

**Results:** Concentrations of all let-7 miRNAs (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e and let-7g) were significantly higher in urine samples obtained from RCC patients compared to healthy controls ( $P < 0.001$ ;  $P < 0.001$ ;  $P = 0.005$ ;  $P = 0.006$ ;  $P = 0.015$  and  $P = 0.002$ , respectively). Subsequent ROC analysis has shown that let-7a concentration possesses good ability to differentiate between cases and controls with area under curve being 0.8307 (sensitivity 71%, specificity 81%).

**Conclusions:** We have shown that let-7 miRNAs are abundant in the urine samples of patients with clear-cell RCC, and out of six let-7 family members, let-7a outperforms the others and presents promising non-invasive biomarker for the detection of RCC.

**Key words:** renal cell carcinoma; urine microRNAs; let-7; diagnostic biomarker

Received: March 12, 2017

Accepted: May 08, 2017

#### Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) accounts for 2–3% of all malignant tumours. There are several histological subtypes of RCC, with clear-cell (or conventional) histological type being the most frequent, presenting 70% – 80% of RCC cases (1). Despite a steady decrease in mortality rates, RCC remains one of the most lethal urological malignancies, with 5-year relative survival 72% (1). For advanced and metastatic RCCs (32% of all diagnosed cases), 5-year relative survival descends to 66% and 12%, respectively. Biomarkers for early detection of RCC

are therefore necessary as there is no reliable diagnostic modality other than radiological imaging.

MicroRNAs (miRNAs) are short noncoding RNAs that regulate gene expression at the posttranscriptional level. They are involved in the number of critical biological processes including carcinogenesis. Besides tumour tissues, they are also present in different body fluids (e.g. serum, plasma, urine) with a high degree of stability indicating their extensive biomarker potential (2). Although variety of circulating miRNAs has been proposed as bio-

markers of RCC, urinary miRNAs have been mostly studied in bladder and prostate cancer (3).

The miRNA let-7 family is widely accepted as a tumour suppressor miRNA with important role in the regulation of cell cycle, cell differentiation and apoptosis (4). Downregulation of the members of let-7 family has been observed in various types of tumour tissue including RCC (5). Less frequent, up-regulation of certain let-7 family members has also been observed, suggesting that let-7 does not play a tumour suppressor function under all circumstances and in all tissues (6). Higher levels of let-7 miRNAs in urine has been reported in bladder cancer (7). There are no data about urinary let-7 miRNAs in RCC, but increased urinary levels of some of the let-7 family members were found in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease suggesting their abundance in urine and therefore also potential utility in other renal diseases such as cancer (8).

Based on that, we hypothesize, that let-7 family miRNAs differ in their concentrations in urine samples of RCC patients and healthy individuals, and could be potentially useful as diagnostic biomarkers of RCC. To this end, the aim of our study was to determine concentration of let-7 miRNAs in cell-free supernatant in group of prospectively enrolled patients with non-metastatic clear cell RCC and group of healthy controls, statistically evaluate the differences in concentrations between the groups and their ability to distinguish between RCC cases and healthy controls.

## Material and methods

### Study design and subjects

Between May 2015 and December 2016, adults undergoing partial or radical nephrectomy for RCC at Department of Urology, University Hospital Brno (UHB) were prospectively screened for participation in this observational case-control study. Inclusion criteria included: histologically proven clear-cell RCC, no distant metastasis or nodal involvement. Exclusion criteria included: active malignancy other than RCC, history of any malignancy, urinary tract infection, foreign bodies in urinary tract

and urolithiasis. Urine samples of the cases were collected prior to surgically treatment. In the same time period participants of the control group were enrolled. Healthy controls included patients surgically treated at UHB for benign urological conditions like urethral stricture, phimosis, undescended testicle, stress urinary incontinence, hydrocele, benign prostatic hyperplasia, urethral caruncula, vesical neck sclerosis, simple renal cyst. Patients with active malignancy or history of any cancer, urinary tract infection, and foreign bodies in urinary tract or urolithiasis were excluded from control group. Urine samples of the control group were collected during regular post-operative follow-up visits. Study was approved by the Ethic committee at UHB and all participants signed informed consent before entering the study.

Out of 76 RCC patients approached, 2 declined to participate in the study, 15 patients were not included due to papillary or chromophobe histological type of RCC proved after surgery. Since we were not focused on the follow-up of patients, there was no additional drop-out from our study. All 36 healthy controls approached, agreed to participate on our study. Finally, 69 patients diagnosed with non-metastatic clear-cell RCC and 36 healthy controls were enrolled. Epidemiological and clinical characteristics of the cases and controls groups are summarized in Table 1.

### Urine sampling and RNA isolation

The first morning urine samples were collected in 15 mL tubes (Sarstedt AG & Co., Numbrecht, Germany) with EDTA used for nucleic acid preservation and kept at 4 °C till further processing. As the next step, urine samples were centrifuged at 4 °C at 2000g for 15 minutes, and the cell-free supernatant was then collected and stored at – 80 °C until analysis. Before RNA isolation another centrifugation of urine sample was performed at 4 °C at 12,000g for 15 minutes. Total RNA from 1 mL of cell-free supernatant was isolated using manual column-based method, Urine microRNA Purification Kit (Norgen Biotek, Thorold, Ontario, Canada) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and purity was evaluated using Na-

**TABLE 1.** Epidemiological and clinical characteristics of study subjects.

	ccRCC patients	Healthy controls
	N = 69	N = 36
<b>Male (N, proportion)</b>	50 (0.72)	24 (0.67)
<b>Age (years)</b>	66 (33-87)	65 (40-79)
<b>pT stage*</b>		
pT1	54	NA
pT2	4	NA
pT3	11	NA
pT4	0	NA
<b>pN stage*</b>		
pN0	69	NA
pN1	0	NA
<b>pM stage*</b>		
pM0	69	NA
pM1	0	NA
<b>Fuhrman grade<sup>†</sup></b>		
G1	11	NA
G2	40	NA
G3	13	NA
G4	5	NA

\*pT,N,M stages accordingly to American Joint Committee on Cancer Staging Manual. <sup>†</sup>The grading scheme used in RCC. RCC - renal cell carcinoma, ccRCC - clear-cell renal cell carcinoma, NA - not applicable.

nodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Only the samples with concentration higher than 5 ng/μL and A260/A280 higher than 1.3 were further analysed in the study.

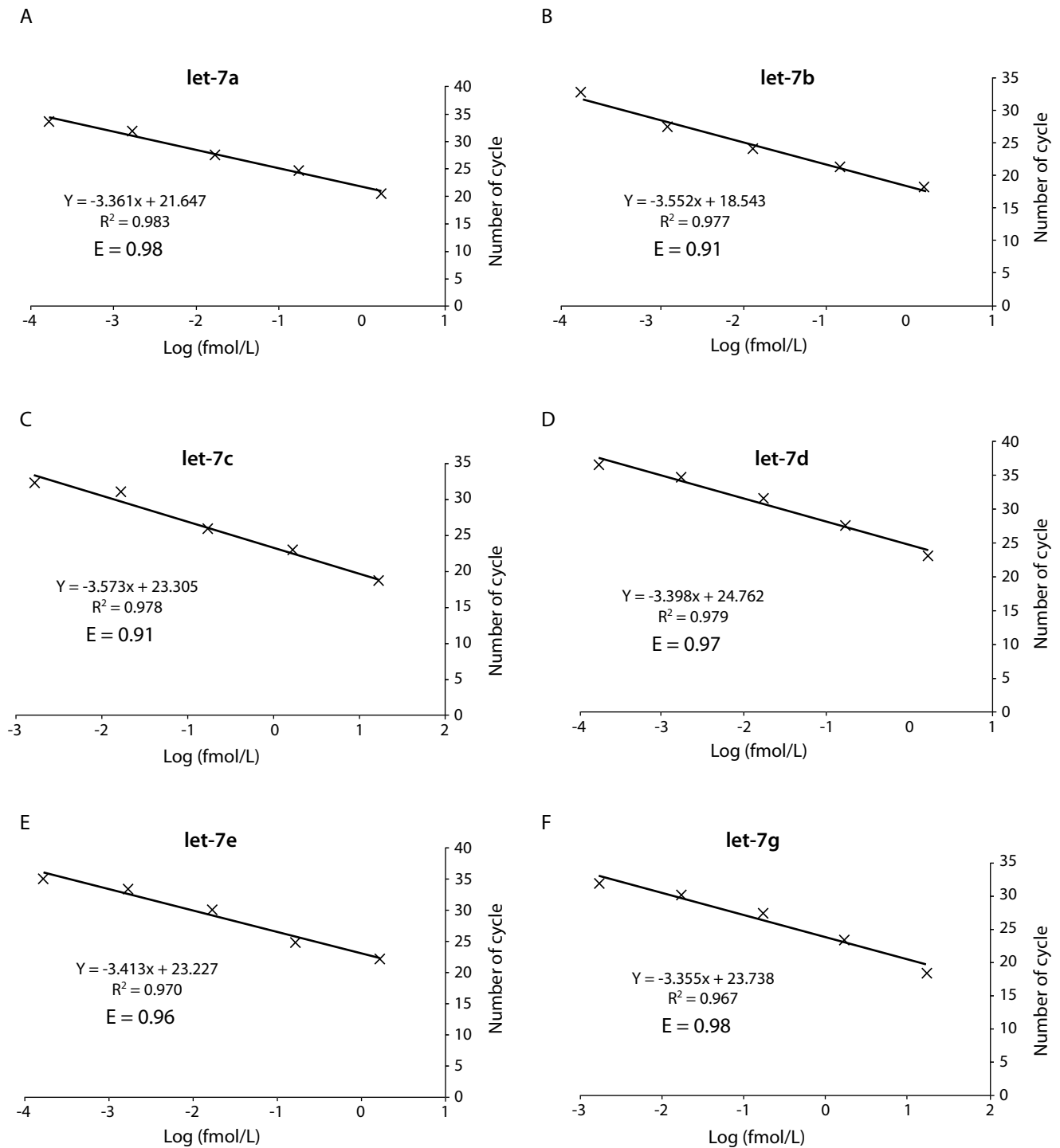
### Quantitative miRNA real-time reverse-transcription PCR

