

**UNIVERZITA PALACKÉHO
V OLOMOUCI**

Lékařská fakulta



**Molekulárně genetické studium vybraných typů
solidních nádorů**

DOKTORSKÁ DIZERTAČNÍ PRÁCE

RNDr. Magdalena Uvírová

Ostrava 2016

Doktorand:	RNDr. Magdalena Uvírová
Doktorský studijní program:	Onkologie
Pracoviště:	CGB laboratoř a.s. Kořenského 1210/10 703 00 Ostrava Vítkovice
Školící pracoviště:	Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc
Školitel:	doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem dizertační práci vykonala samostatně a uvedla jsem veškerou použitou literaturu, ze které jsem čerpala. Projekt byl realizován v CGB laboratoř a.s., Kořenského 1210/10, Ostrava Vítkovice pod odborným dohledem školitele, doc. MUDr. Mariána Hajdúcha, Ph.D., ředitele Ústavu molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc. Tato studie byla podporována grantem Technologické agentury České republiky (TAČR) TE 02000058 - Centrum kompetence pro molekulární diagnostiku a personalizovanou medicínu.

Poděkování

Mé poděkování patří především mému školiteli doc. MUDr. Mariánu Hajdúchovi, Ph.D. za poskytnutí cenných rad a připomínek a vedení mé práce. Za dlouhodobou a intenzivní podporu a důvěru v průběhu celého mého studia děkuji doc. MUDr. Janě Dvořáčkové, Ph.D. Upřímné poděkování patří rovněž kolegům z laboratoře, kteří mi pomohli při realizaci práce, za jejich odborné rady a technickou výpomoc, Ing. Haně Tomáškové, Ph.D. a Mgr. Oldřichu Motykovi, Ph.D. za provedení statistických analýz a bc. Lukáši Straňákovi za pomoc při zpracování práce.

V Olomouci 24. 3. 2016

RNDr. Magdalena Uvírová

Obsah

Seznam použitých zkratk	7
1. Teoretická část	13
1.1 Úvod	13
1.2 Současný stav řešené problematiky	14
1.2.1 Kolorektální karcinom	14
1.2.2 Nematlobuněčný karcinom plic (NSCLC)	23
1.2.3 Karcinom prsu	30
1.2.4 Nádory centrálního nervového system (CNS)	41
1.2.5 Karcinom prostaty	52
1.2.6 Melanom	58
2. Experimentální část	64
2.1 Studium vybraných genetických alterací u maligního melanomu	65
2.2 Analýza alterací v signálních cestách genových rodin RAS a HER ve vybrané skupině solidních nádorů	67
2.2.1 Materiál a metody	68
2.2.2 Výsledky	72
2.2.3 Diskuze	77
2.2.4 Závěr	81
3. Souhrn	83
4. Summary	85
5. Seznam použité literatury	87
6. Přehled publikací autora	97
6.1 Původní a přehledové práce	97
6.2 Publikovaná abstrakta	99
6.3 Seznam přednášek a posterů přednesených autorem (bez abstraktu) na veřejných odborných fórech	104

6.4 Řešitelství v grantových projektech	107
7. Přílohy	108

Seznam použitých zkratek

AI inhibitor aromatáz

AKT akt murine thymoma viral oncogen

ALK anaplastic lymphoma kinase

ALT alternative lengthening of telomeres

APAF1 apoptotic peptidase activating factor 1

APC adenomatous polyposis coli

AR androgenní receptor

ATRX alpha thalassemia/mental retardation syndrom X-linked

BAP1 BRCA1 associated protein 1

BC breast carcinoma (karcinom prsu)

BRAF v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

BRCA1 breast cancer 1

CCND1 cyklin D1

CDK4 cyclin dependent kinase 4

CDK6 cyclin dependent kinase 6

CDKNB1 cyclin dependent kinase inhibitor 1B

CDKN2A (p14^{ARF}) cyclin – dependent kinase inhibitor 2A

CDKN2B cyclin – dependent kinase inhibitor 2B

CIN chromosomová instabilita

CIMP CpG island methylator phenotype

CNS centrální nervová soustava

CP1 cystein proteinase 1

CRC kolorektální karcinom
c-MYC myc avian myelocytomatosis viral oncogen
CSD cumulative sun induced damage
CSMD1 CUB and Sushi multiple domains 1
DNA deoxyribonukleová kyselina
DFS disease free survival
DMBT1 deleted in malignant brain tumors 1
EDNRB endothelin receptor type B
EGFR epidermal growth factor receptor
EIF3S3 (EIF3H) eucaryotic translation initiation factor 3 subunit H
EML4 echinoderm mikrotubule associated protein like-4
ER estrogenový receptor
ERK extracelular regulated MAP kinase
ESR1estrogen receptor 1
ESR2 estrogen receptor2
ETV ets variant 6
EZH2 enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FFPE formalin fixed paraffin embedded
FGFR1 fibroblast grow factor receptor 1
FISH fluorescenční in situ hybridizace
5FU fluorouracil
G-CIMP glioma- CpG- Island methylator phenotype
GDP guanosin difosfatáza
GIST gastrointestinální stromální tumor
GMB glioblastoma multiforme
GNAQ guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide

GNA11 guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11(Gq class)

GSTP1 glutation S-transferáza

GTP guanosin - 5' triphosphate

HER2 human epidermal receptor growth factor 2

HRAS Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

IDH1 isocitrat dehydrogenase 1

IDH2 isocitrat dehydrogenase 2

JAK2 Janus kinase 2

KIAA0196 protein kódující gen

Ki-67 protein kódovaný genem *MKI67*

Kip1 (CDKN1B) cyclin- dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)

KRAS Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

LEF lymphoid enhancer binding factor

LOH loss of heterozygosity

LPL lipoprotein lipase

MAPK mitogen activated protein kinase

MAP3K8 mitogen activated protein kinase kinase 8

MC1R melanocortin-1 receptor

MDM2 (HDM2) MDM2 protooncogene, E3 ubiquitin protein ligase

MEK mitogen activated protein kinase

MET MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase

MGMT methylguanine methyltransferáza

MITF microphthalmia associated transcription faktor

MIS mikrosatelitová instabilita

MHL1 mutL homolog

MSH2 mutS homolog 2
MSH6 - mutS homolog 6
MMR mismatch repair
MSS mikrosatelitová stabilita
MUC4 mucin 4, cell surface associated
MYB v- myb avian myeloblastosis viral oncogene
MYC v- myc avian myelocytomatosis viral oncogene
mTOR mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
NADPH (DCR1) 2,4 – dienyol CoA reductase1, mitochondria
NF1 neurofibromin 1
NF2 neurofibromin 2 (merlin)
NFIB nuclear factor I/B
NOS not other specified
NRAS neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NRK Nik related kinase
NSCLC non small cell lung carcinoma
NST no special type
NTRK3 neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type3
OS overall survival
p27 p27 protein
p21 cyclin dependent kinase inhibitor 1A
PC prostate carcinoma (karcinom prostaty)
PCA3 prostate cancer associated 3
PCR polymerase chain reaction
PDGFR – platelet derived growth factor receptor
PFS progression free survival

PI3K phosphatidylinositide-3-kinase
PIK3CA phosphatidylinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide
PIN prostatická intraepiteliální neoplazie
PITX2 paired like homeodomain2
PMS2 postmeiotic segregation increased 2
PR progesteronový receptor
PRC2 polycomb represivní komplex
PSA prostatický specifický antigen
PTEN phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PTCH2 patched 2
PTGS2 prostaglandin –endoperoxidase synthase2
RAF (ZHX2) zinc fingers and homeoboxes 2
RASSF1 Ras association domain family member1
RB1 retinoblastoma 1retinoblastoma 1provided
RNA ribonukleová kyselina
mRNA messenger RNA
RAD1 ssDNA endodeoxyribonuclease RAD1
ROS1 ROS protooncogen 1, receptor tyrosine kinase
SERM selektivní ER modulátor
SMAD4 SMAD family member 4
SPINK1 serine peptidase inhibitor, Kazal type 1
SPOP speckle type BTB/POZ protein
TCF (HNF4A) hepatocyte nuclear factor 4 alpha
TERT telomerase reverse transcriptase
TKI tyrosin kinase inhibitor

TMPRSS2 transmembrane protease, serine 2

TMZ temozolomid

TNBC triple negativ breast carcinoma

TNM tumor, node, metastasis

TOP2A topoisomerase II alpha

TP53 tumor protein p53

WAF1(CDNK1A) cyclin dependent kinase inhibitor 1A

WHO World Health Organization

Wnt Wingless/Int-1

Wt wild type

+ pozitivní

- negativní

1. Teoretická část

1.1 Úvod

Explozivní nárůst genetických znalostí a technologií umožňuje zaměřit se na multifaktoriální, populačně významná onemocnění, jako jsou například kardiovaskulární, psychická a nádorová onemocnění. Molekulární genetika hraje v medicíně v současné době významnou roli a nabízí spolupráci všem lékařským oborům. Poznání a pochopení molekulární patogeneze je základem pro porozumění procesu nemoci a rovněž nástrojem k nalezení diagnostických a terapeutických cílů směřujících k individualizaci léčby.

Česká republika patří mezi země s vysokou incidencí nádorových onemocnění. Rakovina je nemoc akumulující mnoho genetických aberací, kdy vyjma strukturních změn v genomu (např. translokace, delece, amplifikace), jsou nalézány často mutace a epigenetické alterace v důležitých genech regulujících zejména buněčný cyklus či apoptózu. Navíc evoluční mechanismy v karcinogenezi vytvářejí individualitu nádoru, což ztěžuje nebo znemožňuje použití univerzálních léčebných postupů. Novou výzvou současnosti je hledání významu a dalších souvislostí genetických a epigenetických změn v nádoru a jejich využití jako nových cílů pro terapii. Tato problematika zahrnuje oblast genové instability, biomarkerů a genetiky nádorů a v neposlední řadě epigenomiky¹.

V současnosti není u nádorových onemocnění postačující pouze přesná histologická diagnóza, ale je nutné, i s využitím nejmodernějších sofistikovaných metod molekulární biologie, provádět také vyšetřování molekulárních profilů nádorů, exprese genů a stanovení prediktivních, popřípadě prognostických biomarkerů. Fenoménem v tumorigenezi a problémem přesné diagnostiky se jeví existence klonální intranádorové heterogenity a také genetické změny v nádoru v průběhu léčby.

Vyhledávání prognostických znaků předpovídajících vývoj onemocnění a markerů predikujících léčebnou odpověď, popřípadě resistenci nádorů na

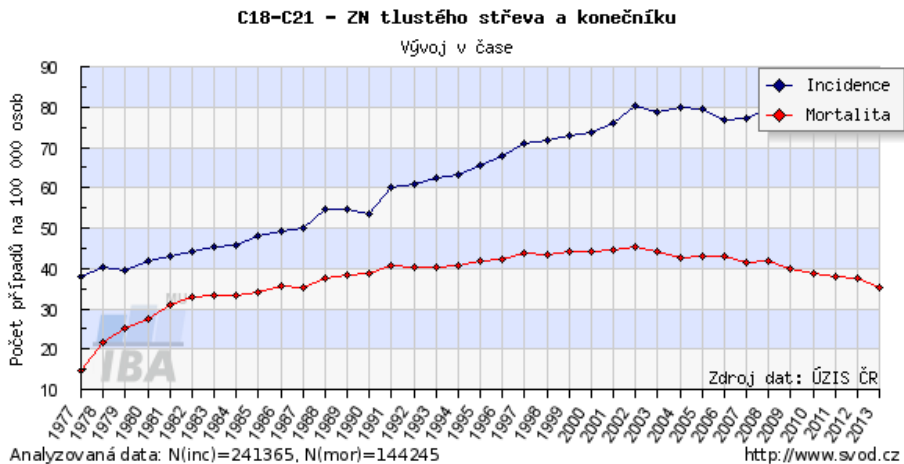
terapii, je významné pro klinický management onemocnění a tzv. personalizovanou terapii. Prediktivní nádorové markery jsou využívány v klinické praxi pro zvolení nejefektivnějšího terapeutického režimu, často s využitím cílené, tzv. biologické terapie. V současné klinické praxi se však setkáváme s případy, jejichž odpověď na cílenou biologickou terapii, přesto že splňují známá molekulárně genetická indikační kritéria, je minimální nebo žádná, což naznačuje komplexnější a složitější provázanost řady buněčných regulačních mechanismů a existenci dalších faktorů ovlivňující genové signální dráhy a expresi proteinů.

1.2 Současný stav řešené problematiky

Tato práce se věnuje identifikaci a využití diagnostických, prognosticko-prediktivních faktorů u nejčastějších onkologických onemocnění, jako je kolorektální karcinom, karcinom plic, karcinom prsu, nádory CNS, prostaty či melanom.

1.2.1 Kolorektální karcinom

Kolorektální karcinom je nejčastěji se vyskytující zhoubný nádor trávicího ústrojí. Představuje druhý nejčastější nádor u mužů hned po nádoru plic a u žen po nádoru prsu². Celosvětově zaujímá třetí příčku mezi malignitami. V roce 2012 bylo celosvětově diagnostikováno téměř 1,4 milionu nových případů³. V České republice jeho incidence neustále stoupá. Vysoká mortalita u tohoto onemocnění je způsobena především nedostatečným screeningem a detekcí tohoto onemocnění až v pokročilých stádiích, kdy jsou již léčebné postupy omezené.



Graf 1: Incidence a mortalita karcinomu tlustého střeva a konečníku v České republice v letech 1977-2013 (Ref²).

Histologicky je kolorektální karcinom v 90% případů adenokarcinom. Mezi jednotlivé histologické subtypy patří: mucinózní adenokarcinom, adenokarcinom s buňkami tvaru pečetiho prstenu, medulární adenokarcinom, mikropapilární adenokarcinom, serátní adenokarcinom, křibriformní komedonový adenokarcinom, adenoskvamózní adenokarcinom, vřetenobuněčný adenokarcinom, nediferencovaný adenokarcinom a dále pak neuroendokrinní tumor, dlaždicobuněčný karcinom, adenoskvamózní karcinom, vřetenobuněčný karcinom a také nediferencovaný karcinom.

Kolorektální karcinom je heterogenní onemocnění, které můžeme rozdělit do tří subtypů podle molekulárních mechanismů řídících jejich transformaci, mezi které patří chromosomová instabilita (CIN), epigenetické změny jako je hypermetylace promotorových sekvencí CpG ostrůvků vedoucí k fenotypu CIMP (CpG Island Methylator Phenotype) a mikrosatelitová instabilita (MSI). Jedná se z molekulárně biologického hlediska o jeden z nejstudovanějších typů nádorů a to vzhledem k jeho vysoké prevalenci a také díky existenci prekurzorových lézí známých jako adenomy.

Více než 70% sporadických kolorektálních karcinomů vzniká na základě chromosomové instability (CIN). Tyto nádory jsou charakterizované

akumulací numerických nebo strukturálních abnormalit chromosomů, jejichž výsledkem je abnormální karyotyp, častá ztráta heterozygoty (LOH) úseků, na kterých jsou lokalizovány tumorsupresorové geny, a chromosomové přestavby⁴. Nejčastější jsou alelické imbalance 5q, 8p, 17p, 18q (Ref¹) a nejčastější studovanou ztrátou je ztráta heterozygoty oblasti chromosomu 18q, která zahrnuje mnoho důležitých kandidátních genů (*DCC*, *SMAD2*, *SMAD4* a *SMAD7* gen). Ztráta oblasti 18q je asociována s horší prognózou⁵. Navíc tumory s CIN se vyznačují akumulací mutací ve specifických onkogenech a tumor supresorových genech (např. *APC*, *KRAS*, *PIK3CA*, *BRAF*, *SMAD4* a *TP53*), čímž dochází k aktivaci signálních drah významných pro karcinogenezi⁴.

U přibližně 15% kolorektálních karcinomů se vyskytuje mikrosatelitová instabilita (MSI), způsobená dysfunkcí genů pro opravy DNA (MMR; mismatch repair genes). Nedostatečná funkce MMR genů je u sporadických CRC způsobená především jejich „vypnutím“ (ztrátou funkce), nejčastěji u genu *MLH1* (více než v 80%), ke které dochází hypermetylací promotoru⁴. Chování nádorů s mikrosatelitovou instabilitou je odlišné od nádorů s chromosomovou instabilitou (CIN)¹. Mají lepší prognózu, odlišně odpovídají na standardní chemoterapii, jsou většinou pravostranné a mají charakteristické genetické znaky, mezi které patří především výše zmiňovaná ztráta schopnosti opravy párování DNA (mismatch DNA repair system), metylace promotoru *MHL1* genu (u sporadických karcinomů) nebo mutace genů *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2* (Lynchův syndrom). Také jsou u nich relativně časté mutace v *BRAF* genu¹.

MHL1 gen - mutL homolog 1, lokalizován na chromosomu 3, lokus 3p22.3, kóduje protein, který se účastní DNA-mismatch repair (MMR) procesů.

MSH2 gen- mutS homolog 2, lokalizován na chromosomu 2, lokus 2p21, kóduje protein, který se účastní DNA-mismatch repair (MMR) procesů.

MSH6 gen - mutS homolog 6, lokalizován na chromosomu 2, lokus 2p16, kóduje protein, který je členem rodiny DNA MMR MutS a jehož funkce je rozpoznání nesprávně spárovaných nukleotidů a jejich příprava na

opravu. Hraje významnou roli v rozvoji hereditárních nádorů, speciálně u CRC a nádorů endometria.

PMS2 gen- postmeiotic segregation increased 2, je lokalizován na chromosomu 7, lokus 7p22.1 a kóduje protein, který je zapojen do DNA MMR.

Třetí mechanismus maligní transformace je charakterizován rozsáhlými metylacemi CpG ostrůvků a je označován jako „island methylator phenotype“ (CIMP). Přibližně 30-40% proximálních sporadických CRC je CIMP pozitivních, naopak pouze 3-12% distálních CRC je CIMP pozitivních. CIMP pozitivní CRC vykazují často vysokou mikrosatelitovou instabilitu (MSI-H) způsobenou metylací *MHL1* promotoru. CIMP se nevyskytuje u Lynchova syndromu, který vykazuje MSI. Navíc CIMP je také asociován s mutací genu *BRAF*, jak u CRC s mikrosatelitovou instabilitou tak u kolorektálních karcinomů s mikrosatelitovou stabilitou (MSS) (Ref⁴).

Kolorektální karcinomy jsou rovněž charakterizovány mutacemi ve Wnt signální dráze genu *APC* (70%) nebo *CTNNB* genu (75%), mutacemi v *KRAS* genu, obvykle v kodonu 12, 13, 59, 61,117 a 146 (45%), mutacemi v *NRAS* genu v kodonu 12, 13, 59, 61,117 a 146 (5%) (viz Obr. 2), mutacemi v *BRAF* genu (5%) a mutacemi v genu *TP53* (70%), které ovlivňují invazivitu nádoru¹.

U kolorektálních karcinomů dochází také k telomerázové aktivaci (70%) nebo delecii v *SMAD4* genu a tím k ovlivnění metastatické aktivity¹. Kritéria pro stratifikaci pacientů z hlediska léčby a prognózy jsou založena primárně na klasifikaci TNM, kdy T – reprezentuje velikost nádoru a jeho invaze stěnou střeva, N - postižení regionálních lymfatických uzlin a M- přítomnost vzdálených metastáz. V současné době je však nutné použít také molekulární parametry, mezi které patří kromě *RAS* mutačního statusu, který slouží jako prediktor léčebné odpovědi na anti EGFR léčbu (Obr. 1), mutační status *BRAF* genu, který je indikátorem prognózy přežití a také mikrosatelitová instabilita, která se jeví být nezávislým prognostickým faktorem. Pacienti s MSI typem kolorektálního karcinomu neprofitují z 5FU chemoterapie, avšak mají

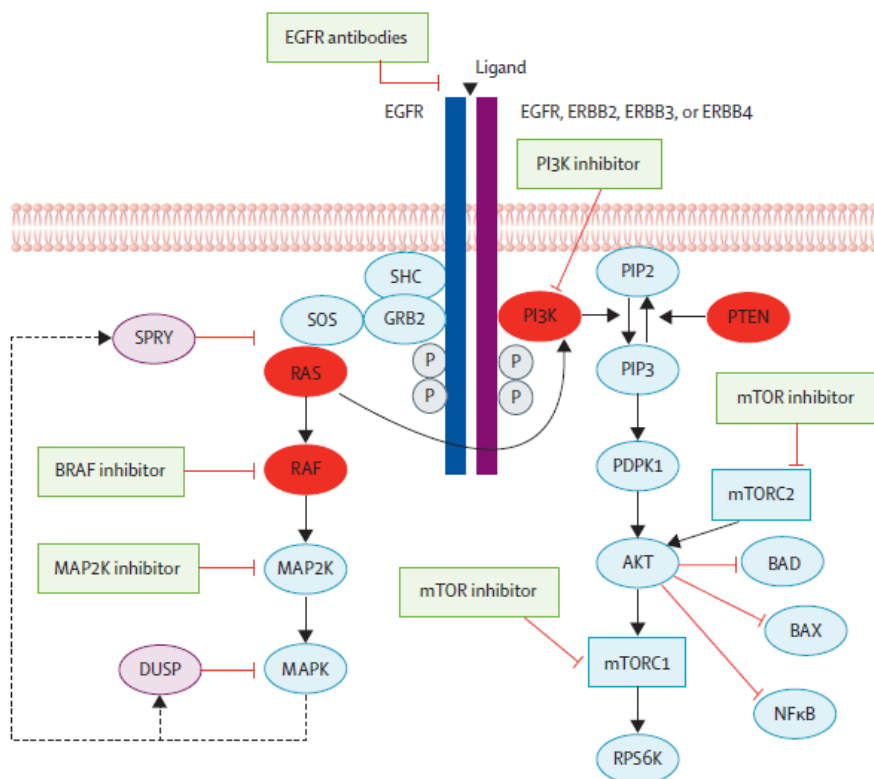
nižší mortalitu při stratifikaci podle stupně nádoru⁵. Kontroverzní se však jeví situace, že ne všichni wild type *RAS* pacienti reagují na anti EGFR léčbu (40-60%). Příčinou mohou být mutace v dalších genech, jako jsou *PIK3CA* gen, *BRAF* gen, *PTEN* gen a pravděpodobně další, popřípadě epigenetické změny, které mohou být významnými potenciálními biomarkery predikce léčebné odpovědi.

KRAS gen, člen rodiny *RAS* genů, kóduje malé proteiny s enzymatickou aktivitou guanosin trifosfatázy (GTPázy). *RAS* proteiny jsou malé GTPazy, které se vyskytují ve formě vazby na guanosin difosfatázu (GDP) a vazby na aktivní guanosin trifosfatázu (GTP). *RAS* proteiny jsou hlavním mediátorem při přenosu externího růstového signálu od receptoru na intracelulární signální molekuly a takto řídí buněčnou proliferaci, přežití a diferenciaci. Mohou aktivovat mnohé další přenosy signálů včetně PI3K-AKT-mTOR signální dráhy, která ovlivňuje buněčné přežití a *RAS*-RAF-MEK-ERK signální dráhy, která se podílí na proliferaci buněk⁶.

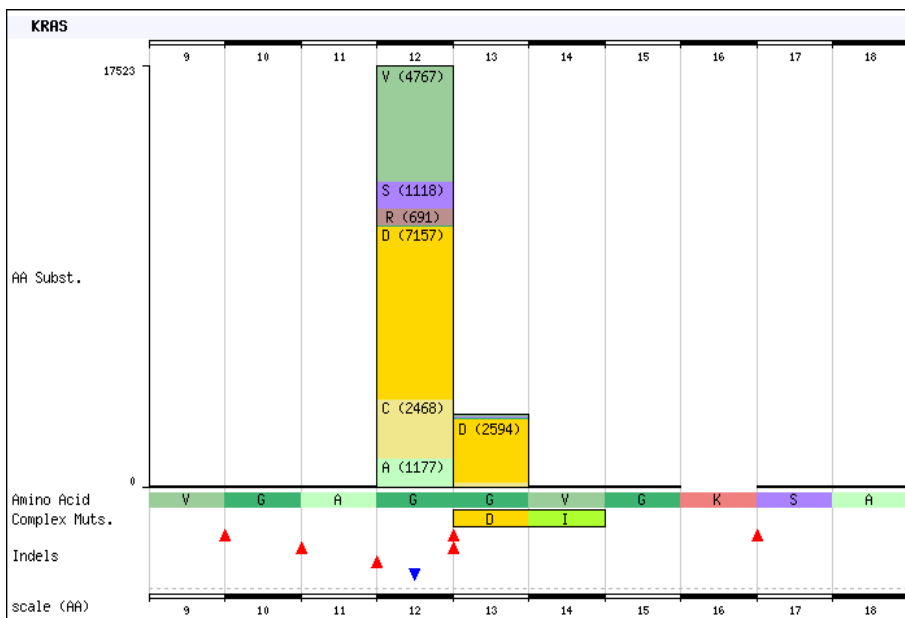
Mutace v *KRAS* genu je časnou událostí v karcinogenezi kolorektálního karcinomu, přibližně 45-50% pacientů s metastatickým CRC mají mutaci v *KRAS* genu. Další člen rodiny *RAS* genů je *NRAS* gen, který je homologem *KRAS* genu a mutace těchto dvou genů jsou vzájemně exkluzivní. Mutace v genech kódujících proteiny *RAS*/*RAF*/*MAPK* signální dráhy ovlivňují účinnost cílené terapie anti EGFR protilátkami, mezi které patří například cetuximab a panitumumab. Pacienti s mutacemi v *RAS* genech mají signifikantně menší benefit z léčby anti EGFR protilátkami než pacienti s *RAS* wild typem karcinomů. Negativní prediktivní hodnota *RAS* mutací pro antiEGFR léčbu je vysoká (95%) (Ref⁵). Mutace v těchto genech jsou tedy významným negativním prediktivním biomarkerem pro cílenou anti EGFR terapii. Důležitou komponentou *RAS*/*RAF*/*MAPK* signální dráhy je i *BRAF* protein.

Aktivační mutace v *BRAF* genu v exonu 15 vedou k aktivaci *MAPK* signální dráhy (Obr. 3). Je prokázáno, že *BRAF* mutace je asociována s horší prognózou CRC, studie prokázaly, že pacienti s *BRAF* mutací v

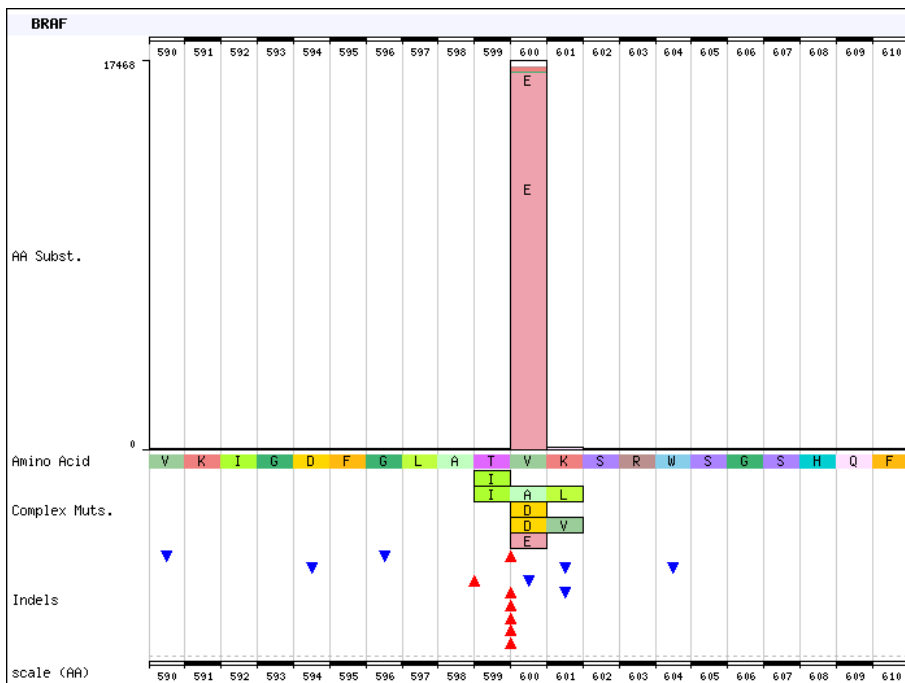
kodonu 600 mají horší prognózu než pacienti s *BRAF* wild typem nádoru⁵.



Obr. 1: Signální dráha EGFR a možné terapeutické cíle⁷.



Obr. 2: Distribuce somatických mutací v kodonech 12 a 13 KRAS genu⁸.



Obr. 3: Distribuce somatických mutací v BRAF genu (část exonu 15) (Ref⁸).

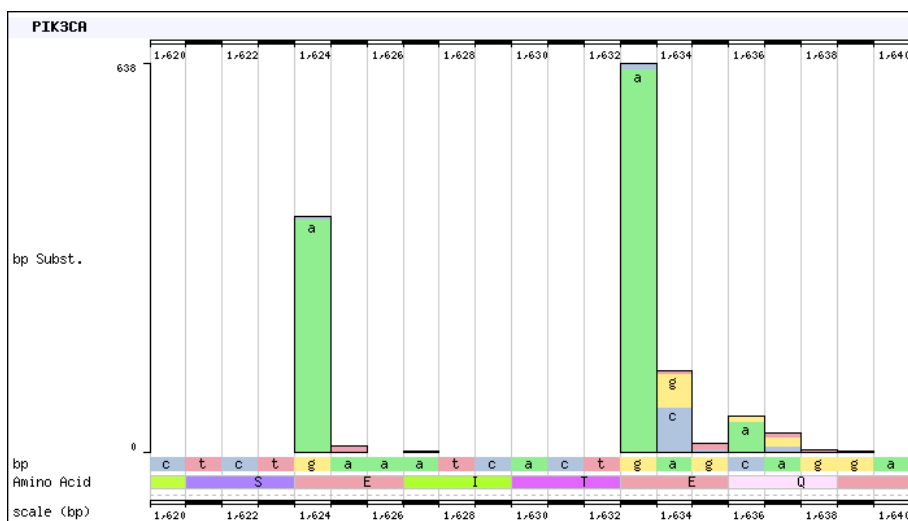
Dalším důležitým markerem u CRC je gen *APC* (adenomatous polyposis coli), lokalizován na chromosomu 5, lokus 5q21-q22. Kóduje tumor supresorový protein účastnící se kontroly buněčného cyklu, mezibuněčné komunikace, podílí se na formování mezibuněčných spojů. Je zapojen v β -Catenin/Wnt signální dráze. Mutace genu *APC* jsou nejčastější příčinou autozomálně dominantního onemocnění zvaného familial adenomatous polyposis (FAP). Absence proteinu či jeho nepřítomnost vede ke tvorbě polypů v tlustém střevě, ze kterých mohou po další kumulaci genetických změn vznikat nádory.

β -catenin je kódován genem *CTNGB1* a je součástí komplexu proteinů, které jsou důležité při regulaci buněčného růstu a adhezi mezi přilehlými buňkami⁹. β -catenin je součástí Wnt signální dráhy, kdy může docházet k jeho fosforylaci, translokaci na buněčné jádro a vzniku β -catenin TCF/LEF komplexu, což má za následek aktivaci onkogenů, mezi které patří například *c-MYC* a *Cyclin D1* (Ref¹⁰).

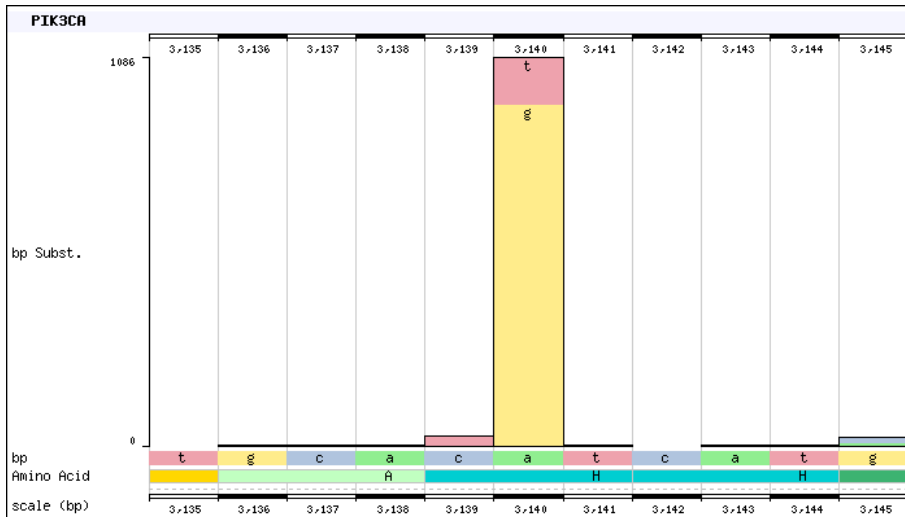
Významným je i gen *TP53*, lokalizovaný na chromosomu 17, lokus 17p13, a kódující tumorsupresorový protein p53, který funguje především jako kontrolní bod v G1/S fázi buněčného cyklu, detekující DNA poškození. Reguluje expresi genů podílejících se na zástavě buněčného cyklu, apoptóze, senescenci či opravě DNA. Jeho nepřítomnost či nefunkčnost umožňuje buňce vstupovat do buněčného cyklu i s poškozenou DNA, což vede ke kumulaci dalších genetických změn a rovněž i snížení účinnosti DNA poškozujících terapií⁶.

PTEN gen- phosphatase and tensin homolog, působí jako tumorsupresor, kóduje protein, který hraje významnou úlohu v mnoha buněčných procesech včetně buněčného růstu, proliferace, přežití a udržování genomické integrity. Je negativní regulátor PI3K/AKT signální dráhy. Ztráta funkce PTEN proteinu (vlivem různých mechanismů – delece genu, epigenetické změny, post-translační modifikace) má za následek zvýšení aktivity PI3K-AKT signální dráhy¹¹. Ztráta exprese PTEN proteinu je prokázána u 30-45% CRC a je pravděpodobně asociována s rezistencí nebo špatnou odpovědí na anti EGFR terapii a s horší prognózou⁵.

Gen *PIK3CA* (phosphatidylinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide) je lokalizován na chromosomu 3q26.3. Kóduje p110 α katalytickou podjednotku fosfatidyl 3-kinázy (PI3K). Tato PI3K je heterodimerní enzym složený z p110 α katalytické podjednotky a p85 regulační podjednotky kódované genem *PIK3R1*. PI3K patří do rodiny lipidových kináz, které regulují různé buněčné funkce jako například proliferaci, buněčné přežití a migraci. Mutace v *PIK3CA* genu se u CRC vyskytují v 15-30%. Majoritní mutací je substituce aminokyseliny exonu 9 (Obr. 4) a 20 (Obr. 5), která způsobuje stálou aktivaci signální PI3K/AKT signální dráhy. Mutace v tomto genu nejsou vzájemně exkluzivní s geny *RAS* a *BRAF*.



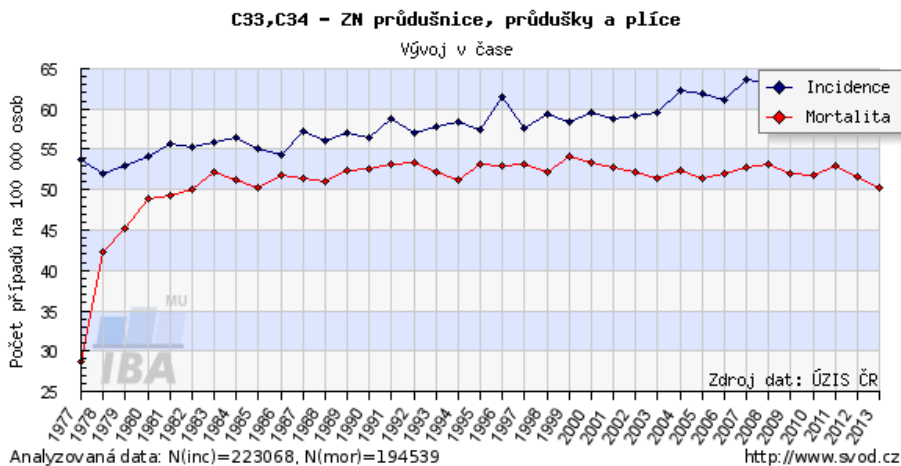
Obr. 4: Somatické mutace v *PIK3CA* genu (část exonu 9) (Ref⁸).



Obr. 5: Somatické mutácie v PIK3CA genu (časť exonu 20) (Ref⁸).

1.2.2 Nemalobunčný karcinóm pľúc (NSCLC)

Karcinomy pľúc patrí medzi nádory s najväčšou mortalitou (85%), na druhom mieste po karcinomu pankreatu.



Graf 2: Incidence a mortalita karcinomu pľúc v Českej republike v letech 1977-2013 (Ref²).