Concentrations of let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, and let-7g were determined by quantitative miRNA real-time reverse-transcription PCR (qRT-PCR) accordingly to TaqMan MicroRNA assay protocol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Complementary DNA was synthesized from 10 ng of total RNA in 15-μL reverse transcription (RT) reaction using microRNA-specific stem-loop RT

primer and the TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) accordingly to manufacturer's recommendations. Real-time PCR was performed in 20-μL PCR reaction with 1.33 μL of RT product using specific TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA assays (let-7a: ID000377, let-7b: ID002619, let-7c: ID000379, let-7d: ID002283, let-7e: ID002406, let-7g: ID002282; Thermo Fisher Scientific) on Roche LightCycler 480 PCR system (Roche, Basel, Switzerland) accordingly to manufacturer's recommendations. The reactions were carried out in a 96-well optical plate at 95 °C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 seconds and 60 °C for 1 minute. All reactions were run in duplicates. After the reaction, the threshold cycle (Ct) values were determined using the fixed threshold settings, and the mean Ct values were calculated from duplicates. For each miRNA assay, a dilution series of synthetic miRNA oligo (IDT, Coralville, Iowa, USA) were carried out in parallel with qRT-PCR of biological samples to generate an absolute standard curve for quantification of let-7 concentrations. We also included inter-plate calibrator on each plate for each assay enabling us to correct for inter-plate variability. Quantitatively all measurements were standardized by use of the same amount of total RNA (10 ng) entering the reverse transcription and PCR reaction. Ct values of biological samples were converted to absolute concentration of miRNAs in the cell-free supernatant of the urine (fmol/L) based on relevant calibration curve equation (Figure 1) based on the recently described approach (9).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). To compare urinary concentrations of miRNAs between RCC cases and healthy controls non-parametric Mann-Whitney U test was used since our experimental data do not follow a normal distribution. A P-value < 0.01 was considered statistically significant. The ROC analysis was performed to evaluate the ability of studied miRNAs to distinguish between urine of RCC patients and healthy controls.



**FIGURE 1.** Absolute standard curves for let-7a (A), let-7b (B), let-7c (C), let-7d (D), let-7e (E) and let-7g (F) used for calculation of let-7 mi-croRNAs concentrations (fmol/L) in the urine samples. E - qPCR reaction efficiency.

**Results**

We successfully purified RNA from urine samples of 105 subjects enrolled into our study. The con-

centration of RNA ranged from 5.1 to 17.3 with a median of 6.7 ng/μL and the purity (A260/A280) ranged from 1.3 to 2.0 with a median of 1.5.

The concentrations of all 6 miRNAs (let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, and let-7g) were significantly higher in urine samples obtained from RCC cases compared to healthy controls ( $P < 0.001$ ;  $P < 0.001$ ;  $P = 0.005$ ;  $P = 0.006$ ;  $P = 0.015$  and  $P = 0.002$ , respectively; Table 2). Subsequent ROC analysis was performed to evaluate ability of urinary miRNAs to distinguish between RCC cases and controls. ROC curves indicated that urine concentration of let-7a possess satisfactory ability to differentiate between patients and controls with the AUC being 0.8307 (Figure 2A,B). The remaining let-7 miRNAs showed inferior analytical performance ( $AUC < 0.75$ ; summarized in Table 2). We further evaluated analytical performance of combination of all let-7 miRNAs with AUC being 0.83.

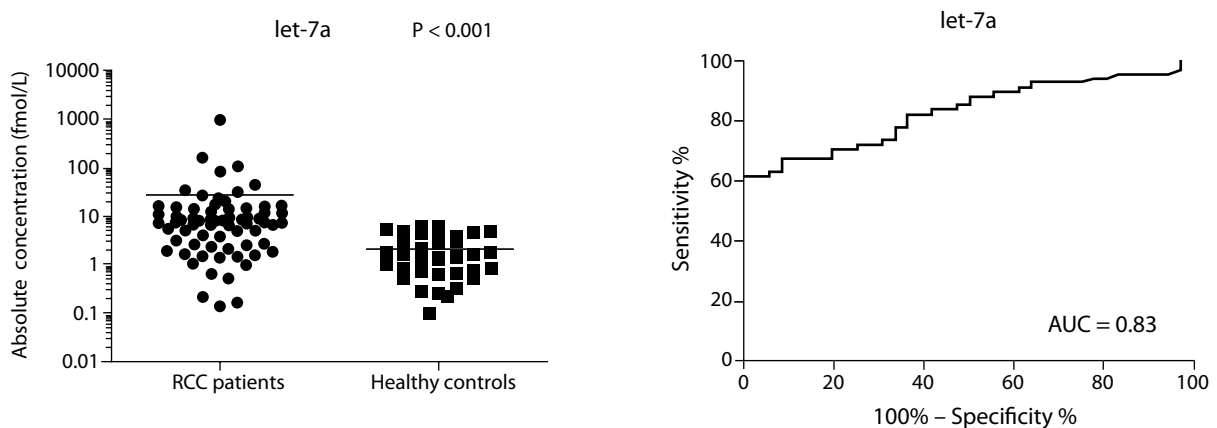
### Discussion

Noninvasive biomarker of RCC in urine presents a significant unmet medical need of urologic oncology. To prove our hypothesis that let-7 miRNAs concentrations in urine differ between RCC cases and healthy controls, we used the case-control design performed prospectively enabling us to control pre-analytical conditions, sample handling and processing. Common approaches to miRNA clinical testing include small RNA sequencing, qRT-PCR, miRNA microarray, multiplexed miRNA detection with color-coded probe pairs, and miRNA *in situ* hybridization. We decided to use qRT-PCR, since our approach is targeted and this method has several advantages in comparison to others:

**TABLE 2.** MiRNA concentrations in urine of RCC patients and healthy controls.

miRNA	RCC patients	Healthy controls	P-value	AUC	Sens. (%)	Spec. (%)
let-7a, fmol/L	7.510 (2.668–14.250)	1.525 (0.673–3.368)	< 0.001	0.83	71	81
let-7b, fmol/L	3.500 (1.835–6.160)	1.350 (0.1400–2.880)	< 0.001	0.75	73	67
let-7c, fmol/L	9.390 (4.090–18.82)	5.115 (2.180–9.253)	0.005	0.67	65	62
let-7d, fmol/L	5.540 (2.450–11.88)	3.505 (1.705–5.145)	0.006	0.66	66	61
let-7e, fmol/L	58.9 (25.03–106.6)	32.35 (15.33–63.60)	0.015	0.65	62	61
let-7g, fmol/L	22.48 (11.46–35.19)	12.89 (5.72–19.64)	0.002	0.69	70	60

Values of MiRNA concentrations are presented as median (interquartile range). AUC - Area under curve; Sens. – Sensitivity; Spec. – Specificity.



**FIGURE 2.** Differences of let-7a concentration between RCC patients and controls. (A) Absolute concentrations of let-7a was determined by qRT-PCR in urine of RCC patients (N = 69) and healthy individuals (N = 36). (B) ROC analysis of let-7a to evaluate the ability to distinguish RCC patients and healthy controls. AUC – area under curve.

high dynamic range, high sensitivity and specificity, small requests on RNA input, it is widely used in clinical diagnostics and comparatively inexpensive.

In our study, we confirmed our hypothesis, and found that urinary concentrations of let-7 miRNAs in RCC patients are significantly higher compared to healthy controls. Let-7a concentrations enabled to discriminate urine of the RCC patients and controls with a sensitivity of 71% and specificity of 81%, suggesting its diagnostic value for detection of RCC. We further evaluated analytical performance of combination of all let-7 miRNAs and there was no notable increase in AUC values observed in comparison to let-7a used as the only biomarker.

In contrast to bladder or prostate cancer, data about urinary miRNAs in RCC are sparse. In the pilot study of von Brandenstein *et al.* (23 RCC patients, 5 controls), higher levels of miR-15a were found in urine of RCC patients but was undetectable in oncocytoma, other tumours or urinary infection (10). In the recent study of Guorong *et al.*, urinary levels of miR-210 were found to be significantly higher in patients with clear-cell RCC (N = 75) compared to healthy controls (N = 45), with sensitivity, specificity and the area under ROC curve 57.8%, 80% and 0.76, respectively. In addition, the expression levels of urinary miR-210 significantly decreased one week after surgery (11). Based on our results, urinary let-7a indicates superior analytical performance to urinary miR-210 studied by Guorong *et al.* (AUC 0.83 vs. 0.76). Although analytical characteristics of urinary let-7a seem to be promising, there are not sufficient for clinical application of let-7a as the only biomarker. However, we believe, that urinary let-7a could add significant diagnostic value if combined with other emerging biomarkers in RCC or for monitoring of the RCC patients with initially increased levels of this biomarker. Analogically to other biomarkers in various cancers (*e.g.* carcinoembryonic antigen in colorectal cancer), we suppose, that in RCC, secre-

tion of the let-7a presents biological feature of the subset and not all RCC cases.

Our study has several limitations, which should be discussed. The main limitation is the small group of RCC cases and controls and absence of the independent validation set. To this end, our study is a pilot study showing diagnostic potential of urinary let-7a concentrations in detection of RCC, but further independent studies are needed to confirm our results. Another limitation is absolute quantification approach, which we used for determination of studied urinary miRNAs disabling to eliminate methodical inaccuracies, which could occur in processing of every sample and, finally, could bias comparisons of different groups of samples. There were some transcripts used for normalization of urinary miRNAs (*e.g.* RNU6B or RNU48) (3), but to our knowledge there is no consensual reference gene. Therefore, we decided to use absolute quantification and to overcome this potential technological variability or bias, we implemented standardized protocols for urine samples collection, handling and storage.