Přežití je závislé na stádiu onemocnění. U stádia I a II onemocnění je 5leté přežití 30-50%, u pokročilých stádií onemocnění (III-IV) je uváděné 5leté přežití méně než 10%. Přibližně 90% těchto nádorů je asociováno s kuřáctvím. Karcinomy plic tvoří obecně velmi heterogenní skupinu vykazující složitou morfolonii a vznikají jak u populace kuřáků, tak nekuřáků a z histologického hlediska se dělí do čtyř hlavních skupin: adenokarcinomy, dlaždicobuněčné karcinomy, velkobuněčné karcinomy a malobuněčné karcinomy⁵. Adenokarcinomy jsou v současnosti velmi diskutovaným tématem vzhledem ke vzrůstající prevalenci v mnoha rozvinutých zemích, ke které dochází bez ohledu na pokles kuřáctví v populaci a také z důvodu jejich subklasifikace na základě molekulárně genetických změn a související dostupné molekulárně cílené terapie. Především se jedná o změny v genech kódujících receptorové tyrosin kinázy (RTKs), o změny v přenosu signálu, ke kterým dochází u nádorů s mutací v genu pro epidermální růstový receptor (*EGFR*), mutací v *KRAS* genu, s přestavbou genu *ALK* (anaplastic lymphoma receptor tyrosin kinase), *MET* amplifikací (tyrosin kinázový receptor) a dalšími jinými změnami⁵. Nádory plic včetně adenokarcinomů tvoří velice heterogenní skupinu, pokud se jedná o genomické změny, expresi genů, regulaci genů, signální dráhy a alterace proteinů. Je prokázáno, že existuje vzájemná asociace mezi histologickými rysy a etiologií, prognózou a molekulárně genetickými změnami nádoru. Bylo prokázáno, že RTK signální dráha je selektivně aktivovaná v závislosti na stadiu a invazivitě nádoru⁵. Preinvazivní a minimálně invazivní adenokarcinomy obvykle aktivují RAS-ERK dráhu, zatím co invazivní nádory proliferují s využitím PI3K-AKT dráhy⁵.

RTK signální dráha je jednou z hlavních cest ovlivňující buněčný růst a diferenciaci a jeví se tedy jako významný terapeutický cíl.

Primární nádory plic se dělí na malobuněčné a nemalobuněčné, přičemž skupina nemalobuněčných karcinomů zahrnuje zvláště:

1. Adenokarcinomy (45%), které vykazují různé histologické a morfologické znaky a jsou dále kategorizovány podle své dominantní populace.

2. Velkobuněčné karcinomy (10%).
3. Dlaždicobuněčné karcinomy (20%).
4. NSCLC NOS (not other specified) (10-30%), tato kategorie zahrnuje tumory, které nemohou být jasně definované na základě morfolgie a imunohistochemie.

Skupina malobuněčných karcinomů plic zahrnuje neuroendokrinní tumory, zvláště malobuněčný karcinom.

S využitím poznatků molekulární genetiky je v současnosti v léčbě NSCLC indikovaná tzv. cílená biologická terapie s využitím inhibitorů tyrozinkináz (TKI). Pacienti jsou stratifikováni podle mutačního statusu genu *EGFR*, kdy mutace v genu *EGFR* je považována za pozitivní prediktor léčebné odpovědi a doby přežití bez progresu (PFS).

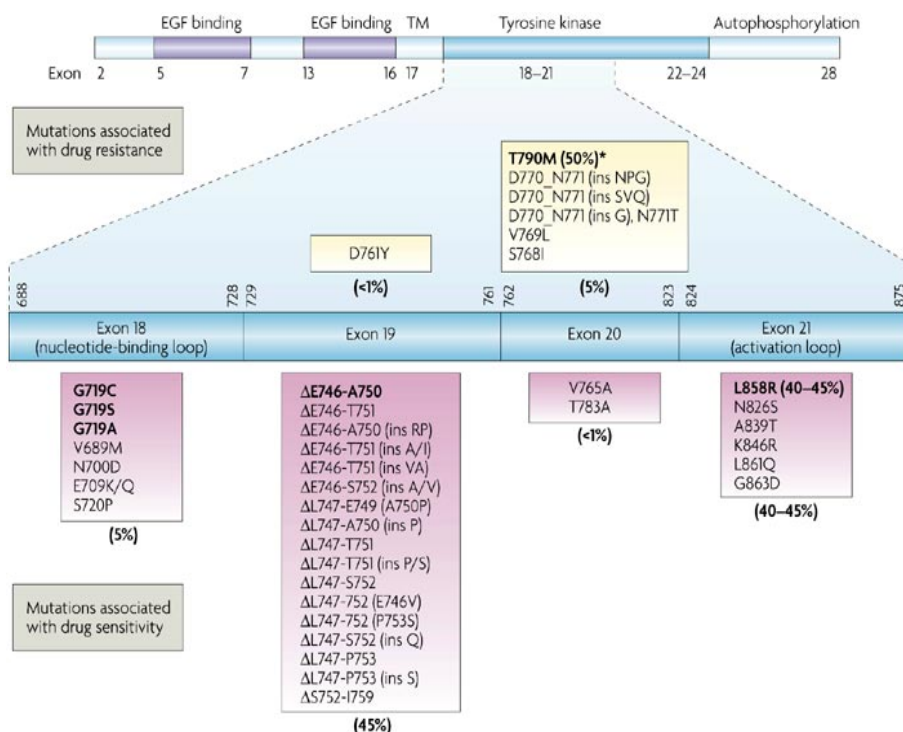
Mutace v *EGFR* genu

EGFR gen (epidermal growth factor receptor) - je lokalizován na chromosomu 7p12, je složen z 28 exonů o celkové velikosti 186 kb, kóduje transmembránový receptor (člen ERBB rodiny receptorů tyrozinkináz, také znám jako *HER1* nebo *ERBB1*). *EGFR* gen hraje významnou úlohu v karcinogenezi. Je popisován u různých typů solidních nádorů, včetně nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC). Nadměrná exprese koreluje s pokročilým stupněm onemocnění a nepříznivou prognózou. Jeho aktivace vazbou ligandu vede ke spuštění intracelulární signální kaskády, jejímž důsledkem je ovlivnění exprese řady genů. Ke zvýšené aktivaci *EGFR* proteinu dochází overexpresí genu a mutacemi nacházejícími se v tyrozinkinázové doméně receptoru (exon 18 – 21), které mají za následek spuštění signální transdukce bez vazby ligandu k vazebné doméně receptoru.

Nejčastěji se nacházejí bodové mutace v exonu 21 (40 - 45 %), dále časté jsou delece v exonu 19 (45%), rovněž se mutace vyskytují v exonu 18 (vzácné – 5%) a vzácně v exonu 20 (nižší než 1%). Mutovaná alela genu *EGFR* je velice často amplifikovaná (Obr. 6)⁵.

EGFR mutované plicní karcinomy jsou častější u žen, u nekuřáků a pacientů asijské populace, avšak tyto klinické charakteristiky jsou

nedostatečné pro selekci pacientů pro testování nebo pro terapii. Objektivní léčebná odpověď u pacientů s mutací v *EGFR* genu, léčených EGFR TKI je 70-90%, oproti pouhým 20-30% při chemoterapii. Medián přežití bez progresu u pacientů s EGFR mutovaným nádorem léčených EGFR TKI je dvojnásobný ve srovnání s chemoterapií u těchto pacientů. Naproti tomu mutace v exonu 20 genu *EGFR* je asociována s rezistencí na EGFR tyrozinkinázy, duplikace nebo inzerce v exonu 20 je asociována s primární rezistencí na léčbu. Substituční mutace T790M se nalézá přibližně u 50% pacientů se získanou (sekundární) rezistencí na léčbu EGFR tyrozinkinázami¹. V klinické praxi bývají pacienti s aktivační mutací genu *EGFR* léčení nejčastěji TKI jako jsou erlotinib, gefitinib či afatinib.



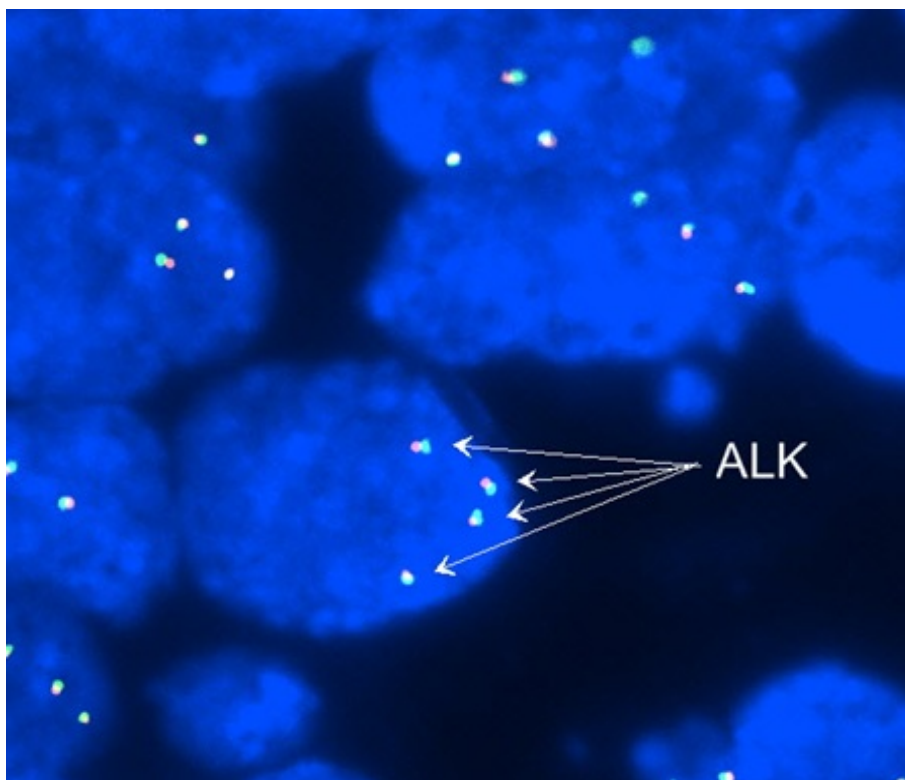
Nature Reviews | Cancer

Obř. 6: Distribuce a klasifikace EGFR mutací¹²

Přestavba *ALK* genu

ALK gen –anaplastic lymphoma kinase - lokalizován na krátkých ramenech chromosomu 2, lokus 2p23, byl poprvé popsán u anaplastického velkobuněčného lymfomu. Kóduje protein patřící do rodiny tyrozin kinázových receptorů. Přibližně 5% plicních adenokarcinomů má aktivovanou *ALK* kinázu způsobenou chromosomovou přestavbou *ALK* genu (Obr. 7), nejčastěji inverzí typu *inv(2)(p21p23)* související se vznikem fúzního genu *EML4-ALK*, popřípadě jinými přestavbami (*TFG-ALK*, *KIF5B-ALK*). V současné době existuje nejméně 13 variant fúze *EML4-ALK*, které zahrnují exony *EML4* genu 2,6,13,14,15,17,18 nebo 20 s exonem 20 nebo intronem 19 *ALK* genu. Přemístění extracelulární a transmembránové domény genu *ALK* s oblastí genu *EML4* způsobí konstitutivní dimerizaci kinázové domény, což má za následek zvýšení její katalytické aktivity.

Pacienti s karcinomem plic a přestavbou *ALK* genu reagují lépe na léčbu inhibitory *ALK* tyrozin kinázy (crizotinib) než na konvenční terapii. Léčebná odpověď u *ALK* přestavěných karcinomů plic je přibližně 60%. Přestavba genu *ALK* se vyskytuje častěji u mladších pacientů, u mužů a u nekuřáků, popřípadě lehkých kuřáků. Etnická asociace nebyla prokázána. Avšak tato klinická data nejsou dostatečná pro výběr pacientů k testování pro indikaci k léčbě a je nutné provádění molekulárně genetické testování pro stratifikaci pacientů k léčbě.



Obr. 7: Fluorescenční in situ hybridizace (FISH), DNA sonda (ON ALK (2p23) Break – KREATECH Diagnostic, normální nález genu *ALK* (překrývající se zelený a oranžový signál) u pacienta s nemalobuněčným karcinomem plic, vyšetřeného v CGB laboratoři a.s.

Přestavba *ROS1* genu

V přibližně 1% případů NSCLC se vyskytuje alterace *ROS1* genu. Gen *ROS1* je lokalizován na chromosomu 6 v oblasti q22.1 a kóduje proteinkinázový receptor. Jeho přestavba je popisována u mladších pacientů a nekuřáků¹³.

Tato mutace je považována stejně jako mutace v *EGFR* genu a přestavba u *ALK* genu za pozitivní prognostický faktor a pacienti, kteří jsou nositelé této mutace, také reagují na léčbu crizotinibem¹⁴. Rezistence na léčbu inhibitory ALK kináz je přisuzována sekundárním mutacím, analogicky jako u rezistentních mutací v *EGFR* genu.

Další mutace u adenokarcinomů plic.

Mezi další geny, které mohou hrát roli v molekulární biologii plicních adenokarcinomů, patří také *KRAS* gen. Přibližně 30% adenokarcinomů plic obsahuje mutaci v tomto genu a to nejčastěji v kodonu 12 a 13 (více než 90%) a v kodonu 61. *KRAS* mutace, *EGFR* mutace a *ALK* přestavba jsou navzájem většinou exkluzivní, dvojitá pozitivita je raritní. U 1-4% nemalobuněčných plicních karcinomů se nachází somatická mutace *BRAF* genu. V porovnání s melanomy, kde je nejčastější mutace pozorována ve valinu 600(V600) v exonu 15 kinázové domény, *BRAF* mutace u plicních karcinomů se vyskytuje na jiné pozici kinázové domény (např. V600E, G469A, D594G) (Ref¹⁵). U 2% NSCLC se vyskytuje *HER2* mutace v exonu 20, avšak v kohortě pacientů s *EGFR/KRAS/ALK*-negativním NSCLC se výskyt mutace v genu *HER2* zvyšuje až na 6% (Ref¹⁶).

S rozvojem sekundární rezistence u pacientů léčených inhibitory tyrozinkináz souvisí také amplifikace *MET* genu, který je lokalizován na chromosomu 7 v oblasti q31.2, nebo polysomie chromosomu 7. Gen *MET* kóduje tyrosinkinázu, jejímž ligandem je hepatocytový růstový faktor (HGF). *MET* gen hraje hlavní roli v organizaci buněčného růstu, migraci a morfologických změnách buněk. U karcinomu plic je popisována rezistence k anti EGFR léčbě u pacientů s amplifikací genu *MET* (Ref¹⁷).

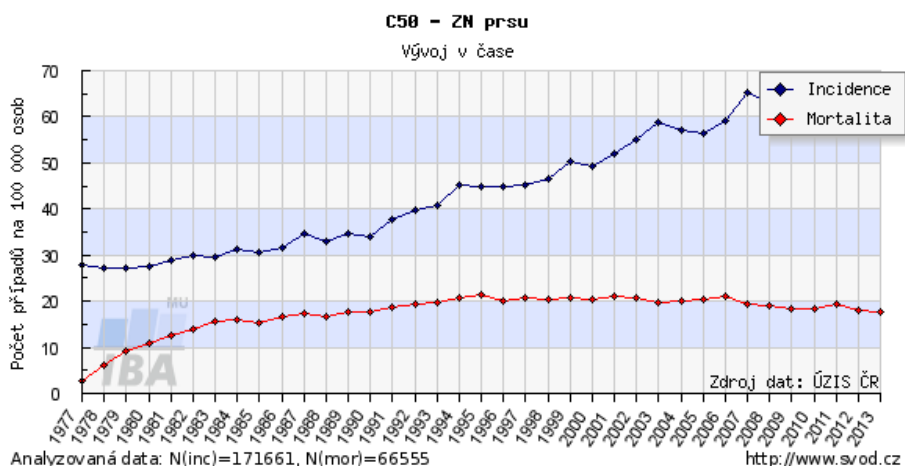
Mutace v *TP53* genu

Mutace v *TP53* tumorsupresorovém genu je významnou událostí v rozvoji mnoha typů nádorů včetně karcinomu plic, přičemž frekvence a typ mutace *TP53* genu může reflektovat endogenní a exogenní faktory podílející se na kancerogenezi a informovat o etiologii daného nádoru. Některé studie prokazují, že nejčastější mutace se nacházejí v exonech 4-8 a exonu 10 (48%) a nebyly prokázány u nenádorové plicní tkáň, vyjma polymorfismů. Nejčastější mutace jsou tranzice – záměna pyrimidinu za pyrimidin (43%), nebo transverze – záměna purinu za pyrimidin nebo naopak (41%) a pouze v 16% se vyskytují delece nebo inserce. Nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi výskytem těchto frekvencí mezi adenokarcinomy a dlaždicobuněčnými karcinomy. Papilární

adenokarcinomy a smíšené adenokarcinomy vykazují nejnižší frekvenci mutací v genu *TP53*, avšak statisticky signifikantní rozdíly mezi jednotlivými subtypy adenokarcinomů nebyly prokázány. Existuje hypotéza, že mutace jsou indukovány exogenními karcinogeny a jsou mnohem častěji nalézány v nádorové tkáni u kuřáků (46%) než u nekuřáků (34%). V porovnání podle typu mutace, tranzice jsou signifikantně méně časté u kuřáků než u nekuřáků, naproti tomu transverze jsou častější u kuřáků (48%) než u nekuřáků (25%), ($P=0.068$) (Ref⁵).

1.2.3 Karcinom prsu

Karcinom prsu je nejčastější nádorové onemocnění postihující převážně ženy, které tvoří skupinu heterogenních tumorů s širokým spektrem morfologických subtypů. Mezi nejčastější histologické typy patří invazivní karcinom NST a lobulární karcinomy, dále pak karcinomy tubulární, kribriformní, mucinózní, medulární, karcinomy s apokrinní diferenciací, metaplastické karcinomy, invazivní mikropapilární karcinomy a další méně frekventní typy.



Graf 3: Incidence a mortalita karcinomu prsu v České republice v letech 1977-2013 (Ref²).

V současné době se v klinické rutinní praxi při určování strategie léčby používají klinickopatologické faktory, mezi které patří věk pacienta, menopauzální status, velikost tumoru, jeho histologický typ včetně gradu, lymfovaskulární invaze, status lymfatických uzlin, přítomnost vzdálených metastáz, společně s estrogenovými receptory (ER), progesteronovými receptory (PR), buněčným proliferačním indexem Ki-67 a statusem genu *HER2* (receptor epidermálního růstového faktoru 2), které jsou považovány za tzv. molekulární biomarkery a jejichž vyšetřování je součástí diagnostiky a prediktivního testování u nádoru prsu⁵.

Estrogenový receptor

ER je zásadním markerem pro management pacientů nejen s karcinomem prsu. První zmínky a studie se datují do roku 1896, kdy G. Batson¹ popsal regresi pokročilého karcinomu prsu po ovairektomii. ER kontroluje vývojové a fyziologické procesy a existuje ve dvou různých formách ER alfa a ER beta, které jsou kódovány odlišnými geny *ESR1*, respektive *ESR2*. V interakci s receptory, reguluje buněčný růst a diferenciaci a pomáhá udržovat homeostázu. Studie ukázaly, že dysregulace estrogenu a progesteronu je významným faktorem karcinogeneze. ER status je vysoce prediktivní pro klinický benefit z endokrinní terapie, ER pozitivní tumory lépe odpovídají na hormonální terapii a mají lepší prognózu ve srovnání s ER negativními nádory. Přibližně 70-80% karcinomů prsu jsou ER pozitivní a 20-30% je ER negativních, z toho 70% ER pozitivních karcinomů vykazuje klinickou odpověď na hormonální terapii. Klinická progresa ER pozitivních karcinomů prsu typicky koreluje s hormonální rezistencí. Epigenetické alterace promotoru ER zahrnující metylaci *ESR1* genu jsou považovány za významné události rozvoje ER negativních karcinomů prsu¹. *ER A86V* mutace je asociována s nízkou aktivitou receptorů. Naopak *ER K303R* mutace způsobuje hypersenzitivitu receptorů a aktivaci estrogenu, což může být příčinou progresa nádoru. Raritní *ER 437* stop kodon mutace byla nalezena u metastatických karcinomů prsu a může být promotorem metastatického šíření¹.

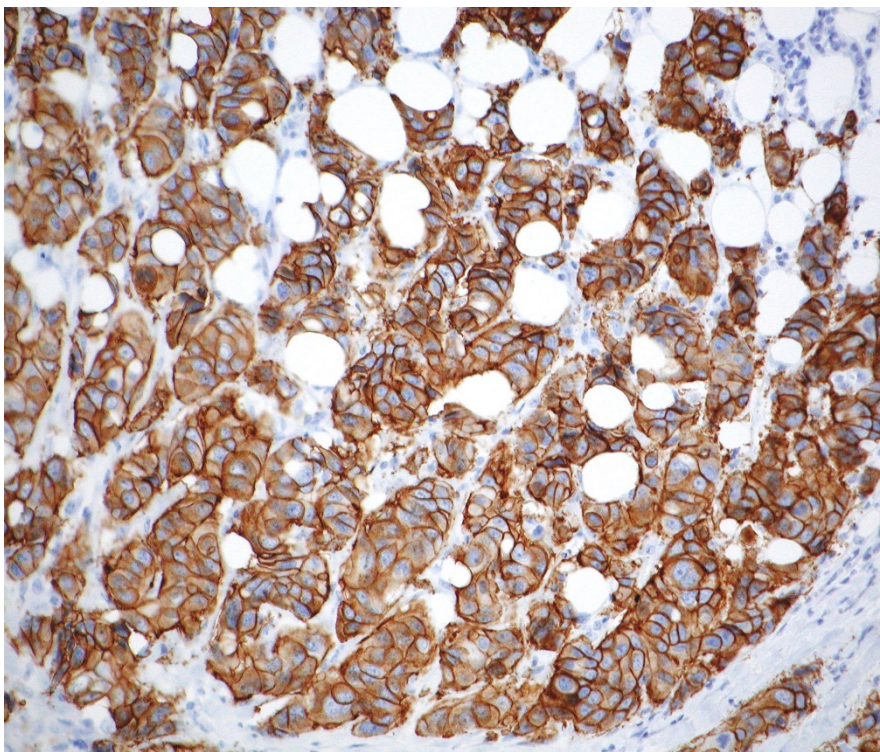
Progesteronový receptor

Přibližně 60% karcinomů prsu exprimuje progesteron, také známý jako NR3C3. Tato exprese je považována za marker neporušené funkce ER a pomáhá predikovat léčebnou odpověď pacienta na hormonální terapii. Efekt progesteronu je zprostředkován intracelulárními proteiny PR-A a PR-B, které jsou kódovány stejným genem avšak s využitím rozdílných iniciačních pozic (izoformy PR). Nadměrný výskyt proteinu PR-A je asociován se zvýšeným rizikem karcinomu prsu. Exprese PR je také spojována s lepší terapeutickou odpovědí při endokrinní terapii^{1,5}.

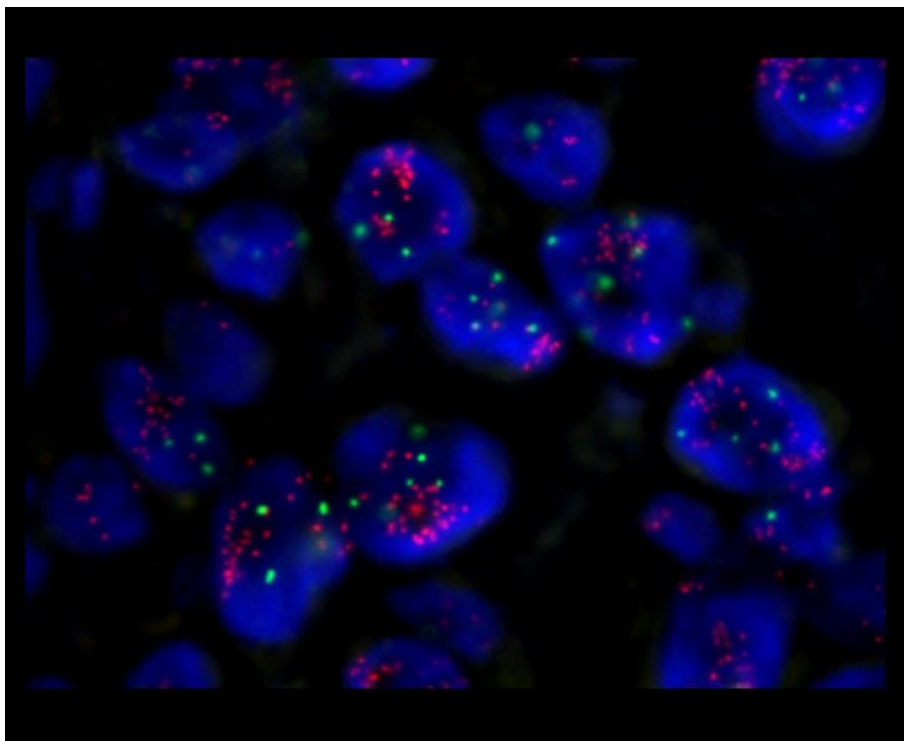
ER a PR jsou v rutinní praxi vyšetřovány imunohistochemicky. Přesné stanovení hormonálních receptorů má zásadní význam, jedná se o jeden z nejsilnějších prediktivních faktorů při endokrinním managementu onemocnění.

HER2 gen

Human epidermal receptor growth factor 2 (*HER2*, *ERBB2*) gen je protoonkogen lokalizovaný na chromosomu 17, kódující tyrozin kinázové receptory na povrchu epiteliálních buněk karcinomu prsu a regulující buněčnou proliferaci a apoptózu. Je amplifikován u 15-20% karcinomů prsu. *HER2* amplifikace je primárním mechanismem, který řídí overexpresi. Amplifikace a overexprese spolu dobře korelují a jsou negativním prognostickým faktorem (nádory s agresivním chováním a špatnou prognózou, častější rekurencí a mortalitou). Předpokládaná frekvence výskytu aktivačních mutací v *HER2* genu u karcinomu prsu je 1,6- 2,0% (Ref^{2,18}). Přesto, že byl jednoznačně prokázán klinický význam anti *HER2* cílené terapie, ne všichni pacienti s amplifikací genu *HER2* z této léčby profitují a primární nebo získané rezistence jsou významným klinickým problémem.



Obr. 8: Imunohistochemický průkaz HER2; pozitivní nález (3+; vysoká membránová pozitivita) u pacientky s karcinomem prsu, vyšetřeno v CGB laboratoři a.s.



Obr. 9: Amplifikace genu *HER2* (SpectrumOrange), detekovaná fluorescenční in situ hybridizací (FISH), PathVysion HER-2 DNA probe kit (Abbott Molecular) u pacientky s karcinomem prsu, vyšetřené v CGB. Sonda pro centromerickou oblast chromozomu 17 je značena zeleně (SpectrumGreen).

V současnosti není klinicky validovaný faktor, který by predikoval rezistenci na anti HER2 terapii u pacientů s HER2 pozitivním typem nádoru. Preklinická data napovídají, že může existovat mnoho potenciálních mechanismů rezistence, počínaje redukcí afinity k protilátce overexpresí *MUC4* nebo aktivací dalších signálních drah zahrnujících *p27*, *Kip1*, *PTEN*, *PI3K*, *mTOR* nebo *Akt* nebo spolupůsobením jiných signálních drah, které vytvoří bypass *HER2* blokády.

Ki-67

Ki-67 je jaderný antigen, který je exprimován v buňkách v G1, S a G2 fázi buněčného cyklu a v mitóze, avšak je negativní v G0 fázi. Vysoká hladina exprese Ki-67 je asociována u karcinomů prsu s vysokým gradem a postižením lymfatických uzlin. Ki-67 má prognostický i prediktivní význam. Bylo prokázáno, že Ki-67 je asociován s velikostí tumoru, s postižením lymfatických uzlin, ER/PR expresí, DFS a OS. Studie také prokázaly, že hladina exprese Ki-67 je prediktivní pro benefit z chemoterapie a hormonální terapie⁵.

Mutace genů u karcinomu prsu

TP53 gen

TP53 gen je mutovaný u více než 30% sporadických karcinomů prsu, stejně tak jako u mnoha dalších typů maligních nádorů. Gen je lokalizován na chromosomu 17, lokus 17p13 a kóduje transkripční faktor ovlivňující proliferaci a apoptózu při poškození DNA nebo při reakci na buněčný stres. V současnosti je popsáno přibližně 2500 inaktivačních mutací genu *TP53* u karcinomu prsu, z čehož v 75% se jedná o záměnu jednoho nukleotidu (single nucleotid substitution) a zbylých 25% jsou inserce, delece, a nonsens mutace. Mutace jedné alely jsou asociovány se ztrátou heterozygoty (LOH), která je nalézána u mnoha karcinomů prsu. Mutace v genu *TP53* dobře korelují se zvýšenou nukleární expresí proteinu p53 v imunohistochemii (IHC). Somatické mutace genu *TP53* jsou pozorovány také u duktálních karcinomů in situ (DCIS) a invazivních karcinomech prsu (IBCs) a jsou asociovány s velikostí tumoru a vyšším gradem stejně tak jako metastázami v axile. Vysoký počet *TP53* mutací bývá nalezen u nositelů *BRCA1/BRCA2* mutace. Přítomnost *TP53* mutací je spojována se špatnou prognózou, kratším DFS a OS jak u karcinomů s metastázami v uzlinách tak bez nich¹.

ESR1 gen

Mutace v *ESR1* genu jsou raritně nacházeny u primárních karcinomů prsu v době diagnózy, ale jsou v 55% identifikovány u ER pozitivních metastatických karcinomů prsu, které byly léčeny antiestrogenní terapií. Tyto mutace způsobují konstitutivní ligand-independentní aktivaci ER transkripce a $E\alpha$ exprese a mohou způsobit antiestrogenní rezistenci¹⁹⁻²².

Alelická imbalance (gene copy number alteration)

Alelická imbalance je u karcinomu prsu poměrně častá, vyskytuje se přibližně v 50% případů. Je popisována jak amplifikace genů, tak i jejich delece. Amplifikace je velice často spojována se zvýšením hladiny mRNA transkriptu a exprese proteinu postižených genů, naopak delece je asociována se ztrátou exprese a funkce. Mezi nejčastější amplifikované onkogeny patří gen *HER2*, často koamplifikován s genem *TOP2A* (zmnožení lokusu 17q12), *MYC* gen (zmnožení lokusu 8p24), *CCND1* gen (zmnožení lokusu 11q13), amplifikace genu *ESR1* (zmnožení lokusu 6p11) a amplifikace genu *FGFR1* (zmnožení lokusu 8p11.3). Gen *TOP2A* je koamplifikován přibližně u 50% *HER2* amplifikovaných případů a jeho zmnožení (popř. delece) bývají spojovány s citlivostí na léčbu inhibitory topoizomerázy II alfa, (antracykliny apod.). Nicméně jeho prediktivní význam dosud nebyl spolehlivě prokázán. Amplifikace genu *ESR1* je nalezána u 5-10% případů karcinomu prsu a je spojována se zvýšením exprese estrogenu a tedy s lepší léčebnou odpovědí na endokrinní terapii.

MYC gen je velice často amplifikován u mnoha různých typů nádorů včetně karcinomu prsu, reguluje buněčný růst a proliferaci a amplifikace je asociována s vyšším histologickým gradem nádoru, vysokou proliferací a časnou rekurencí nádoru a časným úmrtím. Koamplifikace *MYC* a *HER2* genů jejíž výskyt je u karcinomu prsu poměrně frekventní, je spojována s lepší odpovědí na léčbu trastuzumabem ve srovnání s nádory se samostatnou amplifikací genu *HER2*.

Amplifikace genu *CCND1* se vyskytuje u 20% karcinomů prsu a je signifikantně vyšší u ER+/PR+ lobulárních karcinomů. Koamplifikace genů *CCND1* a *MYC* je asociována s agresivním fenotypem nádoru¹.

Gen *FGFR1* je amplifikován přibližně u 10% karcinomů prsu. Typicky je asociován s ER+, PR+ a HER2- fenotypem a s horší prognózou (amplifikace *FGFR1* genu je spojována s rezistencí na endokrinní terapii nádoru).

Amplifikace genu *MDM2*, která byla také u karcinomu prsu prokázána, je asociována s horšími výsledky léčby u pacientů bez postižení uzlin¹.

Molekulární klasifikace karcinomu prsu

Karcinom prsu je prvním onemocněním, u kterého byl rutinní klinický management onemocnění ovlivněn laboratorním výzkumem a to od diagnózy až k terapeutickým rozhodnutím. Molekulární mechanismus odpovědný za rozvoj karcinomu prsu není ještě zcela objasněn. Je známo, že karcinomy prsu zahrnují velké množství mutací a díky možnostem celogenomového sekvenování bylo v některých recentních studiích prokázáno více než 50 somatických bodových mutací (zahrnujících geny *JAK2*, *PTCH2*, *CSMD1*, *NRK*, *TP53*, *MAP3K8*), 28 velkých delecí, 6 inverzí a 7 translokací¹. Byly nalezeny rozdíly v molekulárních profilech u obvyklých histologických subtypů karcinomů. Například medulární karcinomy vykazují významnou T buněčnou imunitní odpověď, adenoidní cystický karcinom prsu vykazuje translokaci t(6;9), která zahrnuje *MYB-NFIB* fúzní transkript, sekretorní karcinomy jsou asociovány s translokací t(12;15) se vznikem *ETV6-NTRK3* fúzního transkriptu, mikropapilární karcinomy se vyznačují významným počtem uzlinových metastáz a velmi často mají vysokou amplifikaci genu *FGFR1*. Metaplastické karcinomy prsu jsou typicky asociované s *PI3K/AKT* mutacemi a ve více než 90% jsou HER2 a ER negativní. U více než 60% těchto metaplastických karcinomů dochází k metylaci promotoru *BRCA1* genu zamezující expresi genu, což má za následek nefunkční BRCA1 signální dráhu¹.

Aplikace expresních analýz genů s využitím nových array technologií je největším pokrokem v pochopení biologické heterogenity u karcinomu prsu. cDNA microarray studie genových expresí pomohly ke vzniku molekulárních subtypů tohoto nádoru. V současnosti se karcinomy prsu dělí na základě IHC metod do těchto podskupin:

Luminal A – ER(+), HER2(-), Ki-67 low

Luminal B – ER(+), HER2(-), Ki-67 high

Luminal HER2 – ER(+), HER2(+)

HER2 Classic – ER(-), HER2(+)

Basal Phenotype – ER(-), HER2(-), CK5/6 a/nebo EGFR(+)

Non basal, Normal -Breast Phenotype – ER(-), HER2(-), CK5/6 a EGFR(-) (Ref⁵)

Luminalní A typy karcinomů jsou typicky nižšího gradu s dobrou prognózou a s vysokou expresí ER aktivujících genů. Luminalní B typ karcinomy mají většinou vyšší histologický grade, vykazují vyšší proliferační aktivitu, mají nižší hladinu exprese steroidních receptorů a mají horší prognózu než nádory typu luminal A. Obě dvě skupiny těchto nádorů odpovídají na hormonální terapii. Současná data navíc potvrzují prognostickou signifikanci Ki-67 a hormonálních receptorů. Byl prokázán signifikantní rozdíl v přežití u dvou skupin pacientů, které byly stratifikovány na základě exprese Ki-67 na skupinu s nízkou ($\leq 14\%$) a s vysokou ($> 14\%$) proliferací. Nejvyšší prognostickou hodnotu u těchto typů karcinomů má však kombinace všech tří markerů (ER, PR, Ki-67). Karcinomy typu HER2 Classic bývají vyššího gradu, s postižením uzlin a ER a PR negativní, avšak často exprimují androgenní receptor. Přestože mají špatnou prognózu z důvodu vysokého počtu relapsů, reagují na léčbu trastuzumabem a léčbu antracykliny. Karcinomy basal like (basal fenotyp) tvoří 10-20% karcinomů prsu. Vysoké procento těchto karcinomů je triple negativních (TNB), s vysokým histologickým gradem a vysokým mitotickým indexem. Často také mají sklon k hematogennímu šíření a metastázování do mozku a plic bez postižení axilárních uzlin.

Tento typ karcinomů patří do skupiny nádorů vznikajících na základě dědičné predispozice – mnoho karcinomů s *BRCA1* mutací jsou basal like typy. Navíc u 50% těchto karcinomů se vyskytuje mutace genu *TP53*. Speciální skupinu karcinomů prsu (10-20%) tvoří karcinomy s negativitou ER, PR, a HER2, tzv. triple negativní karcinomy, které jsou charakteristické agresivním chováním s krátkou dobou bez nemoci (DFS) a kratším celkovým přežitím (OS). Tuto skupinu nádorů tvoří heterogenní molekulární subtypy a v současnosti není pro tento typ karcinomů dostupná cílená terapie²³.

Hereditární karcinomy prsu

Zvláštní skupinu karcinomů prsu tvoří hereditární karcinomy prsu (5-6%). Obecně je tato skupina charakterizována časným nástupem onemocnění, bilaterálním postižením, vyšší frekvencí multiplicitních primárních nádorů (např. karcinom prsu a karcinom ovaria) a autozomálně dominantní dědičností. Typicky jsou u těchto karcinomů nalézány mutace v genech *BRCA1*, *BRCA2*(Ref¹).

BRCA1 gen se nachází na chromosomu 17 (lokus 17q21.31). Bylo popsáno 1643 mutací tohoto genu, z čehož 890 se vyskytlo pouze jedenkrát. V *BRCA2* genu, který se nachází na chromosomu 13 (lokus 13q13.1) bylo nalezeno přibližně 1856 mutací.

Buňky se ztrátou funkční aktivity genu *BRCA1* a *BRCA2* jsou náchylné k chybám v replikaci a ke genomové instabilitě, které vedou k akumulaci abnormalit v DNA a mutací. Navíc funkce genu *BRCA1* je nutná pro transaktivaci promotoru *ER* genu, což může objasňovat fakt, že 90% *BRCA1* asociovaných karcinomů je ER negativních. V ženské populaci je přibližně 45% hereditárních karcinomů prsu s mutací v *BRCA1* genu, při současném výskytu karcinomu prsu a ovaria je mutace v *BRCA1* genu nalezena až v 80% případů. Celoživotní riziko vzniku karcinomu prsu u nositelů mutace v *BRCA1* a *BRCA2* genu je 85% a 15% pro karcinom ovaria. Celkově se prognóza vývoje onemocnění u *BRCA1/BRCA2* mutované populace zdá být podobná jako u non *BRCA* pacientů, avšak

existují jisté kontroverzní poznatky. Některé nové studie ukazují, že pacienti s mutací v *BRCA1* genu mají lepší přežití ve srovnání s non *BRCA* pacienty, a že u karcinomů prsu s mutacemi v *BRCA2* genu je prognóza horší.

BRCA1 mutované karcinomy jsou nejčastěji invazivní duktální karcinomy s medulárními rysy, high grade, s pozitivitou estrogenu pouze v 10% případech, často *HER2* negativní a *p53* pozitivní. V mnohých studiích byl u *BRCA1* pozitivního hereditárního karcinom prsu prokázán triple negativní fenotyp. Histologické rysy nádoru, jako jsou vysoká mitotická aktivita, prominující lymfocytární infiltrát, expanzivní okraje nádoru a minimální tvorba tubulárních struktur, jsou významně prediktivní pro *BRCA1* mutaci.

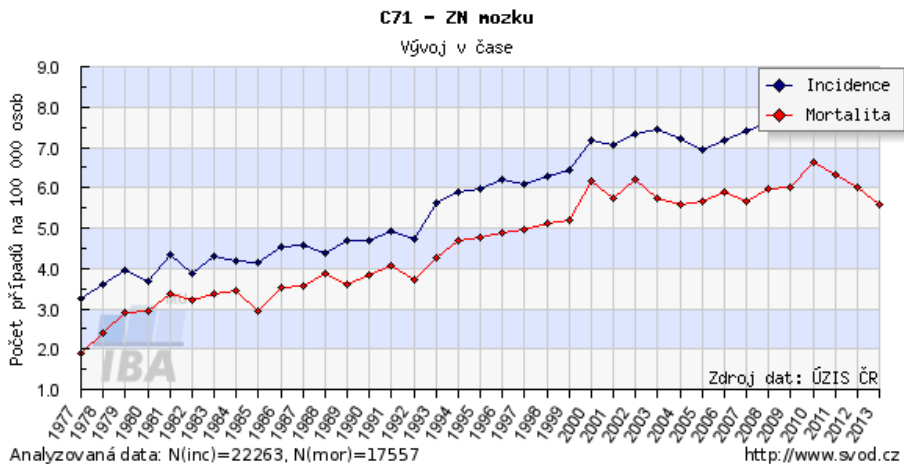
Tumory asociované s mutací v genu *BRCA2* bývají častěji lobulární karcinomy, s minimální tvorbou tubulárních struktur, s nízkým gradem, v 70% ER pozitivní, často *HER2* a *p53* negativní¹. Karcinomy prsu s *BRCA2* mutací mají mnohem variabilnější fenotyp než *BRCA1* mutované karcinomy a exprese ER/PR vypadá stejně nebo podobně jako u non *BRCA* karcinomů.

V posledním desetiletí také stále probíhá hledání robustních prognostických markerů pro zlepšení stratifikace pacientů léčených chemoterapií podle rizika rekurence a pro individualizaci léčby podle genových expresních profilů a pro snížení morbidity a mortality. Bylo vyvinuto několik komerčně dostupných testů, mezi které patří například H/I Ratio (Breast Cancer Index) u pacientek léčených v monoterapii tamoxifenem, založený na poměru relativních hladin exprese mRNA *HOXB13* genu a *IL17BRF* genu. Vysoký H/I poměr koreluje s agresivním chováním nádoru a selháním terapie a je také prediktorem pozdní rekurence nádoru (10let). Může identifikovat pacientky, které budou profitovat s prolongované terapie tamoxifenem. Naopak může také identifikovat pacientky, které nevyžadují další terapii po 5 letech léčby tamoxifenem. Mezi nejznámější komerční testy patří také Oncotype DX, který identifikuje 21 genů (16 nádorových a 5 referenčních). Tento test

stratifikuje pacientky s ER pozitivním, HER2 negativním typem karcinomu prsu, velikosti od 1,1 – 5,0 cm v největším rozměru bez postižení axilárních uzlin do skupin s nízkým, vysokým a středním rizikem rozvoje vzdálené rekurence nádoru v průběhu 10 let po ukončení léčby tamoxifenem. U tohoto testu byla provedena prospektivní klinická evaluace TAILORx a byl validován jako prognostický test a prediktivní test léčebné odpovědi. Dalšími testy jsou MammaPrint, který využívá techniku microarray a analyzuje 70 genů a jehož prospektivní klinická evaluace ještě stále probíhá, Prosigna Breast BioClassifier, Rotterdam Gene Signature, Invasive gene signature, Mammostrat, SET index, Endopredict (11 genů), MapQant Dx (97 genů) (Ref²³).

1.2.4 Nádory centrálního nervového systému (CNS)

Nádory mozku tvoří skupina různorodých typů nádorů, které se dělí na dvě velké skupiny gliální a nongliální tumory, s dalším širokým členěním do podskupin podle platné WHO klasifikace z roku 2007. Mezi tumory neuroepiteliální tkáně patří především astrocytární, oligodendroglialní, oligoastrocytární, ependymální tumory, nádory choroidního plexu, skupina vymezených „dalších“ neuroepiteliálních tumorů, neuronální a smíšené neuronální- gliální tumory, nádory epifyzální oblasti a embryonální tumory. Další skupiny tvoří nádory hlavových a paraspinálních nervů, meningeální tumory, hematopoetické neoplazie, germinální tumory, nádory tureckého sedla a metastatické tumory.



Graf 4: Incidence a mortalita nádorů CNS v České republice v letech 1977-2013 (Ref²).

Přestože morfologie a imunohistochemické vyšetření tvoří zlatý standard v diagnostice nádorů mozku, molekulárně genetické techniky a cytogenetické analýzy hrají stále větší roli při doplňování a zpřesňování klasifikace u diagnosticky obtížných případů a jsou využívány pro prognózu onemocnění. Současné nálezy ukazují, že genetické alterace mohou mít vliv na přežití nebo terapeutickou odpověď u některých mozkových nádorů. Terapie onemocnění je ztížena zejména z důvodu lokalizace nádorů, přítomnosti hemato-encefalické bariéry (bránící průniku léčiv určité molekulární velikosti) a díky případnému difuznímu charakteru růstu těchto nádorů. Jsou intenzivně hledány nové biologické cíle, které by umožnily aplikaci nových léčiv.

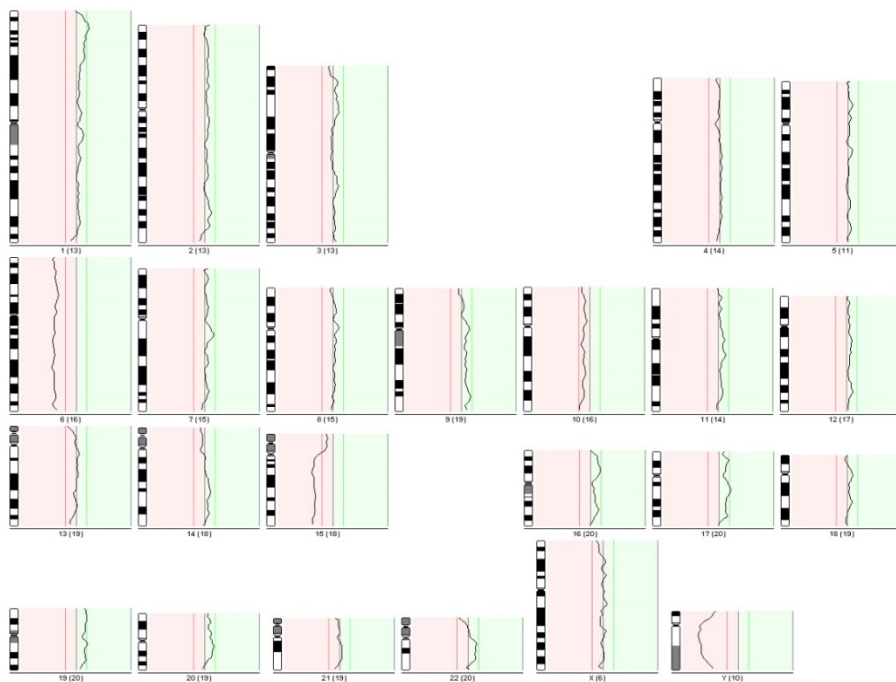
Nongliální tumory

V této skupině nádorů (jedná se převážně o meduloblastom a meningeom) byly identifikovány četné genetické aberace, zahrnující delece chromosomů nebo jejich částí včetně inaktivace tumorsupresorových genů, které se v těchto regionech nacházejí, nebo aktivace onkogenů. Nejčastější genetickou aberací je delece 17p (u 30-60% meduloblastomů), jejímž důsledkem pak může být duplikace dlouhých ramen chromosomu a

vznik isochromosomu 17q. Abnormality 17p jsou v některých studiích uváděny v souvislosti s agresivnějším chováním nádoru. Imunohistochemická overexprese p53 pak koreluje s horším přežíváním pacientů. Se špatnou prognózou bývá také spojena amplifikace genu *MYC* a také zmnožení oblasti 1q. Delece chromosomu 10 zahrnující oblast *PTEN* genu a *DMBT1* genu je detekována u 80% meduloblastomů.

U této skupiny nádorů bývají nalézány aberace také dalších chromosomů, např. zvýšený počet chromosomu 7, isochromosom 12p, ztráta chromosomu 11, alelické ztráty 1p, 6q, 9q, 10q, 14q, 17p, 18q a další (Obr. 10).

Ztráta chromosomu 22, obvykle ve formě monozomie 22 nebo delece regionu 22q je nejčastější genetickou aberací u meningeomů (40-70%). Tato delece zahrnuje také ztrátu významného tumorsupresorového genu *NF2*, který je na chromosomu 22 lokalizován v oblasti 22q12. Inaktivační mutace tohoto genu bývá přítomna u přibližně 70% případů sporadických meningeomů a 60% schwannomů. Ztráta 1p a 14q je spojena s meningeomy gr. II a III, současná ztráta 1p/14q je spojená s vyšším rizikem rekurence nádoru a s vyšším rizikem progresu. Tento marker je často prediktorem rizika rekurence u meningeomů gr. I dle histopatologického nálezu^{24,25}. Velmi častou ztrátou u anaplastických meningeomů (gr. III) je delece *CDNK2A(p16)* genu v regionu 9p21. Tato delece je signifikantně prognostická a indikuje horší výsledky léčby.



Obr. 10: Komparativní genová hybridizace (CGH analýza) – meduloblastom, delece chromosomů 6, 15, Y u pacienta vyšetřeného v CGB laboratoři a.s.

Gliální tumory

Jsou to nejčastěji se vyskytující nádory CNS, tvoří heterogenní skupinu a přibližně zahrnují až 40% primárních neoplazií CNS. Difúzní astrocytomy, především glioblastomy, jsou nejvíce studované gliomy v posledních dvou desetiletích. Molekulární alterace u gliomů tvoří komplex zahrnující inaktivaci mnoha tumorsupresorových genů a aktivaci mnoha protoonkogenů. V nedávné době byly publikovány články, které hovoří o reklasifikaci gliomů na základě molekulárních markerů²⁶.

Genetické alterace u gliomů

Byla popsána řada genetických aberací, mající vliv na vývoj či agresivitu gliomů. Pravdou zůstává, že jedinou dostupnou léčbou pro tyto pacienty

je mimo chirurgického zákroku pouze temozolomid a ozařování. Z tohoto důvodu jsou intenzivně zkoumány nové i stávající onko-markery, se snahou nalézt vhodný terapeutický cíl.

Za prvotní událost v tumorigenezi gliomů je v současné době považována mutace v isocitrát dehydrogenáze^{27,28}. Mutace zasahuje gen *IDH1*, méně frekventně gen *IDH2*. *IDH1* gen (isocitrate dehydrogenase-1) je lokalizován na chromosomu 2, lokus 2p33. Kóduje *IDH1* cytoplazmatický protein, který ovlivňuje tvorbu důležitého intracelulárního antioxidantu NADPH. *IDH1* mutace jsou nalézány především u difúzních gliomů grade II a grade III (v 60-80%) a u sekundárních glioblastomů (více než v 80%). U primárních glioblastomů je jejich výskyt raritní (méně než 5%) (Ref^{26,29}). *IDH1* je vysoce exprimován v oligodendrogliomech a oligoastrocytomech (více než 80%). Nejčastější mutací *IDH1* genu je mutace v kodonu 132. Mutace *IDH1* genu přímo koreluje s mladším věkem v době diagnózy, přítomností *TP53* mutace, kombinovanou delecí 1p/19q a metylací promotoru *MGMT* genu. Role *IDH1* mutačního statusu jako prediktivního markeru není dosud zřejmá a neexistuje dosud cílená léčba. Nicméně mutace v *IDH1/2* genech jsou spojeny s dobrou prognózou³⁰. Bylo prokázáno, že 50-70% low grade a anaplastických oligodendrogliomů vykazuje kombinovanou delecí 1p/19q, která je asociována s chemosenzitivitou^{24,26,31}. Tato delece je výsledkem translokace t (1;19) je spojena s gliomy s oligo komponentou (oligodendrogliony a oligoastrocytomy) (Ref^{26,32}). Na chromosomu 1 je lokalizován gen *FUBP1*, což je transkripční modulátor genu *MYC*, na chromosomu 19 je lokalizován gen *CIC*, který funguje jako represor EGFR, RAS/RAF a MAPK signálních drah²⁴.

Díky využití těchto robusních molekulárních markerů (status *IDH1* genu a kodelece 1p/19q) mohou být difúzní gliomy děleny do skupin. Tumory s kodelecí 1p/19q a s mutací v genu *IDH1* mají příznivější léčebnou odpověď a dobrou prognózu. Nádory, které mají mutaci v genu *IDH1* a nemají delecí 1p/19q tvoří prognostický střed, zatímco „double negativní“ nádory (bez mutace a bez delece) mají nejhorší léčebnou odpověď a špatnou prognózu. Tato stratifikace je platná jak pro difúzní gliomy gradu II, tak i gradu III (Tab. 1). Získaná data potvrzují, že tato molekulární

subklasifikace je objektivní, reprodukovatelná a je silným prediktorem odpovědi na terapii²⁴.

WHO grade II-III diffuse glioma		
IDH1/2 mutant		IDH1/2 wild-type
1p/19q co-deleted	1p/19q non-co-deleted	
<i>TERT</i> promoter	<i>ATRX</i>	<i>TERT</i> promoter
<i>FUBP1/CIC</i>	<i>TP53</i>	<i>EGFR</i> amplification <i>PTEN</i> loss 10q, 9p loss <i>PI3K/AKT</i> pathway activation
Molecular Oligodendroglioma	Molecular Astrocytoma	Molecular Glioblastoma
Best prognosis	Intermediate prognosis	Worse prognosis

Tab. 1: Navrhovaná molekulární klasifikace WHO grade II-III u difúzního gliomu²⁶.

Inaktivace tumorsupresorového genu *TP53* byla považována za časnou událost v tumorigenezi glioblastomů a vyskytuje se u nízkostupňových gliomů, které později progredují směrem k sekundárnímu glioblastomu. Mutace *TP53* genu je genetickým znakem sekundárních glioblastomů (více než 60%) a je pozorována u více než 60% astrocytomů grade II. *TP53* mutace je však také pozorována u přibližně 25% primárních (de novo) glioblastomů, avšak základní mechanismus těchto mutací je u primárních a sekundárních glioblastomů odlišný. *TP53* mutace koreluje s nízkým věkem pacientů a velkobuněčným typem glioblastomu. Imunohistochemická exprese p53 nemusí vždy indikovat přítomnost mutace *TP53* genu, konkordance je 74%.

MDM2 gen – mouse double minute gen je lokalizován na chromosomu 12, lokusu 12q14.3-14.5, kóduje transkripční faktor, který inhibuje aktivitu wild type p53 proteinu a podporuje jeho degradaci, vytváří alternativní mechanismus pro únik z buněčné regulace. *MDM2*

amplifikace a imunohistochemická exprese je pozorována u 10%, respektive u 50% primárních glioblastomů. Overexprese *MDM2* je některými autory považována za negativní prognostický indikátor.

MDM4 gen vykazuje podobné charakteristiky jako *MDM2* gen, ale je lokalizován na chromosomu 1, lokus 1q32.

p14^{ARF} gen – podobně jako geny *CDKN2A* a *CDKN2B* je lokalizován na chromosomu 9, lokus 9p21, kóduje protein, který se přímo váže na *MDM2* a inhibuje *MDM2* zprostředkovanou degradaci p53. Homozygótní delece nebo hypermetylace genu *p14^{ARF}*, která se vyskytuje u difúzních astrocytomů (v 1/3 případů) a u glioblastomů (v 50% u primárních a v 75% u sekundárních), dereguluje funkci p53 při absenci mutace *TP53* genu. Naopak *p14^{ARF}* exprese je negativně regulována p53. (Ref.¹)

CDKN2A (*p16^{INK4a}*) gen kontroluje přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu. Proto každá alterace exprese tohoto genu má za následek ztrátu kontroly buněčného cyklu. *CDKN2A* (*p16^{INK4a}*) a *CDKN2B* (*p15*) geny kódují proteiny p16 a p15, které působí jako negativní regulátory buněčného cyklu inhibicí cyklin dependentních kináz. *CDKN2A* homozygótní delece a hypermetylace se vyskytuje u anaplastických astrocytomů a glioblastomů. Stejně tak *RBI* gen, který je lokalizován na chromosomu 13, lokus 13q14, je také regulátorem buněčného cyklu. *RBI* hypermetylace je častěji pozorována u sekundárních glioblastomů (43%) než u primárních glioblastomů (14%). Nebyla však nalezena u anaplastického astrocytomu¹.

CDK4 gen, který je lokalizován na chromosomu 12, lokus 12q13-14 je amplifikován u přibližně 15% high grade gliomů, obvykle pokud není přítomna delece *CDKN2A* genu. Podobně také gen *CDK6*, který se nachází na chromosomu 7, lokusu 7q21-22. *CDK4/CDK6* amplifikace, cyklin D1 overexprese a/nebo *RB1* overexprese mají podobný vliv jako *CDKN2A/CDKN2B* mutace a jsou vzájemně exkluzivní.

PTEN gen (chromosom 10, lokus 10q23.3) je často mutovaný u mnoha typů pokročilých karcinomů a je často deletován také u glioblastomů. Mutace *PTEN* genu jsou příčinou formování gliomů a jejich progresu.

Jsou nalézány u 15-40% glioblastomů, zejména u primárních glioblastomů. Homozygótní delece tohoto genu je velice raritní. Společně s genem *PTEN* bývá také deletován u glioblastomů gen *DMBT1*, který je lokalizován také na dlouhých ramenech chromosomu 10, lokus 10q25.3-26.1. Všeobecně ztráta heterozygoty (LOH) na chromosomu 10 (regionu nebo celého chromosomu) je genetickým markerem glioblastomů obou typů (60-90%). Tato LOH chromosomu 10 je spojována s progresí anaplastického astrocytomu do sekundárního GBM (Ref.¹).

Protoonkogen *EGFR* je velice často amplifikován u primárních glioblastomů (40-60%), raritně u sekundárních glioblastomů (u sekundárních glioblastomů je znám výskyt polyzomie chromozomu 7). Tato amplifikace *EGFR* bývá typicky provázena overexpresí na proteinové úrovni a koreluje s amplifikací v 70-90%. U 50-60% pacientů s amplifikací *EGFR* genu je také exprimována zkrácená varianta EGFR receptoru, EGFRvIII, která je konstitutivně aktivovaná nezávisle na vazbě ligandu²⁴. *EGFR* amplifikace je spojena s vyšším věkem pacientů a malobuněčným typem glioblastomů. Společně s *EGFR* amplifikací se také obvykle vyskytuje delece *CDKN2A* genu. Mutace *EGFR* genu zvyšuje nádorovou proliferaci, invazivitu, rezistenci k cytotoxické terapii a zhoršuje prognózu pacientů²⁴ a má antiapoptotický efekt. Následkem je rezistence na chemoterapii, avšak *EGFR* může být terapeutickým cílem s využitím inhibitorů EGFR tyrozinkináz.

PDGFR – platelet derived growth factor receptor je tyrozin kinázový receptor kódovaný genem *PDGF*, který je lokalizován na chromosomu 4, lokus 4q12. *PDGF* gen má tři známé ligandy a dva receptory kináz (*PDGFRA* a *PDGFRB*) je exprimován buňkami astrocytomů. *PDGFRA* gen je amplifikován pouze v malé podskupině glioblastomů. Amplifikace *PDGFRA* u sekundárních GBM s mutací v *IDH 1/2* genu je spojována s horší prognózou a taktéž je negativním prognostickým markerem u gliomů gr. III (Ref³³).

Cyklin D1 (*CCND1*) lokalizovaný na chromosomu 11, lokus 11q13 a cyklin D3 (*CCND3*), který se nachází na chromosomu 6, lokus 6p21, jsou

podobně jako geny *CDK4* a *CDK6* regulátory buněčného cyklu při přechodu z G1 fáze do S fáze. Amplifikace nebo overexprese těchto genů se vyskytuje u primárních glioblastomů¹.

ATRX a TERT promotorové mutace u gliomů a jejich vliv na telomery

U nádorů jsou telomery udržovány telomerázou nebo nezávislým mechanismem, který se nazývá ALT (Alternative lengthening of telomeres) (Ref²⁶). Dva vzájemně se vylučující mechanismy byly popsány u *IDH* mutančních WHO grade II-III gliomů. Prvním mechanismem je ztráta normální funkce ATRX proteinu, který udržuje integritu chromatinu pro replikaci. *ATRX* gen (alpha thalassemia/mental retardation syndrom X-linked) kóduje podjednotku chromatin remodeling komplexu, který je klíčový v inkorporaci histonu H3.3 do heterochromatinu centromer a telomer³³. Tento mechanismus je popsán u *IDH* mutančních, 1p/19q neodeletovaných gliomů (astrocytomů). Druhým mechanismem je bodová mutace v *TERT* promotoru. *TERT* kóduje katalytickou podjednotku telomerázy. Telomeráza je RNA dependentní polymeráza sestávající z *TERT* (katalytické) podjednotky a *TERC* (templát pro extenzi telomer). U gliomů byly popsány dvě mutace vzájemně se vylučující - C228T a C250T. Většina studií popisuje zlepšené přežívání u pacientů s *IDH* mutací, *TERT* promotorovou mutací. *TERT* mutace jsou negativním prognostickým markerem u *IDH* wild typ grade II-III gliomů a primárních GBM³³.

Na základě molekulárního profilování a výsledků TCGA Research Network studie byly GBM rozděleny na 4 subtypy: proneurální, mesenchymální, neurální a klasický³⁴.

Epigenetické změny

Současná data nasvědčují, že aberantní metylace genů je častější než genetické alterace, zejména u low grade astrocytomů. U astrocytomů a především u glioblastomů byly identifikovány geny, u kterých dochází k hypermetylacii promotorů. Jedná se o regulátory buněčného cyklu, mezi které patří *CDNK2A*, *CDNK2B*, *RBI*, *p14^{ARF}* a *TP53* gen. Dále také geny

související s apoptózou jako např. *APAF1* a *MGMT* gen, který kóduje DNA repair enzym O⁶-methylguanine-DNA methyltransferázu. Metylace promotoru *MGMT* je frekventně přítomna u glioblastomů a high grade gliomů (40% prim GBM, 70% sek GBM, 50% anaplastické astrocytomy) a je silně asociována s kódelecí 1p/19q, IDH1/2 mutací a G-CIMP fenotypem. Metylace *MGMT* promotoru je prediktivním markerem příznivé léčebné odpovědi na temozoloid a nitrosoureu²⁴ a je asociována s delším přežitím pacientů s glioblastomem léčených temozolomidem (TMZ). Nicméně metylace *MGMT* promotoru má také prognostický význam u starších pacientů s glioblastomy bez ohledu na TMZ terapii.

G-CIMP (glioma- CpG- Island methylator phenotype)

G-CIMP fenotyp vede k umlčení specifických genů díky metylaci jejich promotorů. Tyto geny jsou zahrnuty do buněčné adheze, regulace transkripce, metabolických procesů a syntézy NK. Tento fenotyp je asociován s mladším věkem, s proneurálním typem GBM, s IDH1/2 mutacemi a TP53 mutacemi. U tohoto fenotypu je nízká frekvence PTEN, NF1 a EGFR mutací. Předpokládá se, že G-CIMP je spojen s mutacemi v IDH1/2 genech²⁴.

Přehled prediktivních a prognostických markerů u gliomů dětí a dospělých je uveden v Tab. 2.

Biomarker	Diagnostic	Prognostic	Predictive	Comment
ADULT GLIOMAS				
IDH1 mutations	+	+	-	DNA sequence or protein level biomarker; commonly mutated in low grade and secondary GBM (20); negative in non-neoplastic glioma mimickers; has prognostic value in WHO Grade III and IV GBM (22, 23)
MGMT promoter methylation	(+)	+	+	An epigenetic biomarker in GBM with a putative diagnostic role in detecting pseudoprogression (190); indicates an improved prognosis in malignant glioma (191) and predicts an improved PFS with TMZ chemotherapy and RT vs. RT alone (52, 53)
1p/19q Co-deletion	+	+	+	Chromosome level biomarker commonly found in oligodendroglial tumors (192); associated with an overall better prognosis (193) and predicts improved survival benefit in response to chemotherapy and RT vs. RT alone (68, 69)
EGFR amplification/EGFRVIII mutation	(+)	(+)	(+)	A gene level biomarker frequently altered in GBM (194); with putative prognostic validity (103–105); a potential predictive biomarker for molecular therapies (113)
PTEN	-	+	(+)	A gene level biomarker, LOH of which is associated with poor survival outcomes for both anaplastic astrocytomas and GBM (92). The lost or inactive state of PTEN has been linked to the resistance of targeted EGFR inhibitors in GBM (93)
PDGFRA	-	+	-	A gene level biomarker; PDGFRA amplification has recently been shown to be associated with a poor prognosis in IDH1 mutant GBM (117) and have a negative prognostic value in Grade III gliomas (118)
PEDIATRIC GLIOMAS				
KIAA1549:BRAF	+	+	-	A gene level biomarker commonly detected in PA (153) and PMA (167); has prognostic validity in PA and WHO Grade II astrocytomas (156)
BRAF ^{V600E}	+	(+)	(+)	A gene level biomarker commonly seen in supratentorial PA, PXA, or GG (154); has putative roles as a prognostic (165) and predictive biomarker (166). Vemurafenib may improve outcomes in adults with recurrent BRAF ^{V600E} mutated PXA (170)
K27M-H3.3	-	+	-	An epigenetic biomarker conferring a worse OS in DIPG (145)

⁺Current evidence based glioma biomarker.

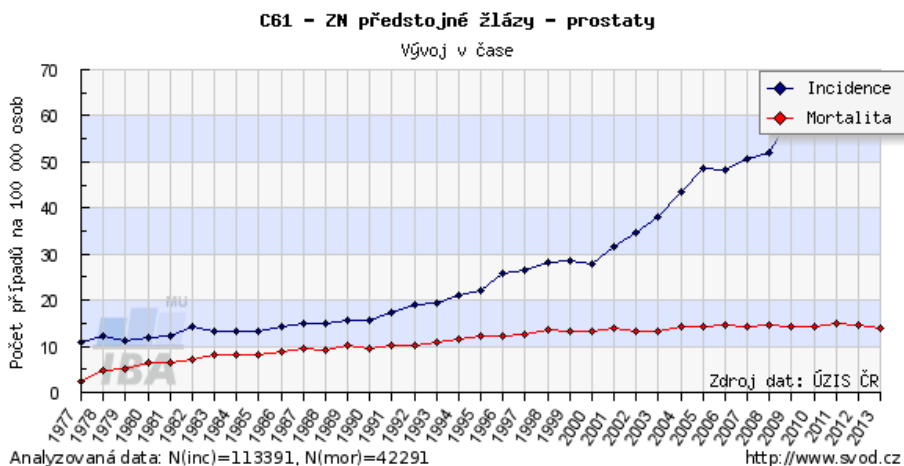
⁽⁺⁾Putative glioma biomarker under current investigation.

TMZ, temozolomide; RT, radiotherapy; PFS, progression free survival; OS, overall survival; GBM, glioblastoma multiforme; AO, anaplastic oligodendrogloma; PA, pilocytic astrocytoma; PMA, pilomyxoid astrocytoma; PXA, pleomorphic xanthoastrocytoma; GG, ganglioglioma; DIPG, diffuse intrinsic pontine glioma.

Tab. 2: Prediktivní a prognostické markery u gliomů dětí a dospělých³³.

1.2.5 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty je nejčastější mimokožní malignitou u mužů.



Graf 5: Incidence a mortalita karcinomů prostaty v České republice v letech 1977-2013 (Ref²).

Mezi faktory, které ovlivňují vznik a progresi karcinomu prostaty, patří genetické a hereditární faktory, stravovací návyky, hormonální alterace a záněty, popřípadě infekce. Histologicky je rozeznáváno několik typů: adenokarcinom acinární, vyskytuje se až v 95% karcinomů prostaty a nejčastěji vzniká v periferní oblasti žlázy (v 75% v dorzálním laloku), malobuněčný karcinom, který neprodukuje PSA, karcinom z urotelu, dlaždicobuněčný karcinom a vzácně se vyskytující sarkom. Pro stanovení gradu nádoru se v praxi užívá tzv. Gleasonova klasifikace, která spočívá v hodnocení architektiky nádorových žlázek pomocí stupnice 1-5. Gleasonovo skóre je součet dvou nejčastěji se vyskytujícími typů nádorových žlázek 1-5, s tím, že 2-4 je grade 1 – dobře diferencovaný karcinom, Gleasonovo skóre 5-6 je grade 2 - středně diferencovaný karcinom a Gleasonovo skóre 7-10 je grade 3-4 – níže diferencovaný/nediferencovaný karcinom.

Pro detekci a monitoring karcinomu prostaty se standardně používá hodnota prostatického specifického antigenu (PSA) v séru. K diagnostice je využívána transrektální biopsie pro získání histologického materiálu.

Nízká specifita PSA antigenu vede k nadužívání biopsie, ale také k případům, u kterých došlo ke špatné diagnóze z důvodů limitace tohoto druhu vyšetření (např. špatné lokalizace odběru). Prognóza a strategie léčby je založena na histologickém gradu a Gleasonově skóre. Prekurzorem pro vznik invazivního karcinomu prostaty je high grade prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN).

Karcinogeneze prostaty zahrnuje mnohočetné genetické změny včetně ztrát specifických genomických sekvencí, které mohou být asociovány s inaktivací tumor supresorových genů a zmnožením části chromosomů, které mohou souviset s aktivací onkogenů. Mezi nejčastější genetické aberace v PIN i karcinomech prostaty patří *TMPRSS2-EGFR* translokace, zmnožení chromosomu 7, především oblasti 7q31, ztráta 8p a zmnožení 8q, ztráta 10q, 16q a 18q. Avšak vzhledem k enormní komplexitě genetických změn a heterogenitě karcinomu prostaty jak na buněčné úrovni, tak z hlediska multifokality, není v současnosti dostupná jednotná molekulární klasifikace karcinomu prostaty⁵.

DNA ploidie

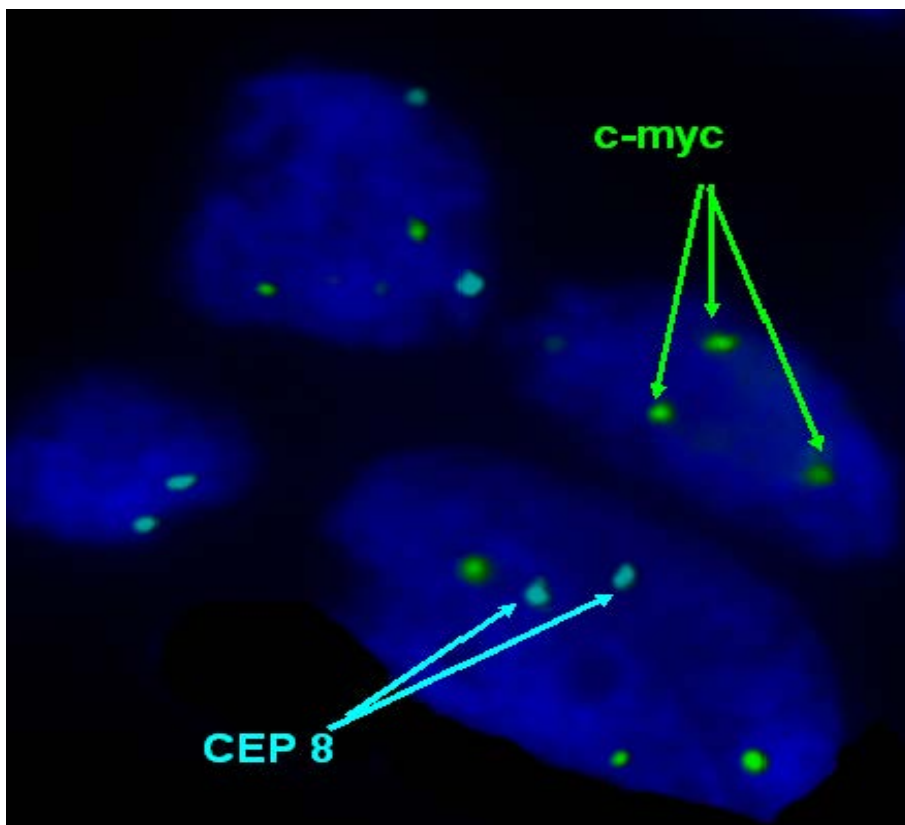
Je prokázáno, že DNA ploidie dobře koreluje s histologickým gradem a pacienti s diploidními tumory mají lepší výsledky než pacienti s aneuploidii. Avšak ploidie je v karcinomu prostaty velice heterogenní a pro její stanovení je nutno analyzovat vícečetné biopsie. Incidence aneuploidii u high grade PIN lézí se pohybuje mezi 32-68% a u karcinomů v rozmezí 55-62%, přičemž až 70% aneuploidních případů PIN je asociováno s aneuploidním karcinomem, naproti tomu pouze 29% aneuploidních karcinomů je spojeno s aneuploidní PIN lézí. DNA ploidie koreluje s gradem, velikostí a stupněm (stagingem) karcinomu prostaty. 5leté přežití je 95% u diploidních, 70% u tetraploidních a 25% u aneuploidních karcinomů prostaty a ploidie je významným nezávislým prediktorem rekurence nádoru u pacientů s prostatektomií. Vyšetřování ploidie DNA je v současné době nahrazováno specifitějšími a modernějšími testy⁵.

Genetické alterace u karcinomu prostaty

TMPRSS2-EGFR přestavba zahrnuje fúzi androgen regulujícího genu *TMPRSS2* s členem ETS rodiny transkripčních faktorů *EGFR*. Oba geny se nacházejí na chromosomu 21. Fúze může probíhat dvěma predominantními mechanismy a to buď delecí na chromosomu 21 nebo translokací resultující v inzerci. Tato fúze vede k mnoha změnám, nejčastěji k poruše buněčné diferenciaci, snížení působení androgenů a k invazivitě nádoru. Přítomnost této fúze je považována za časnou událost v karcinogenezi karcinomu prostaty. Fúze *TMPRSS2-EGFR* má zásadní diagnostický význam, je 100% specifická pro karcinom prostaty. Předběžné studie ukazují zvýšenou odpověď při adjuvantní androgenní deprivaci u pacientů, kteří jsou nositeli fúze *TMPRSS2-EGFR*, ale také při přítomnosti *TOP2A* overexpresi⁵.

Mezi další genetické alterace u karcinomu prostaty patří zkracování telomer, které způsobuje chromosomovou instabilitu a je pozorované u případů high- grade PIN a adenokarcinomů⁵.

Nejčastějšími chromosomovými změnami u karcinomu prostaty jsou delece lokusu 8p22 (29-50% v PIN, 32-69% u primárního karcinomu a v 65-100% u metastatického karcinomu), delece lokusu 8p12-8p21, amplifikace (gain) 8q a ztráta heterozygosity. Ztráta heterozygosity, která je popisována až u 69% karcinomů prostaty, je zodpovědná za iniciaci změn vedoucích ke vzniku karcinomu prostaty. Změny na lokusu 8p22, kde se nachází gen pro nádorový supresor *LPL* (lipoprotein lipase), jsou u pacientů s pokročilým karcinomem prostaty asociovány se špatnou prognózou. Část dlouhých ramen chromosomu 8q zahrnuje čtyři potenciální cílové geny - *ElonginC* (8q21), *EIF3S3*, *KIAA0196* a *RAD1* (8q23-q24). Navíc v lokusu 8q24 je lokalizován onkogen *c-MYC*, regulující buněčnou proliferaci a apoptózu. Amplifikace tohoto genu je čtenější u nádorů s vyšším Gleasonovým skóre (Obr. 11)^{5,35}.



Obr. 11: Zmnožení genu *c-MYC*, fluorescenční in situ hybridizace (FISH), ProVysion multicolor FISH (Abbott Molecular) u pacienta s karcinomem prostaty, vyšetřeného v CGB laboratoři a.s.

U karcinomu prostaty jsou prokázány také genetické alterace chromosomu 7, které jsou asociovány s vyšším gradem nádoru a s kratším přežitím. Byla prokázána častá alelická imbalance 7q31, která silně koreluje s agresivitou a progresí karcinomu prostaty. Mezi ostatní chromosomové aberace patří ztráty na chromosomu 16q (30%), nejčastěji v lokusu 16q24.1- q24.2, které souvisí s progresí nádoru, alelické imbalance 18q22.1, 3p25-p26, 5q12-q23,6q, 13q, 17q31.1 a 21q22.2-22.3 (Ref^{5,35}).