In conclusion, we showed that let-7 miRNA family members are abundant in the urine cell-free supernatant of patients with clear-cell RCC, and confirmed our hypothesis, that let-7 miRNAs have different concentrations in the urine of RCC cases and healthy controls. Out of six let-7 members analysed, let-7a outperforms the others and may be considered as a promising noninvasive biomarker for the detection of clear-cell RCC.

### Acknowledgments

The project was supported by Ministry of Health of the Czech Republic, grant nrs. AZV 15-31071A, 15-34678A, and MZCR RVO (MOU, 00209805); the project CEITEC 2020 (LQ1601) provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic.

### Potential conflict of interests

None declared.

## References

1. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012. In: Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2015. Available at: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2012](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012). Accessed March 3rd 2016.
2. Fedorko M, Pacik D, Wasserbauer R, Juracek J, Varga G, Ghazal M, et al. MicroRNAs in the pathogenesis of renal cell carcinoma and their diagnostic and prognostic utility as cancer biomarkers. *Int J Biol Markers* 2016;31:e26-37. <https://doi.org/10.5301/jbm.5000174>
3. Mlcochova H, Hezova R, Stanik M, Slaby O. Urine microRNAs as potential noninvasive biomarkers in urologic cancers. *Urol Oncol* 2014;32:41.e1-9. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.04.011>
4. Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr Oncol* 2010;17:70-80. <https://doi.org/10.3747/co.v17i1.356>
5. Liu YC, Yin BD, Zhang CC, Zhou LB, Fan J. Hsa-let-7a functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma cell lines by targeting c-myc. *Biochem Biophys Res Comm* 2012;417:371-5. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.119>
6. Boyerinas B, Park S, Hau A, Murmann A, Peter M. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endoc Related Cancer* 2010;17:F19-F36. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0184>
7. Liu Q, Shin Y, Kee JS, Kim KW, Rafei SR, Perera AP, et al. Mach-Zehnder interferometer (MZI) point-of-care system for rapid multiplexed detection of microRNAs in human urine specimens. *Biosens Bioelectron* 2015;71:365-72. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.052>
8. Ben-Dov IZ, Tan YC, Morozov P, Wilson PD, Rennert H, Blumenfeld JD, Tuschl T. Urine MicroRNA as Potential Biomarkers of Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease Progression: Description of miRNA Profiles at Baseline. *PLoS One* 2014 29;9:e86856.
9. Hong Y, Wang C, Fu Z, Liang H, Zhang S, Lu M, Sun W, Ye C, Zhang CY, Zen K, et al. Systematic characterization of seminal plasma piRNAs as molecular biomarkers for male infertility. *Sci Rep* 2016;6:24229. <https://doi.org/10.1038/srep24229>
10. von Brandenstein M, Pandarakalam JJ, Kroon L, Loeser H, Herden J, Braun G, et al. MicroRNA 15a, inversely correlated to PKCa, is a potential marker to differentiate between benign and malignant renal tumors in biopsy and urine samples. *Am J Pathol* 2012;180:1787-97. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.014>
11. Li G, Zhao A, Péoch M, Cottier M, Mottet N. Detection of urinary cell-free miR-210 as a potential tool of liquid biopsy for clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2017;35:294-99. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2016.12.007>

# Skin toxicity and efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic renal cell carcinoma: a national registry-based study

A. Poprach<sup>1</sup>, T. Pavlik<sup>2</sup>, B. Melichar<sup>3</sup>, I. Puzanov<sup>4</sup>, L. Dusek<sup>2</sup>, Z. Bortlicek<sup>2</sup>, R. Vyzula<sup>1</sup>, J. Abrahamova<sup>5</sup> & T. Buchler<sup>5\*</sup> on behalf of the Czech Renal Cancer Cooperative Group

<sup>1</sup>Department of Complex Oncology Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno; <sup>2</sup>Institute of Biostatistics and Analyses, Masaryk University, Brno; <sup>3</sup>Department of Oncology, Palacký University Medical School and Teaching Hospital, Olomouc, Czech Republic; <sup>4</sup>Vanderbilt University Medical Center, Nashville, USA; <sup>5</sup>Department of Oncology and 1st Faculty of Medicine, Thomayer University Hospital and Charles University, Prague, Czech Republic

Received 17 November 2011; revised 15 March 2012; accepted 12 April 2012

**Background:** A retrospective, registry-based analysis to assess the outcomes of metastatic renal cell cancer (mRCC) patients treated with sunitinib and sorafenib who developed dermatologic adverse events was performed.

**Patients and Methods:** Data on mRCC patients treated with sunitinib or sorafenib were obtained from the Czech Clinical Registry of Renal Cell Cancer Patients. Outcomes of patients who developed hand–foot syndrome (HFS) of any grade and/or grade 3/4 rash during the treatment were compared with patients without HFS and no, mild, or moderate rash.

**Results:** The cohort included 705 patients treated with sunitinib and 365 patients treated with sorafenib. For sunitinib, the median overall survival (OS) was 43.0 months versus 31.0 months ( $P = 0.027$ ) and median progression-free survival (PFS) 20.8 months versus 11.1 months ( $P = 0.007$ ) for patients with versus without dermatologic toxicity, respectively. For sorafenib, the median OS and PFS were 27.9 and 24.6 months ( $P = 0.244$ ), and 12.2 and 8.8 months ( $P = 0.050$ ), respectively. In multivariable Cox regression, the skin toxicity was significantly associated with longer OS in the sunitinib cohort.

**Conclusion:** The presence of skin toxicity is associated with improved OS and PFS in patients with mRCC treated with sunitinib.

**Key words:** hand–foot syndrome, rash, renal cell cancer, sorafenib, sunitinib, survival

## introduction

Tyrosine kinase inhibitors (TKIs) represent a standard therapeutic option in the first-line therapy of metastatic renal cell cancer (mRCC) patients with good or intermediate prognosis. Skin toxicity manifesting as hand–foot syndrome (HFS) or skin rash commonly accompanies TKI therapy. HFS has been reported in ~20% of patients treated with sunitinib and 35% of patients treated with sorafenib, and the incidence of skin rash is ~40% and 20% for sorafenib and sunitinib, respectively [1, 2].

It has been known for some time that the presence of skin toxicity is associated with tumour response to targeted agents, especially to drugs targeting the epidermal growth factor receptor [3]. Recent retrospective analysis of patients with mRCC found an association between HFS in sunitinib-treated

patients and favourable overall response rate, progression-free survival (PFS), and overall survival (OS) [4].

The aim of this retrospective analysis was to evaluate the predictive significance of dermatologic toxicity in patients with mRCC treated with sorafenib or sunitinib in a national registry.

## patients and methods

### patients and treatment

Data on mRCC patients treated with sunitinib or sorafenib were obtained from the Czech Clinical Registry of Renal Cell Cancer Patients (RENIS), a database of patients treated with targeted agents in 13 Czech comprehensive cancer centres. The patient records in the database are updated quarterly and include information on baseline patient and disease characteristics, restaging results, treatment dose and duration, adverse events, and survival. We have retrospectively analysed the outcome and TKI toxicity for all patients in the registry treated between May 2006 and May 2011. Patients with follow-up shorter than 1 month after the start of TKI therapy and those who were treated with TKIs for <1 month were excluded from the statistical analysis as the period was considered insufficient to detect any dermatologic toxicity. The standard dose of

\*Correspondence to: Dr T. Buchler, Department of Oncology, Thomayer University Hospital, Videnska 800, 140 59 Prague, Czech Republic. Tel: +420-261-082-637; Fax: +420-261-082-522; E-mail: tomas.buchler@ftn.cz



**Table 1.** Overview of characteristics of patients in the sunitinib and sorafenib cohorts. Full baseline characteristics are available as supplementary material, available at *Annals of Oncology* online.

Characteristic	Sunitinib (N = 705)			Sorafenib (N = 365)		
	Without HFS and/or severe rash (N = 654)	With HFS and/or severe rash (N = 51)	P-value <sup>a</sup>	Without HFS and/or severe rash (N = 282)	With HFS and/or severe rash (N = 83)	P-value <sup>a</sup>
Males, N (%)	482 (73.7)	35 (68.6)	0.416	193 (68.4)	55 (66.3)	0.789
Age at the TKI treatment initiation (years) median (5–95th percentile range)	62 (45–75)	60 (46–74)	0.147	62 (47–75)	63 (47–74)	0.806
Clear cell histology, N (%)	628 (96.3)	49 (96.1)	0.712	274 (97.2)	78 (94.0)	0.182
Previous nephrectomy, N (%)	574 (87.8)	45 (88.2)	0.999	240 (85.1)	77 (92.8)	0.095
Previous cytokine therapy, N (%)	404 (61.8)	33 (64.7)	0.765	246 (87.2)	77 (92.8)	0.239
Time from treatment initiation to HFS and/or severe rash occurrence (months) median, (5–95th percentile range)	–	3.0 (0.5–16.2)	–	–	1.6 (0.3–5.8)	–
MSKCC score, N (%)						
0	127 (19.5)	10 (19.6)	0.953	50 (17.7)	18 (22.2)	
1–2	425 (65.2)	34 (66.7)		193 (68.4)	59 (72.8)	0.080
3 and more	100 (15.3)	7 (13.7)		39 (13.8)	4 (4.9)	

<sup>a</sup>Continuous variables were assessed using Mann–Whitney test, categorical variables were assessed using either Fisher exact test or chi-square dependent on number of categories.