Ztráta funkce tumorsupresorových genů u karcinomu prostaty je poměrně častým nálezem. U 20-40% karcinomů prostaty je přítomna delece *PTEN*

genů, tumor supresorového genu, který se nachází na chromosomu 10, lokus 10q23, která je také asociována s vyšším Gleason skóre, pokročilým stadiem onemocnění, rychlejším metastazováním a kratším přežitím. *PTEN* se jeví v současnosti jako jeden z nejslibnějších cílů pro cílenou biologickou terapii, speciálně v kombinaci s terapií zaměřenou na AR signální dráhu. U karcinomu prostaty jsou pozorovány delece také tumorsupresorových genů, které bývají deletovány i u mnoha jiných typů nádorů. Jedná se především o gen *TP53* a gen *RBI*. Gen *TP53* je nezávislý prediktor rizika metastázování a inaktivace tohoto genu je asociována s progresí. Mutace těchto genů bývají nalézány u pokročilých stadií onemocnění^{1,5}.

Mezi významné onkogeny u karcinomu prostaty patří gen pro androgen receptor (*AR*), který je standardně vysoce exprimován v normálních lumenálních buňkách prostaty a je asociován s buněčnou diferenciací. Aktivační mutace *AR* genu bývá nalezena u kastrát rezistentních tumorů. Amplifikace *AR* genu společně s vysokou hladinou *AR* mRNA je pozorována u mnoha těchto typů karcinomů prostaty¹.

Nejspecifičtějším identifikovaným genem pro karcinom prostaty je Prostate Cancer Antigen 3 (*PCA3*), který je lokalizován na chromosomu 9q21-22 a je silně exprimován u více než 90% karcinomů prostaty a současně není přítomen u benigních lézí. *PCA3*mRNA obsahuje vysokou denzitu stop kodonu, tudíž nemá otevřený čtecí rámeček, čímž vzniká nekódující RNA, která je u karcinomu prostaty vysoce exprimována. Nezávislé studie ukazují, že se jedná o velice slibný test pro časnou diagnostiku karcinomu prostaty z moče pacienta. U 6-13% karcinomů prostaty bývá popisována missens mutace *SPOP* genu a je spojována s vyšší invazivitou tumoru. *EZH2* histon lysin transferáza ovlivňuje jako část PRC2 polycomb represivního komplexu remodelaci chromatinu. Ve všech fázích karcinomu prostaty včetně PIN se může nalézat overexprese tohoto *EZH2* genu, který podporuje proliferaci, invazivitu a tumorigenicitu buněk karcinomu prostaty.

Epigenetické alterace u karcinomu prostaty

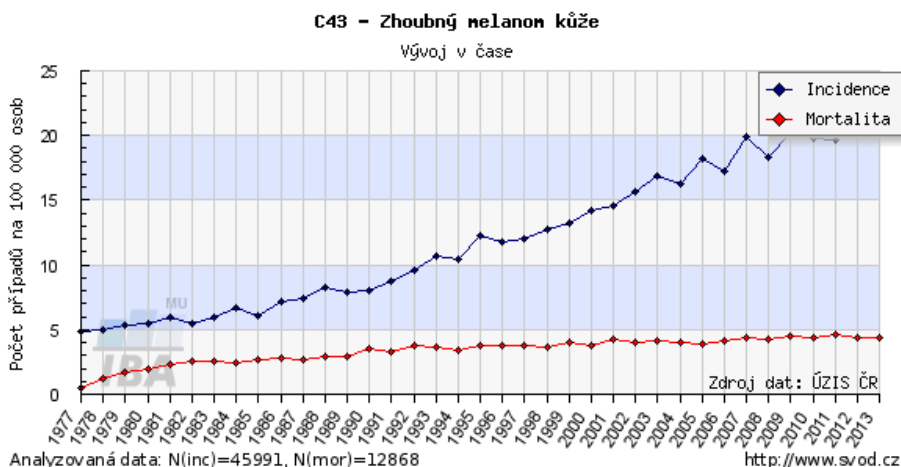
Mezi nejčastější epigenetické alterace u karcinomu prostaty patří metylace CpG ostrůvků a nejčastěji postiženým je gen pro glutation S-transferázu (*GSTP1*). CpG hypermethylace tohoto genu má za následek vypnutí jeho funkce a zvýšení citlivosti ke genetickému poškození vlivem oxidativního stresu. CpG metylace *GSTP1* genu je popisována u více než 90% prostatických adenokarcinomů a přibližně u 70% PIN. V malém procentu se může vyskytovat u atrofických lézí prostaty (4-6%), avšak není přítomna v normálním epitelu prostaty. Vysoká hladina hypermethylace promotoru genu *GSTP1* souvisí s přechodem z PIN do adenokarcinomu a její detekce může být diagnostickým markerem karcinogeneze. Mezi další geny, které mohou být hypermetylovány patří *APC* gen, *RASSF1* gen, *ENDRB* gen, *PTGS2* gen, *MDR1* gen a *PITX2* gen^{1,5}.

Významným prognostickým markerem u karcinomu prostaty je také protein p27, který je kódován genem *CDKN1B*. Vlivem mutací a/nebo delecí tohoto genu dochází ke snížení exprese proteinu p27, jak u PIN, tak u adenokarcinomů prostaty, které je asociováno s horší prognózou. Je prokázáno, že exprese proteinu p27 je asociována s Gleasonovým skóre, rekurencí nádoru a dobou přežití u pacientů s karcinomem prostaty. Také exprese proteinu p21, inhibitoru cyklin dependentní kinázy, kódovaným genem *WAF1/CPI*, regulátoru buněčného cyklu, je spojována s přežitím pacientů s karcinomem prostaty^{5,35}.

Využití specifických molekulárně genetických markerů umožní časnou detekci karcinomu prostaty s vyšší specifitou než PSA, omezí opakování bioptického odběru při negativním výsledku prvního vyšetření a zajistí včasnou léčbu onemocnění. Přínosem biomarkerů je také efektivnější monitorování nemoci a přesná predikce léčebné odpovědi a včasná indikace rekurence onemocnění po léčbě. Mnoho biomarkerů může mít také vysokou prognostickou hodnotu, např. ploidie, exprese Ki67, BCL2, p53 nebo p27 vyšetřované pomocí IHC, 8q24 amplifikace stanovená pomocí FISH metody. Mezi nadějně prediktivní faktory patří delece *PTEN* genu, *TOP2A* gen, *SPINK1* gen¹.

1.2.6 Melanom

Melanom vzniká neoplastickou proliferací kožních melanocytů, buněk tvořících pigment. Ve srovnání s jinými epiteliálními kožními nádory, jako je basaliom nebo spinaliom, se melanom vyznačuje vysokým rizikem časného hematogenního či lymfogenního metastázování. Melanom bývá nejčastěji detekován u pacientů nad 50 let a obě pohlaví jsou postižena přibližně stejně.



Graf 6: Incidence a mortalita maligního melanomu kůže v České republice v letech 1977-2013 (Ref²).

Melanomy zahrnují skupinu odlišných biologických subtypů charakterizovaných specifickými genetickými, epidemiologickými, klinickými a histologickými znaky. Největší skupinu tvoří kožní melanomy s vysoce rostoucí incidencí, která toto onemocnění řadí na přední místa mezi nádorovými onemocněními jak mužské, tak ženské populace. Podle histologické klasifikace se melanomy dělí na superficiálně se šířící melanomy (SSM), které jsou nejčastějším typem melanomu a vyskytují se kdekoli na těle, sekundárně nodulární SSM vznikající z SSM, s tvorbou uzlíků a s agresivním chováním, nodulární melanomy s typickým vertikálním růstem do hloubky a nad úroveň okolní kůže (tyto nádory mívají špatnou prognózu), lentigo maligna melanom, akrolentigózní melanomy, které vznikají v dlaních, na ploskách a pod nehty. Zvláštní skupinu tvoří amelanotické melanomy, které nejsou

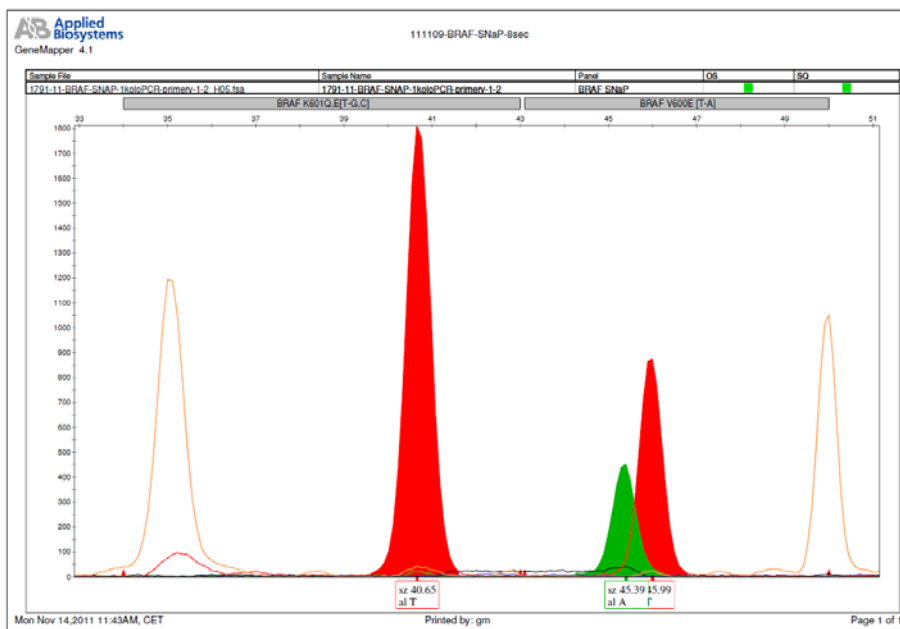
pigmentovány a klinická diagnostika vyžaduje větší zkušenost než u nádorů s pigmentem.

Byly prokázány genetické predispozice vzniku melanomu. Přibližně 10% melanomů má familiární výskyt, z nichž třetina je způsobena mutací v genu *CDKN2A* (*p16^{INK4a}*). Malou skupinu pak tvoří melanomy způsobené zárodečnou mutací genů *p14/ARF*, *CDK4*, *BAP1*, *MITF* genu či skupiny XP genů (xeroderma pigmentosum). Navíc byly identifikovány geny s nízkou penetrací, které ovlivňují pigmentaci a zbarvení kůže. Nejdůležitějším je *MC1R* gen, který vykazuje vysokou polymorfii v bělošské populaci, která způsobuje snížení zbarvení kůže, pihovatost a rusovlasost⁵. Jednotlivé subtypy kožních melanomů jsou charakterizovány různými predispozičními genotypy, rizikovými faktory prostředí, klinickopatologickými rysy, molekulárními mechanismy a schopností reagovat na léčbu. Diagnostika melanomů a jejich odlišení od ostatních melanocytárních lézí může být v určitých případech velmi obtížná a při diferenciální diagnostice jsou využívány různé melanomové markery. Je však známo, že „no single MELANOMA MARKER exists“⁵, což znamená, že výsledek musí být interpretován v kontextu všech dostupných dat - morfologie, imunohistochemických markerů a případně molekulárně genetických nálezů.

Genetické aberace

Byly identifikovány onkogeny rodiny RAS a RAF (zahrnující *NRAS* a *BRAF* geny), které vlivem genetických mutací získávají konstitutivní trvalou aktivaci a u kterých se předpokládá, že hrají klíčovou roli v rozvoji různých subtypů kožních melanomů. Aktivační mutace genu *BRAF* se vyskytuje u 40-50% melanomů, nejčastěji v kodonu 600 v exonu 15 (V600E nebo méně častá V600K) a *NRAS* mutace u 21% případů. Je prokázáno, že *BRAF* mutované melanomy se vyskytují častěji u jedinců s vyšším počtem benigních melanocytárních névů, ze kterých 80% nese *BRAF* aktivační mutaci. Mutace genu *BRAF* V600E je považována v současnosti za významný prediktivní marker léčebné

odpovědi na cílenou biologickou terapii BRAF inhibitory u pacientů s metastatickým melanomem (Obr. 12) ^{1,5}.



Obr. 12: SNaPshot assay, kodon 600, 601 BRAF genu, mutace V600E, detekovaná u pacienta vyšetřovaného v CGB laboratoři a.s.

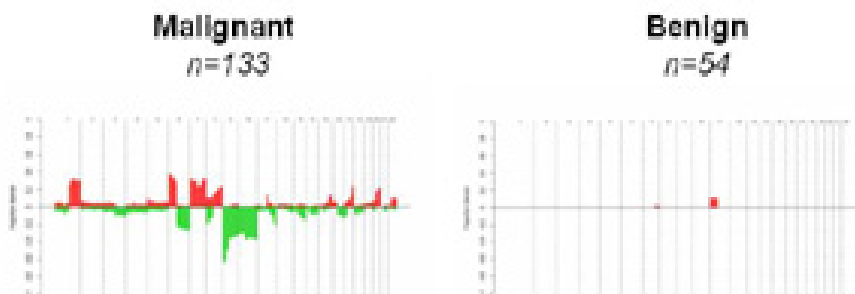
Mutace *HRAS* genu se vyskytuje pouze v 1% melanomů, ale je přítomna v 20% benigních Spitz névů, mutace genu *KRAS* se vyskytuje (pokud vůbec) raritně¹. Některé studie uvádějí asociaci mutace genu *NRAS* s melanomy vznikajícími na podkladě poškození chronickou expozicí slunečním zářením, s nodulárními melanomy a melanomy typu lentigo maligna melanoma, s vyšším Breslow skóre, vyšším mitotickým indexem a kratším přežitím. U akrálních melanomů se vyskytuje mutace genu *c-KIT* v 10-20%. Tato mutace však nikdy nebyla nalezena u melanomů vznikajících na podkladě chronické sluneční expozice. V mnohých melanocytárních lézích se nacházejí další mutace genů, mezi které patří aktivační mutace v *GNAQ* a *GNAI1* genech, které se vyskytují u blue névů, v juvenilních melanomech a melanocytech CNS. Vlivem mutace těchto genů, která je exkluzivní s mutacemi *RAS* genů, dochází

k poškození GTPázové aktivity G proteinů vedoucí ke konstitutivní aktivaci signální dráhy. Stejně tak jako v mnoha jiných typech nádorů, také u melanomů (avšak minoritně) se vyskytuje mutace tumorsupresorového genu *TP53*. Významným genem v onkogenezi melanomů je gen *CCND1*, který bývá nečastěji amplifikován¹.

Chromosomové aberace

Většina melanomů vykazuje zmnožení (gain) nebo ztrátu jednoho nebo více chromosomů, nebo jejich částí. Pomocí metody komparativní genové hybridizace (Obr. 13) bylo prokázáno, že mezi nejčastěji zmnožené chromosomy patří 1q, 6p, 7, 8q, 11q, 17q a 20q a naopak nejčastější ztráty jsou oblasti na chromosomech 6q, 8p, 9p, 9q a chromosomu 10. Tato vysoká heterogenita chromosomových aberací by mohla objasnit rozdílné klinické a morfologické charakteristiky jednotlivých melanomů nebo podskupin melanomů.

Chromosome CGH of primary melanocytic neoplasms



Obr. 13: CGH primární melanocytární neoplazie³⁶

Pokroky v poznání molekulární patogeneze melanomů naznačují existenci rozdílných subtypů a možnost subklasifikace melanomů do skupin, které se odlišují kumulací rozdílných genetických a chromosomových aberací. Jednotlivé skupiny zahrnují:

a) melanomy vznikající bez chronického poškození slunečním zářením (non CSD melanoma), které jsou nejčastějším typem v evropské populaci s největším výskytem v páté až šesté dekádě života a s poklesem výskytu v pozdějších letech života. Primární výskyt je nejčastější na trupu a proximální části končetin. U přibližně 70% těchto melanomů se vyskytuje aktivační mutace genu *BRAF* a mezi časté chromosomové aberace patří gain 1q, 6p, 7, 8q, 17q, 20q, a ztráty 9p, 6q, 10.

b) melanomy vznikající chronickým poškozením slunečním zářením (CSD), které jsou druhým nejčastějším typem kožních melanomů v evropské populaci, nejčastěji se vyskytující u osob starších 55 let a s incidencí rostoucí s věkem. Primárně se nejčastěji vyskytují v oblasti hlavy a krku a v distální části končetin. 20% těchto melanomů nese aktivační mutaci *NRAS* genu a 10-20% mutaci nebo zmnožení počtu genu *cKIT*. Zatímco mutace *BRAF* genu má malou prevalenci, přibližně 10%. Nejčastější chromosomové aberace jsou gain 1q, 6p, 11q, 13, 17q, 20q a ztráty chromosomů nebo jejich částí 6q, 8p, 9p, a 13.

c) akralní melanomy, vznikají v neochlupených částech těla, nehtech a v palmoplantárních oblastech a vyskytují se převážně v sedmé až osmé dekádě života. Ve 20-30% případů se vyskytuje mutace nebo amplifikace genu *cKIT*, ve 20% mutace v genu *BRAF* a 15% těchto melanomů nese mutaci v *NRAS* genu. Výskyt těchto mutací se vzájemně nepřekrývá. Mezi další genetické znaky patří genomová instabilita, která zahrnuje časté amplifikace genu *CCND1*, lokus 1q13 a genu *hTERT*, lokus 5p15, ke kterým dochází v průběhu progresu. Další chromosomové aberace jsou zmnožení oblastí 6p, 7, 8q, 17q, 20q, amplifikace 5p13 a 12q14 a ztráty oblastí 6q, 9p, 10 a 11q.

d) slizniční melanomy jsou melanomy vyskytující se orofarynxu, paranasálních sinusech, anogenitálním regionu apod. Incidence výskytu je celosvětově stejná. Přibližně v 20-30% se u tohoto typu melanomu

vyskytuje mutace genu *cKIT*, a v 15% mutace v genu *NRAS*, avšak nikoliv současně. Mutace v genu *BRAF* je raritní. Podobně jako u akralních melanomů nachází se genová instabilita, nejčastější amplifikace je *CDK4/HDM2* na lokusu 12q, 1q31 a 4q12, navíc se vyskytují zmnožení oblastí chromosomu 1q, 6p, 7, 8q, 11q13, 17q, 20q a ztráty 3q, 4q, 6q, 8p, 9p, 10, 11p, 11q.

e) desmoplastické melanomy, nepřiliš častá varianta invazivního melanomu s hlubokou invazí a proliferací vřetenitých melanocytů do stromatu s vysokou incidencí lokálních rekurencí. Typicky se u tohoto typu melanomu nevyskytují obvyklé genetické změny, které jsou popisovány u ostatních kožních melanomů (mutace v genech *BRAF*, *NRAS*, *cKIT*).

f) dětské melanomy jsou melanomy, které se obecně vyskytují v prepubertálním věku, protože melanomy starších dětí mají genetické charakteristiky a prognózu shodné s melanomy dospělého věku (vysokou frekvenci *BRAF* mutací). Tato kategorie zahrnuje heterogenní skupinu tumorů, mezi které patří transplacentární melanomy, melanomy vznikající na podkladě kongenitálního névu, melanomy asociované s onemocněním, u kterých je známa predispozice k tvorbě melanomů, např. xeroderma pigmentosum a maligní spitzoidní nádory, které mohou mít klonální chromosomové aberace nápomocné diagnóze.

g) uveální melanomy jsou nejčastější intraokulární malignitou u dospělých se vzrůstající frekvencí u jedinců se světlým typem kůže a světlou barvou očí. U 90% pacientů dochází následně k rozvoji jaterních metastáz. U těchto typů melanomů se nachází zmnožení mutovaných onkogenů *GNAQ* a *GNA11*, tyto mutace jsou vzájemně exkluzivní. Nevyskytují se mutace v genech *BRAF*, *NRAS* a *cKIT*. Bialelická ztráta *BAP1* na chromosomu 3 koreluje s metastatickou progresí a špatnou prognózou¹.

2. Experimentální část

V souvislosti se současným stavem poznání a pochopení molekulární patogeneze onemocnění a s možností využití nejmodernějších sofistikovaných metod molekulární biologie pro vyšetřování molekulárních profilů nádorů, exprese genů a stanovení prediktivních, popřípadě prognostických biomarkerů je pro diagnostický a léčebný proces nutná mezioborová komunikace kliniků, patologů a molekulárních genetiků. Tato mezioborová spolupráce je nezbytnou součástí moderního diagnostického procesu a poskytuje důležité informace pro klinický management onemocnění a pro cílenou personalizovanou medicínu. Prvním příkladem praktického významu spolupráce expertů z různých oblastí medicíny je problematika gastrointestinálních stromálních tumorů, které se řadí mezi první onemocnění, u kterého byly využity poznatky genetiky. S objevem onkogenních mutací kináz u GISTů došlo k rychlému pochopení molekulárně biologické povahy těchto nádorů a k zavedení inhibitorů tyrozinkináz do klinické praxe i u tohoto typu nádorů. Proto v současné době hraje významnou úlohu molekulární genotypizace těchto lézí, především z hlediska prognózy, léčebné odpovědi, respektive primární nebo sekundární rezistence na cílenou léčbu. Molekulárně genetické vyšetření nádorů (nejen typu GIST) má význam nejen diferenciativně diagnostický, ale i prediktivní. Rychlost a správnost diagnostiky je u nádorových onemocnění zásadní a má neoddiskutovatelný vliv na prognózu a úspěšnost léčby pacienta.

Cílem předkládané doktorské práce bylo studium genetických alterací u vybraných solidních nádorů z hlediska diagnostiky a managementu onemocnění. Konkrétní cíle byly:

1. Studium vybraných genetických alterací u maligního melanomu,
2. Analýza alterací v signálních cestách genových rodin RAS a HER ve vybrané skupině solidních nádorů.

2.1 Studium vybraných genetických alterací u maligního melanomu

Určení biologické povahy melanocytárních lézí je jednou ze základních podmínek správné léčby. I když mnoho případů může být spolehlivě klasifikováno podle současných histopatologických kritérií, existuje určitá skupina případů, kdy nedochází ke shodě ani mezi experty. Stanovit diagnózu plně vyvinutého melanomu není pro zkušeného patologa obvykle obtížné. Přesto je podle řady literárních zdrojů diagnóza melanomu stanovena správně pouze v 75–80 % případů³⁷. Rozdíly mezi benigními a maligními tumory jsou v některých případech nejednoznačné, takže histopatologická diagnóza je velmi obtížná i pro zkušené dermatopatology. Mezi takové léze patří například Spitz névus, jehož odlišení od Spitzoidního melanomu může být diagnostickým problémem³⁸. Studie biologické povahy různých typů melanocytárních lézí a jejich určení s využitím molekulárně genetických analýz, převážně metodami komparativní genomové hybridizace (CGH) a fluorescenční in situ hybridizace (FISH), prokázaly u melanomů řadu klonálních chromosomových aberací, zatímco u benigních névů nebyly zjištěny žádné chromosomové změny s jedinou výjimkou – zmnožení oblasti 11p u Spitz névů, tento nález však nebyl pozorován u melanomu³⁹⁻⁴².

Molekulárně cytogenetické metody spojují přednosti cytogenetického a molekulárně genetického vyšetření. Přestože zlatým standardem při vyšetření melanocytárních lézí zůstává histopatologická analýza včetně imunohistochemických vyšetření, moderní molekulárně cytogenetická vyšetření hrají stále důležitější roli v diagnostice kožních pigmentových lézí. Retrospektivně bylo vyšetřeno metodou fluorescenční in situ hybridizace 160 pacientů s melanocytárními lézemi nejisté biologické povahy, kteří byli diagnostikováni v letech 2008-2012 v CGB laboratoři a.s. a v Ústavu patologie Fakultní nemocnice Ostrava a Lékařské fakulty Ostravské univerzity. Muži tvořili 53% a ženy 47% s mediánem věku 54 let. K molekulárně genetickému vyšetření byly vybrány melanocytární léze s nejednoznačným histologickým nálezem nebo s nejistou biologickou povahou. Rozdělení na maligní a benigní léze bylo

provedeno podle kódu biologického chování MKN – O-3 klasifikace, melanoma in situ byl vzhledem k svému malignímu potenciálu zařazen mezi maligní nádory. Pro stanovení genetických aberací asociovaných s diagnózou maligního melanomu byla použita sonda Vysis LSI *RREB1*/LSI *MYB*/LSI *CCND1*/CEP6 Probes (Abbott Molecular Inc.), která je přímo značená a připravena k použití (11q13 (*CCND1*) Spectrum Green, 6p25 (*RREB1*) Spectrum Red, 6q23 (*MYB*) Spectrum Gold a centromera chromozomu 6 Spectrum Aqua). Pro lokalizaci nádorových buněk byl před hodnocením metodou FISH použit preparát barvený hematoxylin-eosinem. Hodnoceno bylo celkem třicet nepřekrývajících se jader ze tří oblastí nádorové tkáně.

Jako pozitivní byly hodnoceny léze, pokud průměrný počet signálů pro gen *CCND1* na jádro nebo průměrný počet signálů pro gen *MYB* na jádro byl $\geq 2,5$ nebo, delece *MYB* byla ≥ 31 % nebo, počet abnormálních jader pro gen *RREB1* bylo ≥ 63 %. Tyto změny mohou být pozorovány každá samostatně, častěji však byla zjištěna změna dvou či všech tří genů. Jako negativní byly označeny léze nesplňující ani jednu z výše uvedených podmínek. Pozitivní nález byl prokázán u 116 vzorků (72,5 %), negativní nález u 41 (25,6 %) vzorků.

Na základě dosažených výsledků byla stanovena senzitivita metody 96,6 % a specifita 91 %. Ve třech případech (1,8 %) nebylo možné jednoznačně rozhodnout. V těchto netypických případech byly nádorové buňky rozmístěny soliterně v celé lézi. Tyto léze byly tedy popsány jako hraniční a indikující lékaři byli vyrozuměni o jejich možném maligním potenciálu. V jednom případě (0,6 %) se jednalo o vyšetření recidivy melanomu v jizvě, který byl svým nálezem atypický a nebylo možno jej zařadit (monozomie chromozomu 6 – byl pozorován jeden signál pro geny *RREB1*, *MYB* i centromeru chromozomu 6).

U pacientů s melanomy byly ve 40 % nalezeny změny všech tří sledovaných genů, ve 29 % změny dvou genů a ve 28 % jedna změna. V počtu těchto změn je mezi jednotlivými typy maligních melanomů statisticky významný rozdíl ($P = 0,025$). Největší průměrný počet změn byl zjištěn u akrolentiginózních melanomů (3,0), Spitzové melanomů

(2,7) a povrchově se šířících melanomů s vertikalizací (2,6). Nejčastější změnou byla amplifikace všech tří genů, následovala amplifikace samotného genu *CCND1* a dále amplifikace genu *CCND1* spolu s delecí nebo amplifikací genu *MYB*.

Z výsledků vyplývá, že nejmenší počet změn sledovaných lokusů je možné pozorovat u melanoma in situ (v průměru numerická změna jednoho sledovaného genu), největší průměrný počet změn byl zjištěn u akrolentiginózních melanomů (3,0), Spitzové melanomů (2,7) a povrchově se šířících melanomů s vertikalizací (2,6). Kumulace genetických změn by tedy mohla svědčit pro progresi onemocnění a odpovídá vysokému malignímu potenciálu těchto lézí. Pozitivní nález byl v našem souboru pozorován také u tří dysplastických névů a névu modrého benigního. Stejně výsledky jsou popisovány až u 10 % různých typů benigních névů s atypii, které jsou pak řazeny do skupiny névů s nejistou biologickou povahou^{43,44}. V těchto případech je vhodné zvážit reexcizi se širokým lemem a zařazení pacientů do skupiny s intenzivnějším sledováním, aby bylo možné včas zachytit případný maligní zvrát.

Rychlost a správnost diagnostiky je u vysoce maligních melanomů zásadní a má neoddiskutovatelný vliv na prognózu a úspěšnost léčby pacienta.

2.2 Analýza alterací v signálních cestách genových rodin RAS a HER ve vybrané skupině solidních nádorů

Současný výzkum a nové vědecké poznatky upozorňují na mimořádný význam jak miRNA let-7, tak *KRAS* onkogenu v kancerogenezi solidních nádorů. Z tohoto důvodu bylo cílem práce porovnání polymorfismu *KRAS-LCS6* (rs61764370) u skupiny vybraných typů nádorů zahrnujících nejčastěji se vyskytující diagnózy, jako je kolorektální karcinom, karcinom prsu, nemalobuněčný karcinom plic, nádory mozku, karcinom prostaty a melanom. Cílem bylo nejen zmapovat výskyt těchto polymorfismů napříč uvedenými diagnózami, ale rovněž ověřit jejich význam či možné korelace s přítomností vybraných somatických mutací a

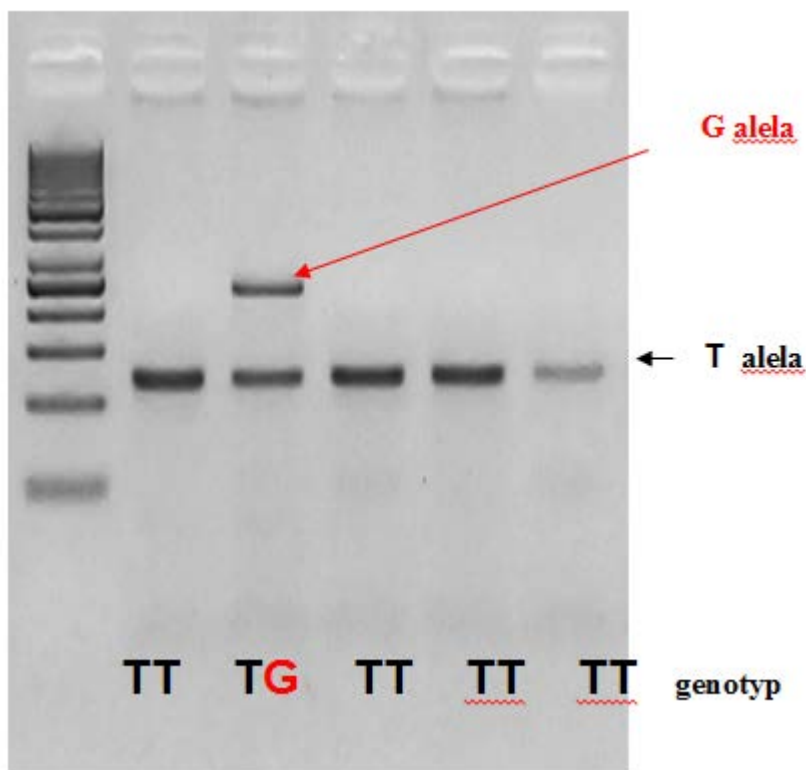
amplifikací / delecí genů reprezentující prediktivní, popřípadě prognostické biomarkery u těchto tumorů v české populaci.

2.2.1 Materiál a metody

V této práci bylo retrospektivně vyšetřeno celkem 1295 vzorků DNA, izolovaných z histologicky ověřené nádorové tkáně pacientů, kterým byly v období 2008-2015 vyšetřovány prediktivní markery (status genů) *RAS*, *BRAF*, *EGFR* a *HER2* apod., jako indikace k cílené biologické terapii. Jednalo se o pacienty s karcinomy plic, prsu, prostaty, melanomy a nádory CNS. U pacientů s karcinomem kolorekta, stadium III-IV, bylo vyšetřeno 277 mužů (64,7%) ve věku 35-91 let, 151 žen (35,3%) ve věku 31-94 let, medián věku ve skupině kolorektálních karcinomů byl 65 let. Skupinu nemalobuněčných nádorů plic tvořilo 311 vzorků DNA, z čehož bylo 202 mužů (65,0%) ve věku 34-99 let, 109 žen (35%) ve věku 32-89 let, medián věku ve skupině nemalobuněčných karcinomů plic byl 67 let. Ve skupině vzorků karcinomu prsu bylo 195 vzorků, zahrnujících 121 invazivních duktálních karcinomů (62%), 15 vzorků s invazivním lobulárním karcinomem prsu (7,7%) a 59 vzorků ostatních typů karcinomu prsu (30,3%). Skupinu pacientů s karcinomem prsu tvořili 2 muži (1%) ve věku 51 a 70 let a 193 žen (99%) ve věku 25-77 let. Medián věku ve skupině těchto pacientů byl 60 let. Ve skupině 151 vzorků DNA izolované z nádorů CNS bylo 117 vzorků gliomů, grade I-IV (77,5%), 23 vzorků meningeomů (15,2%) a 11 vzorků ostatních typů nádorů (7,3%). Skupinu těchto pacientů tvořilo 75 mužů (49,7%) ve věku 10-77 let, 76 žen (50,3%) ve věku 1-81 let. Medián věku pacientů s tumory CNS byl 56,5 let. Skupinu pacientů s karcinomem prostaty tvořilo 135 mužů, ve věku 49-85 let, s mediánem věku 65 let a skupinu 75 vzorků melanomu tvořilo 40 mužů, ve věku 11- 79 let, 35 žen ve věku 22-84 let. Medián věku pacientů s melanomem byl 62 let.

DNA nádorové tkáně byla izolována z různých typů vzorků. Jednalo se o nativní zmražený materiál, material ve formalínové fixaci zalitý do parafinových bloků (FFPE) a cytologické vzorky. Pro izolaci DNA byly použity komerční kity Cobas® DNA Sample Preparation Kit nebo MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostic

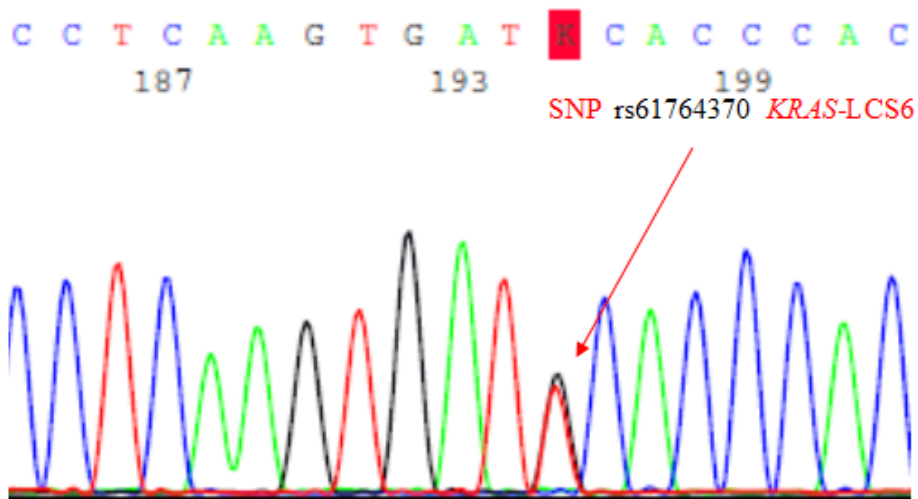
Corporation, GmbH, Mannheim, Germany). Kvalita a kvantita izolované DNA byla stanovena Nanophotometrem IMPLEN (Implen. GmbH, Munchen, Germany). Analýza SNP (rs61764370) (*KRAS-LCS6*) byla prováděna polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s enzymatickou digescí. Dvacet mikrolitrů reakčního mixu obsahovalo: PCR vodu (Thermo Scientific, Vilnius, Litva), PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, Vilnius, Litva), specifické primery (0,2 pmol sens a antisens primery) a DNA. Pro *KRAS-LCS6* polymorfismus byly použity tyto primery: sense 5'- CCTGAGTAGCTGGGATTACA-3' a antisence 5'- GGATACCATATACCCAGTGCCTT-3' (amplifikace fragmentu 232 bp). Podmínky PCR reakce byly následující: iniciální denaturace byla při 95°C po dobu 5 minut, následovalo 35 cyklů při teplotě 95°C po dobu 20 sekund, při teplotě 60°C po dobu 15 sekund a při 72°C 10 sekund. Finální amplifikace byla při teplotě 72°C po dobu 5 minut. PCR produkty byly ověřeny elektroforézou na 3% agarovém gelu. Po PCR byla provedena enzymatická digesce pomocí FastDigest *HinfI* enzymu pro *KRAS-LCS6* polymorfismy (Thermo Scientific, Vilnius, Litva) při 37°C podle pokynů výrobce. Reakce byla analyzována na agarovém gelu (3%), který byl nabarven pomocí ethidium bromidu a vizualizován na transiluminátoru UVT-20 (Herolab, GmbH, Germany). Podle fragmentů byly identifikovány genotypy: *KRAS-LCS6* polymorfismus; TT genotyp (117 bp + 115 bp), TG (232 bp + 117 bp + 115 bp) a GG (232 bp). Obr. 14.



Obr. 14: Detekce SNP (rs61764370, T>G) v 3'-UTR *KRAS* genu (*KRAS*-LCS6) polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) and enzymatickou digescí.

Pozitivní výsledky byly potvrzeny metodou přímé sekvenace, která byla provedena pomocí kitu BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA). 5 µL PCR produktu bylo čištěno pomocí Exonuclease I a FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific, Vilnius, Litva) inkubací při 37°C po dobu 15 minut, potom 15 minut při 80°C a uchováno při 4°C. Reakční pufr obsahoval 3 µL BigDye® Terminator v 3.1, 0,5 µL pufru BigDye® Terminator 5x, 2,5 µL primeru v konečné koncentraci 1,25 pmol/µL. Reakce probíhala podle následujícího protokolu: 96°C po dobu 1 minuty, 25 cyklů při 96°C po dobu 10 sekund, při 50°C 5 sekund, při 60°C po dobu 3 minut. Produkty sekvenační reakce byly čištěny pomocí BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA) podle pokynů výrobce. Následně byly analyzovány v genetickém analyzátoru Applied Biosystem® 3130 s

využitím programu Sequencing Analysis Software, verze 5.2 (Life Technologies, Foster City, CA, USA). Obr. 15.



Obr. 15: Sekvenační chromatogram - část *KRAS* genu s SNP *KRAS-LCS6* (rs61764370,T>G).

Mutační status genů *KRAS* (mutace v kodonech 12, 13 a 61) a *BRAF* (mutace V600E) byl stanoven s využitím real-Time PCR (cobas® 4800 *KRAS* Mutation test, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany a cobas® 4800 *BRAF* V600 Mutation Test, Roche Molecular Systems, Inc., Branchbury, NJ, USA). Analýza 40 mutací v genu *EGFR* (29 delecí v exonu 19, L858R, T790M, G719X včetně G719S, G719A, G719C, S 768I, 5 insercí v exonu 20) ve skupině nemalobuněčných karcinomů plic byla provedena metodou real-time PCR kitem Cobas® *EGFR* Mutation Test (CE, IVD, Roche). Stanovení statusu genu *HER2* a vyšetření genetických aberací u karcinomu prostaty (8p22- *LPL* genu, 8q24 *c-MYC* genu a centromery chromosomu 8) bylo provedeno metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s použitím kitu PathVysion *HER-2* DNA probe kit (Abbott Molecular) a kitu ProVysion multicolor FISH (Abbott Molecular).

Pro statistické analýzy byl použit χ^2 -test a Fischerův exaktní test s hladinou signifikance 5% (pokud je hladina signifikance < 5 je výhodnější použít Fischerův exaktní test než χ^2 -test). Statistické zhodnocení bylo provedeno pomocí Stata software, verze 13.

2.2.2 Výsledky

Byla vyšetřena frekvence *KRAS-LCS6* variant ve 1295 vzorcích DNA nádorové tkáně různých typů nádorů, zahrnujících kolorektální karcinom, nemalobuněčný plicní karcinom, karcinomy prsu, nádory CNS, karcinom prostaty a melanom.

S využitím χ^2 -testu byl nalezen signifikantní rozdíl v distribuci G alely (TG genotyp) v individuálních podskupinách, kdy vzorky karcinomu prsu byly rozděleny podle statutu genu *HER2*. ($P = 0,026$). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 3.

KRAS - LCS6	TT genotyp		TG genotyp		Souhrn	
	počet	%	počet	%	počet	%
<i>HER2</i> pozitivní karcinom prsu	29	96,7	1	3,3	30	100
<i>HER2</i> negativní karcinom prsu	123	79,9	31	20,1	154	100
χ^2 -test, $P = 0,026$						

Tab. 3: Distribuce *KRAS-LCS6* (rs61764370) genotypu u pacientů s karcinomem prsu v závislosti na statutu *HER2* genu.

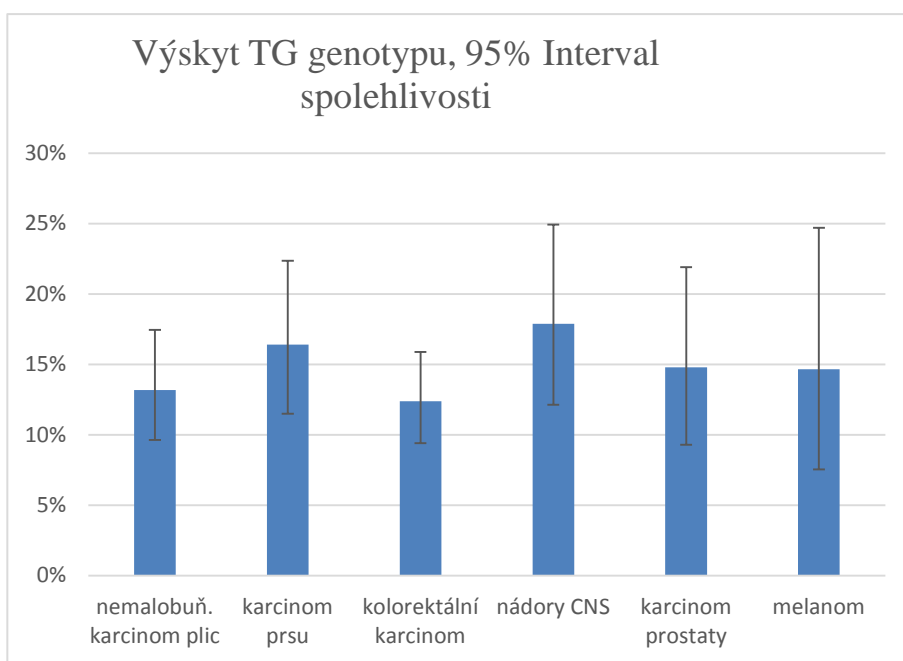
Naproti tomu χ^2 -test nepotvrdil statisticky signifikantní rozdíl v distribuci G alel (TG genotyp) v neselektované skupině vzorků karcinomu prsu, stejně tak jako u dalších vyšetřovaných skupin nádorů, ($P = 0,484$). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 4.

Současně také nebyl nalezen homozygot pro G alelu (GG genotyp), což není v souladu s Hardy-Weinberg rovnováhou. Důvodem, je pravděpodobně malé množství testovaných vzorků.

KRAS - LCS6	TT alela		TG alela		Celkem	
	počet	%	počet	%	počet	%
nemalobuněčný karcinom plic	270	86,8	41	13,2	311	100
karcinom prsu	163	83,6	32	16,4	195	100
kolorektální karcinom	375	87,6	53	12,4	428	100
nádory CNS	124	82,1	27	17,9	151	100
karcinom prostaty	115	85,2	20	14,8	135	100
melanom	64	85,3	11	14,7	75	100
χ^2 -test, P = 0,484						

Tab. 4: KRAS-LCS6 (rs61764370) genotyp ve vyšetřovaných skupinách nádorů.

Pro výskyt TG genotypu byl stanoven 95% interval spolehlivosti (CI), viz Obr. 16.



Obr. 16: Distribuce TG genotypu KRAS-LCS6 (rs61764370) polymorfismu v jednotlivých skupinách nádorů (NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic; BC – karcinom prsu; CRC – kolorektální karcinom).

Ve skupině pacientů s kolorektálním karcinomem byla provedena další statistická analýza *KRAS*-LCS6 (rs61764370) polymorfismu ve vztahu k mutačnímu statutu genů *KRAS* a *BRAF*. Přesto, že skupina kolorektálních karcinomů s mutací v genu *BRAF* vykazuje vyšší procento variantních alel, nebyl při použití χ^2 -testu nalezen statisticky významný rozdíl v distribuci G alely (TG/GG genotypu) mezi jednotlivými vzorky kolorektálního karcinomu rozdělenými do tří skupin podle mutačního statutu genů *KRAS* a *BRAF*, ($P = 0,081$). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 5.

KRAS - LCS6	TT genotyp		TG genotyp		Celkem	
	počet	%	počet	%	počet	%
<i>KRAS/BRAF</i> wild type CRC	135	89,4	16	10,6	151	100
<i>KRAS</i> mutantní CRC	152	89,9	17	10,1	169	100
<i>BRAF</i> V600E mutantní CRC	88	81,5	20	18,5	108	100
χ^2 -test, $P = 0,081$						

Tab. 5: Distribuce *KRAS*-LCS6 (rs61764370) genotypu u pacientů s CRC v závislosti na mutačním statutu *KRAS* and *BRAF* genů.

U pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) byla provedena statistická analýza *KRAS*-LCS6 (rs61764370) polymorfismu ve vztahu k mutačnímu statutu genu *EGFR*. Pomocí Fischerova exaktního testu nebyl nalezen signifikantní rozdíl v distribuci G alel (TG genotyp) mezi jednotlivými skupinami vzorků NSCLC rozdělenými podle mutačního statutu genu *EGFR*, ($P = 0,752$). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 6.

KRAS - LCS6	TT genotyp		TG genotyp		Souhrn	
	počet	%	počet	%	počet	%
<i>EGFR</i> mutantní NSCLC	23	92,0	2	8,0	25	100
<i>EGFR</i> wild type NSCLC	249	87,1	37	12,9	286	100
Fisherův exaktní test, $P = 0,752$						

Tab. 6: Distribuce *KRAS*-LCS6 (rs61764370) genotypu ve skupině pacientů s NSCLC v závislosti na mutačním statutu genu *EGFR*.

U pacientů s karcinomem prostaty (PC) byly provedeny analýzy výskytu *KRAS*-LCS6 (rs61764370) polymorfismu ve vztahu ke gradu tumoru (Tab. 7) a ve vztahu k aberacím genů *LPL* a *c-MYC* prokázaných metodou

FISH (Tab. 8). V těchto jednotlivých podskupinách pacientů s karcinomem prostaty také nebyl nalezen signifikantní rozdíl v distribuci G alel (TG genotyp) mezi jednotlivými skupinami vzorků.

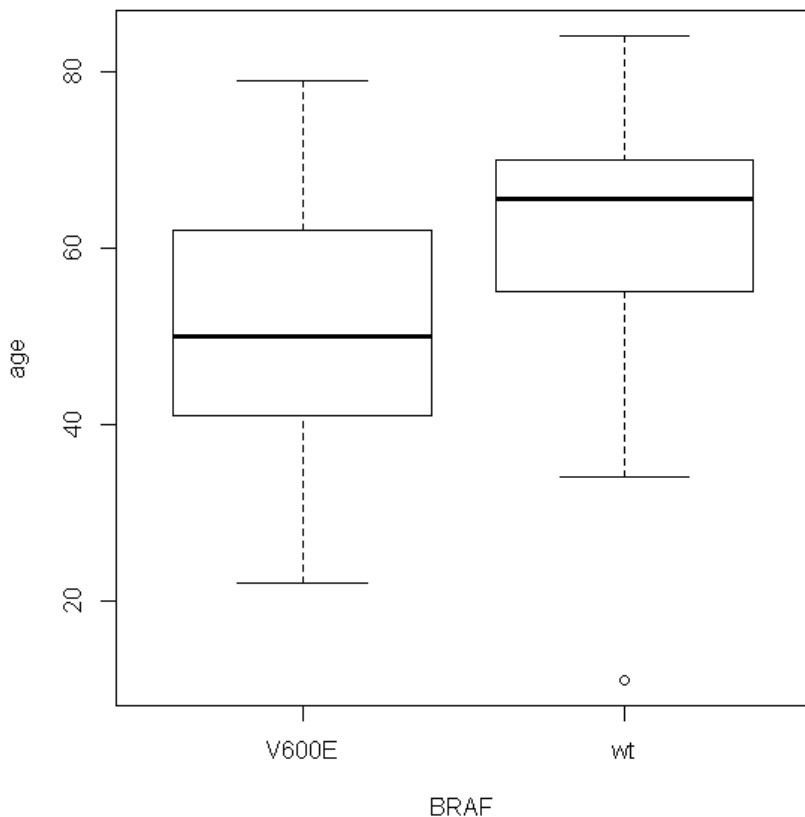
KRAS - LCS6	TT genotyp		TG genotyp		Celkem	
	počet	%	počet	%	počet	%
PC bez aberace <i>LPL</i> a <i>c-MYC</i>	68	81,9	15	18,1	83	100
PC s aberacemi <i>LPL</i> a <i>c-MYC</i>	25	83,3	5	16,7	30	100
χ^2 -test, $P = 1,0$						

Tab. 7: Distribuce *KRAS-LCS6* (rs61764370) genotypu ve skupině pacientů s PC v závislosti na chromosomových aberacích.

KRAS - LCS6	TT genotyp		TG genotyp		Celkem	
	počet	%	počet	%	počet	%
PC grade 1	2	66,7	1	33,3	3	100
PC grade 2	31	81,6	7	18,4	38	100
PC grade 3/4	82	87,2	12	12,8	94	100
χ^2 -test, $P = 0,4678$						

Tab. 8: Distribuce *KRAS-LCS6* (rs61764370) genotypu ve skupině pacientů s PC v závislosti na gradu tumoru.

Ve skupině vzorků melanomů byla provedena statistická analýza výskytu *KRAS-LCS6* (rs61764370) polymorfismu ve vztahu k mutačnímu statutu genu *BRAF*. Přesto, že byla nalezena signifikantní asociace mezi mutací genu *BRAF* a věkem pacientů (Graf. 7), nebyl v tomto našem souboru prokázán prakticky žádný rozdíl v distribuci G alely (TG/GG genotypu) mezi skupinou s mutací v genu *BRAF* a skupinou wild type melanoma, ($P = 1,0$). Výsledky jsou uvedeny v Tab. 9.



Graf 7: Byl nalezen signifikantní rozdíl ve střední hodnotě věku mezi pacienty s mutací *BRAF* genu V600E a *BRAF* wt (wild-type).

KRAS - LCS6	TT genotyp		TG genotyp		Celkem	
	count	%	count	%	počet	%
<i>BRAF</i> mutantní melanom	25	86,2	4	13,8	29	100
<i>BRAF</i> wild type melanom	39	84,8	7	15,2	46	100
χ^2 -test, $P = 1,0$						

Tab. 9: Distribuce *KRAS*-LCS6 (rs61764370) genotypu ve skupině pacientů s melanomem v závislosti na mutačním statutu genu *BRAF*.

2.2.3 Diskuze

Zárodečný polymorfismus SNP (rs61764370), který se nachází na let-7 komplementární (LCS) v 3' nepřekládané oblasti (3'UTR) *KRAS* onkogenu, je v současnosti velmi studován v souvislosti s mnoha typy nádorů, především vzhledem k riziku vzniku tohoto onemocnění, prognóze a / nebo ve vztahu k léčebné odpovědi, respektive k rezistenci na terapii⁴⁵⁻⁵⁶. Bylo prokázáno, že členové rodiny let-7 microRNA hrají významnou roli v tumorigenezi nádorů pomocí regulace exprese mnoha onkogenů včetně *KRAS* onkogenu. *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) je jedním z nejčastěji mutovaných genů u lidských nádorů⁵⁷ – téměř čtvrtina různých tumorů vykazuje alteraci funkce genu *KRAS*. Tento gen kóduje protein, který hraje zásadní roli v přenosu signálu a buněčné proliferaci a je klíčovým cílem let-7 miRNA (miRNAs), kterými je jeho funkce regulována^{49,58,59}. Let-7 miRNA snižuje expresi *KRAS* proteinu vazbou na 3'UTR *KRAS*mRNA⁴⁸. Změněná exprese let-7 microRNA se vyskytuje u různých typů nádorů⁶⁰⁻⁶². SNP (rs61764370), také známý jako *KRAS-LCS6*, obsahující záměnu T a G bází, alteruje vazebnou schopnost let-7 na *KRAS*mRNA, což má za následek jak zvýšení *KRAS* exprese, tak redukcí hladiny let-7(Ref^{45,47}). Některé skupiny autorů reportují, že nádory asociované s nekódujícími SNP (rs61764370) nevykazují biologický efekt pomocí transkripční modulace *KRAS*, ale spíše pomocí změněné exprese microRNA let-7(Ref⁶³).

Výskyt těchto SNP se v celosvětové populaci liší geograficky. V databázi ALFRED (The Allele FREquency Database) (Ref⁶⁴) se uvádí očekávaná heterozygotita (rs61764370) v Evropské populaci 0,05-0,25. Chin LJ⁴⁵ reportuje výsledky genotypizování 3 433 vzorků, reprezentujících 46 geografických populací, že v obecné populaci je frekvence G alely *KRAS-LCS6* 5,8% a okolo 7,6% v evropské populaci. Zajímavé je, že se tato varianta prakticky nevyskytuje u rodilých Američanů a východních Asiatů a je velmi raritní u Afričanů.

Předchozí studie prokázaly, že SNP (rs61764370) je negativní prognostický marker u pozdních stádií karcinomů tlustého střeva⁴⁶ a pozitivní prognostický indikátor a prediktor léčebné odpovědi u časných stádií tohoto nádoru^{46,49,53}. Nicméně systematická revue a metaanalýza provedená Langevinem a Christensenem⁶⁵ nepotvrdila asociaci mezi

KRAS-LCS6 genotypem a celkovým přežitím nebo přežitím bez progresu u pacientů s kolorektálním karcinomem a to ani po stratifikaci pacientů do podskupin podle anti EGFR léčby. *LCS6* polymorfismus je také asociován se zvýšeným rizikem vzniku nemalobuněčného karcinomu plic u mírných kuřáků, triple negativních karcinomů prsu u premenopauzálních žen, karcinomu ovária u BRCA negativních žen se syndromem familiárního výskytu karcinomů prsu a ovária. Poslední studie potvrzují také význam *LCS6* variantní alely u karcinomů ovária u postmenopauzálních žen a ukazují, že je biomarkerem špatných výsledků léčby u tohoto onemocnění, pravděpodobně díky rezistenci na terapii platinou⁶⁶.

Na rozdíl od většiny autorů, kteří se zaměřují na jednu diagnózu, v naší studii jsme vyšetřili 1295 vzorků DNA pacientů s různými typy nádorů a kromě stanovení polymorfismu *KRAS-LCS6* (rs61764370) byly u těchto typů nádorů vyšetřeny také další vybrané prediktivní a prognostické biomarkery, jako jsou mutace genů *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*, status genu *HER2*, *LPL*, *c-MYC*, a byl ověřován jejich možný vzájemný vztah k distribuci *KRAS-LCS6* (rs61764370) genotypu. DNA byla izolována z různých typů biologického materiálu. Nejčastěji využívaným zdrojem nádorové DNA byla formalínem fixovaná tkáň zalitá v parafínu (FFPE), dále pak cytologické preparáty a také nativní zmražený materiál, který se jevil jako nejlepší pro získání kvalitní DNA, avšak nevýhodou byla nutnost histologického ověření nádoru pomocí zmražených řezů. Zásadní pro úspěšnost analýzy je také primární zpracování materiálu a preanalytická fáze, kdy může dojít k významnému poškození a inhibici DNA. Je prokázáno, že nesprávná manipulace s materiálem v průběhu odběru, při jeho transportu a fixaci může zapříčinit ztrátu významných molekul¹. Je potom v mnoha případech nemožné vyšetřit vzorky jak metodou fluorescenční in situ hybridizace, tak jinými metodami molekulární genetiky, anebo vyšetření mohou být zatížena chybou.

Ve vybrané skupině 184 vzorků nádorů prsu v závislosti na statutu genu *HER2* jsme našli signifikantní rozdíly v distribuci G alely (TG genotypu) u *KRAS-LCS6* polymorfismu. U pacientů s *HER2* negativním karcinomem byl nalezen *KRAS-LCS6* TG genotyp ve 20,1%, naproti

tomu ve skupině pacientů s *HER2* pozitivními karcinomy prsu byl nález pouze ve 3,3% vzorků. Tento výsledek může znamenat, že *KRAS-LCS6* TG genotypu SNP (rs61764370) může vést k alteraci v expresním profilu genu *HER2*.

Tyto výsledky však nekorelují s nálezem Cerne⁵⁴, která nepotvrdila signifikantní asociaci TG/GG genotypu ve skupině pacientů s karcinomem prsu se statusem genu *HER2*, přičemž v této studii bylo analyzováno celkem 506 případů karcinomů prsu, z čehož pouze 63 (12,45%) bylo *HER2* pozitivních. Autoři našli pozitivní asociaci SNP (rs61764370) pouze u podskupiny *HER2* pozitivních karcinomů s vysokým histopatologickým gradem u pacientů se substituční hormonální terapií (HRT). Zastoupení *HER2* pozitivních karcinomů prsu v našem souboru pacientů však bylo vyšší (16,3%), takže se domníváme, že lépe odráží vzájemnou asociaci mezi *HER2* pozitivitou a *KRAS-LCS6* TG genotypem.

V neselektované skupině našich vzorků karcinomů prsu byla nalezena frekvence TG genotypu u SNP (rs6174370) v 16,4%, což odpovídá nálezům Cerne⁵⁴, která tuto frekvenci našla ve skupině sporadických karcinomů prsu v 17,2%. Tyto nálezy nepodporují hypotézu, že *KRAS* varianta rs61764370 se podílí na etiologii sporadických nebo familiálních karcinomů prsu. Také Paranjape a kol.⁵⁰ ve své práci nenalezli statisticky významný rozdíl v celkové frekvenci distribuce variant genotypů *KRAS-LCS6* ve vzorcích karcinomů prsu a kontrolní skupinou. V této studii byla nalezena signifikantní asociace *KRAS-LCS6* pouze u skupiny karcinomů prsu u premenopauzálních žen s negativitou estrogenních a progesteronových receptorů. V naší studii nebyla asociace SNP (rs6174370) s hormonálními receptory sledována z důvodu rozpadu souboru na malé podskupiny, jejichž analýza by s největší pravděpodobností nepřinesla statisticky významné výsledky.

Ve skupině kolorektálních karcinomů, byl nález frekvence TG genotypu SNP (rs61764370) 12,4%. Nebyl prokázán signifikantně významný rozdíl mezi distribucí TG genotypu v jednotlivých podskupinách, do kterých byly vzorky rozděleny podle mutačního statusu genů *KRAS* a *BRAF*. V podskupině *KRAS/BRAF* wild type byla frekvence 10,6%, v podskupině *KRAS* mutovaných karcinomů 10,1% a ve skupině *BRAF* mutovaných

karcinomů CRC byla nalezena frekvence 18,5%. Přesto, že ve skupině *BRAF* mutantních CRC pacientů pozorujeme tendenci téměř dvojnásobného výskytu sledované alely ve srovnání s *KRAS/BRAF* wildtype a *KRAS* mutovanou skupinou, nebyl při použití χ^2 -testu nalezen statisticky významný rozdíl. Nebyla tedy prokázána signifikantní asociace mezi *KRAS* a *BRAF* mutačním statutem a *KRAS*-LCS6 genotypem u kolorektálního karcinomu. Nalezená frekvence *KRAS*-LCS6 G alel (TG genotypu) ve skupině *KRAS/BRAF* wild type je v souladu s výsledky publikovanými jinými autory Páez⁶³. Naopak rozdílné výsledky našli autoři Graciano a kol.⁴⁶, kteří našli signifikantně vyšší frekvenci *KRAS*-LCS6 G alel u *KRAS* mutovaných karcinomů. Také norská studie⁶⁶ a studie autorů Sha⁶⁷ nepotvrdili ve svých výsledcích asociaci mutace *KRAS* a *BRAF* genu s *KRAS*-LCS6 genotypem u pacientů s kolorektálním karcinomem. Závěry těchto studií jsou v souladu také s našimi výsledky.

Let-7 micro RNA jsou důležitými molekulami také u karcinomu plic. Někteří autoři⁶⁸ uvádějí silnou asociaci mezi mutací *KRAS* genu a přežitím pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. V souladu s tím je také redukce exprese *let-7* asociována se špatnou prognózou pacientů. V naší skupině 311 vzorků nemalobuněčného karcinomu plic byla nalezena varianta TG genotypu v 13,2%. Naše výsledky korelují s výsledky ostatních autorů⁶⁸, kteří potvrdili frekvenci variant alel v 14,7%. Tato data ukazují, že *KRAS*-LCS6 polymorfismus má limitovaný (pokud nějaký) klinický význam u nemalobuněčného karcinomu plic. V naší práci také nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi jednotlivými podskupinami NSCLC stratifikovaných podle mutačního statusu genu *EGFR*. Z těchto dat vyplývá, že LCS6 není vhodný marker zvýšeného rizika NSCLC, což jako hypotézu uvádí ve své práci Chin LJ⁴⁵.

V heterogenní skupině 151 histologicky potvrzených nádorů CNS byl TG genotyp SNP (rs61764370) nalezen v 17,9% vzorků. Také v této skupině nebyl prokázán signifikantní rozdíl ve srovnání s ostatními typy nádorů.

Ve skupině 135 pacientů s karcinomem prostaty byl TG genotyp prokázán v 14,8% analyzovaných vzorků a nebyl prokázán signifikantní rozdíl mezi jednotlivými podskupinami vzorků stratifikovanými podle nálezu aberací genů *LPL* a *c-MYC* a také mezi podskupinami pacientů stratifikovanými podle gradu nádoru Grade I - Grade III, přičemž grade

odráží hodnotu Gleasonova skóre, kdy Grade 1 je hodnota 1- 3 Gleasonova skóre, grade 2 je 4-6 a Grade 3/4 zahrnuje Gleasonovo skóre 7 a více. V současné literatuře nejsou dostupná data podobných analýz nádorů CNS a prostaty umožňující porovnání našich výsledků s výsledky jiných autorů.

Ve skupině melanomů byl prokázán TG genotyp SNP (rs61764370) v 14,7% vzorků a v jednotlivých podskupinách melanomů stratifikovaných podle mutačního statutu genu *BRAF* nebyla prokázána asociace mutace genu *BRAF* s *KRAS-LCS6* genotypem. Jednoznačně však byl prokázán signifikantně významný rozdíl ve střední hodnotě věku mezi pacienty s mutací *BRAF* genu V600E a *BRAF* wild type. Tento výsledek koreluje se studií autorů Menzies a kol.⁶⁹, kteří prokázali, že frekvence non V600E genotypu (včetně V600K) vzrůstá s vyšší dekádou věku a navíc, že věk v době diagnózy vzdálených metastáz melanomu je signifikantně nižší u *BRAF* mutovaných melanomů. Také studie japonských autorů⁷⁰ prokázala signifikantní asociaci mutace *BRAF* genu s mladším věkem pacientů (median 50,0 vs. 70,0 let, $p < 0,001$).

Naše analýzy nepotvrdily významný rozdíl mezi skupinami jednotlivých typů karcinomů ($P = 0.484$), což odpovídá výsledkům studie Chin LJ⁴⁵, kde také není popisován signifikantní rozdíl frekvence výskytu G alel (TG/GG genotypu) *KRAS-LCS6* polymorfismu ani mezi jednotlivými skupinami nádorů ani mezi nádory a běžnou populací.

2.2.4 Závěr

Stanovení rizikových faktorů u nádorových onemocnění má zásadní význam pro zlepšení diagnostiky a léčby těchto onemocnění. Vzhledem k vysokému potenciálu využití jak miRNA let7, která hraje významnou roli v tumorigenezi nádorů pomocí regulace exprese mnoha onkogenů^{49,58,59}, tak *KRAS* genu, který je jedním z nejčastěji mutovaných genů humánních tumorů, jakožto prediktivního nebo prognostického biomarkeru, jsme se zaměřili na vyšetření frekvence výskytu G alel v SNP (rs61764370) u jednotlivých vybraných skupin solidních nádorů. Na základě našich výsledků byl nalezen signifikantní rozdíl v *KRAS-LCS6* genotypu v závislosti na statutu genu *HER2* u karcinomu prsu. Tento výsledek naznačuje, že *KRAS-LCS6* G alela (TG/GG genotyp) může vest k

alteraci v expresním profilu *HER2* genu, což by mohlo být využito jako potenciální biomarker rozvoje *HER2* negativních karcinomů prsu. Pro potvrzení tohoto nálezu bude nutná další analýza vzorků karcinomu prsu. Naproti tomu nebyl prokázán významný rozdíl ve výskytu *KRAS* LCS6 G alel (TG/GG genotype) mezi jednotlivými skupinami studovaných nádorů.

3. Souhrn

Molekulárně genetické testování nádorů je velkým příslibem do budoucna s potenciálem k získání nových informací, které mohou být využívány v klinickém rozhodování. Největší význam má objevování nových kandidátních genů umožňujících přesnou diagnostiku a cílenou biologickou léčbu, která by byla mnohem účinnější na nádorové tkáně a mnohem méně toxická pro normální buňky. Nezbytnost získávání nových informací o biologii nádorů přináší s sebou také požadavky na kvalitu vzorků a zacházení s biologickým materiálem v průběhu jeho odběru a fixace. Byly prokázány ztráty významných cílových molekul vlivem metabolického stresu, tkáňové ischemie, acidózy a enzymatické degradace, ke kterým může docházet v průběhu chirurgického výkonu, při transportu vzorků a nesprávné fixaci materiálu. Vzhledem k tomu, že určení biologické povahy melanocytárních lézí je jednou ze základních podmínek správné léčby, bylo jedním z cílů naší práce analyzovat vybrané genetické aberace (*CCND1*, *RREB1* a *MYB* genů) u histologicky nejednoznačných melanocytárních lézí s využitím metody fluorescenční in situ hybridizace a posoudit jejich vztah k jednotlivým subtypům melanomů. Bylo vyšetřeno celkem 160 vzorků, z nichž u 116 byl prokázán pozitivní nález genetických aberací, a 41 vzorků bylo negativních. Ve třech případech nebylo možné jednoznačně rozhodnout o pozitivitě nálezu. Nejčastější změnou byla amplifikace všech tří genů (*CCND1*, *RREB1* a *MYB*), následovala amplifikace samotného genu *CCND1* a dále amplifikace genu *CCND1* spolu s delecí nebo amplifikací genu *MYB*. Z výsledků vyplývá, že nejmenší počet změn sledovaných lokusů je možné pozorovat u melanoma in situ, největší průměrný počet změn byl zjištěn u akrolentiginózních melanomů, Spitzové melanomů a povrchově se šířících melanomů s vertikalizací. Kumulace genetických změn by tedy mohla svědčit pro progresi onemocnění a odpovídá vysokému malignímu potenciálu těchto lézí.

Druhým cílem práce bylo porovnání polymorfismu *KRAS-LCS6* (rs61764370) u skupiny vybraných typů nádorů. Výskyt těchto variant

pak byl korelován s výskytem vybraných prediktivních a prognostických biomarkerů v české populaci v kontextu identifikace nového markeru, který by mohl stratifikovat pacienty do podskupin s ohledem na jejich případnou rezistenci na léčbu. Vzhledem k tomu, že zárodečný polymorfismus SNP (rs61764370) je v současnosti velmi studován v souvislosti s mnoha typy nádorů, porovnávali jsme současně výsledky s již publikovanými daty. Celkem bylo retrospektivně vyšetřeno 1295 vzorků. Analýza SNP (rs61764370) *KRAS*-LCS6 byla prováděna polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s enzymatickou digescí a podle fragmentů byly identifikovány genotypy. Byl nalezen signifikantní rozdíl v distribuci G alely (TG genotyp) v individuálních podskupinách u karcinomu prsu v závislosti na statutu genu *HER2*. Validita tohoto výsledku by měla být potvrzena další nezávislou prospektivní studií. Naopak nebyl nalezen rozdíl mezi jednotlivými skupinami nádorů ani uvnitř těchto skupin při porovnání s již vyšetřovanými biomarkery (mutace genů *KRAS*, *BRAF*, *EGFR*, status genů *HER2*, *LPL* a *c-MYC*). Při provádění statistických analýz získaných dat byl nalezen signifikantní rozdíl ve střední hodnotě věku mezi pacienty s melanomem s mutací v *BRAF* genu V600E a *BRAF* wt. Tato studie je pilotní k dlouhodobějšímu projektu, jehož cílem bude porovnání lokalizace a klinickohistologických charakteristik s genovými alteracemi u pacientů s melanomem.

4. Summary

Testing tumors using molecular genetic approaches holds great promise for gaining new information that can aid in clinical decision making. Of greatest importance, is discovery of new candidate genes that could enable accurate diagnostics and targeted biological treatment that will be much more effective towards malign tissue and less toxic to normal cells. However, this presupposes high sample quality and proper sample handling during acquisition and fixation. Loss of key target molecules due to metabolic stress, tissue ischemia, acidosis and enzymatic degradation, can occur during surgery, sample transport and incorrect fixation of material. As the biological behaviour of melanocytic lesions is an important term of the right treatment, we aimed at analysing the selected genetic aberrations (*CCND1*, *RREB1* and *MYB* genes) in histological ambiguous melanocytic lesions by using fluorescence in situ hybridization method. We evaluated the association of genetics changes with subtypes of melanomas. In 116 cases out of 160 analysed samples were found genetics aberrations and 41 samples were negative. Atypical and ambiguous finding was found in 3 cases. The most common alteration was amplification of all three genes (*CCND1*, *RREB1* and *MYB*), followed by single amplification of *CCND1* gene. Another group of genetics changes were coamplification of *CCND1* and *MYB* genes and amplification of *CCND1* gene in common with deletion of *MYB* gene. Minimum of genetics aberrations was found in melanoma in situ and the large number aberrations was found in acrolentiginous melanoma, Spitz melanoma and SSM melanoma. Accumulation of genetics changes suggests progression of diseases and high malignant potential of lesions.

The second aim of our study was comparing the polymorphism *KRAS*-LCS6 (rs61764370) in a group of selected tumors. The occurrence of variants was then correlated to selected predictive and prognostic biomarkers in a Czech population, to identify a new marker that would serve to stratify patients into subgroups reflecting possible resistance to treatment. As germinal polymorphism SNP (rs61764370) is currently under investigation in relation to a number of tumor types, we

concurrently compared the results with published data. Altogether, 1295 samples were analyzed retrospectively. SNP (rs61764370) *KRAS*-LCS6 was analysed using polymerase chain reaction (PCR) with enzymatic digestion and, genotypes were identified from fragments. We found a significant difference in the distribution of the G allele (TG genotype) in subgroups of breast carcinoma depending on the *HER2* gene status. The validity of the results was tested in another independent prospective study. However, no difference was found either between individual tumor groups or within groups compared to previously evaluated biomarkers (mutations of *KRAS*, *BRAF*, and *EGFR* genes, and the status of *HER2*, *LPL* and *c-MYC* genes). The statistical analysis showed a significant difference in mean age of melanoma patients with the V600E mutation in the *BRAF* gene and patients with wild type *BRAF* gene. This was a pilot study in the context of a long-term project, the aim of which is to compare localization and histology type of tumor with gene alterations in melanoma patients..

5. Seznam použité literatury

1. Cheng L, Eble JN. Molecular Surgical Pathology, ISBN 978-1-4614-4899-0, Sringer, New York, 2013
2. Dusek L, Muzik J, Kubasek M, Koptikova J, Zaloudik J, Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. www.svod.cz [2016-03-07].
3. WORLD CANCER RESEARCH FUND INTERNATIONAL,. Colorectal cancer statistics [online]. World Cancer Research Fund International, <<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/colorectal-cancer-statistics> [2015-11-13].
4. Yamagishi H, Hajime Kuroda H, Yasuo Imai Y, Hiraishi H. Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. Chin J.Cancer 2016; 35:4.
5. Tan D, Lynch HT. Principles of Molecular Diagnostics and Personalised Cancer Medicine .ISBN 978-1-4511-3197-0, Lippincott Williams &Wilkins, a Wolters Kluwer business, Philadelphia, 2013
6. My Cancer Genome. <http://www.mycancergenome.org> [2016-03-07].
7. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer, The Lancet Oncology 2011;12(6):594-603
8. COSMIC, Catalogue of somatic mutations in cancer; <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic> [2016-03-07].
9. Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton, Biochim Biophys Acta 2008;1778(3):660-9.

10. Giles RH, Van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer, *Biochim Biophys Acta* 2003;1653(1):1-24.
11. Leslie NR, Foti M. Non-genomic loss of PTEN function in cancer: not in my genes. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(3):131-40.
12. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer, *Nature Reviews Cancer* 2007;7:169-181.
13. Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, Massion PP, Siwak-Tapp C, Gonzalez A, Fang R, Mark EJ, Batten JM, Chen H, Wilner KD, Kwak EL, Clark JW, Carbone DP, Ji H, Engelman JA, Mino-Kenudson M, Pao W, Iafrate AJ. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of Clinical Oncology* 2012; 30(8):863-70.
14. Xu L, Zhao R, Dong Z, Zhu T. Clinical significance of ROS1 rearrangements in non-small cell lung cancer, *Chinese journal of lung cancer* 2013;16(12):663-70.
15. Paik PK, Arcila ME, Fara M, Sima CS, Miller VA, Kris MG, Ladanyi M, Riely GJ. Clinical Characteristics of Patients With Lung Adenocarcinomas Harboring BRAF Mutations, *J Clin Oncol.* 2011; 29(15): 2046–2051.
16. Arcila ME, Chaft JE, Nafa K, Chowdhury SR, Lau C, Zaidinski M, Paik PK, Zakowski MF, Kris MG, Ladanyi M. Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res.* 2012;18(18):4910-8.
17. Seiji Yano S, Nakagawa T. The Current State of Molecularly Targeted Drugs Targeting HGF/Met, *Jpn J Clin Oncol* 2014;44(1)9-12).

18. Bose R, Kavuri SM, Searleman AC, Shen W, Shen D, Koboldt DC, Monsey J, Goel N, Aronson AB, Li S, Ma CX, Ding L, Mardis ER, Ellis MJ. Activating HER2 mutations in HER2 gene amplification negative breast cancer, *Cancer Discov.* 2013 Feb;3(2):224-37.
19. Jeselsohn R, Yelensky R, Buchwalter G, Frampton G, Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM, Ferrer-Lozano J, Perez-Fidalgo JA, Cristofanilli M, Gómez H, Arteaga CL, Giltane J, Balko JM, Cronin MT, Jarosz M, Sun J, Hawryluk M, Lipson D, Otto G, Ross JS, Dvir A, Soussan-Gutman L, Wolf I, Rubinek T, Gilmore L, Schnitt S, Come SE, Pusztai L, Stephens P, Brown M, Miller VA. Emergence of constitutively active estrogen receptor- α mutations in pretreated advanced estrogen receptor-positive breast cancer, *Clin Cancer Res.* 2014;20(7):1757-67.
20. Robinson DR, Wu YM, Vats P, Su FY, Lonigro RJ, Cao XH, Kalyana-Sundaram S, Wang R, Ning Y, Hodges L, Gursky A, Siddiqui J, Tomlins SA, Roychowdhury S, Pienta KJ, Kim SY, Roberts JS, Rae JM, Van Poznak CH, Hayes DF, Chugh R, Kunju LP, Talpaz M, Schott AF, Chinnaiyan AM. Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer, *Nature Genetics*, 2013;45(12), 1446-1451.
21. Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, Li ZQ, Gala K, Fanning S, King TA, Hudis C, Chen D, Taran T, Hortobagyi G, Greene G, Berger M, Baselga J, Chandralapaty S. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer, *Nature Genetics*, 2013;45(12), 1439-1445.
22. Merenbakh-Lamin K, Ben-Baruch N, Yeheskel A, Dvir A, Soussan-Gutman L, Jeselsohn R, Yelensky R, Brown M, Miller VA, Sarid D, Rizel S, Klein B, Rubinek T, Wolf I. D538G mutation in estrogen receptor- α : A novel mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *The Journal of Cancer Research.* 2013;73(23):6856-64.
23. Lee IH. Molecular Prognostic and Predictive Assay in Breast Cancer: A Practical Review, *AJSP: Reviews & Reports* 2016;21:4-10.