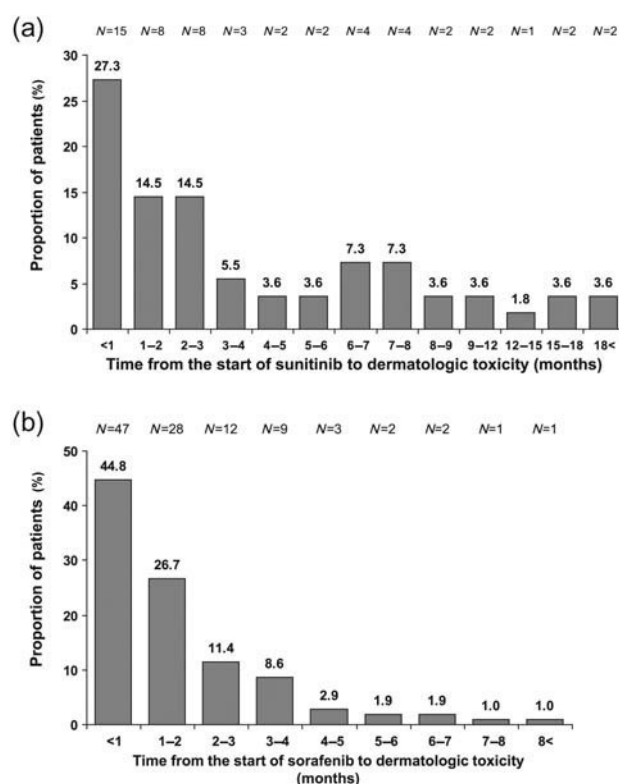
sorafenib was 800 mg daily orally in two divided doses administered continuously, and sunitinib was administered orally in a single dose of 50 mg daily for 28 days of a 42-day cycle. There was no predefined number of cycles and the treatments were continued until progression or severe toxicity as determined by the attending medical oncologist. Dose modifications were also at the discretion of the attending medical oncologist. Disease response was assessed according to Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST).

### toxicity assessment

Dermatologic toxicities were assessed using the Common Terminology Criteria for Adverse Events-(CTCAE) version 3.0 criteria. The severity of skin rash was classified by the attending medical oncologist as ‘mild to moderate’ corresponding to grade 1 to 2 toxicity or ‘severe’ corresponding to grade 3 to 4 toxicity. HFS was reported separately from other skin toxicities. In the present analysis, patients who developed HFS of any grade and/or severe rash on treatment with sunitinib or sorafenib were compared with those without HFS and no, mild, or moderate rash. Only toxicities occurring during the administration of the first TKI were considered in patients who received the two TKIs sequentially.

### statistical analysis

Standard frequency tables and summary statistics, i.e. median and percentiles, were used to describe the sample dataset. Statistical significance of differences in initial categorical parameters was assessed using the Fisher exact test; the Pearson chi-square test was applied for more than two categories. Comparisons of the treatment groups in continuous variables were based on the Mann–Whitney test. Both OS and PFS were calculated since the start of first TKI treatment and estimated using the standard Kaplan–Meier method. PFS was defined as the time from the onset of TKI therapy to the progression on the first TKI or death due to any cause. Statistical significance of the differences in survival between the two groups was assessed using the log-rank test. Moreover, multivariable Cox proportional hazards model with HFS and/or severe skin rash as a time-dependent covariate was used to evaluate influence of all potential predictive and prognostic factors on survival. Model optimization was



**Figure 1.** Manifestation of skin toxicity (defined as hand–foot syndrome of any grade and/or grade 3 to 4 rash) during treatment with sunitinib (a) and sorafenib (b).

performed via analysis of deviance and model residuals. Random effects were used to adjust for the influence of individual cancer centres. Hazard ratios were accompanied with 95% confidence interval and supported by calculating the significance level. Association between the occurrence of different toxicities was analysed using the Fisher’s exact test.

## results

### patient characteristics and skin toxicity

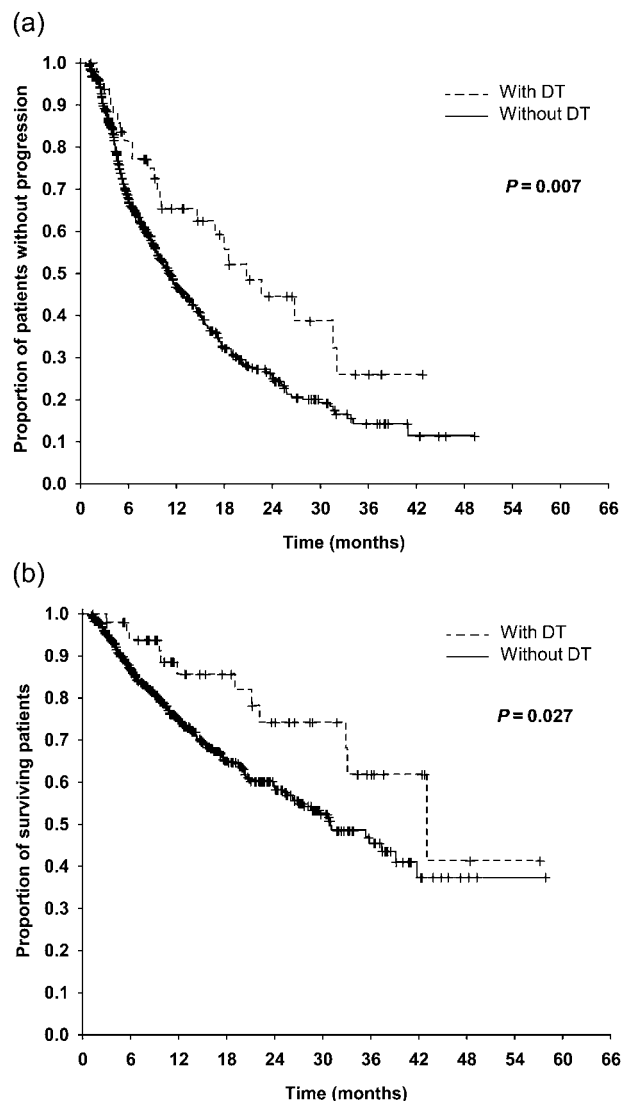
Eight-hundred and eleven mRCC patients treated with sunitinib as the first TKI and 444 patients receiving sorafenib as their first TKI were identified (Table 1 and Supplementary material, available at *Annals of Oncology* online). Most patients in both sunitinib and sorafenib cohorts received prior immunotherapy. Of the patients treated with sunitinib, 705 patients had treatment time and follow-up longer than 1 month and a total of 51 patients (7.2%) had significant dermatologic toxicity, including 43 patients (6.1%) with HFS and 8 patients (1.1%) with severe skin rash other than HFS. Of the patients treated with sorafenib, 365 patients had had treatment time and follow-up longer than 1 month and 83 (22.7%) developed significant skin toxicity, including HFS in 69 patients (18.9%) and severe rash in 14 patients (3.8%).

We have analysed the possible association between the skin toxicity and the occurrence of diarrhoea, another potential dose-related toxicity of TKIs. For patients treated with sunitinib, there was no statistically significant association between the occurrence of these two types of toxicity ( $P = 0.15$ ). However, dermatologic toxicity significantly correlated with the manifestation of diarrhoea in the sorafenib cohort ( $P = 0.004$ ).

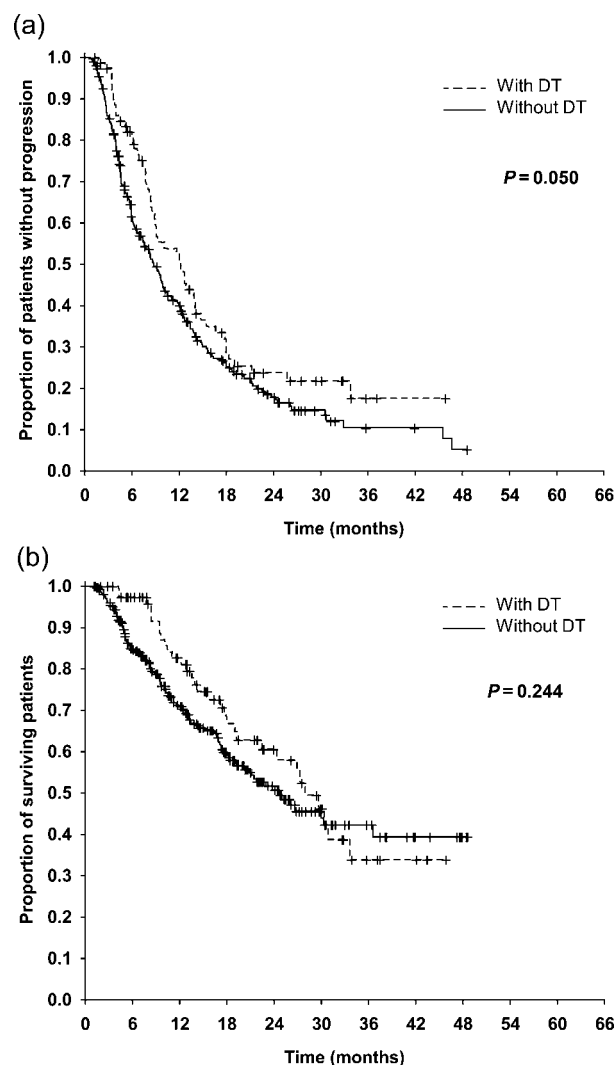
In contrast, there was no significant association between body weight and skin toxicity for either cohort.

### survival according to skin toxicity

Dermatologic toxicity as defined above was first noted mostly in the first 3 months of therapy for both TKI inhibitors (Figure 1). In patients treated with sunitinib, the manifestation of skin toxicity strongly correlated with both OS and PFS (Figure 2). The median OS was 43.0 months (95% confidence interval [CI] 25.8 to 60.3 months) for the cohort with



**Figure 2.** Progression-free survival (a) and overall survival (b) of patients treated with sunitinib according to the occurrence of dermatologic toxicity (DT).



**Figure 3.** Progression-free survival (a) and overall survival (b) of patients treated with sorafenib according to the manifestation of skin toxicity.

significant dermatologic toxicity versus 31.0 months (95% CI 25.0 to 37.0 months) for other patients ( $P = 0.027$ ). The median PFS for patients with significant skin toxicity was 20.8 months (95% CI 13.9 to 27.6 months) versus 11.1 months (95% CI 9.6 to 12.5 months) for others ( $P = 0.007$ ).