24. Karajannis M A, Zagzag D. *Molecular Pathology of Nervous System Tumors; Biological Stratification and Targeted Therapies*. 2015. ISBN 978-1-4939-1829-4. Springer, New York, 2015.
25. Lopez-Gines, C. Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2004; 148 (2), 123–128.
26. Olar, A., et al. Molecular Markers in Low Grade Glioma - Toward Tumor Reclassification. *Seminars in Radiation Oncology* 2015; vol. 25, no. 3, p. 155–163.
27. Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov.* 2013;3:730-741.
28. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature.* 2012;483:474-478.
29. Horbinski C. What do we know about IDH1/2 mutations so far, and how do we use it? *Acta Neuropathol.* 2013;125:621-636.
30. Turkalp Z, Karamchandani J, Das S. IDH Mutation in Glioma: New Insights and Promises for the Future. *JAMA Neurol.* 2014;71(10):1319-25.
31. Van den Bent MJ. How to Use Molecular Markers When Caring for a Patient with Brain Cancer: 1P/19Q as a Predictive and Prognostic Marker in the Neuro-oncology Clinic. *ASCO Educational Book* 2013; 114–116.
32. Bourne DT.; et al. Update on molecular findings, management and outcome in low-grade gliomas. *Nature* 2010, 6, 695–701.

33. Haynes HR., et al. Prognostic and predictive biomarkers in adult and pediatric gliomas: toward personalized treatment. *Frontiers in Oncology*, 2014, vol. 4, p. 1–12.
34. Verhaak RGW, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1, *Cancer Cell* 2010;17(1), 98-110.
35. Dvorackova J, Uvirova M. A molecular genetic determination of prognostic factors of the prostate cancer and their relationships to expression of protein p27(kip1). *Neoplasma* 2007; 54(2),149-154.
36. Bastien BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene*, 2003;22, 3081-3086.
37. Veenhuizen KCW, De Wit PEJD, Mooi WJ, Scheffer E, Verbeek ALM, Ruiter DJ. Quality assessment by expert opinion in melanoma pathology: experience of the Pathology Panel of the Dutch Melanoma Working Party, *The Journal of Pathology* 1997; 182: 266–272.
38. Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 2009; 33: 1146–1156.
39. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. *Classifying Melanocytic*

Tumours Based on DNA Copy Number Changes. *The American Journal of Pathology*. 2006; 163: 1765–1770.

40. Dahlstrom JE, Scolyer RA, Thompson JF, Jain S. Spitz naevus: diagnostic problems and their management implications. *Pathology* 2004; 36 (5): 452–457.

41. Bastien BC, Wesselmann U, Pinkel D and LeBoit PE. Molecular cytogenetic analysis of Spitz nevi with distinctive histopathologic features. *The American Journal of Pathology* 2000; 157: 967–972.

42. Bastien BC, Wasselmann U, Pinkel D, LeBoit PE. Molecular Cytogenetic Analysis of Spitz Nevi Shows Clear Differences to Melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology* 1999; 133 (6), 1065–1069.

43. Moore MW and Gasparini R. FISH as an effective diagnostic tool for the management of challenging melanocytic lesions. *Diagnostic Pathology* 2011; 6: 76.

44. Gerami P, Zembowitz A: Update on Fluorescence In Situ Hybridization in Melanoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2011; 135: 830–837.

45. Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Muller RU, Straka E, Su L, Burki EA, Crowell RE, Patel R, Kulkarni T, Homer R, Zelterman D, Kidd KK, Zhu Y, Christiani DC, Belinski SA, Slack FJ, Weidhaas JB. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Research* 2008; 68(20):8535–8540.

46. Graziano F, Canestrari E, Loupakis F, Ruzzo A, Galluccio N, Santini D, Rocchi M, Vincenzi B, Salvatore L, Cremolini C, Spoto C, Catalano V, D'Emidio S, Giordani P, Tonini G, Falcone A, Magnani M. Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to KRAS 3'-untranslated

region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. *Pharmacogenomics Journal* 2010;10(5):458-464.

47. Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD, Marsit CJ, Kelsey KT. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis* 2009;30(6):1003-1007.

48. Smits KM, Paranjape T, Nallur S, Wouters KA, Weijenberg MP, Schouten LJ, van den Brandt PA, Bosman FT, Weidhaas JB, van Engeland M. A let-7 microRNA SNP in the KRAS 3'UTR is prognostic in early-stage colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2011; 17(24):7723-31.

49. Sebio A, Paré L, Páez D, Salazar J, González A, Sala, N, Baiget M. The LCS6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA to the KRAS 3'-untranslated region: its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics and genomics* 2013;23(3):142-147.

50. Paranjape T, Heneghan H, Lindner R, Keane FK, Hoffman A, Hollestelle A, Dorairaj J, Geyda K, Pelletier C, Nallur S, Martens JW, Hoening MJ, Kerin M, Zelterman D, Zhu Y, Tuck D, Harris L, Miller N, Slack F, Weidhaas J. A 3'-untranslated region KRAS variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis. *Lancet Oncology* 2011;12 (4):377–386.

51. Pilarski R, Patel DA, Weitzel J, McVeigh T, Dorairaj JJ, Heneghan HM, Miller N, Weidhaas JB, Kerin MJ, McKenna M, Wu X, Hildebrandt M, Zelterman D, Sand S, Shulman LP. The KRAS-Variant Is Associated with Risk of Developing Double Primary Breast and Ovarian Cancer. *PLOS One* 2012;7(5): e37891.

52. Ryan BM, Robles AI, Harris CC: KRAS-LCS6 Genotype as a Prognostic Marker in Early-Stage CRC-Letter. *Clinical Cancer Research* 2012;18(12):3487-3488.
53. Zhang W, Winder T, Ning Y, Pohl A, Yang D, Kahn M, Lurje G, LaBonte MJ, Wilson PM, Gordon MA, Hu-Lieskovan S, Mauro DJ, Langer C, Rowinsky EK, Lenz HJ. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of KRAS gene predicts response in wildtype KRAS patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. *Annals of Oncology* 2011;22(1):104–109.
54. Cerne JZ, Stegel V, Gersak K, Novakovic S. KRAS rs61764370 is associated with HER2-overexpressed and poorly-differentiated breast cancer in hormone replacement therapy users: a case control study. *BMC Cancer* 2012;12:105.
55. Chung CH, Lee JW, Slebos RJ, Howard JD, Perez J, Kang H, Fertig EJ, Considine M, Gilbert J, Murphy BA, Nallur S, Paranjape T, Jordan RC, Garcia J, Burtress B, Forastiere AA, Weidhaas JB. A 3'UTR KRAS variant is associated with cisplatin resistance in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of Oncology* 2014 Jul 31. pii: mdu367 [Epub ahead of print].
56. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research* 2012; 72(10):2457–2467.
57. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120(5):635–647.
58. Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology* 2008;18(10): 505- 516.

59. Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2010;17(1): F19–F36.
60. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006;6(4):259–269.
61. Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, Jacks T. Suppression of non-small cell lung tumour development by the let-7 micro-RNA family. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2008;105(10):3903–3908.
62. Crowley EH, Arena S, Lamba S, Nicolantrino F, Bardelli A. Targeted Knock-in of the Polymorphism rs61764370 does not affect KRAS Expression but reduces let-7 levels. *Human Mutation* 2014; 35(2):208-214.
63. Páez D, Paré L, Salazar J, Sala N, Del Río E, Barnadas A, Marcuello E, Baiget M. Let-7 microRNA complementary site polymorphism in the KRAS 3'-UTR region as a genetic regulator in advanced colorectal cancer. Conference: 35th European-Society-for-Medical-Oncology (ESMO); 2010, 8-12 October, Milan, Italy. *ANNALS OF ONCOLOGY* Volume: 21, Supplement: 8, p.213-213.
64. Rajeevan H, Soundararajan U, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK. "ALFRED: an allele frequency resource for research and teaching." *Nucleic Acids Research*. 40(D1): D1010-D1015.(2012). Available from: <http://alfred.med.yale.edu>.
65. Langevin SM, Christensen BC. Let-7 microRNA-binding-site polymorphism in the 3'UTR of KRAS and colorectal cancer outcome: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Medicine* 2014 ;3(5):1385-95.

66. Kjersem JB, Ikdahl T, Guren T, Skovlund E, Sorbye H, Hamfjord J, Pfeifer P, Glimelius B, Kersten CH, Solvang H, Tveit KM, Kure EH. Let-7 miRNA-binding site polymorphism in the KRAS 3' UTR; colorectal cancer screening population prevalence and influence on clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin+/-cetuximab. *BMC Cancer* 2012;12(1): 1-8.

67. Sha D, Lee AM, Shi Q, Alberts SR, Sargent DJ, Sinicrope FA, Diasio RB. Association Study of the let-7miRNA-Complementary Site Variant in the 3'Untranslated Region of the KRAS Gene in Stage III Colon Cancer (NCCTG N0147 Clinical Trial). *Clinical Cancer Research* 2014;20, 3319.

68. Nelson HH, Christensen BC, Plaza SL, Wiencke JK, Marsit CJ, Kelsey KT. KRAS mutation, KRAS-LCS6 polymorphism, and non- small cell lung cancer, *Lung Cancer* 2010;69(1):51-3.

69. Menzies AM, Haydu LE, Visintin L, Carlino MS, Howle JR, Thompson JF, Kefford RF, Scolyer RA, Long GV. Distinguishing Clinicopathologic Features of Patients with V600E and V600K BRAF-Mutant Metastatic Melanoma, *Clinical Cancer Research* 2012 18;3242.

70. Sakaizawa K, Ashida A, Uchiyama A, Ito T, Fujisawa Y, Ogata D, Matsushita S, Fujii K, Fukushima S, Shibayama Y, Hatta N, Takenouchi T, Uehara J, Okuyama R, Yamazaki N, Uhara H. Clinical characteristics associated with BRAF, NRAS and KIT mutations in Japanese melanoma patients., *J Dermatol Sci.* 2015;80(1):33-7.

6. Přehled publikací autora

6.1 Původní a přehledové práce

Mačák J, Dvořáčková J, **Uvírová M**, Kuglík P. Coincidence of chronic lymphocytic leukaemia with Merkel cell carcinoma: deletion of the RB1 gene in both tumors. *Československá patologie a soudní lékařství*. 2011;47(3), 118-121.

Uvírova M, Dvořáčková J. Kvalitní mezioborová spolupráce jako důležitý faktor pro prediktivní vyšetřování u nemalobuněčného karcinomu plic. *Lékařské listy (odborná příloha Zdravotnických novin)*. 2012; (4), 6-8.

Dvořáčková J, Žmolíková J, Mužík J, **Uvírová M**. Využití fluorescenční in situ hybridizace v diagnostice melanocytárních lézí. *Onkologie*. 2013; 7(2), 74-77.

Díte P, Nechutova H, **Uvírova M**, Dvorackova J, Kianicka B, Martinek A. Autoimunné pankreatitidy. *Biomedical Papers* 2014; 158 (1), 17-22. IF (2014): 1,200.

Svoboda P, Dítě P, Klvaňa P, Kupka T, Bojková M, Žmolíková J, Urbanovská I, **Uvírová M**, Buzrla P, Dvořáčková J. Rizikové faktory a predátory progresu Barrettova jícnu do adenokarcinomu. *Vnitřní Lék.* 2014; 60, 5-6 : 467 – 473.

Uvírová M, Šimová J, Kubová B, Žmolíková J, Urbanovská J, Dvořáčková J, Martinek A, Dítě P. Molekulární genetika u gastrointestinálních stromálních tumorů. *Onkologie* 2014;8(6):257-258.

Kupka T, Šimová J, Martinek L, Svoboda P, Klvaňa P, Bojková M., **Uvírová M**, Dovrtělová L, Dítě P. Crohnova nemoc-genetické faktory z pohledu etiopatogeneze. *Vnitřní Lék.* 2014; 60. 7-8: 635-639.

Žiak D, Dvořáčková J, Hurník P, Židlík V, Šustíková J, Šimová J, **Uvírová M**, Tomanová R, Kliment M, Urban O, Zoudíjekpon V, Motyka O, Dítě P. Gastrointestinální stromální tumory, morfológická a imunohistochemická vyšetření z pohledu histologického a cytologického odběru. *Onkologie* 2014;8(6):259-263.

Dítě P, **Uvírová M**, Bojková M, Novotný I, Dvořáčková J, Kianička B, Nechutová H, Dovrtělová L, Floreanová K, Martínek A. Differentiating autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer. *Minerva Gastroenterologica et Dietologica* 2014 December;60(4):247-53.

Bojkova M, Dite P, Dvorackova J, Novotny I, Floreanova K, Kianicka B, **Uvirova M**, Martinek A. Immunoglobulin G4, Autoimmune Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Digestive Diseases* 2015;33(1), 86-90. IF (2014): 2,181.

Zidlik V, Brychtova S, **Uvirova M**, Ziak D, Dvorackova J. The Changes of Angiogenesis and Immune Cell Infiltration in the Intra-and Peri-Tumoral Melanoma Microenviroment. *International Journal of Molecular Sciences* 2015;16 (4), 7876-7889. IF (2014): 2,862.

Dvorackova J, Bielnikova H, Kukutchova J, Peikertova P, Filip P, Zelenik K, Kominek P, **Uvirova M**, Pradna J, Cermakova Z, Dvoracek I. Detection of nano- and micro- sized particles in routine biopsy material – pilot study. *Biomedical Papers* 2015; 159 (1), 87-92. IF (2014): 1,200.

Uvirova M, Simova J, Kubova B, Dvorackova N, Tomaskova H, Sedivcova M, Dite P, Comparison of the prevalence of *KRAS*-LCS6 polymorphism (rs61764370) within different tumour types (colorectal, breast, non-small cell lung cancer and brain tumours). A study of the Czech population. *Biomedical Papers* 2015; 159(3), 466-471. IF (2014): 1,200.

Rydlo M, Dvořáčková J, Kupka T, Klvaňa P, Havelka J, **Uvírová M**, Geryk E, Czerný D, Jonszta T, Bojková M, Hrabovský V, Jelínková V,

Martínek A, Dítě P. Racionální diagnostika cholangiokarcinomu. *Vnitřní Lék.* 2016; 62(2): 125-133.

6.2 Publikovaná abstrakta

Dvorackova J, **Uvírova M**, Pernicova M. Importance of FNAC in bone tumor Diagnostics: giant cell rib bone tumor: unusual case report. *Acta Cytologica* 2010; 54(3), 462-462, ISSN: 0001-5547

Uvírová M, Dvořáčková J, Šimová J, Urbanovská I, Žiak D, Konvalinka D, Kubová B. Molecular genetics changes in melanocystic lesions – case report. *Programme and abstract book: Olomouc 2011*, 33-34. ISBN 978-80-87327-59-3.

Uvírova M, Dvorackova J, Konvalinka D. From human papilloma viruses and cervical carcinoma to HPV detection. *Virchows Archiv* 2010;452(2), 234-234, ISSN: 0945-6317

Uvírova M, Urbanovska I, Konvalinka D, Simova J, Kubova B, Jaluvkova M, Zmolikova J, Ziak D, Dvorackova J. Genetic changes in non- small cell lung carcinoma. *Virchows Archiv* 2012; 461, S172-S172, ISSN: 0945-6317

Nieslanik J, Dvorackova J, **Uvírova M**, Laciok S, Ondrussek R, Ziak D. Phenotypical and morphological heterogeneity of breast cancer. Our experience. *Virchows Archiv* 2012;461, S250-S250, ISSN: 0945-6317

Ziak D, Dvorackova J, **Uvírova M**, Zidlik V, Sustikova J. Pancreatic lesions – a proposal for diagnostic protocol for FNA cytology, based on analysis of 510 our cases. *Histopathology* 2012;61 (S1), 58-58, ISSN: 0309-0167. IF (2012):2,857.

Šimová J, Kubová B, **Uvírová M**, Urbanovská I, Konvalinka D, Žebráková I, Žmolíková J, Pitronová S, Dvořáčková J. Mutace v *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* genu a jednonukleotidový polymorfismus (SNP) ve vazebném místě pro let-7 mikroRNA v 3'-UTR oblasti *KRAS* genu

(KRAS-LCS6) u pacientů s kolorektálním karcinomem. *Onkologie*. 2012; 6(Suppl.B), B39. ISSN 1802-4475.

Sustikova J, Dvorackova J, **Uvirova M**, Ziak D, Zidlik V. EUS-FNA (endoscopic ultrasonography directed fine needle aspiration biopsy) and diagnostic pitfalls in diagnostic cytology of cystic lesions of the pancreas, *Pancreatology* 2012;12(6), 511, ISSN: 1424-3903. IF (2012):2,043.

Nieslanik J, Dvorackova J, **Uvirova M**, Ziak D, Konvalinka D, Zmolikova J, Laciok S, Ondrussek R, Zidlik V. Frequency and immunohistomorphological profile of the lung adenocarcinomas with activation mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor (*EGFR*) gene in 435 Non small Cell Lung Carcinomas (NSCLC). *Virchows Archiv* 2013;463(2), 237-237, ISSN: 0945-6317

Uvirova M, Konvalinka D, Simova J, Kubova B, Urbanovska I, Jaluvkova M, Zmolikova J, Ziak D, Dvorackova J: Genetics changes in non-small cell lung carcinoma, *Biomedical Papers* 2013;157 (Supplement2):S89-S105. IF (2013):1,661.

Uvirova M, Simova J, Kubova B, Urbanovska I, Zmolikova J, Pitronova S, Mech R, Konvalinka D, Dvorackova J. Analysis of potential predictive biomarkers (mutation of *BRAF*, *PIK3CA* gene, *PTEN* expression and *EGFR* gen amplification) for resistance to anti EGFR therapy in metastatic colorectal cancer patients, *Biomedical Papers* 2013;157 (Supplement2):S89-S105. IF (2013):1,661.

Kubova B, Simova J, **Uvirova M**, Urbanovska I, Konvalinka D, Mech R, Mazurova J, Hopenstokova A, Dvorackova J. Prevalence of *KRAS-LCS6* polymorphism (rs61764370) within different tumours types (breast, colorectal and non small cell lung cancer): A study of Czech population. *European Journal of Cancer* 2013;49, S202-S202, ISSN: 0959-8049. IF (2013):4,819.

Urbanovská I., Konvalinka D, **Uvírová M**, Tomanová R, Buzrla P, Marková D, Paleček T, Dvořáčková J, Drábek J. An association of molecular genetic parameters in gliomas and meningiomas with

histological type and grade. *Programme and abstract book*: Olomouc, 2013, 44-45. ISBN 978-80-7471-022-3.

Šimová J, Kubová B, **Uvírová M**, Pitronová S, Urbanovská I, Konvalinka D, Měch R, Hopenštoková A, Mazurová J, Žebráková I, Benková K, Kubošová M, Ondrušek R, Dvořáčková J: Alterace PI3K signální dráhy a SNP (*KRAS-LCS6*, rs61764370) u pacientek s karcinomem prsu, *Abstract book*, Olomouc 2013, A32, ISBN 978-80-260-8368-9

Kubova B, Simova J, Uvirova M, Urbanovska I, Konvalinka D, Měch R, Mazurova J, Hopenstokova A, Dvorackova J. Prevalence of *KRAS-LCS6* polymorphism (rs61764370) within three different type of tumours (breast, colorectal and non small cell lung cancer (NSCLC)). A study of Czech population, *European Journal of Cancer* 2013;49 Supplement 2, ISSN: 0959-8049. IF (2013):4,819.

Konvalinka D, Simova J, Zmolikova J, Pitronova S, Kubova B, Mech R, Urbanovska I, **Uvirova M**, Hopenstokova A, Rafajova M, Trombik L, Zebrakova I, Mazurova J, Dvorackova J. Testing of *EGFR* mutations, *ALK* and *ROS1* rearrangements, and *KRAS-LCS6* polymorphisms in NSCLC in Czech Patients, *European Journal of Human Genetics* 2014; 22, Suppl 1, 492, ISSN: 0959-8049. IF (2014):4,349.

Zidlik V, Brychtova S, Nieslanik J, Ziak D, Dvorackova J, **Uvirova M**, Dvoracek M. Immunohistochemical analysis of FOXP3+T regulatory lymphocytes in cutaneous melanocytic lesions. *Virchows Archiv* 2014;465, S188-S188, ISSN: 0945-6317

Židlík V, Brychtová S, Dvořáčková J, **Uvírová M**, Hurník P, Šustíková J, Laciok Š, Ondrušek R, Markantová-Petrová Z. Imunohistochemická analýza FOXP3+ T regulačních lymfocytů u kožních melanocytárních lézí. *Programme and abstract book*: Olomouc, 2014, ISBN 978-80-7471-069-8

Sustikova J, **Uvirova M**, Žiak D, Tomaskova H, Hoskova E, Jaluvkova A, Kucerova L, Hurnik P, Zidlik V, Dvorackova J. Smear, cytoblock,

liquid based cytology (LBC) and their role in processing cytology specimens by EUS FNAB method. *Cytopathology* 2014; 25(S1) 83, ISSN: 0956-5507. IF (2014):1,481.

Sustíková J, Dvorackova J, **Uvírova M**, Ziak D, Zidlik V, Hurnik P, Urban O, Kliment M. Histo-cytological diagnosis of GIST EUS FNA versus clamp biopsy, sensitivity, specificity and limitations, *Pancreatology* 2014;14(3),S26-S27, ISSN: 1424-3903. IF (2014):2,837.

Dite P, Dvorackova J, **Uvírova M**, Bojkova M, Martinek A. Serological immunoglobulin g4 positivity in pancreatic cancer, *Pancreatology* 2014;14(3),S49, ISSN: 1424-3903. IF (2014):2,837.

Uvírová M, Dvořáčková J, Žmolíková J. Genetické aberace u melanocytárních lézí, *Česko-Slovenská patologie a soudní lékařství* 2014; Supplementum 1, 29-30, ISSN: 1210-7875

Dvořáčková J, Žiak D, Hurník P, Židlík V, Šustíková J, Šimová J, **Uvírová M**, Tomanová R, Kliment M, Urban O. Výhody on site cytologie EUS FNA pankreatu, *Česko-Slovenská patologie a soudní lékařství* 2014; Supplementum 1, 53, ISSN: 1210-7875

Dvořáčková J, Žiak D, Hurník P, Židlík V, Šustíková J, Šimová J, **Uvírová M**, Tomanová R, Kliment M, Urban O, Zoundjiekpon V, Motyka O, Dítě P. Porovnání cytologického a bioptického vyšetření v diagnostice GIST z pohledu patologa, *Česko-Slovenská patologie a soudní lékařství* 2014; Supplementum 1, 42, ISSN: 1210-7875

Měch R, Urbanovská I, Šimová J, **Uvírová M**, Konvalinka D, Kubová B, Hopenštoková A, Mazurová J, Žebráková I, Kalábová L, Trombik L, Žmolíková J, Tomášková H, Svoboda P, Dítě P, Dvořáčková J. Analysis of candidate molecular markers in prediction of Barrett's esophagus, *Gastroenterologie a hepatologie* 2014,68(S2), ISSN 1804-7874

Ondrussek R, Nieslanik J, Antol M, Ziak D, Hurnik P, **Uvirova M**, Dvorackova J, Laciok S. The coexistence of breast columnar cell lesions in low grade invasive carcinoma: Immunohistochemical study of Bcl2 expression and cyclin D1. *Virchows Archiv* 2015;467, S53-S53, ISSN: 0945-6317

Zmolikova J, Pitronova S, **Uvirova M**, Kubova B, Simova J, Strossova N, Ziak D, Dvorackova J. Our experience with HER2 screening of the bioptic breast cancer samples using method fluorescence in situ hybridisation in the year 2014 – application of the updated ASCO/CAP guideline recommendations. *European Journal of Cancer* 2015;51, S85-S86, ISSN: 0959-8049. IF (2014):5,417.

Šustíková J, **Uvírová M**, Žiak D, Tomášková H, Židlík V, Hurník P, Urban O, Dvořáčková J. Šetrná diagnostická metoda EUS FNA pankreatických lézí s pohledu patologa, *Sborník abstrakt*, ISBN 978-80-7464-739-0

Žmolíková J, Pitronová S, **Uvírová M**, Kubová B, Šimová J, Urbanovská I, Žiak D, Dvořáčková J Aplikace aktuálních Doporučených postupů pro zpracování a vyšetření bioptických vzorků prsu u testování HER2 metodou fluorescenční hybridizace in situ a jejich význam v praxi. *Klinická Onkologie* 2015,28 (Suppl1) S44, ISSN: 0862-495X

Kubova B, Simova J, **Uvirova M**, Tomaskova H, Bravencova H, Zmolikova J, Pitronova S, Urbanovska I, Kalabova L, Konvalinka D, Mech R, Zebrakova I, Hopenstokova A, Mazurova J, Dvorackova J. Alteration in the PI3K/AKT signaling pathway in Czech breast cancer patients, *European Journal of Human Genetics* 2015; 23(S1),299-300, ISSN: 1018-4813. IF (2014):4,349.

Sustikova J, **Uvirova M**, Ziak D, Tomaskova H, Zidlik V, Hurnik P, Urban O, Dvorackova J. Cytological diagnosis of metastatic and less common lesions of pancreas from materials obtained by EUS-FNA method, *Pancreatology* 2015; 15(3), S38, ISSN: 1424-3903. IF (2014):2,837.

Hurnik P, Ziak D, **Uvírova M**, Zidlík V, Sustikova J, Ondrussek R, Kliment M, Urban O, Fojtik P, Nohynkova E, Dvorackova J. Cytodiagnostic challenge: Carcinoma or reactive atypia – EUS FNA of bile duct in the field of parasitosis *Giardia Lamblia*.

Pancreatology 2015; 15(3), S38, ISSN: 1424-3903. IF (2014):2,837.

Ziak D, Dvorackova J, Faistova H, Dolezilek R, Hurnik P, Zidlík V, Sustikova J, Simova J, **Uvírova M**, Tomanova R, Kliment M, Urban O, Zoundjiekpon V, Motyka O, Dite P. EUS –FNA cytology versus forceps and resection biopsy in evaluation of the prognostic parameters of gastrointestinal stromal tumours, *Cytopathology* 2015; 26 (S1), 46-47, ISSN: 1365-2303. IF (2014):1,481.

Měch R, Urbanovská I, Šimová J, **Uvírová M**, Konvalinka D, Kubová B, Hopenštoková A, Mazurová J, Žebráková I, Kalábová L, Trombik L, Žmolíková J, Motyka O, Svoboda P, Dítě P, Dvořáčková J. Analysis of candidate molecular markers in prediction of Barrett's esophagus, *Abstract book*, Olomouc 2015, P47, ISBN 978-80-260-8368-9

6.3 Seznam přednášek a posterů přednesených autorem (bez abstraktu) na veřejných odborných fórech

Uvírova M.: Možnosti molekulárně genetických vyšetření melanomových lézí. Olomouc, přednáška, projekt OPVK, 10.11.2009

Urbanovská I, **Uvírová M**, Jalůvková M, Šimová J, Konvalinka D, Kubová B, Žebráková I, Dvořáčková J, Buzrla P. Současné možnosti molekulárně cytogenetické a molekulárně genetické analýzy u nádorů mozku, 26.-27.11.2009, XIII. Konference DNA diagnostiky,

Konvalinka D, Šimová J, Kubová B, Jalůvková M, **Uvírová M**, Dvořáčková J. Interdisciplinární konsensus pro prediktivní vyšetřování aktivačních mutací genu pro receptor epidermálního růstového faktoru

(*EGFR*) u nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC), 25.-26.11.2010, XIV. Celostátní konference DNA diagnostiky, Brno

Uvírová M, Dvořáčková J, Šimová J, Urbanovská I, Žiak D, Konvalinka D, Kubová B. Molecular genetics changes in melanocystic lesions, The 7th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, April 29-30,2011, Olomouc

Žiak D, Dvořáčková J, **Uvírová M**, Šimová J, Konvalinka D. Vyšetřování aktivačních mutací *EGFR* u nemalobuněčného karcinomu plic. Naše zkušenosti v CGB laboratoři, Seminář mladých patologů Litomyšl 2011

Uvírová M, Žmolíková J, Šimová J, Marková D, Skalíková R, Jalůvková M, Štrossová N. Úloha biomarkerů v léčbě solidních nádorů, Celostátní sjezd Společnosti lékařské genetiky ČLS JEP a 44. výroční cytogenetická konference, Třeboň 7. - 9. září 2011

Urbanovská I, Šimová J, **Uvírová M**, Dvořáčková J, Buzrla P, Paleček T, Drábek J. Detekce genetických a epigenetických změn u multiformního glioblastomu, Izakovičův memoriál, 6.-7.10.2011, Spišská Nová Ves, Slovensko

Šimová J, Kubová B, Janáková T, **Uvírová M**, Urbanovská I, Jalůvková M, Konvalinka D, Žebráková I, Dvořáčková J. Mutace v *KRAS*, *BRAF* a *PIK3CA* genu u pacientů s kolorektálním karcinomem, 24.-25.11. 2011, XV. Celostátní konference DNA diagnostiky, Praha

Žmolíková J, **Uvírová M**, Šimová J, Buzrla P, Marková D, Dvořáčková J. Molekulárně genetické změny u melanocytárních lézí, Hradecké cytogenetické dny, 24.5.2012,

Žmolíková J, **Uvírová M**, Bajčiová V, Skalíková R, Pitronová S, Marková D, Dvořáčková J. Molekulárně genetická diagnostika melanocytárních lézí dětského věku, 45. výroční cytogenetická konference s mezinárodní účastí, 13.-14.9.2012

Urbanovská I, Konvalinka D, Šimová J, Kubová B, Měch R, **Uvírová M**,

Tomanová R, Buzrla P, Delongová P, Paleček T, Drábek J, Dvořáčková J. Somatic mutations in IDH1 and IDH2 genes in gliomas, 10th Symposium & Workshop on Molecular Pathology and Histo(cyto)chemistry, 100th Olomouc Diagnostic Seminar of the Czech Division of the International Academy of Pathology, 24.4-26.4.2013, Olomouc

Konvalinka D, Urbanovská I, **Uvírová M**, Šimová J, Mazurová J, Měch R, Kubová B, Hopenštoková A, Dvořáčková J. Lidské papillomaviry a možnosti jejich detekce pro prevenci cervikálního karcinomu, Konference ČSLGS, Ostrava, 30.5. 2013

Žmolíková J, **Uvírová M**, Šimová J, Skalíková R, Pitronová S, Dvořáčková J. Význam molekulárně genetických vyšetření v diagnostice Barrettova jícnu, 46. výroční konference Cytogenetické sekce Čs. biologické společnosti s mezinárodní účastí, Brno, 5.-6.9.2013

Kubová B, Šimová J, **Uvírová M**, Urbanovská I, Konvalinka D, Měch R, Mazurová J, Hopenštoková A, Dvořáčková J. Prevalence of *KRAS*-LCS6 polymorphism (rs61764370) within three different type of tumours (breast, colorectal and non small cell lung cancer (NSCLC)), XVII. celostátní konference DNA diagnostiky, 28. – 29. listopadu 2013, Dolní Morava, poster

Ondrušek R, Dvořáčková J, **Uvírová M**, Žiak D, Laciok Š, Nieslanik J, Židlík V, Markantová-Petrová Z, Hurník P. Kazuistika: intranodální palisádující myofibroblastom
11. – 12. 4. 2014, Seminář mladých patologů, Litomyšl

Urbanovská I, Konvalinka D, Šimová J, Kubová B, Měch R, **Uvírová M**, Tomanová R, Buzrla P, Delongová P, Paleček T, Drábek J, Dvořáčková J. Somatic mutations in *IDH1* and *IDH2* genes in gliomas, XXV. Izakovičov memoriál, 2.-3.10.2014, Trenčianské Teplice,

Konvalinka D, Urbanovská I, Měch R, Šimová J, Kubová B, **Uvírová M**, Rafajová M, Hopenštoková A, Mazurová J, Žebráková I, Trombik L,

Kalábová L, Dvořáčková J: Možnosti molekulární diagnostiky v alergologii a imunologii, XVI. Imunologické a alergologické dny, 22. 11. 2014, Malenovice

Hurník P, Žiak D, Heroková J, **Uvírová M**, Tomanová R, Buzrla P, Nieslanik J, Antol M, Faistová H, Doležilek R, Motyka O, Dvořáčková J. Koexistence intraduktálních proliferativních lézí prsu u dobře diferencovaného invazivního karcinomu NST a tubulárního karcinomu. Retrospektivní studie 46 případů. 17. – 18. 4. 2015, Seminář mladých patologů, Litomyšl.

6.4 Řešitelství v grantových projektech

Analýza mutací ve vybraných genech signální dráhy EGFR receptoru, imunohistochemická analýza exprese PTEN proteinu v souvislosti s vnímavostí resp. odpovědí pacientů na léčbu pomocí monoklonálních protilátek proti EGFR u mCRC., vnitřní grant AGEL, 2011-2013

Kolorektální karcinom – molekulárně genetická analýza vybraných genů, projekt MSK 01868/2012/RRC, 2012-2013

TE02000058 - Centrum kompetence pro molekulární diagnostiku a personalizovanou medicínu, Technologická agentura České republiky, 2014-2019.

7. Přílohy

Coincidence of chronic lymphocytic leukaemia with Merkel cell carcinoma: deletion of the RB1 gene in both tumors

Mačák J.¹, Dvořáčková J.², Uvírová M.³, Kuglík P.⁴

¹Department of Pathology, Faculty Hospital and Medical Faculty, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²Department of Pathology, Faculty Hospital Ostrava and Medical Faculty University of Ostrava, Czech Republic

³CGB laboratory Ltd., Ostrava, Czech Republic

⁴Department of Medical Genetics, Faculty Hospital and Medical Faculty, Masaryk University, Brno, Czech Republic

SUMMARY

The authors report a case of a 64-year-old man with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) diagnosed 5 years ago. Recently, the patient was admitted with a tumour of the skin in the left lumbar region. Histological and immunohistochemical examinations established the diagnosis of Merkel cell carcinoma (MCC). Electron-microscopic examination revealed the formation of spherical aggregates of intermediate-sized filaments in the perinuclear region. The coincidence of MCC and CLL is rather rare and in published cases, no cytogenetic examinations were performed. We examined the RB1 gene using the interphase FISH method. A biallelic deletion in CLL tumour cells was detected; in MCC tumour cells, biallelic deletion was found in 33 % of the cells and monoallelic deletion in 57 % of the cells. In addition, chromosome 6 trisomy and 1p36 deletion were detected. Examination of non-neoplastic cells of the patient's skin showed a biallelic presence of the RB1 gene. According to the relevant literature, examination of the RB1 gene in CLL has informational value as a prognostic factor. The relationship between deletion of the RB1 gene and prognosis in MCC has not yet been determined and needs more research.

Keywords: Merkel cell carcinoma – chronic lymphocytic leukaemia – immunohistochemistry – RB1 gene

Koincidence chronické lymfatické leukémie a karcinomu z Merkelových buněk: delece RB1 genu v obou nádorech

SOUHRN

Autoři popsali případ 64-letého muže, u kterého byla zjištěna chronická lymfatické leukémie (CLL) před pěti lety. V současné době byl pacient přijat pro nádor kůže v lumbální oblasti vlevo. Histologické a imunohistologické vyšetření ukázalo, že jde o karcinom z Merkelových buněk (MCC). Elektronově mikroskopické vyšetření ukázalo charakteristické paranukleární globule tvořené intermediálními filamenti. Koincidence MCC a CLL je poměrně vzácná a cytogenetická vyšetření zde nebyla publikována. Vyšetřovali jsme RB1 gen pomocí interfázové FISH metody. Cytogenetické vyšetření RB1 genu ukázalo bialelickou delecí u nádorových buněk CLL; u MCC byla bialelická delece u 33 % a monoalelická delece u 57 % buněk. Současně byla prokázána trizomie 6 a delece 1p36. Vyšetření nenádorové kůže ukázalo přítomnost RB1 genu v obou alelách. Podle literárních údajů má vyšetření RB1 genu u CLL význam při stanovení prognózy onemocnění. Vztah mezi delecí RB1 genu a prognózou onemocnění nebyl dosud u MCC stanoven a vyžaduje vyšetření dalších případů.

Klíčová slova: karcinom z Merkelových buněk – chronická lymfatická leukémie – imunohistochemie – RB1 gen

Cesk Patol 2011; 47(3): 118–121

The coincidence of Merkel cell carcinoma (MCC) and chronic lymphocytic leukaemia/small lymphocytic lymphoma (CLL) was described in isolated cases (1–3). To distinguish the tumours, immunohistochemical or electron-microscopic examination is required in most cases. In cases where MCC occurs subsequently after the formation of CLL, it is necessary to eliminate the possibility of a transformation to lymphoma of a high grade of malignancy.

Cytogenetic examination of MCC reveals a deletion of the RB1 gene (location 13q14), trisomy 6 occurs in about 50 % of cas-

es and distal deletion involving chromosome 1p35–36 is common; in CLL, 13q14 deletion is rather frequent as well (4,5). The goal of this study was to examine both tumours in histological, immunohistochemical and cytogenetic terms. The interphase FISH method was used to prove the presence of the tumour suppressor gene RB1.