The association between the manifestation of skin toxicity and response was less pronounced in patients who received sorafenib as their first TKI and was not statistically significant for OS (Figure 3). The median OS for sorafenib was 27.9 months (95% CI 24.0 to 31.9 months) in patients with

dermatologic toxicity versus 24.6 months (95% CI 18.4 to 30.9 months) in others ( $P = 0.244$ ). The median PFS for patients with skin toxicity was 12.2 months (95% CI 8.5 to 16.0 months) versus 8.8 months (95% CI 7.3 to 10.2 months) for others ( $P = 0.050$ ).

The multivariable Cox model was calculated regarding HFS and/or severe skin rash as a time-dependent covariate and the results are shown in Tables 2 and 3 for sunitinib- and sorafenib-treated cohorts, respectively. In the Cox model, dermatologic toxicity was significantly associated with OS in the sunitinib cohort.

In order to detect the possible impact of subsequent therapies on OS, we have analysed the proportion of patients treated with everolimus after failure of TKI therapy. Of the 705 patients in the sunitinib cohort and the 365 patients in the sorafenib cohort, only 44 (6.2%) and 24 (6.6%) patients, respectively, received subsequent therapy with everolimus by the cut-off date; therefore, the influence of everolimus therapy on OS would be small if any.

**Table 2.** Cox model for progression-free and overall survival of patients treated with sunitinib

Risk factor <sup>a</sup>	Grouping	HR	95% CI	P-value
Progression-free survival				
HFS or severe skin toxicity	No/yes	1.33	0.89 to 1.98	0.170
Age	>60/≤60 years	0.96	0.80 to 1.17	0.700
Number of metastatic sites	More than one/only one	1.66	1.36 to 2.01	<0.001
Time from diagnosis to TKI	≤1/>1 year	1.78	1.48 to 2.16	<0.001
Calcium	>2.5/≤2.5 mmol/l	1.48	1.05 to 2.08	0.026
Overall survival				
HFS or severe skin toxicity	No/yes	1.82	1.02 to 3.24	0.043
Age	>60/≤60 years	1.12	0.87 to 1.45	0.390
Number of metastatic sites	More than one/only one	1.82	1.38 to 2.40	<0.001
Time from diagnosis to TKI	≤1/>1 year	2.04	1.58 to 2.64	<0.001
Calcium	>2.5/≤2.5 mmol/l	2.27	1.49 to 3.46	<0.001
Haemoglobin	Low/normal	1.31	0.93 to 1.83	0.130

<sup>a</sup>Due to nonproportionality of hazards, the Karnofsky performance status score was incorporated to the model as a stratification factor. The clinical centre was incorporated to the model as a random effect.

## discussion

The results of the present analysis of a large, national registry-based cohort suggest that significant skin toxicity is a predictive factor in mRCC patients treated with TKI. The association between PFS or OS and skin toxicity was evident in the larger cohort of patients treated with sunitinib as the first TKI. For sorafenib, only an association of borderline significance has been observed for PFS, and no effect of skin toxicity on OS was evident. PFS and OS rather than the response rate were used as parameters of efficacy in this setting because the response rate is generally low for targeted agents used in mRCC, and disease control rate is more important. In clinical practice, disease progression is not uncommonly defined at the discretion of attending medical oncologist, so it was important to corroborate the association between improved PFS and dermatologic toxicity by analysing the relationship of this type of toxicity with OS. Although

**Table 3.** The Cox model for progression-free survival and overall survival of patients treated with sorafenib

Risk factor <sup>a</sup>	Grouping	HR	95% CI	P-value
Progression-free survival				
HFS or severe skin toxicity	No/yes	1.23	0.93 to 1.62	0.140
Age	>60/≤60 years	0.97	0.77 to 1.22	0.760
Number of metastatic sites	More than one/only one	1.59	1.25 to 2.02	<0.001
Time from diagnosis to TKI	≤1/>1 year	1.52	1.19 to 1.94	0.001
Calcium	>2.5/≤2.5 mmol/l	1.66	1.03 to 2.68	0.037
Karnofsky score	<80/≥80%	1.48	1.06 to 2.07	0.021
Overall survival				
HFS or severe skin toxicity	No/yes	1.20	0.83 to 1.71	0.330
Age	>60/≤60 years	1.06	0.78 to 1.44	0.720
Number of metastatic sites	More than one/only one	1.87	1.35 to 2.60	<0.001
Time from diagnosis to TKI	≤1/>1 year	2.16	1.57 to 2.97	<0.001
Calcium	>2.5/≤2.5 mmol/l	1.85	1.03 to 3.33	0.040
LDH	>1.5× upper limit of norm/≤1.5× upper limit of norm	1.70	1.11 to 2.60	0.014
Karnofsky score	<80/≥80%	1.77	1.16 to 2.69	0.008

<sup>a</sup>The clinical centre was incorporated to the model as a random effect.

therapies administered sequentially after TKI failure may obviously influence OS, the effect of sequential therapy is limited in the present cohort as the access to the new targeted agents was restricted in the Czech Republic. The present analysis evaluated patients treated during a 5-year period between 2006 and 2011, but only for the last 18 months was everolimus, the only agent with proven efficacy after TKI failure, available, still under a number of restrictions. Thus, in the present cohort, the number of patients treated with everolimus and, consequently, the effect of subsequent lines of treatment were very limited.

Sunitinib and sorafenib are TKIs with antiproliferative and antiangiogenic activity that have shown activity in randomized phase III studies in patients with mRCC [1, 2]. The selection of optimal therapeutic algorithm using the several drugs active in mRCC currently is of paramount importance because of toxicity and cost associated with the treatment. Molecular or clinical predictors of successful response to these agents have yet to be identified.

Rash and HFS occur frequently during treatment with sunitinib and sorafenib or BRAF inhibitors [1, 2, 4, 5]. However, cutaneous toxicity is not only a common side-effect of the treatment, but may also identify patients with potentially long-term treatment benefit [4]. Early and aggressive therapy of skin toxicity often allows continuation of potentially effective therapy, with no need for treatment discontinuation or dose reduction. HFS has a markedly more profound effect on the daily activities of the patient than skin rash classified as of the same severity. The present analysis is retrospective and unplanned, and there could have been a bias for reporting more severe symptomatic episodes of cutaneous toxicities. Therefore, it was decided to include only patients with significant (i.e. grade 3 or 4) rash. Moreover, HFS is more specifically associated with TKI treatment and therefore less likely to be misclassified by physicians reporting patients for the RENIS registry. Therefore, in the present study, significant skin toxicity comprised HFS of any grade and severe (grade 3 or 4) skin rash.

Recently, a US collaborative group has had reported on 770 patients with mRCC and 416 gastrointestinal stromal tumour patients treated with single-agent sunitinib in various regimens within clinical trials. The median OS was doubled in 22% mRCC patients who developed any-grade HFS [4].

The association between skin toxicity of sorafenib and treatment outcomes in mRCC has only been suggested by anecdotal reports [6, 7], but an association between OS and the presence of HFS and other adverse drug effects has been reported in patients with hepatocellular carcinoma treated with this agent [8]. The association between skin toxicity and treatment efficacy could be caused by variations in pharmacokinetics as both the toxicity and the response may be dose-dependent.

The incidence of all-grade sunitinib-induced HFS ranged from 14% to 41% in different studies with severe (i.e. grade 3) HFS occurring in 4% to 11% of patients [1, 9–11]. A meta-analysis of 5005 sunitinib-treated patients reported the incidence of all-grade and severe HFS in 18.9% and 5.5% of patients, respectively. It is noteworthy that the incidence of HFS in sunitinib-treated mRCC patients appears to be lower

than that in patients with non-mRCC tumours [12]. There seems to be no significant difference in the incidence of HFS during continuous (i.e. 37.5 mg daily) or intermittent (i.e. 50 mg over 4 weeks, than a 2-week treatment-free period, 6-week cycle) sunitinib administration [13]. The first signs of HFS occur after a median of 32.4 days (range 5–82 days), but HFS may develop after several months of treatment [14, 15].

The incidence of HFS in sorafenib-treated patients is somewhat higher than that for sunitinib and has been estimated at 21%–40% for all-grade HFS and 8%–11% for severe HFS [2, 12, 16–18]. The incidence of HFS in another meta-analysis of sorafenib-treated patients (4883 patients) was 33.8% for all-grade and 8.9% for severe HFS. In contrast to sunitinib, all-grade HFS (although not severe HFS) was more frequent in patients with mRCC than in non-mRCC patients [16]. The incidence of HFS increased when sorafenib was combined with bevacizumab, another antiangiogenic agent [19]. HFS usually occurs during the first weeks of treatment with sorafenib and the median time from the treatment initiation to the first symptoms of HFS for sorafenib was 18.4 days (range 3–56 days) [14, 15].

The pathogenesis of HFS has not been fully elucidated. It has been speculated that HFS is triggered by the inhibition of the vascular endothelial growth factor tyrosine kinase, platelet-derived growth factor tyrosine kinase, the RET-encoded proto-oncogene receptor (RET) tyrosine kinase and Fms-like tyrosine kinase-3 (Flt-3) [12, 14, 16, 19–21]. It is therefore possible that the occurrence of dermatologic or other side effects is associated with the same polymorphisms as treatment response to TKIs in mRCC. Interestingly, it has been noted that when sorafenib and sunitinib are given in sequence, skin toxicity of the drug administered as second appears to be attenuated by pre-treatment with the other TKI [22].

The main weakness of the present study is the retrospective and registry-based design where selection bias cannot be excluded. The incidence of dermatologic adverse events in our database seems to be at the lower range of other reports, specifically for HFS [1, 2]. In addition, heterogeneity was noted in reported incidences of dermatologic adverse events between some centres. These findings suggest underreporting of skin toxicity in the present study. Underreporting represents a problem inherent to retrospective studies. Data on ethnicity are not routinely collected because of scarcity of patients with non-Caucasian ethnicity. On the other hand, with the regard to potential ethnic differences in skin toxicity, more than 99% of cancer patients in the Czech Republic are Caucasians, as were patients included in the present dataset. The incidence of RCC in the Czech Republic is the highest in the world (almost double the US and EU-27 incidence, respectively) for as yet unexplained reasons and differences in population or environmental factors cannot be excluded [23].

The question of subsequent therapies influencing OS in the studied cohort has been addressed but is likely to be negligible. We found that <7% of patients received further therapy with everolimus by the cut-off date due to the relatively late approval of reimbursement for everolimus therapy in the Czech Republic.

There is also a possible bias resulting from the association between the length of treatment and skin toxicity, especially for

the sunitinib cohort (Figure 1). To counter this bias, patients treated for less than a month were excluded from the analysis. Moreover, this time-course bias is less likely in the present cohort as the skin toxicity manifested during the first 3 months of therapy. Clearly, the question of skin toxicity as a predictive marker of response will need to be addressed prospectively, perhaps in a dose-escalation trial.

In conclusion, the presence of significant skin toxicity including any-grade HFS and/or severe rash correlates with OS and PFS of patients with mRCC treated with sunitinib as the first TKI in univariate analysis as well as an independent predictive factor only for OS in sunitinib-treated patients if analysed in a Cox regression model.

## acknowledgements

We would like to thank the following heads of the comprehensive cancer centres for their permission to use data of patients from their respective regional networks: Dr Václav Janovský, České Budějovice; Professor Jindřich Fínek, Plzen; Professor Jiří Vorlíček and Dr Marek Svoboda, Brno; Dr Lubomír Slavíček, Jihlava, Professor Renata Soumarová, Nový Jičín; Dr Jiří Bartoš, Liberec; Dr David Feltl, Ostrava; Dr Jana Prausová, Prague; Dr Milan Lysý, Ústí nad Labem; Dr Milan Kohoutek, Zlín; Professor Jiří Petera, Hradec Králové. We are also indebted to all physicians who provided data for the RENIS registry.

## funding

This work was supported by Grant MZO MOU2005 from the Czech Ministry of Health. The RENIS database maintenance is supported in part by Bayer-Schering Pharma, Roche, Novartis and Glaxo-Smith Kline.

## disclosures

T.B. has received honoraria for lectures from Bayer-Schering Pharma and Roche. B.M. has received honoraria for lectures from Bayer-Schering Pharma, Roche, Novartis and Glaxo-Smith Kline. T.P. has received honoraria for lectures from Sanofi-Aventis. I.P. has worked as a consultant for Pfizer, Glaxo-Smith Kline, and Genetech. Other authors have declared no conflict of interest.

## references

- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 115–124.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356: 125–134.
- Cunningham D, Humblet Y, Siena S et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337–345.
- Puzanov I, Michaelson MD, Cohen DP et al. Evaluation of hand-foot syndrome (HFS) as a potential biomarker of sunitinib (SU) efficacy in patients (pts) with metastatic renal cell carcinoma (mRCC) and gastrointestinal stromal tumor (GIST). *J Clin Oncol* 2011; 29(suppl): abstract e21113.
- Kollmannsberger C, Soulieres D, Wong R et al. Sunitinib therapy for metastatic renal cell carcinoma: recommendations for management of side effects. *Can Urol Assoc J* 2007; 1(2 Suppl): S41–S54.
- Galán Brotons A, Borrás-Blasco J, Rosique-Robles JD et al. Generalised erythematous skin eruptions induced by sorafenib: cutaneous toxicity and treatment outcome. *Clin Transl Oncol* 2008; 10: 844–846.
- Bajetta E, Procopio G, Verzoni E et al. Renal cell cancer and sorafenib: skin toxicity and treatment outcome. *Tumori* 2007; 93: 201–203.
- Song T, Zhang W, Wu Q et al. A single center experience of sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma patients: evaluation of prognostic factors. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2011; 23: 1233–1238.
- Demetri GD, van Oosterom AT, Garrett CR et al. Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 368: 1329–1338.
- Lipworth AD, Robert C, Zhu Ax. Hand-foot syndrome (Hand-foot skin reaction, palmar-plantar erythrodysesthesia): focus on sorafenib and sunitinib. *Oncology* 2009; 77: 257–271.
- Van der Veldt AA, Boven E, Helgason HH et al. Predictive factors for severe toxicity of sunitinib in unselected patients with advanced renal cell cancer. *Br J Cancer* 2008; 99: 259–265.
- Chu D, Lacouture ME, Weiner E, Wu S. Risk of hand-foot skin reaction with the multitargeted kinase inhibitor sunitinib in patients with renal cell and non-renal cell carcinoma: a meta analysis. *Clin Genitourin Cancer* 2009; 7: 11–19.
- George S, Blay JY, Casali PG et al. Clinical evolution of continuous daily dosing sunitinib malate in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after imatinib failure. *Eur J Cancer* 2009; 45: 1959–1968.
- Lee WJ, Lee JL, Chang SE et al. Cutaneous adverse effects in patients treated with the multitargeted kinase inhibitors sorafenib and sunitinib. *Br J Dermatol* 2009; 161: 1045–1051.
- Lacouture ME, Wu S, Robert C et al. Evolving strategies for the management of hand-foot skin reaction associated with the multitargeted kinase inhibitors sorafenib and sunitinib. *Oncologist* 2008; 13: 1001–1011.
- Chu D, Lacouture ME, Fillos T, Wu S. Risk of hand-foot skin reaction with sorafenib: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* 2008; 47: 176–186.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378–390.
- Cheng AL, Kang YK, Chen Z et al. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol* 2009; 10: 25–34.
- Azad NS, Aragon-Ching JB, Dahut WL et al. Hand-foot skin reaction increases with cumulative sorafenib dose and with combination anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 1411–1416.
- Erber R, Thurnher A, Katsen AD et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB J* 2004; 18: 338–340.
- Yang CH, Lin WC, Chuang CK et al. Hand-foot skin reaction in patients treated with sorafenib: a clinicopathological study of cutaneous manifestations due to multitargeted kinase inhibitor therapy. *Br J Dermatol* 2008; 158: 592–596.
- Buchler T, Klapka R, Melichar B et al. Sunitinib followed by sorafenib or vice versa for metastatic renal cell carcinoma—data from the Czech registry. *Ann Oncol* 2012; 23: 395–401.
- Dušek L, Mužík J, Gelnarová E et al. Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin Onkol* 2010; 23: 311–324.

## Research Article

# miR-155 and miR-484 Are Associated with Time to Progression in Metastatic Renal Cell Carcinoma Treated with Sunitinib

Jana Merhautova,<sup>1</sup> Renata Hezova,<sup>2,3</sup> Alexandr Poprach,<sup>3</sup> Alena Kovarikova,<sup>2</sup>  
Lenka Radova,<sup>2</sup> Marek Svoboda,<sup>2,3</sup> Rostislav Vyzula,<sup>3</sup> Regina Demlova,<sup>1</sup> and Ondrej Slaby<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Central European Institute of Technology, Masaryk University, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Comprehensive Cancer Care, Masaryk Memorial Cancer Institute, 656 53 Brno, Czech Republic

Correspondence should be addressed to Ondrej Slaby; [on.slaby@gmail.com](mailto:on.slaby@gmail.com)

Received 3 March 2015; Accepted 17 April 2015

Academic Editor: Paul L. Crispen

Copyright © 2015 Jana Merhautova et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Background.** Sunitinib is a tyrosine kinase inhibitor used in the treatment of metastatic renal cell carcinoma. The main difficulty related to the treatment is the development of drug resistance followed by rapid progression of the disease. We analyzed tumor tissue of sunitinib treated patients in order to find miRNAs associated with therapeutic response. **Methods.** A total of 79 patients with metastatic renal cell carcinoma were included in our study. miRNA profiling in tumor tissue samples was performed by TaqMan Low Density Arrays and a group of selected miRNAs (miR-155, miR-374-5p, miR-324-3p, miR-484, miR-302c, and miR-888) was further validated by qRT-PCR. Normalized data were subjected to ROC and Kaplan-Meier analysis. **Results.** We reported decreased tissue levels of miR-155 and miR-484 as significantly associated with increased time to progression (miR-155: median TTP 5.8 versus 12.8 months, miR-484: median TTP 5.8 versus 8.9 months). **Conclusion.** miR-155 and miR-484 are potentially connected with sunitinib resistance and failure of the therapy. miR-155 is a known oncogene with direct influence on neovascularization. Biological role of miR-484 has to be clarified. Stratification of patients based on miRNA analysis would allow more personalized approach in therapy of metastatic renal cell carcinoma.

## 1. Introduction

Targeted therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKIs) is used in the first line of metastatic renal cell carcinoma (mRCC) treatment. TKIs inhibit multiple receptor tyrosine kinases needed for the activation of intracellular signaling pathways controlling cell proliferation, survival, or angiogenesis. Almost all treated patients will eventually develop secondary resistance to TKIs [1]. Other therapeutic alternatives, such as TKIs pazopanib or sorafenib, mTOR inhibitor temsirolimus, VEGFR antibody bevacizumab, cytokine therapy with interferon- $\alpha$ , or clinical trials [2], could be provided, if there would be a possibility to distinguish individuals with and without benefit from sunitinib therapy.

Emerging evidence suggests that microRNAs (miRNAs) could be suitable biomarkers with diagnostic, prognostic, and predictive potential [3–6]. These small (18–25 nt) noncoding

RNAs are posttranscriptional regulators of gene expression. miRNAs affect most cellular processes and the dysregulation of their network has been linked to various malignant diseases including RCC [7]. miRNAs as biomarkers could be measured in tissues and body fluids and are relatively resistant to decay. The aim of our study was to find tissue miRNAs associated with the time to progression of mRCC in patients treated with sunitinib. To have an effective tool for distinguish patients according to the expected therapy outcome would contribute to more personalized mRCC therapy.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Study Design, Patients, and Tissue Samples.** The study protocol was approved by the local ethical committee and written informed consent was obtained from all patients. Metastatic RCC patients included in the study were from

TABLE 1: Clinicopathological characteristics of patients.