MATERIALS AND METHODS

In a 64-year-old patient, CLL was diagnosed 5 years ago by flow cytometry of peripheral blood – the lymphocytes were CD5 and CD19 positive. The disease did not progress, and the patient was followed in clinical conditions, but he was not treated (watch and wait management). Neither the lymph nodes, spleen nor liver were enlarged. During the examination, the number of lymphocytes in the peripheral blood was $47.2 \times 10^9/L$, erythrocytes $2.52 \times 10^{12}/L$,

✉ Correspondence address:

Prof. MUDr. J. Mačák, CSc.
Ústav patologie FN Brno
Jihlavská 20, 625 00 Brno
e-mail: macak.jirka@seznam.cz
tel.: (+420) 53 223 2366



Fig. 1. Merkel cell carcinoma of the skin in the lumbar area.

thrombocytes $98.4 \times 10^9/L$ and the concentration of haemoglobin 86g/L.

A hemispherical tumour sized 4.0×6.0 cm occurred on the skin in the left lumbar region with a 4-month history (Fig. 1). The tumour was removed surgically and no relapse was found in the next 8 months of clinical follow-up. Standard histological, immunohistochemical, electron-microscopic and cytogenetic examinations using the FISH method were performed.

The tumour of the skin was fixed by 4% neutral formalin and processed using a standard paraffin technique. Histological sections were stained with haematoxylin-eosin.

Immunohistochemical examination. All immunohistochemical examinations were performed using the avidin-biotin complex method according to the manufacturer's data sheets with positive and negative controls. The following antibodies were used (dilution in parenthesis): AE1-AE3, clone AE1-AE3 (1:50); CK20, clone Ks 20.8 (prediluted); CK7, clone OV-TL 12/13 (1:50); NSE, clone 2F11¹ (1:50); LCA, clone 2B11+PD7/26 (1:100); CD20 clone L26 (1:100); CD45 RO, clone UCHL 1 (1:100); Bcl-2, clone 124 (1:25); CD117 (1:25); CD99, clone 12E7¹ (1:25); vimentin, clone 3B4 (1:50); Ki-67, clone MIB-1, all from DAKO Glostrup, DK; synaptophysin, clone 27G12 (1:100); chromogranin, clone 5H7 (1:100); CD56, clone 1B6 (1:100); TTF-1, clone SPT24 (1:50), from Novocastra, Newcastle-upon-Tyne, UK; CAM 5.2 (1:200) produced by Becton Dickinson, USA.

Electron-microscopic examination. Small pieces of tumour tissue were prefixed in 3% glutaraldehyde in a 0.2 M phosphate buffer pH 7.4 for 24 h at 4 °C and postfixed in a 2% osmium tetroxide in phosphate buffer for 2 h at 4 °C, followed by dehydration and embedding in an Epon-Durcupan resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. The FEI Morgagni 268(D) electron microscope was used for the examination.

Interphase fluorescence in situ hybridization (FISH). Paraffin sections with a thickness of 5µm were heated overnight at 56 °C. After the paraffin was removed, paraffin-free sections were permeabilized using HCl and incubated in sodium thiocyanate (NaSCN). Then, proteolytic predigestion

with protease at 37 °C for 30–35 minutes followed. The sections were postfixed in a 10% buffered formalin and, after the probe was applied, co-denatured at 85 °C for 1 minute. Hybridization was carried out overnight at 37 °C. After the probe was washed out, the nuclei were additionally stained with DAPI II. The result was read in a fluorescent microscope. The following probes were used for the hybridization: LSI 13(RB1) 13q14 Spectrum Orange Probe and Spectrum Green Probe, LSI 1p36/1q25, LSI 13q34; CEP 6 made by Vysis, Abbott Laboratories Inc., Des Plaines, IL, USA.

According to a standard method, cultured lymphocytes from the patient's peripheral blood were processed as well. The LSI 13(RB1) 13q14 Spectrum Orange Probe was used together with the LSI 13q34 Spectrum Green Probe (Vysis, Abbott) for verification purposes.

RESULTS

Histological examination of the skin tumour showed a malignant neoplasm consisting of medium-sized cells having large nuclei with homogeneous chromatin (Fig. 2). Necrosis was observed in some nodules. The tumour extended from the upper dermis to the subcutis; angioinvasion was evident in some areas. The mitotic rate was high (50 mitoses/10HPF).

The immunohistochemical examination revealed that the tumour cells reacted positively with the following markers: CK20 (dot-like paranuclear positivity) (Fig. 3), synaptophysin, Bcl-2, CD99, CD56, proliferation marker Ki-67 was positive in about 40 % of cells. Negative results were found with the following markers: TTF1, LCA, CD20, CD45RO, CD10, CK7, AE1-AE3, CAM 5.2, vimentin, CD117.

Electronmicroscopic examination showed mostly spherical formations consisting of intermediate filaments in the cytoplasm of

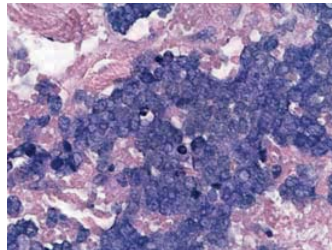


Fig. 2. Merkel cell carcinoma consists of medium-sized tumour cells containing rather large, oval, hyperchromatic nuclei and a small amount of cytoplasm. Haematoxylin-eosin, magnification 400x.

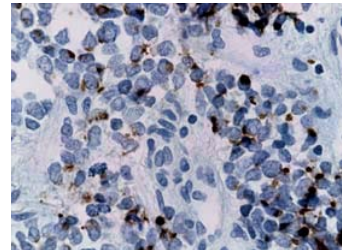


Fig. 3. Merkel cell carcinoma – paranuclear dot-like positivity with an antibody against CK20. Immunohistochemistry CK20, magnification 400x.

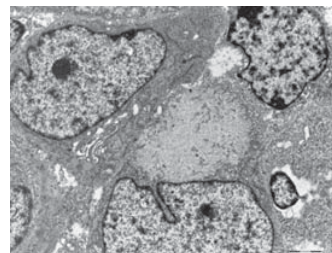


Fig. 4. Merkel cell carcinoma – paranuclear aggregates of intermediate-sized filaments. Electron-microscopy, magnification 7100x

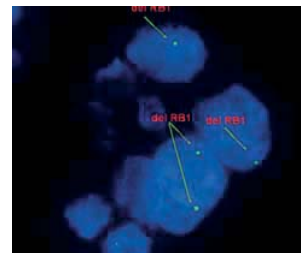


Fig. 5. Biallelic deletion of the RB1 gene in Merkel cell carcinoma. Interphase FISH method with a 13q14 probe, magnification 5000x.

many cells in the paranuclear area (Fig. 4). The presence of neurosecretory granules was minimal. Cell junctions were formed by desmosomes.

Using the interphase FISH method in MCC, monoallelic deletion of the RB1 gene was shown in 57 % of tumour cells and biallelic deletion in 33 % (Fig. 5). Examination of the tumour-free cells of the patient's skin revealed the presence of the RB1 gene in both alleles. In the neoplastic lymphocytes of CLL, deletion of the RB1 gene was found in both alleles. In addition, chromosome 6 trisomy and 1p36 deletion were found in MCC.

DISCUSSION

MCC is a rather rare tumour that occurs predominantly at the age of about 68 years (4,6). It is derived from Merkel cells dispersed between basal cells of the epidermis and hair follicles.

On the contrary, CLL is one of the most frequent leukaemias/lymphomas of the western world with incidence increasing with age. The mean age of diagnosis is 65 years (7).

Brenner et al. (1) found, in a group of 67 patients diagnosed with MCC, that a second neoplasia occurred in up to 25 % of the patients; in 63 % of cases the second tumour occurred before the formation of MCC, 2 % contemporaneously and 26 % subsequently. The average time of formation of the secondary neoplasia was 4 years. In our case, CLL preceded and it was not treated. MCC occurred 5 years later.

Two main causes play a role in the carcinogenesis of these two tumours:

- an immune system defect with various immunocompromised conditions (8,9).
- cytogenetic changes; particularly 13q losses with deletion of the RB1 locus are very important in most cases (10). Protein of the RB1 gene (pRB1) reacts with the family of transcriptional factors involved in cell cycle regulation. If pRB1 is bound to the transcription factor E2F, the cell does not enter the cell cycle (11).

Another cause of carcinogenesis in MCC is Merkel cell polyomavirus, found in about 80 % of cases (12,13). After viral episome disruption and integration into the cell genome, the process of carcinogenesis can be initiated.

Although the suppressor gene RB1 was discovered in retinoblastoma, its mutations and deletions are associated with other types of tumours as well, such as small-cell lung cancer, bladder cancer, cervical cancer and prostate cancer.

In CLL, deletion of the RB1 gene (13q14) can be found frequently. Using the FISH method, the deletion was found in 40–50 % of

patients (14). Other frequent cytogenetic aberrations are: IG genes are rearranged in 40–50 % of cases, non-mutated (>98% homology with the germline) and showing somatic hypermutation in 50–60 % of cases (7).

If deletion of the RB1 gene occurs in both alleles, it usually results in a loss of pRB1 formation or function (15). In our case, the biallelic deletion was found in lymphocytes of CLL while it was shown in 33 % of MCC tumour cells. Examination of tumour-free skin revealed a biallelic presence of the RB1 gene. Therefore, the genetic changes are supposed to occur subsequently during the patient's life. Deletion of the RB1 gene in lymphocytes of CLL is relatively frequent (in 40–50 % of cases) (14). In MCC, the data indicate 13q losses as the most common chromosomal abnormalities and the likely target of these deletions is the RB1 locus (10). According to our opinion, deletion of the RB1 gene in both tumours is an incidental event having no connection with mutation mosaicism.

Chromosome 6 trisomy occurs in almost 50 % of cases in patients diagnosed with MCC, and deletions of 1p35–36 are frequent as well (4). Both cytogenetic abnormalities were present in our case.

Using immunohistochemical methods, MCC must be distinguished particularly from lymphomas, metastasis of small-cell lung cancer, Ewing's sarcoma/PNET and melanoma. By immunohistochemical examination, dot-like positivity with an antibody against CK20 is found. The finding is typical of MCC and it was noted in our case as well. Small-cell lung cancer expresses the CK20 marker in only 0.03 % of cases (16). On the contrary, positivity with an antibody against CK7 occurs in up to 43 % of small-cell lung cancer cases. The TTF-1 marker is typical of small-cell lung cancer, and is positive in more than 90 % of cases (16). In our case, the CK7 and TTF-1 markers were negative.

MCC can be distinguished from lymphomas by immunohistochemical examination with the LCA, CD20, CD45RO and CD10 antibodies. A positive finding including markers CD99, synaptophysin and CD56 would favour Ewing's sarcoma/PNET. This diagnosis is also disproved by the findings of dot-like positivity with an antibody against cytokeratin CK20 and of intermediate filaments by electron-microscopic examination (16).

A coincidence of CLL and MCC can probably occur accidentally in a patient's life. Since the number of tumours increases substantially in later life, the probability of their concurrent or subsequent occurrence increases as well. Deletion of the RB1 gene occurs frequently in the two tumours as well. Results of the RB1 gene examination in progenitor cells would also be interesting. Deletion of the RB1 gene adversely affects the prognosis of certain tumours such as plasmacytoma and CLL (5,17).

Relationship between deletion of the RB1 gene and prognosis in MCC has not been defined.

REFERENCES

- Brenner B, Sulkes A, Rakowsky E, et al. Second Neoplasms in Patients with Merkel Cell Carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1358–1362.
- Warakale DR, Rytina E, Burrows NP, et al. Merkel cell tumour associated with chronic lymphocytic leukaemia. *Brit J Dermatol* 2001; 144: 216–217.
- Ziprin P, Smith S, Salerno G, et al. Two cases of Merkel cell tumour arising in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Brit J Dermatol* 2000; 142: 525–528.
- Weeden D, Strutton G. *Skin pathology* (2nd edn). Churchill Livingstone; 2002: 989.
- Zoer N, Königsberg R, Ackermann J, et al. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000; 95: 1925–1930.
- Akhtar S, Oza KK, Wright J. Merkel cell carcinoma: Report of 10 cases and review of the literature. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 755–767.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (4th edn). IARC; 2008: 439.
- Boyle F, Pandalbury S, Bell D. Further insights into the natural history and management of primary cutaneous neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 31: 3615–3623.
- Goopu C, Woolons A, Ross J, et al. Merkel cell carcinoma arising after therapeutic immunosuppression. *Br J Dermatol* 1997; 137: 637–641.
- Leonard JH, Hayward N. Loss of heterozygosity of chromosome 13 in Merkel cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 20: 93–97.
- Snustad PD, Simmons MJ. *Principles of genetics* (5th edn). John Wiley and Sons; 2009: 823.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, et al. Clonal

- integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cells Carcinoma. *Science* 2009; 22: 1096–1100.
13. Wada M, Okamura T, Okada M, et al. Frequent chromosome arm 13q deletion in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 1999; 13: 792–798.
 14. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al. 13q14 deletion in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinicopathologic features. *Haematologica* 1999; 84: 589–593.
 15. Liu YL, Hermanson M, Grandér D, et al. 13q deletions in lymphoid malignancies. *Blood* 1995; 86: 1911–1915.
 16. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry (2nd edn). Churchill Livingstone; 2006: 828.
 17. Hernández JÁ, Rodríguez AE, González M, et al. A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with a worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica* 2000; 95: 1925–1930.



MONITOR

aneb **nemělo by vám uniknout, že ...**

■ ORTOPEDICKÁ PATOLOGIE ►

... téměř 70 % angiosarkomů kosti je cytokeratin pozitivních s možnou snadnou záměnou za metastatický karcinom

Vaskulární nádory kostí (kromě hemangiomů) jsou vzácné a jejich klinické příznaky a histologické znaky jsou variabilní – od snadno rozpoznatelné vazoformativní proliferace po nediferencovaný nádor. Angiosarkomy (AS) kostí jsou známy svým nepředvídatelným chováním a mohou být extrémně agresivní.

Autoři ze dvou kontinentů se pokusili na sestavě 42 angiosarkomů kostí od 38 pacientů definovat histologické znaky primárního kostního angiosarkomu, které zatím nejsou nikde v literatuře jednoznačně vymezeny. Podle některých je AS kosti definován high-grade cytologickými atypiami a vysokou mitotickou aktivitou, jiní doporučují jako kritérium jadernou hyperchromázii, pleomorfismus a vysokou mitotickou aktivitu (> 5 mitóz/10 HPF).

Dalším cílem studie byla eventuelní identifikace intermediární kategorie vaskulárních nádorů kosti ležící mezi epitelioidním hemangiomelem a AS kosti. Bylo naznačeno, že endoteliální malignity kosti by měly být považovány za součást spektra, jehož limitem na jedné straně jsou zcela benigní afekce, na druhé high-grade endoteliální malignity (AS). Klasifikace nádorů s morfologií mezi běžným hemangiomelem a angiosarkomem je poněkud kontroverzní. Dobře popsanou jednotkou je epitelioidní hemangiom, který může být multifokální, může destruovat kortex a šířit se do měkkých částí, a recidivuje v 8 % případů a ve 2 % metastazuje do lymfatických uzlin. Má značné podobnosti s nádorem, který byl popsán Evansem et al. jako hemangioendoteliom kosti s intermediárním biologickým chováním. Nicméně kritéria odlišující epitelioidní hemangiom a hemangioendoteliom nejsou v literatuře uváděna, snad kromě lobulární architektury u epitelioidního hemangiomu. Dalším maligním tumorem je epitelioidní hemangioendoteliom kosti s charakteristickou morfologií, identickou jako u měkkotkáňových případů.

Pro tyto dva cíle bylo vybráno 80 tumorů od 74 pacientů diagnostikovaných jako AS kostí, a vybrány byly nádory vykazující atypie, hyperchromazii jader, mitózy a/nebo atypické mitózy, a ty, které byly pozitivní v imunoreakci nejméně pro jeden endoteliální marker.

Histologicky AS kosti nejčastěji vykazovaly solidní růst, v 50 % případů byly přítomné zralé cévy, vždy vyslané atypickými endoteliemi. Většina angiosarkomů měla epitelioidní morfoloii. Častým histologickým znakem byla přítomnost intracytoplazmatických vakuol s erytrocyty nebo prázdných, extravazace erytrocytů s depozicí Fe. Všechny nádory vykazovaly cytonukleární atypie, od lehkých až po těžké. U většiny angiosarkomů byla jádra nádorových buněk vezikulární, a ve více než polovině případů tato jádra obsahovala 1 – 3 jadérka, a asi ve třetině makronukleoly (pokud > 75 % nádorových buněk obsahovalo jadérko, které mělo rozměr poloviny lymfocytu, tj. 4 μm či větší). V polovině nádorů byly nekrózy, ve všech případech byl přítomen zánětlivý infiltrát různé intenzity, obvykle lymfocytární, ale eozinofilní infiltráty (> 4 eozinofily/10 HPF) byly téměř v 50 % případů.

Imunohistochemicky bylo 95 % případů CD31+, 39 % CD34+ a 60 % vWF+. Všechny nádory byly pozitivní nejméně pro jeden endoteliální marker, což však bylo selekční kritérium. 2/3 vykazovaly pozitivitu izolovaných buněk pro hladkosvalový aktin, D2-40+ byla 1/3. 69 % bylo cytokeratin (CK) pozitivních (všechny s epitelioidní morfoloii). Solidní růst, epitelioidní buňky, pozitivita CK a multifokalita tak může vést ke snadné záměně s metastatickým karcinomem a na tuto možnost je třeba myslet při vyšetřování podezřelých kostní „metastázy karcinomu“.

Zdroj:

Verbeke SL et al. Distinct histological features characterize primary angiosarcoma of bone. *Histopathology* 2011; 58(2): 254–264.

– K. Veselý –

Kvalitní mezioborová spolupráce jako důležitý faktor pro prediktivní vyšetřování u nemalobuněčného karcinomu plic

RNDr. Magdalena Uvířová¹,
MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D.,²

¹CGB laboratoř a. s.

²Ústav patologie LF Ostravské univerzity a FN Ostrava



Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC; non-small-cell lung cancer) je převládající typ plicního karcinomu a je celosvětově nejčastější příčinou úmrtí na zhoubný nádor. Jde o skupinu heterogenních nádorů, do níž patří dlaždicobuněčný nebo-li epidermoidní, také skvamózní karcinom, adenokarcinom a velkobuněčný karcinom.

Klíčové postupy v léčbě nemalobuněčných karcinomů se významně změnily od doby, kdy do terapie zasáhly inhibitory tyrozinkinázy EGFR. Bylo prokázáno, že tyto inhibitory snižují proliferaci buněk u karcinomu plic, čímž blokují růst tumoru. Naději pro pacienty přináší biologicky cílená léčba tímto inhibitorem EGFR tyrozinkinázy, která vede u některých nemocných s nemalobuněčným karcinomu plic ke stabilizaci či ústupu nádoru a ke zlepšení kvality i délky života. Proto je v současné době vyšetřováno několik molekulárně-genetických markerů. Přibývá tak mnoho důkazů o tom, že přítomnost některých mutací EGFR genu je nejen prognostickým faktorem, ale i prediktorem účinnosti cílené biologické léčby.

Receptor pro epidermální růstový faktor

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) je membránový glykoprotein s důležitou rolí v procesech proliferace, diferenciace a přežívání normálních buněk. Nadměrná exprese EGFR genu je popisována u různých typů solidních nádorů. Je to především nemalobuněčný plicní karcinom (NSCLC), dále nádory prsu, hlavy a krku, trávicího traktu, močového měchýře, vaječníků, kolorektálních nádorů a glioblastomů. Tato nadměrná exprese je v těchto případech spojována s pokročilým stupněm rozvoje onemocnění a horší prognózou. Současné studie týkající se problematiky NSCLC uvádějí, že u některých pacientů byly detekovány somatické mutace v genu pro EGFR. Frekvence výskytu mutací v genu pro EGFR se pohybuje mezi 5 a 20 % v závislosti na populaci.

Výskyt těchto mutací zároveň koreluje s efektivitou účinku tyrozinkinázových inhibitorů (TKI), jako jsou gefitinib (Iressa) nebo erlotinib (Tarceva) při léčbě NSCLC. Výskyt aktivačních mutací v EGFR genu koreluje s vnímavostí nádoru na léčbu, zatímco přítomnost jedné z mutací, T790M, koreluje s rezistencí vůči TKI. Mutační status DNA pacientova nádoru může tudíž poskytnout účinný nástroj pro stanovení nejefektivnější strategie léčby NSCLC.

Anaplastic Lymphoma Kinase gen (ALK)

V souladu s novými poznatky je doporučeno pacienty s NSCLC testovat také na přítomnost EML-ALK fúzního genu. Aberace lokusu ALK na chromozomu 2p23 se účastní ve vývoji nemalobuněčného karcinomu plic, lymfomů a neuroblastomů. Gen ALK kóduje transmembránový glykoprotein s tyrozinkinázovou aktivitou. Aberace se známými fúzními partnery způsobují, že ALK kinázová doména je regulována promotorem jiného genu. Důsledkem takové fúze je chimérický protein s konstituční tyrozinkinázovou aktivitou, která hraje klíčovou roli v řízení buněčné proliferace. U nemalobuněčných karcinomů plic byla aberace genu ALK poprvé identifikována v souvislosti s genem EML4 (Echinoderm Microtubule Associated Protein – Like4). Fúze genů EML4-ALK zahrnují varianty obsahující více zlomových oblastí genu EML4 v exonech 2,6,13,14,15,18 a 20 a všechny varianty se zlomem v exonu 20 genu ALK. Kromě fúze s genem EML4 dochází u nemalobuněčných karcinomů plic k dalším fúzím genu ALK s geny TFG a KIF5B. Pacienti s přestavbou ALK genu vykazují léčebnou odpověď na novou Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) inhibitor crizotinib. Přestavby ALK genu za vzniku EML4-ALK fúzního genu se vyskytují u 2–7 % pacientů s NSCLC a slouží jako další prediktivní marker.

Rutiní zavedení testování mutací EGFR v Moravskoslezském kraji

Zavedení vyšetřování aktivačních mutací EGFR u nemalobuněčného karcinomu plic do rutinní praxe v Moravskoslezském kraji předcházelo jen několik minisymposií a mezioborových seminářů. V regionu se toto testování podařilo zrealizovat ve velmi krátkém časovém intervalu několika měsíců. Protože léčba vyžaduje rychlou, citlivou a přesnou histologickou typizaci nádoru a identifikaci genetických změn, které mohou predikovat účinnost této cílené terapie, hrají čas a spolupráce několika

Tab. 1 – Detekční limity

Metoda detekce	Detekční limit
Mutant-enriched PCR	0,09 %
Mutant-allele-specific amplification PCR	0,1 %
Real-time PCR (TheraScreen EGFR kit)	1 %
High-performance liquid chromatography	1 %
PCR a fragmentační analýza	5 %
Pyrosekvence (TheraScreen EGFR Pyro kit)	5 %
SNaPshot analýza	5 %
Sekvence	15–25 %

odborností v tomto procesu významnou roli. Dne 25. 6. 2010 byl ustanoven Interdisciplinární konsensus pro prediktivní vyšetřování aktivačních mutací receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC), který zahrnuje odpovědi na několik důležitých otázek shrnutých následovně: koho testovat, kdy a co testovat, jak testovat a konečně kde testovat a jak mezioborově spolupracovat. Po necelých dvou letech – 16. 3. 2012 – byl konsensus upraven tak, aby odrazil nové poznatky v diagnostice a léčbě NSCLC.

Během těchto dvou let proběhlo na Moravě několik meetingů a seminářů, které zaktivizovaly klinické lékaře, patologu a molekulární genetiky k velmi rychlé a dnes můžeme říci i úspěšné spolupráci. Předložený původní konsensus umožňuje dohodu s pneumology nejen Moravskoslezského kraje, kteří vybírají pacienty s NSCLC jako kandidáty léčby inhibitory tyrozinkinázy receptoru pro epidermální růstový faktor. Testování je prováděno tak, že klinik – pneumolog zasílá odebraný vzorek nádoru plic a žádanku k histologickému/cytologickému vyšetření současně se žádostí o provedení molekulárněgenetického vyšetření. V případě, že klinik genetické vyšetření z určitého důvodu nepožaduje, informuje o tom včas patologa. Úspěchem celého procesu je automatické testování všech pacientů s NSCLC v momentě, kdy je patologem z histologie nebo cytologie stanovena definitivní morfologická diagnóza. V případě, že ke stanovení diagnózy máme pouze cytologický materiál, je použit i pro molekulárněgenetickou analýzu. Patolog ze zaslaného biotického materiálu odebrá reprezentativní vzorek pro genetické vyšetření a zasílá jej do spolupracující CGB laboratoře a. s. s žádostí o molekulárněgenetické vyšetření. Má-li patolog k dispozici pouze cytologický odběr, zakroužkuje na skle skupiny maligních buněk

Tab. 2 – Výsledky mutačních analýz v CGB laboratoři a. s.

Počet vzorků k vyšetření	242	Období 10/2010–2/2012
Úspěšně vyšetřeno	238	98,35 %
Neúspěšná amplifikace	4	1,65 %
Z toho pozitivních	17	7,14 %

(minimálně 200 buněk, optimálně 400 buněk) a takto označené sklo zašle na genetickou analýzu. Striktně dodržujeme pravidlo, že odběr materiálu na genetické testování nesmí ohrozit stanovení definitivní histopatologické diagnózy. V případě, že máme k dispozici materiál z resekátu, odebíráme z něj multifokálně co možná největší množství viabilní tkáně. Genetické vyšetření provádíme i z punktátu morfologicky ověřeného maligního výpotku. V případě pozdního relapsu nádoru, v kontextu s doporučením konsensu, vždy navrhujeme klinickovi otestování nově odebraného vzorku. Vzhledem k tomu, že rychlost vyšetření je zásadní pro včasné zahájení léčby, musí být vzorek dopraven k patologovi a zpracován během 24 hodin po odběru. Pro minimalizaci časového prodloužení zajišťujeme bezproblémový a rychlý transport vlastními svyzy laboratoře molekulární genetiky. V některých případech je využívána i služba PPL.

Vyšetření otázek týkajících se optimální fixace tkáně pro histologické/cytologické vyšetření je ponecháno na domluvě mezi patologem a molekulárněgenetickou laboratoří. Vhodné je odebrat jeden vzorek velikosti minimálně 3 × 3 × 3 mm a uložit ho do mikrozkušavky s neformalinovou alkoholovou fixací (FineFix), která zajišťuje lepší ochranu DNA, popřípadě RNA. Také je možno odebrat nádorovou nativní tkáň do sterilní mikrozkušavky s fyziologickým roztokem nebo použít pufovaný formalín s kontrolovaným pH, protože kyselé prostředí degraduje DNA.

Klíčovou úlohu v zajištění hladkého průběhu celého diagnostického procesu má patolog v součinnosti s klinikem. Je naprosto nezbytné navázat úzkou spolupráci mezi klinikem a patologem a následně se obracet na pracoviště molekulární genetiky. Tuto spolupráci je třeba nastavit na regionální úrovni. Podle našich zkušeností by si každé pracoviště provádějící molekulárněgenetickou diagnostiku mělo vytvořit svůj postup. Pracoviště provádějící testování mutací EGFR však musí být schopné provádět molekulárněgenetické vyšetření pomocí nejméně dvou nezávislých metod. Důležitá je těsná spolupráce mezi histopatologickou a molekulárněgenetickou laboratoří a zajištění externí kontroly kvality nebo alespoň mezilaboratorní porovnávání vzorků.

Mutace lze testovat v histologických i cytologických vzorcích. Nezbytností je morfologická konfirmace paralelních histologických vzorků na jednom pracovišti (nedělit materiál mezi dvě pracoviště patologie), na molekulární genetikou lze odeslat jedině vzorek prokazatelně obsahující nádorové elementy. Platí, že jakýkoli materiál vhodný pro morfologickou diagnostiku je vhodný i pro molekulárněgenetické vyšetření, základem je kvalitní DNA v dostatečném množství.

Cytologický vzorek je z hlediska času a zachování DNA pro molekulárněgenetickou diagnostiku výhodnější.

Histologické/cytologické vyšetření

Histologické/cytologické vyšetření se neliší od rutinně zpracovávaných vzorků v laboratoři patologie. Hlavní úlohou patologa je posouzení morfologických změn se zaměřením na rozlišení nádorové a nenádorové léze, stanovení biologické povahy nádoru, zhodnocení, zda jde o nádor primární či metastatický. Nezbytné je s pomocí IHC rozlišení malobuněčného a nemalobuněčného typu plicního karcinomu a v kontextu s guidelines ERS/ATR přesně určit subtyp. V průběhu předěšlých dvou let jsme k molekulárněgenetickému vyšetření zaslali všechny NSCLC karcinomy, tedy i spinocelulární karcinomy. Nový konsensus doporučuje vyšetření pouze adenokarcinomu, NSCLC spíše adenokarcinom a NSCLC NOS. Imunohistochemická vyšetření lze aplikovat i na cytologická skla k jednoznačnému rozlišení subtypů nádorů.

Tab. 3 – Spektrum zachycených mutací v CGB laboratoři a. s.

G719X v exonu 18	1x
delece v exonu 19	6x
L858R v exonu 21	10x

Molekulárněgenetické vyšetření

Metody detekce mutací EGFR genu

Zásadním faktorem je množství a kvalita nádorové DNA. V CGB laboratoři a. s. se izolace DNA provádí kitem NucleoSpin Tissue XS, který je určen na izolaci z malého množství vstupního materiálu. Pro materiál, který je ve větším množství (parafinové bločky), je možné také využít kit NucleoSpin Tissue.

Analýzu genetických změn v nádorové DNA je možné provádět pomocí vhodné molekulárněbiologické metody, nejčastěji pomocí real-time PCR (TheraScreen EGFR RQO PCR kit), který byl historicky prvním a tehdy jediným CE IVD kitem na trhu pro detekci 29 mutací (včetně delecí) v EGFR genu pomocí real-time PCR. Navíc obsahuje mix pro provedení kontrolní real-time PCR, což umožňuje ověřit si amplifikovatelnost vizolované DNA a v případě nízké kvality ušetřit kiz a použít metodu 2. volby – tuto možnost konkurenční kity nemají. Dále je pak možné využít metodu fragmentační analýzy, přímého sekvenování, primer extension analýzy (SNaPshot assay) nebo mutant-enriched PCR. U této metody jde o dvoukrokovou PCR, u které je v mezikrocích prováděno restriční štěpení wt PCR produktů, a tím dochází k obohacení (resp. zvýšení podílu) mutovaných „alel“ pro druhé kolo PCR. Výsledkem je citlivost (námi dosažená) 0,09 % mutovaných „alel“. Využívá se v případě pozitivního zachytu kitem TheraScreen pro ověření výsledku (delece v exonu 19 a mutace L858R v exonu 21) a v případě nekvalitní DNA a tudíž neúspěšné amplifikace pomocí kitu TheraScreen. Každá z těchto molekulárněgenetických metod má však jiný detekční limit (tab. 1).

Nejlepším materiálem pro zpracování je cytologický nátěr, dále pak preparát na sklíčku (z parafinového bloku), nakonec materiál v parafinovém bloku. Důležitá je přesná lokalizace nádorové tkáně v rámci preparátu/bloku – zakroužkování fixem.

Metody detekce přestavby ALK genu

Analýza přestavby ALK genu (2p23) se provádí na histologických preparátech metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), což je molekulárněcytogenetická metoda, při níž hybridizuje fluorescenčně označená molekula nukleové kyseliny – sonda – s hledanou a analyzovanou sekvencí nukleové kyseliny přímo v buňce, „na místě“, na histologických řezech tkáně či na izolovaných buňkách na podložním sklíčku. Pro detekci genu ALK u nemalobuněčného karcinomu plic v současné době neexistuje žádná jiná standardní metoda, než je metoda FISH se sondou Vysis ALK Break Apart FISH probe kit. Tato metoda je přesnější než imunohistochemické vyšetření, ve kterém díky velice slabé expresi může být nerozpoznáno až 20–60 % přestavby genu ALK. Její použití je také výhodnější než např. RT-PCR, která není schopná jednoznačně detekovat všechny fúzní produkty genu ALK.

Problémy molekulárněgenetické diagnostiky

V některých případech, přes veškerou snahu, není možné ze zaslaného materiálu analýzu mutačního stavu genu EGFR, popřípadě vyšetření přestavby ALK genu metodou FISH provést. Nejdůležitější je dostatečné množství materiálu zaslaného k molekulárněgenetickému testování, nevhodná je nekrotická tkáň a vzorek s nízkým podílem maligních buněk. Velmi významným faktorem ovlivňujícím úspěšnost analýzy je preanalytická fáze vyšetření. Jedná se především o manipulaci s materiálem po jeho odběru z těla pacienta. Doba mezi odběrem a vložením do fixačního činidla by měla být co nejkratší, nejlépe méně než 1 hodina. Dalším zásadním bodem zpracování materiálu je fixace, která nesmí přesáhnout 48 hodin (nejlépe 6 až 24 hodin). Jako fixativum je doporučeno používat pufovaný 10% formalín. V neposlední řadě je nutné eliminovat nestandardní použití fixační tekutiny.

Úskalí, na která v praxi narážíme, teší molekulární genetik s patologem, popřípadě patolog s klinickým lékařem. V případě nedostatečného množství materiálu doporučuje neprodleně provést nový odběr tkáně. V případě limitovaného množství nádorových buněk v jinak reprezentativním vzorku je vhodné zvýšit zastoupení nádorových elementů pomocí makrodisekce, případně mikrodisekce, kterou CGB laboratoř a. s. již dlouho disponuje. Rovněž lze zvážit provedení celogenomové amplifikace.

Troufáme si říci, že spolupráce probíhající mezi patologem jednotlivých oddělení patologií Moravskoslezského kraje, Ústavem patologie Fakultní nemocnice a molekulárněgenetickým pracovištěm CGB laboratoře a. s. je velmi dobrá a onkologická pracoviště v regionu jsou s poskytováním službami spokojena. ■

Využití fluorescenční in situ hybridizace v diagnostice melanocytárních lézí

Jana Dvořáčková^{1,2,3}, Jana Žmolíková^{1,2}, Jan Mužík⁴, Magdalena Uvírová^{1,2}

¹Lékařská fakulta Ostravské univerzity v Ostravě

²CGB laboratoř a.s., Ostrava

³Ústav patologie FN Ostrava

⁴Institut biostatistiky a analýz, Masarykova univerzita, Brno

Melanocytární léze vykazují značnou morfoloickou heterogenitu. Jejich diagnostika je náročná i přes současné využití moderních histopatologických a imunohistochemických metod. Významným přínosem v diagnostice melanocytárních lézí je zavedení molekulárně genetické metody fluorescenční in situ hybridizace s použitím čtyřbarevné sondy značící geny *CCND1*, *RREB1*, *MYB* a centromeru chromozomu 6. V letech 2008–2012 bylo v naší laboratoři úspěšně metodou fluorescenční in situ hybridizace vyšetřeno 160 vzorků různých typů melanocytárních lézí, 44 névů a 116 melanomů. Změny asociované s diagnózou melanomu byly prokázány u 116 vzorků (72,5%), normální nálezy u 41 vzorků (25,6%), ve dvou případech bylo rozhodnutí na hranici hodnotitelnosti metody (1,2%) a v jednom případě se jednalo o vyšetření recidivy melanomu v jizvě, který byl svým nálezem atypický (monozomie chromozomu 6) (0,6%). Na základě dosažených výsledků byla stanovena senzitivita metody 96,6% a specifita metody 91%. Tyto výsledky ukazují, že fluorescenční in situ hybridizace je vhodnou metodou pro zajištění přesné a rychlé diagnostiky nejednoznačných melanocytárních lézí. Právě rychlost a správnost diagnózy je u vysoce maligních melanomů zásadní a má neoddiskutovatelný vliv na prognózu a úspěšnost léčby pacienta.

Klíčová slova: melanom, névus, fluorescenční in situ hybridizace, FISH, gen.

Fluorescence in situ hybridization in diagnostics melanocytic lesions

Melanocytic lesions exhibit significant morphological heterogeneity, making their diagnosis difficult, although both sophisticated histopathological and immunohistochemical methods are used. The introduction of molecular genetic method fluorescence in situ hybridization (FISH) has contributed significantly to the diagnosing of melanocytic lesions. Between 2008 and 2012, we studied a total of 160 samples of different types of melanocytic lesions, including 44 nevi and 116 melanomas, using a four-color probe mix for *CCND1*, *RREB1* and *MYB* genes and for the centromere of chromosome 6. A positive result was found in 116 melanoma samples (72.5%) and a negative result in 41 samples (25.6%). A borderline value was found in two samples (1.2%), and an atypical finding (monosomy of chromosome 6) was seen in a melanoma recurrence in one case (0.6%). Sensitivity and specificity were 96.6% and 91%, respectively. These results show that FISH is a suitable and relatively low-cost method for accurate, rapid diagnosis of ambiguous melanocytic lesions. The speed and accuracy of diagnosis of highly malignant melanomas are crucial and have great impact on the prognosis and success of a patient's treatment.

Key words: melanoma, naevus, fluorescence in situ hybridization, FISH, gene.

Onkologie 2013; 7 (2): 74–77

Úvod

Maligní melanom je jedním z nejagresivnějších a v současné době velice intenzivně studovaných nádorových onemocnění. Jeho výskyt celosvětově roste každým rokem o více než 4% a často postihuje i pacienty mladšího a středního věku (1–2). Určení biologické povahy melanocytárních lézí je jednou ze základních podmínek správné léčby. I když mnoho případů může být spolehlivě klasifikováno podle současných histopatologických kritérií, existuje určitá skupina případů, kdy nedochází ke shodě ani mezi experty. Stanovit diagnózu plně vyvinutého melanomu není pro zkušeného patologa obvykle obtížné. Přesto je podle řady literárních zdrojů diagnóza melanomu stanovena správně pouze v 75–80% případů (3). Rozdíly mezi benigními

a maligními melanocytárními lézemi nejsou v některých případech jednoznačné a histopatologická diagnóza je tak problematická i pro zkušené dermopatology. Mezi takové léze patří například névus Spitzové, jehož odlišení od spitzové melanomu může být velmi obtížné (4–5).