	Screening cohort		Validation cohort	
	Responders <i>N</i> = 8	Nonresponders <i>N</i> = 8	Responders <i>N</i> = 44	Nonresponders <i>N</i> = 19
Gender				
Male	6 (75%)	8 (100%)	34 (77.3%)	11 (57.9%)
Female	2 (15%)	0 (0%)	10 (22.7%)	8 (42.1%)
Age				
Median	64	64	66	66
Range	40–80	53–73	41–84	45–84
Histology				
Papillary carcinoma	1 (12.5%)	1 (12.5%)	3 (6.8%)	3 (5.8%)
Clear cell carcinoma	7 (87.5%)	7 (87.5%)	41 (93.2%)	16 (84.2%)
Grade				
1	0 (0%)	0 (0%)	6 (13.6%)	0 (0%)
2	2 (25%)	3 (37.5%)	11 (25%)	5 (26.4%)
3	5 (62.5%)	3 (37.5%)	13 (29.5%)	7 (36.8%)
4	1 (12.5%)	2 (25%)	5 (11.4%)	7 (36.8%)
Unknown	0 (0%)	0 (0%)	9 (20.5%)	0 (0%)
Response to sunitinib according to RECIST criteria				
Complete response	0 (0%)	0 (0%)	1 (2.3%)	0 (0%)
Partial response	6 (75%)	0 (0%)	19 (43.2%)	0 (0%)
Stable disease	2 (25%)	0 (0%)	24 (54.5%)	0 (0%)
Progressive disease	0 (0%)	8 (100%)	0 (0%)	19 (100%)

South Moravian region of Czech Republic with uniform exposure to the environmental factors. Hereditary cases of RCC were excluded from the study. Two cohorts of patients with mRCC treated with sunitinib in a standard regimen were set up retrospectively. The screening group included 16 patients from Masaryk Memorial Cancer Institute, Brno, Czech Republic (MMCI). Response to the treatment was assessed according to RECIST criteria after 9 months and patients were divided into two groups: (a) responders to the treatment (complete, or partial response, and stable disease) and (b) nonresponders with rapid progression. A group of candidate miRNAs was chosen and the expression was analyzed by qRT-PCR in the validation cohort of 63 mRCC patients from MMCI. Clinicopathological characteristics of both cohorts are summarized in Table 1.

**2.2. Tissue Samples and RNA Isolation.** Tumor tissue was provided as formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) samples. Total RNA enriched with small RNA was isolated using mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion, Austin, USA). Concentration and purity of the isolated RNA were determined spectrophotometrically using Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, Rockford, USA).

**2.3. Microarray Profiling.** miRNAs profiling was conducted using TaqMan Low Density Array (TLDA) technology. Megaplex miRNA RT primers set (pools A and B, version 3.0, Applied Biosystems, Foster City, USA) and TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems)

were used for reverse transcription. Reactions were carried out according to the manufacturer's protocol. 667 miRNAs were simultaneously quantified using ABI 7900 HT Instrument (Applied Biosystems).

**2.4. RT-PCR Quantification.** Gene-specific primers were used in reverse transcription according to the TaqMan MicroRNA Assay protocol (Applied Biosystems). qRT-PCR was performed on ABI 7500 HT Instrument (Applied Biosystems) using the Applied Biosystems 7500 Sequence Detection System. TaqMan (NoUmpErase UNG) Universal PCR Master Mix and specific primer and probe mix (Applied Biosystems) for each miRNA were used. PCR reactions were run in duplicates, and average threshold cycles and SD values were calculated.

**2.5. Data Normalization and Statistical Analysis.** Expression data from TLDA profiling were normalized using miR-625\*, which was uniformly expressed in all samples from screening cohort. Normalized miRNA expression data were evaluated using Bioconductor Limma differential expression analysis. *P* value lower than 0.01 was selected according to the potential of identified miRNAs to accurately discriminate responders and nonresponders in consequent HCL analysis. In validation phase of the study, average expression levels of miRNAs in RT-PCR quantification were normalized using miR-1233 as a reference gene. miR-1233 was selected according to our previous experience with normalization of renal cell carcinoma FFPE samples. Normalized expression data were

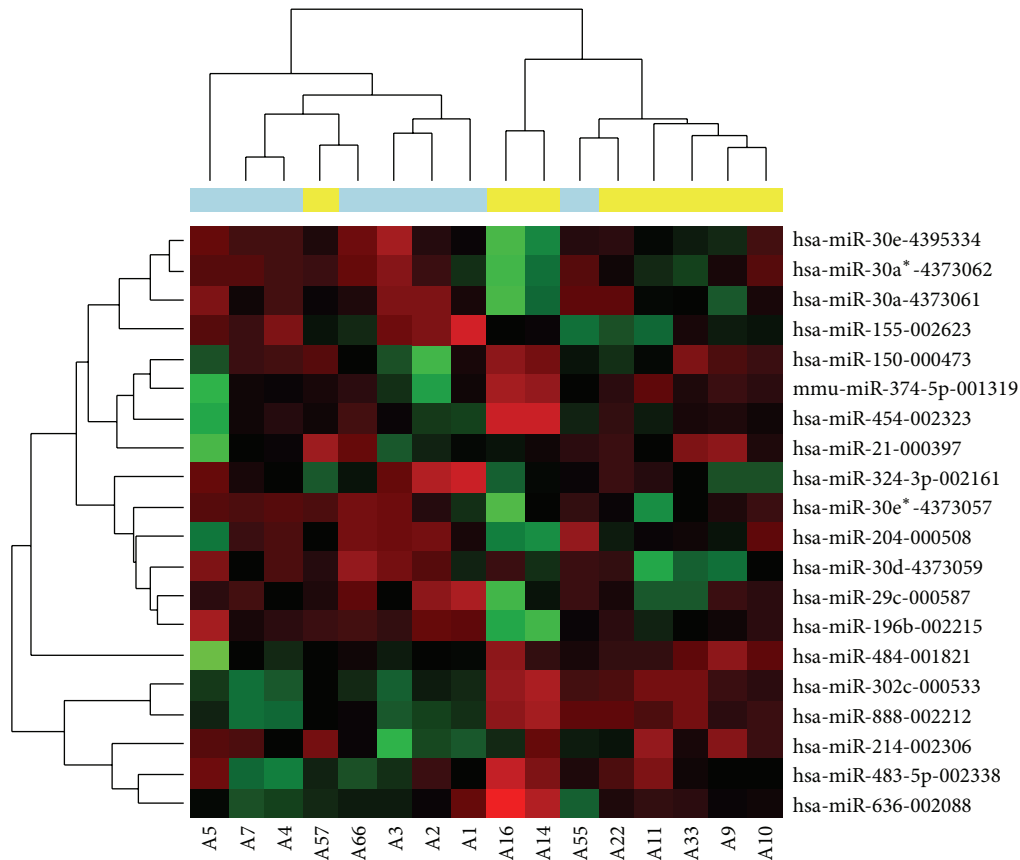


FIGURE 1: Hierarchical clustergram of miRNAs differentially expressed in sunitinib responding and nonresponding patients. Cluster analysis groups samples and miRNAs according to the expression similarity. miRNAs are in rows and samples in columns. Upregulated miRNAs are marked as red and downregulated miRNAs as green. Blue color indicates responders, yellow color indicates nonresponders.  $P < 0.01$ .

evaluated by ROC analysis (MedCalc 14.12.0) and Kaplan-Meier analysis followed by log-rank test (GraphPad Prism 5.03).  $P$  values lower than 0.05 were considered statistically significant.

**3. Results**

*3.1. Microarray Profiling Revealed 19 Differentially Expressed miRNAs between the Responders and Nonresponders Group.* High-throughput miRNA analysis of tumor tissue of 16 patients treated with sunitinib belonging to either responding ( $N = 8$ ) or nonresponding ( $N = 8$ ) group was performed. Limma analysis of normalized expression data identified 19 miRNAs differentially expressed (Figure 1). Six miRNAs (miR-155, miR-374-5p, miR-324-3p, miR-484, miR-302c, and miR-888) were chosen as candidates for the verification using qRT-PCR ( $P$  value  $< 0.01$ ,  $C_T < 35$ ).

*3.2. Association between miR-155 and miR-484 Expression and Time to Progression in mRCC Treated with Sunitinib.* The results obtained from the screening cohort were verified on the independent cohort ( $N = 63$ ) by qRT-PCR. Normalized data were analyzed by ROC analysis and patients were separated into two groups according to the calculated criterion. Kaplan-Meier analysis revealed that lower level of miR-155

is associated with increased time to progression in patients on sunitinib treatment (Table 2 and Figure 2(a), median TTP 5.8 versus 12.8 months). Similar result was obtained for miR-484 (Table 2 and Figure 2(b), median TTP 5.8 versus 8.9 months). Kaplan-Meier plots of other miRNAs did not reach statistical significance, although some of them indicate potentially interesting trends (data not shown).

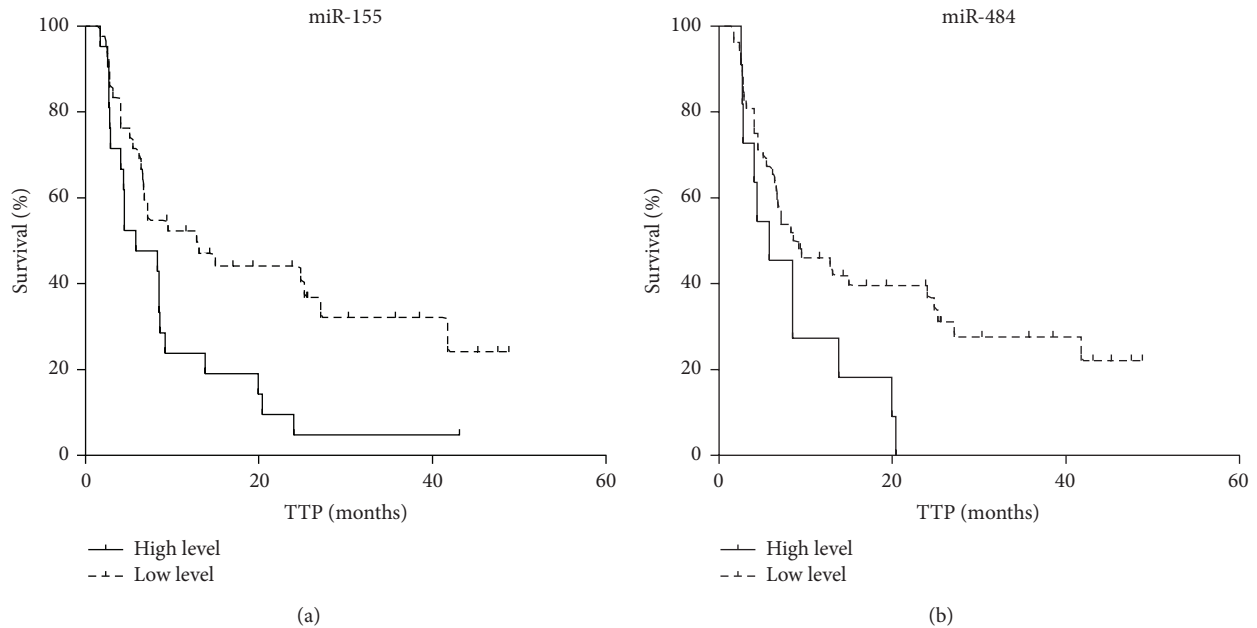
**4. Discussion**

Our findings suggest a link between two miRNAs (miR-155 and miR-484) and disease progression in mRCC patients treated with sunitinib. Tyrosine kinase inhibitors inhibit tyrosine kinase domains of growth factor receptors, albeit their main activity is promoted by the inhibition of VEGF receptor cascade, which leads to the decrease in blood tumor perfusion and to the inhibition of neovascularization. Tumors of TKI treatment-refractory patients are able to escape from the VEGFR blockade [1]. miR-155 is a potent oncomiR upregulated in diverse types of cancer including renal cancer [8, 9], which is in accordance with our findings. The role of miR-155 in angiogenesis is well described. Positive feedback loop between VEGF and miR-155 exists, and miR-155 decreases the expression of VHL tumor suppressor, a protein with ubiquitin ligase activity sequestering, for example, hypoxia-induced



TABLE 2: Validation of miR-155 and miR-484 on the independent cohort ( $N = 63$ ) and their correlation with TTP (months).

	Number of patients ( $N = 63$ )	Median TTP (months)	Log-rank $P$	HR	95% CI
miR-155					
Low, $<0.2381$	42	12.8	0.0092	2.412	1.243–4.680
High, $\geq 0.2381$	21	5.8			
miR-484					
Low, $<1.4408$	52	8.9	0.0296	2.623	1.100–6.254
High, $\geq 1.4408$	11	5.8			

FIGURE 2: Kaplan-Meier survival curves estimating TTP in sunitinib treated mRCC patients ( $N = 63$ ) according to miR-155 ((a);  $P$  value  $< 0.01$ ) and miR-484 ((b);  $P$  value  $< 0.05$ ) tumor tissue expression levels. Patients with low expression of the relevant miRNA are illustrated by dashed line.

factors (HIFs). Higher levels of HIFs promote expression of genes involved in angiogenesis, proliferation, and other aspects of the tumorigenesis, even in the condition of VEGFR blockade [10, 11].

Our data imply that patients with higher tissue expression of miR-155 have decreased time to progression on sunitinib treatment and thus limited benefit from the therapy. However, we have detected a discrepancy between the results obtained from the screening and independent cohort. TLDA screening indicated that the nonresponders from the screening group have lower expression of miR-155 than the responders. Opposite result was achieved by qRT-PCR in the independent cohort (data not shown). We suppose that a bias might occur due to a small number of the specimens analyzed by TLDA, which is also significant limitation of our study.

The expression of miR-484 in mRCC patients treated with sunitinib has already been noticed. Prior et al. described high tumor tissue levels of miR-484 as significantly associated with decreased TTP and overall survival [12]. Our findings are in agreement with this study.

Research in ovarian cancer proved that miR-484 is excreted from tumor cells as a paracrine regulator of tumor microenvironment [13] and it is also measurable in plasma [14, 15]. Therefore, it was found decreased in the tumor tissue [13] and increased in plasma [16]. However, adrenocortical cancer is typical with high tissue expression of miR-484 [17]. The role of this miRNA is probably diverse and depends on the tumor type and miRNA localization. Up to date, there are no reports of possible targets of miR-484 in renal cell carcinoma. Its paracrine function was described in ovarian cancer, where miR-484 targets VEGF B in tumor cells and VEGFR2 in adjacent endothelial cells [13]. Increased levels of miR-484 attenuate the intrinsic apoptotic pathway rising from mitochondria in anoxia, which was unveiled in experiments with myocardial infarction [18].

Independent validation of our results in responders and nonresponders to the sunitinib treatment on larger cohorts of patients and functional analysis of miR-155/miR-484 regulatory involvement in VEGFR signaling might help to understand the underlying mechanism of sunitinib resistance

and also prove the potential of these miRNAs to serve as a suitable predictive biomarkers in mRCC patients treated with sunitinib.

### Conflict of Interests

The authors declare there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

### Acknowledgments

The project was supported by MZCR NT/13547-4/2012, AZV NV15-34678A, CEITEC–Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), the Project MZCR–RVO (MOU, 00209805), and The Ministry of Education, Youth and Sports for the Project BBMRI CZ (LM2010004).

### References

- [1] B. I. Rini and M. B. Atkins, "Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma," *The Lancet Oncology*, vol. 10, no. 10, pp. 992–1000, 2009.
- [2] A. Bex, B. K. Kroon, and R. de Bruijn, "Is there a role for neoadjuvant targeted therapy to downsize primary tumors for organ sparing strategies in renal cell carcinoma?" *International Journal of Surgical Oncology*, vol. 2012, Article ID 250479, 6 pages, 2012.
- [3] H. Mlcochova, R. Hezova, M. Stanik, and O. Slaby, "Urine microRNAs as potential noninvasive biomarkers in urologic cancers," *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, vol. 32, no. 1, pp. 41.e1–41.e9, 2014.
- [4] C. Wang, J. Hu, M. Lu et al., "A panel of five serum miRNAs as a potential diagnostic tool for early-stage renal cell carcinoma," *Scientific Reports*, vol. 5, article 7610, 2015.
- [5] P. J. Mishra, "MicroRNAs as promising biomarkers in cancer diagnostics," *Biomarker Research*, vol. 2, no. 19, 2014.
- [6] T. F. Hansen, A. L. Carlsen, N. H. Heegaard, F. B. Sørensen, and A. Jakobsen, "Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer," *British Journal of Cancer*, vol. 112, no. 4, pp. 624–629, 2015.
- [7] N. M. A. White, T. T. Bao, J. Grigull et al., "MiRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation," *The Journal of Urology*, vol. 186, no. 3, pp. 1077–1083, 2011.
- [8] S. Li, T. Chen, Z. Zhong, Y. Wang, Y. Li, and X. Zhao, "MicroRNA-155 silencing inhibits proliferation and migration and induces apoptosis by upregulating BACH1 in renal cancer cells," *Molecular Medicine Reports*, vol. 5, no. 4, pp. 949–954, 2012.
- [9] A. Wojcicka, A. Piekliko-Witkowska, H. Kedzierska et al., "Epigenetic regulation of thyroid hormone receptor beta in renal cancer," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 5, Article ID e97624, 2014.
- [10] S. Biswas, H. Troy, R. Leek et al., "Effects of HIF-1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  on growth and metabolism of clear-cell renal cell carcinoma 786-0 xenografts," *Journal of Oncology*, vol. 2010, Article ID 757908, 14 pages, 2010.
- [11] W. Kong, L. He, E. J. Richards et al., "Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple-negative breast cancer," *Oncogene*, vol. 33, no. 6, pp. 679–689, 2014.
- [12] C. Prior, J. L. Perez-Gracia, J. Garcia-Donas et al., "Identification of tissue microRNAs predictive of sunitinib activity in patients with metastatic renal cell carcinoma," *PLoS ONE*, vol. 9, no. 1, Article ID e86263, 2014.
- [13] A. Vecchione, B. Belletti, F. Lovat et al., "A microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 24, pp. 9845–9850, 2013.
- [14] A. Li, J. Yu, H. Kim et al., "MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls," *Clinical Cancer Research*, vol. 19, no. 13, pp. 3600–3610, 2013.
- [15] S. Zearo, E. Kim, Y. Zhu et al., "MicroRNA-484 is more highly expressed in serum of early breast cancer patients compared to healthy volunteers," *BMC Cancer*, vol. 14, no. 1, article 200, 2014.
- [16] J. B. Kjersem, T. Ikdahl, O. C. Lingjaerde, T. Guren, K. M. Tveit, and E. H. Kure, "Plasma microRNAs predicting clinical outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin-based treatment," *Molecular Oncology*, vol. 8, no. 1, pp. 59–67, 2014.
- [17] E. I. Bimpaki, D. Iliopoulos, A. Moraitis, and C. A. Stratakis, "MicroRNA signature in massive macronodular adrenocortical disease and implications for adrenocortical tumorigenesis," *Clinical Endocrinology*, vol. 72, no. 6, pp. 744–751, 2010.
- [18] K. Wang, B. Long, J.-Q. Jiao et al., "MiR-484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1," *Nature Communications*, vol. 3, article 781, 2012.