Studium biologické povahy různých typů melanocytárních lézí s využitím molekulárně genetických analýz, převážně metodami komparativní genomové hybridizace (CGH) a fluorescenční in situ hybridizace (FISH), prokázalo u melanomů řadu klonálních chromozomových aberací, jako jsou delece a amplifikace specifických lokusů chromozomů. Zde jsou nejčastěji lokalizovány geny kódující proteiny důležité v procesu regulace buněčného cyklu. Identifikovány byly ztráty v chromozomových oblastech 6q, 8p, 9p

a 10p a zmnóžení v oblastech 1q, 6p, 7, 8q, 17q a 20q (6). U benigních névů nebyly zjištěny žádné chromozomové změny s jedinou výjimkou – zmnóžení oblasti 11p u névů Spitzové, tento nálezy však nebyl pozorován u melanomů (7–10).

Na základě těchto studií byla vyvinuta sonda pro fluorescenční hybridizaci in situ, která identifikuje změny v počtu kopií onkogenu *CCND1* (onkogen – cyklin D1 dependentní kináza) a transkripčních faktorů *RREB1* (Ras responsive element binding protein), *MYB* (v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog) a dále počet centromer chromozomu 6. Kombinací těchto diagnostických markerů bylo firmou Abbott ve studii přijatelnosti metody dosaženo největší možné specifity (92%) a senzitivity (94%) této sondy pro diagnostiku melanomu.

Tabulka 1. Charakteristika souboru podle pohlaví a věku

Pohlaví	N	%
muž	85	53 %
žena	75	47 %
celkem	160	
Věk při diagnóze		
průměr	52,2	
medián	54,5	
minimum - maximum	3–92	

Tabulka 2. Základní charakteristika souboru podle typu melanocytární léze

Benígní melanocytární léze	N = 44
dysplastický névus	N = 15
dermoepidermální névus	N = 7
névus Spitzové	N = 7
intradermální névus	N = 5
névus modrý benígní	N = 4
névus epiteloidně vřetenovitý	N = 3
junkční névus	N = 2
lentigo maligna	N = 1
Melanomy	N = 116
nodulární melanom	N = 46
povrchově se šířící melanom	N = 41
melanoma in situ	N = 9
povrchově se šířící melanom s vertikalizací	N = 8
akrolentiginózní melanom	N = 3
Spitzové melanom	N = 3
animal-type melanom	N = 2
lentigo maligna melanoma	N = 2
metastatický melanom	N = 2

Soubor nemocných

Retrospektivně bylo vyšetřeno 160 pacientů s melanocytárními lézemi nejisté biologické povahy, kteří byli diagnostikováni v letech 2008–2012 v CGB laboratoři a.s. a v Ústavu patologie Fakultní nemocnice Ostrava a Lékařské fakulty Ostravské univerzity. Muži tvořili 53 % a ženy 47 % souboru, střední věk je 54 let (tabulka 1).

K molekulárně genetickému vyšetření byly vybrány melanocytární léze s nejednoznačným histologickým nálezem nebo s nejistou biologickou povahou. Spektrum diagnóz shrnuje tabulka 2. Rozdělení na maligní a benígní léze bylo provedeno podle kódu biologického chování MKN-O-3 klasifikace, melanoma in situ byl vzhlédem ke svému malignímu potenciálu zařazen mezi maligní nádory.

Použité metody

Fixace

Doba mezi odběrem a vložením do fixačního činidla by měla být co nejkratší, nejlépe méně

než 1 hodina. Fixace v 4% formaldehydu (pH 6,9) nesmí přesáhnout 48 hodin (nejlépe 6–24 hod). Pokud nejsou dodrženy podmínky správné fixace, může dojít k poškození DNA a FISH analýzu pak není možno provést, materiál nehybridizuje.

FISH na parafinových řezech

Z tkání zalitých v parafínu byly zhotoveny 4µm tenké řezy, které byly deparafinizovány oplachem v řadě roztoků při laboratorní teplotě: xylen 3 × 10 min, 96% etanol 2 × 5 min, 0,2N HCl 1 × 20 min a na závěr inkubace při 82 °C 35 min v 1M NaSCN. Mezi jednotlivými kroky byly preparáty oplachovány pufrům 2 × SSC (LK-104B, Kreotech) laboratorní teploty. Následně proběhla digesce v pepsinu (Pepsin Solution LK-101B, Kreotech) při 37 °C, 15–30 min dle velikosti řezu. Působení pepsinu bylo zastaveno oplachem v roztoku 2 × SSC laboratorní teploty po dobu 5 min. Na takto připravené preparáty byla nanášena sonda Vysis LSI RREB1/LSI MYB/LSI CCND1/CEP6 Probes (Abbott Molecular Inc.), která je přímo značená a připravena k použití. V zařízení TermoBrite proběhla denaturace při 85 °C po dobu 2 min a následovala hybridizace při 37 °C přes noc. Po odmytí nadbytečné sondy byly detekovány a následně vyhodnoceny chromozomové abnormality v oblasti 11q13 (CCND1) značené Spectrum Green, 6p25 (RREB1) značené Spectrum Red, 6q23 (MYB) značené Spectrum Gold a centromery chromozomu 6 značené Spectrum Aqua. Pro lokalizaci nádorových buněk byl před hodnocením metodou FISH použit preparát barvený hematoxylin-eosinem. Hodnoceno bylo celkem třicet nepřekrývajících se jader ze tří oblastí nádorové tkáně mikroskopem Olympus BX 51.

Hodnocení FISH preparátu

Jako pozitivní na melanom byly vyhodnoceny preparáty přesně podle pokynů výrobce, pokud:

- průměrný počet signálů pro gen *CCND1* na jádro nebo průměrný počet signálů pro gen *MYB* na jádro byl $\geq 2,5$ nebo,
- delece *MYB* byla ≥ 31 % nebo,
- % abnormálních jader pro gen *RREB1* bylo ≥ 63 %.

Tyto změny mohou být pozorovány každá samostatně, častěji však byla zjištěna změna dvou či všech tří genů. Jako negativní na melanom byly označeny léze nespĺňující ani jednu z výše uvedených podmínek.

Preparáty byly hodnoceny mikroskopem Olympus BX51 při 1 250 × zvětšení, obraz byl digitalizován pomocí software Lucia Cytogenetics 2 1998–2012 Laboratory Imaging.

Hodnocení senzitivity

Senzitivita byla stanovena jako procento jednoznačných melanomů vyhodnocených metodou FISH jako pozitivní na melanom, dělená počtem všech jednoznačných melanomů včetně FISH negativních z uvedeného souboru.

Hodnocení specifity

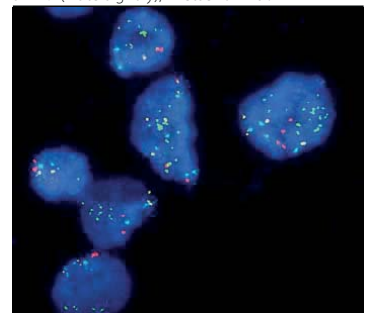
Specifita byla stanovena ze skupiny benigních névů, které FISH metodou byly určeny jako negativní na melanom, dělená počtem všech benigních névů včetně FISH pozitivních na melanom z uvedeného souboru.

Výsledky

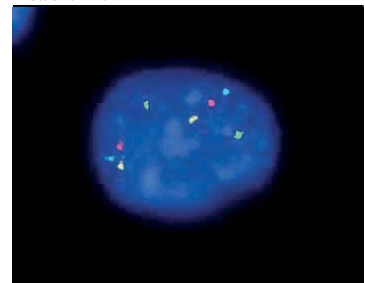
Positivní nález na melanom byl metodou FISH prokázán u 116 vzorků (72,5%) (obrázek 1), negativní nález na melanom u 41 (25,6%) vzorků (obrázek 2). Na základě dosažených výsledků byla stanovena senzitivita metody 96,6 % a specifita 91 %.

Ve třech případech (1,8%) nebylo možné jednoznačně rozhodnout, zda je nález pozitivní nebo negativní na melanom (tabulka 3). Podle výrobce má být hodnoceno 30 buněk ze tří oblastí nádoru, v těchto netypických případech však byly nádorové buňky rozmístěny soliterně v celé lézi a pokud byl striktně dodržen postup doporučený výrobcem, byl nález nega-

Obrázek 1. Nález pozitivní na melanom – amplifikace *CCND1* (zelené signály), *RREB1* (červené signály) a *MYB* (žluté signály), zvětšeno 1 250 ×



Obrázek 2. Nález negativní na melanom – *CCND1* (zelené signály), *RREB1* (červené signály), *MYB* (žluté signály), centromery chromozomu 6 (modré signály), zvětšeno 1 250 ×



Tabulka 3. Výsledky metodou FISH – celkové shrnutí

	benigní	maligní	celkem
	N = 44	N = 116	N = 160
negativní na melanom	40 (91 %)	1 (0,8 %)	41 (25,6 %)
pozitivní na melanom	4 (9 %)	112 (96,6 %)	116 (72,5 %)
hraniční nález, atypický nález		3 (2,6 %)	3 (1,9 %)

Tabulka 4. Výsledky metodou FISH – celkové shrnutí

	N	Změny genů: CCND1, RREB1, MYB			
		průměr	medián	min	max
melanomy	N = 116	2,0	2,0	0	3
nodulární melanom	N = 46	2,0	2,0	0	3
povrchově se šířící melanom	N = 41	2,0	2,0	1	3
melanoma in situ	N = 9	1,3	1,0	0	3
povrchově se šířící melanom s vertikalizací	N = 8	2,6	3,0	1	3
akrolentiginózní melanom	N = 3	3,0	3,0	3	3
Spitzové melanom	N = 3	2,7	3,0	2	3
animal-type melanom	N = 2	0,0	0,0	0	0
lentigo maligna melanoma	N = 2	2,5	2,5	2	3
metastatický melanom	N = 2	2,0	2,0	1	3

p = 0,008; (Kruskal Wallis Test)

Tabulka 5. Nálezy

Změny genů	N = 116
CCND1+ RREB1+ MYB	45 (38,8 %)
CCND1	19 (16,4 %)
CCND1+ MYB	12 (10,3 %)
RREB1+ MYB	10 (8,6 %)
RREB1	9 (7,8 %)
MYB	8 (6,9 %)
žádná změna	4 (3,4 %)

ativní na melanom. Pokud však byly hodnoceny přednostně buňky vykazující změny v počtu sledovaných chromozomů, byl nález pozitivní na melanom. Tyto léze byly tedy popsány jako hraniční a indikující lékaři byli vyrozuměni o možném maligním potenciálu těchto lézí. V jednom případě (0,6 %) se jednalo o vyšetření recidivy melanomu v jizvě, který byl svým nálezem atypický a nebylo možno jej zařadit ani jako pozitivní ani negativní na melanom (monozomie chromozomu 6 – byl pozorován jeden signál pro geny *RREB1*, *MYB* i centromeru chromozomu 6).

U pacientů s melanomy byly ve 40 % nalezeny změny všech tří sledovaných genů, ve 29 % změny dvou genů a ve 28 % jedna změna. V počtu těchto změn je mezi jednotlivými typy maligních melanomů statisticky významný rozdíl ($p = 0,025$). Z tabulky 4 je patrné, že největší průměrný počet změn byl zjištěn u akrolentiginózních melanomů (3,0), Spitzových melanomů (2,7) a povrchově se šířících melanomů s vertikalizací (2,6).

Nejčastější změnou byla amplifikace všech tří genů, následovala amplifikace samotného genu *CCND1* a dále amplifikace genu *CCND1* spolu s delecí nebo amplifikací genu *MYB*. Nálezy jsou shrnuty v tabulce 5.

Diskuze

V případě diagnostiky nejednoznačných melanocytárních lézí je FISH efektivní metoda s vysokou specifikou a senzitivitou, kdy je možné v krátké době díky mezooborové spolupráci lékařů praktických či kožních, patologů a molekulárních cytogenetiků včas zajistit přesnou diagnostiku a pacientům následně adekvátní péči.

V literatuře je uváděn různý stupeň senzitivity sondy Vysis LSI *RREB1*/LSI *MYB*/LSI *CCND1*/CEP6 Probes (Abbott Molecular Inc) – někteří autoři uvádí senzitivitu dokonce významně nižší, než uvádí výrobce (nejmenší hodnota 68 %) (11), přičemž specifita je srovnatelná. Tyto rozdíly mohou být způsobeny jednak velikostí hodnocených souborů, jednak způsobem odečítání preparátů FISH. Například při použití automatické analýzy obrazu byla hodnota senzitivity nižší (12). V našem testovaném souboru byla prokázána senzitivita naopak vyšší, než uvádí výrobce (96,6 %/92 %), specifita byla o něco nižší (91 %/94 %).

Z výsledků vyplývá, že nejmenší počet změn sledovaných lokusů je možné pozorovat u melanoma in situ (v průměru numerická změna jednoho sledovaného genu), největší průměrný počet změn byl zjištěn u akrolentiginózních me-

lanomů (3,0), Spitzových melanomů (2,7) a povrchově se šířících melanomů s vertikalizací (2,6). Kumulace genetických změn by tedy mohla svědčit pro progresi onemocnění a odpovídá vysokému malignímu potenciálu těchto lézí.

Nález pozitivní na melanom byl v našem souboru pozorován také u tří dysplastických névů a névu modrého benigního. Stejně výsledky jsou popisovány až u 10 % různých typů benigních névů s atypii, které jsou pak řazeny do skupiny névů s nejistou biologickou povahou (13–14). V těchto případech je vhodné reexcizit se širokým lemem a zařazení pacientů do skupiny s intenzivnějším sledováním, aby bylo možné včas zachytit případný maligní zvrát.

Přestože byly některé léze označeny jako hraniční a nebylo možné je metodou FISH jednoznačně určit jako pozitivní nebo negativní, přinesla tato metoda informaci o jejich možném maligním potenciálu. I tito pacienti by měli být zařazení do skupiny s častějším sledováním.

Závěr

Molekulární cytogenetické metody spojují přednosti cytogenetického a molekulární genetického vyšetření. Přestože zlatým standardem při vyšetření melanocytárních lézí zůstává histopatologická analýza včetně imunohistochemických vyšetření, moderní molekulární cytogenetická vyšetření hrají stále důležitější roli v diagnostice kožních pigmentových lézí. Rychlost a správnost diagnostiky je u vysoce maligních melanomů esenciální a má neoddiskutovatelný vliv na prognózu a úspěšnost léčby pacienta. V případě histologicky diagnostikovaných benigních névů s FISH pozitivním nálezem na melanom je možné vytipovat vysoce rizikové léze s nejistou biologickou povahou a dispenzarizací takových pacientů zajistit časný záchyt případného maligního zvrátu původně benigní léze.

Literatura

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. Cancer statistics, 2008. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2008; 58: 71–96.
- American Cancer Society. A Cancer Journal for Clinicians, Global Cancer Statistic 02. Atlanta: American Cancer Society 2006.
- Veenhuizen KCW, De Wit PEJD, Mooi WJ, Scheffer E, Verbeek ALM, Ruiter DJ. Quality assessment by expert opinion in melanoma pathology: experience of the Pathology Panel of the Dutch Melanoma Working Party, The Journal of Pathology 1997; 182: 266–272.
- Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying Melanocytic Tumours Based on DNA Copy Number Changes. The American Journal of Pathology. 2006; 163: 1765–1770.
- Dahlstrom JE, Scolyer RA, Thompson JF, Jain S. Spitz naevus: diagnostic problems and their management implications. Pathology 2004; 36 (5): 452–457.

6. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Brocker EB, and Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Research* 1998; 58: 2170–2175.
7. Bastien BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene* 2003; 22: 3081–3086.
8. Su Luo, Alireza Sepehr, Hensin Tsao: Spitz nevi and other Spitzoid lesions: Part I. Background and diagnoses. *Journal of the American Academy of Dermatology* 2011; 65: 1073–1084.
9. Bastien BC, Wesselmann U, Pinkel D and LeBoit PE. Molecular cytogenetic analysis of Spitz nevi with distinctive histopathologic features. *The American Journal of Pathology* 2000; 157: 967–972.
10. Bastien BC, Wasselmann U, Pinkel D, LeBoit PE. Molecular Cytogenetic Analysis of Spitz Nevi Shows Clear Differences to Melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology* 1999; 133 (6), 1065–1069
11. Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 2009; 33: 1146–1156.
12. Gaiser T, Kutzner H, Palmedo G., et al. Classifying ambiguous melanocytic lesions with FISH and correlation with long-term follow up. *Modern Pathology* 2010; 23, 413–419.
13. Moore MW and Gasparini R. FISH as an effective diagnostic tool for the management of challenging melanocytic lesions. *Diagnostic Pathology* 2011; 6: 76.
14. Gerami P, Zembowitz A: Update on Fluorescence In Situ Hybridization in Melanoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 2011; 135: 830–837

Článek přijat redakcí: 5. 3. 2013
Článek přijat k publikaci: 5. 4. 2013

Mgr. Jana Žmolíková
Kofenského 10, 703 00 Ostrava-Vítkovice
zmolikova@pathology.cz

Autoimmune pancreatitis

Petr Dite^a, Hana Nechutova^{b,c}, Magdalena Uvirova^d, Jana Dvorackova^{a,e}, Bohuslav Kianicka^b, Arnost Martinek^a

Introduction. Autoimmune pancreatitis (AIP) is the specific type of chronic pancreatitis due to autoimmune background and mechanism.

Characteristics. The main clinical symptoms of AIP are obstructive jaundice and abdominal discomfort. The typical histological findings are lymphocytes and IgG4 plasma cells infiltration, fibrosis and venulitis within pancreatic gland. Plasma level of IgG4 is usually extremely high.

Objectives. Diagnosis: High level IgG4 positive plasma cells in serum, lymphoplasmatic infiltration found on histological staining of pancreatic tissue, "sausage-like" pancreas in ultrasound and CT scans, and response to steroid therapy are crucial for making of diagnosis.

Classification of AIP: AIP can be classified into two subtypes. Type 1 was recognized as the pancreatic manifestation of multiorgan disorder, called IgG4 related disease. Type 2 is a pancreas-specific disorder not associated with IgG4, with similar histological signs as type 1, but also with the positivity of GEL (granulocytic epithelial lesion).

Results. Therapy: Due to its high effectivity in AIP treatment, steroid therapy is the first-line option. The alternative therapy is using immunosuppressants (azathioprine). Recently, there are also first experience in biological therapy already published.

Conclusion. Before the start of AIP therapy - the differential diagnosis between pancreatic cancer and AIP is essential.

Key words: chronic pancreatitis, autoimmune pancreatitis, immunoglobulines, IgG4, steroids, extrapancreatic lesions, pancreatic biopsy

Received: June 29, 2013; Accepted with revision: December 13, 2013; Available online: February 24, 2014
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2013.094>

^aAcademic Center of Gastroenterology, Department of Internal Medicine, University Hospital Ostrava and Faculty of Medicine, University of Ostrava, Czech Republic

^b2nd Department of Internal Medicine, St. Anne's University Hospital Brno and Medical Faculty, Masaryk University, Brno

^cInternational Clinical Research Center, St. Anne's University Hospital Brno

^dAgel Research and Training Institute, CGB Laboratory, Ostrava-Vitkovice Branch

^eDepartment of Pathology, Faculty of Medicine, University of Ostrava and University Hospital Ostrava

Corresponding author: Petr Dite, e-mail: pdite.epc@gmail.com

INTRODUCTION

Chronic pancreatitis is an inflammatory process, during which the pancreatic parenchyma is replaced with fibrotic tissue. This morphological change leads to irreversible destruction of both the exocrine and the endocrine glandular pancreatic parenchyma. The terminal point of these changes is exocrine and endocrine pancreatic insufficiency. The literature on the incidence and prevalence of chronic pancreatitis is not voluminous and time trends in incidence rates are lacking. The study in Copenhagen area in the 1970's reported an incidence of 6.9 - 10.0 new cases per 100 000 inhabitants per year¹ In the Cantabria region of Spain between 1981 and 1991 the incidence was found to be 14 per 100000 per year, of which 80% were alcohol induced². In 2002, Lankisch and co-workers published their results of chronic pancreatitis incidence in the region of Northern Germany. The incidence in the period 1988 to 1995 was 6.4 per 100000 per year^{3,4}. In 2001, Dite and co-workers reported an incidence of 7.9/100000/year in the Czech Republic and the incidence was similar to that of other European countries /France, Denmark Germany, Hungary/. The highest

incidence of chronic pancreatitis, 23/100000/year, was found in Finland⁵. Some studies have found a serious increase in the number of patients admitted to hospital with chronic pancreatitis, e.g. in the UK an increase of 100% from 1989/90 to 1999/2000 was documented⁶ (Table 1). Japan also registered an increase in prevalence from 28.5 to 32.9/100000 and from 5.4 to 5.7/100000/year during the period 1994 to 1999 (ref.⁶).

In 2001, the TIGAR-O classification system of etiological factors for chronic pancreatitis was published⁷. This system is based on the mechanism of injury of pancreatic tissue, and it addresses the risk, etiology, and complexity of the disease. Chronic pancreatitis is a complex disorder that may involve the interaction of two or more environmental or genetic factors. The TIGAR-O model addresses this potential synergistic role of multiple risk factors in a single individual with chronic pancreatitis and allows assessment of the contributory level of each of the interacting risk factors. Although the critical information about different forms of chronic pancreatitis is not fully available, the TIGAR-O system lays the foundation for further advancement in the field. The major categories include toxic-metabolic (T), idiopathic (I), genetic (G),

autoimmune (A), recurrent severe acute pancreatitis (R), and obstructive (O) mechanisms.

In 1961, Sarles and co-workers described the idiopathic form of pancreatitis with minimal subjective symptoms, obstructive jaundice and hypergammaglobulinemia and they were the first to suspect an autoimmune process as an etiological factor⁸. In 1995, Yoshida and co-workers described a patient with obstructive jaundice, with diffusely enlarged pancreas, irregular pancreatic duct and hypergammaglobulinemia. The pancreatic biopsy revealed pancreatic fibrosis. The symptoms resolved after steroid therapy. The term "AUTOIMMUNE PANCREATITIS" was used for the first time⁹. Recent knowledge supports the concept of autoimmune pancreatitis (AIP) as a unique clinical entity within putative IgG4 systemic diseases. The pathogenetic mechanisms remain unclear¹⁰, but autoimmune etiology is presumed.

EPIDEMIOLOGY

Epidemiological data on AIP is still very poor. A nationwide study in Japan estimated the prevalence of AIP to be 0.82 per 100 000 inhabitants¹¹, when diagnostic criteria for AIP proposed by the Japanese Pancreas Society in 2002 were used¹². AIP is at least twice as common in men as in women. The onset of the disease is typical in patients over 55 years of age^{11,13,14}. The incidence of AIP appears to have risen in last few years - from 2.0 to 4.0 in our series.

Clinical feature

- mild abdominal symptoms
- occasional presence of obstructive jaundice
- high level of serum gammaglobulin IgG and IgG4
- presence of non-specific antibodies
- diffuse enlargement of the pancreas ("sausage-like"), in CT scan with capsule-like low density rim
- diffuse irregular of pancreatic duct on ERCP
- histomorphologically lymphocyte and IgG4-positive plasmacyte infiltration and fibrosis, obliterative phlebitis
- association with extrapancreatic lesions
- responsibility to steroid therapy

HISTOLOGY

Histopathological features support the hypothesis of two histological and clinical subtypes of AIP (ref.^{14,15}).

The histological pattern in type 1 is identical to the classic description of the disease and is associated with the histological pattern known as lymphoplasmatic sclerosing pancreatitis - LPSP. Typical histological signs are dense periductal lymphoplasmacytic infiltrates, swirling fibrosis, obliterative venulitis and IgG4 tissue positivity. The main serological marker is elevation of serum immunoglobulin IgG4. Type-1 AIP is considered to be a part of IgG4-associated systemic disease for which extrapancreatic involvement is typical. The bile ducts, kidneys, salivary glands, retroperitoneum and mediastinum

Table 1. Incidence of Chronic Pancreatitis.

Country	Incidence
Switzerland	1.2/100 000/year
Poland	4.0/100 000/year
Germany	7.4/100 000/year
Czech Rep.	7.9/100 000/year
Hungary	8.0/100 000/year
Denmark	10.0/100 000/year
Sweden	10.0/100 000/year
Finland	23.0/100 000/year
United States	5.7-7.6/100 000/year

Table 2. Autoimmune pancreatitis - subtypes.

Type 1	- periductal lymphoplasmatic infiltrates
Lymphoplasmatic sclerosing pancreatitis (LPSP)	- high amount IgG4
	- positive plasma cells
	- swirling fibrosis
	- obliterative venulitis
Type 2	- ductal epithelial granulocytic infiltration
Idiopathic duct-centric pancreatitis (IDCP)	- ductal damage
„non-alcoholic duct destructive pancreatitis“	- obliteration

are among the most commonly affected extrapancreatic organs¹⁶⁻²⁰ (Table 2).

The most frequent clinical symptom in type 1 AIP is obstructive jaundice. In patients with AIP type 2 features typical for acute or chronic pancreatitis can be occasionally seen. IgG4 elevation is very rare in type 2 AIP, but very frequent (about 80%) in patients with type 1 AIP. Association between inflammatory bowel disease, primary biliary cirrhosis and AIP is connected with type 2 AIP. In contrast, type 1 AIP is combined with extrapancreatic manifestations, as are IgG4 sclerosing cholangitis, sialoadenitis, retroperitoneal fibrosis, etc.²¹ (Table 3). According to the TIGAR-O classification system⁷ AIP can be subdivided into isolated and syndromic subgroups with syndromic AIP being associated with inflammatory bowel disease and primary biliary cirrhosis²¹. In our sample of patients with AIP, we also identified IgG4 mastitis and Mikulicz syndrome (Table 4).

DIAGNOSIS

Asian consensus criteria (Table 5) and/or HISORT criteria of AIP (table 6) are generally accepted²²⁻²⁴. The problem with the Japanese Diagnostic Criteria is a lower sensitivity (80%) and specificity (87%) than HISORT criteria (92% sensitivity and 97% specificity) (ref.²⁵).

Five cardinal feature of AIP are as follows:

- pancreatic histology
- serology
- imaging of pancreatic parenchyma and duct

Table 3. Comparison of type 1 and type 2 AIP.

	Type 1 AIP	Type 2 AIP
Mean Age	Sixth decade	Fourth decade
Gender	Predominantly male	Equal
Histological pattern	Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis	Duct-destructive pancreatitis
Histological signs	Periductal lymphoplasmacytic infiltrates Swirling fibrosis Obliterative venulitis	Lymphoplasmacytic infiltrates Granulocyte epithelial lesions with partial/ complete duct obstruction (GEL)
IgG4 cells on immunostaining	Moderate-severe (98%)	Moderate (40%) in one study
Serum IgG4 levels	Elevated	Normal
Other organ involvement	Sclerosing sialadenitis, IgG4-associated cholangitis, retroperitoneal fibrosis, IgG4-associated tubulointerstitial nephritis, pneumonitis, prostatitis, IgG4 mastitis	Inflammatory bowel disease Primary biliary cirrhosis

Table 4. AIP with extrapancreatic lesions (n=13).

Gender	Age	Concomitant autoimmune disease
Male	36	IgG4 sclerosing cholangitis
Male	43	Sialadenitis
Male	53	Sjögren sy
Female	54	Sjögren sy, autoimmune hepatitis
Male	56	autoimmune hepatitis
Male	32	autoimmune hepatitis
Female	55	primary biliary cirrhosis
Male	51	IBD
Male	46	Xxx
Female	33	Xxx
Female	58	IgG4 positive mastitis, sialadenitis
Female	55	IgG4 sclerosing cholangitis
Male	49	IgG4 sclerosing cholangitis

- other organ involvement
- response to steroid therapy

Diagnostic biopsy with histological examination is usually sufficient for the diagnosis of type 1 of AIP and is a mandatory procedure in the differential diagnosis between AIP and pancreatic cancer²⁶⁻²⁸. Sausage-like enlargement of the gland in CT imaging and/or endosonography is present in more than 50% of patients with AIP. Dynamic CT and MRI show delayed enhancement of the swollen pancreas, in some patients forming a "capsule-like rim" surrounding the pancreas. ERCP, better than MRCP, shows diffuse narrowing of the pancreatic duct with some irregularities. Positron emission tomography /PET/ does not play any role in diagnostic work-up²⁵. In the case

Table 5. Clinical diagnostic criteria for AIP 2006.

1. Diffuse or segmental narrowing of the MPD with irregular wall and diffuse or localized enlargement of the pancreas by imaging studies, such as abdominal US, CT, and magnetic resonance.
2. High serum γ -globulin, IgG, or IgG4, or the presence of autoantibodies such as antinuclear antibodies and rheumatoid factor.
3. Marked interlobular fibrosis and prominent infiltration of lymphocytes and plasma cells in the periductal area, occasionally with lymphoid follicles in the pancreas.

Diagnosis of AIP is established when criterion 1 and criterion 2 and/or 3 are fulfilled. However, it is necessary to exclude malignant diseases.

of typical histology, serological positivity of IgG4, other organ involvement and typical imaging in CT or EUS, the diagnosis of autoimmune pancreatitis is most certain. Narrowed pancreatic duct, enlarged gland with sausage-like shape, elevation of serum IgG4 and/or compatible histology are typical for AIP type 1. Other serological markers are less specific but rheumatoid factor or high titres of ANA may also be present^{11,29}. In AIP-type 2, IgG4 cells on immunostaining are usually absent and IgG4 serum level is usually normal. Histological hallmarks are lymphoplasmatic infiltration and granulocyte epithelial lesions with partial or complete duct obstruction - duct-centric destructive pancreatitis /IDCP/. The wall of the duct is usually infiltrated with neutrophils, lymphocytes and plasma cells with involvement of the duct epithelium and lumen. The ductal lesions are called GEL - granulocyte epithelial lesion^{13,14}.

Accurate diagnosis of the AIP-type 2 requires core biopsy of the gland. Patients with type 1 are typically males with a mean age in the sixth decade. Patients with

AIP type 2 tend to be younger with a mean age in the fourth decade and with equal gender distribution¹⁴. From a practical point of view, the distinction between the AIP subtypes will help in clarifying the clinical features, pathogenesis and natural history of disease.

THERAPY

Most patients with AIP respond well to steroid therapy^{29,30}. Corticosteroids reduce inflammation and restore both digestive enzymes and HCO₃ secretion in patients with AIP by regenerating acinar cells and correcting CFTR localization in pancreatic duct cells, mislocalized to the cytoplasm of duct cells^{31,32}. For the induction of remission in type 1 AIP, a dose of 30-40 mg for 2 weeks is generally recommended^{11,30}. The dose of steroids is tapered by 5 mg per two weeks. The total time of therapy is usually 6-12 months. The monitoring of clinical and biochemical status is essential. Only in a few patients with obstructive jaundice, short-term biliary stent insertion is indicated¹¹. The relapse of AIP can be seen in about approximately 30% of the patients with AIP. In AIP relapse (after the steroid therapy), a combination of steroids (1 mg/kg) with azathioprine (2 mg/kg) for 12 weeks is recommended³³. A new drug, which was reported to induce remission is the CD20 antibody, rituximab. Preliminary results with this drug are promising³⁴.

Reliable data on treating AIP type 2 are scarce but steroid use appears to be preferred and is effective. Whether AIP predisposes to pancreatic cancer is not known but case-report studies of pancreatic cancer complicating AIP have been published^{27,28}.

DISCUSSION

Current research on AIP focuses on the pathogenesis of the disease. Genetic factors of AIP, humoral immunity and target antigens of cellular immunity and effector cells and the role of microbial infection (*H. pylori* infection and molecular mimicry) are being intensively studied³⁵. Okazaki and co-workers¹¹ hypothesized that the pathogenesis of AIP involves a biphasic mechanism consisting of "induction" and "progression". In the early stage, the initial response to self-antigens (antilactoferrin, carbonic anhydrase II, pancreatic secretory trypsin inhibitor and alpha-fodrin) and molecular mimicry are induced by a decrease in naive regulatory T-cells (Tregs) and T-helper (Th1) cells mediated release of proinflammatory cytokines. In the chronic stage, progression is supported by increase in memory Tregs (regulatory T cells) and Th2 immune responses. The complement system pathway may be activated by the IgG1 complex. A model published by Chari's group from Rochester, USA is similar and considers IgG4 to be related to the differentiation phase of Treg function. During the evolution of AIP, Treg activity may be related to specific amino acid substitution of HLA class II. IgG1 immune complex may be related to IgG4-negative and granulocyte epithelial lesion (GEL)-positive

Table 6. HISORT criteria of AIP.

Category	Criteria
A. Histology	<ol style="list-style-type: none"> Diagnostic (any one): <ol style="list-style-type: none"> Pancreatic histology showing periductal lymphoplasmacytic infiltrate with obliterative cholangitis (LPSP) Lymphoplasmacytic infiltrate with abundant (>10 cells/hpf) IgG4 positive cells in the pancreas Supportive (any one) <ol style="list-style-type: none"> Lymphoplasmacytic infiltrate with abundant (>10 cells/hpf) IgG4 positive cells in involved extra-pancreatic organ Lymphoplasmacytic infiltrate with fibrosis in the pancreas
B. Imaging	<p>Typical imaging features:</p> <ol style="list-style-type: none"> CT/MR: diffusely enlarged gland with delayed (rim) enhancement ERCP: Diffusely irregular, attenuated main pancreatic duct <p>Atypical Imaging Features: Pancreatitis, focal pancreatic mass, focal pancreatic duct stricture, pancreatic atrophy, pancreatic calcification</p>
C. Serology	Elevated serum IgG4 level (normal 8-140 mg/dL)
D. Other Organ involvement	Hilar/intrahepatic biliary strictures, persistent distal biliary stricture, Parotid/lacrimal gland involvement, Mediastinal lymphadenopathy, Retroperitoneal fibrosis
E. Response to steroid therapy	Resolution/marked improvement of pancreatic/extrapancreatic manifestation with steroid therapy

AIP/idiopathic duct-centric pancreatitis IDCP. The IgG4 immune complex may correlate with IgG4-positive and GEL-negative AIP. Further research is necessary to confirm the cellular model of AIP. In 2008, Kamisawa et al.³⁶ proposed a new clinicopathological entity - IgG4 related sclerosing disease (IgG4-RSC) (ref.³⁵). The clinical manifestation of this systemic disease is different and related to the fragmentary involvement of the pancreas, liver, bile duct, salivary gland, kidney and lung³⁷. Typical for this disease is abundant IgG4 positive plasma cells and T-lymphocyte organ infiltration^{38,39}. Masaoki et al. extended the IgG-RSC complex into an even more extensive clinical entity - IgG4-positive multiorgan lymphoproliferative syndrome (IgG4-MOLPS). This syndrome includes inflammatory pseudotumors (liver, breast, lung, Mikulicz's syndrome, intestinal fibrosis and autoimmune hypophysitis). Sjögren syndrome is not considered a part of IgG4-MOLPS (ref.⁴⁰).

In 2009 experts from Europe, Japan, Korea and USA met in Honolulu to describe the entity of AIP (ref.⁴¹). The

Honolulu Consensus Document characterized AIP as a pancreatitis, which has unique histopathologic features allowing it to be distinguished from other forms of chronic pancreatitis, and with histopathological correlates of 2 distinct forms of AIP. The last international consensus - diagnostic criteria consensus, published in 2011 (ref.⁴²) recognizes the spectrum of AIP as we know it today. In 2011 the criteria of the Japan Pancreas Society (HISORTs criteria) together with Korean, Asian, Italian and Mannheim criteria, led to the International Consensus Diagnostic Criteria for autoimmune pancreatitis.

The diagnostic criteria were separated into two levels. In level 1, the typical criterion is a diffuse enlargement of the pancreas with delayed enhancement. In the pancreatic duct, there is a typical sign- in more than 1/3 the length of the main pancreatic duct, there are multiple strictures without marked upstream dilatation.

Elevation of IgG4 >2x upper normal value

The diagnosis of AIP typically includes involvement of other organs with histological changes-lymphoplasmatic infiltration with fibrosis and without granulocytic infiltration with storiform fibrosis, obliterative flebitis and an abundance of IgG4 positive cells-more than 10 cells / HPF. At least 3 of the pancreatic histological signs are typical for the diagnosis. An alternative to histological changes is the presence of typical radiological markers which are a segmental proximal or multiple proximal or proximal and distal bile duct stricture and retroperitoneal fibrosis.

In the histology of pancreas at least 3 of the following markers are relevant:

- periductal lymphoplasmatic infiltrate without GEL
- obliterative flebitis
- storiform fibrosis
- abundant IgG4 positive cells

The important diagnostic criterion is the response to steroid therapy, when radiologically it is possible to demonstrate the resolution or improvement in pancreatic and extrapancreatic manifestation.

For level 2 the criteria for AIP- there are no typical markers, for example no diffuse enlargement. The sign is segmental or focal enlargement of pancreatic parenchyma. Other signs are symmetrically enlarged salivary/lacrimal glands, renal involvement described in association with AIP, segmental or focal narrowing of the pancreatic duct without marked upstream dilatation (duct size <5.0 mm). There is no doubt, that autoimmune pancreatitis is still a challenge for pancreatologists, endoscopists, surgeons, histopathologists, immunologists and radiologists and it is a "hot topic" in internal medicine. Type 1 AIP is the pancreatic manifestation of the multiorgan syndrome-IgG4 related disease (called also MOLPS - MultiOrgan Lympho Proliferative Syndrome). Relapses of AIP type 1 can be prevented using immunomodulators or biological agents. Type 2 autoimmune pancreatitis is a distinct disease entity with some markers common to type 1 AIP. AIP type 2 responds promptly to steroid therapy and subsequent relapse is uncommon^{43,44}.

CONCLUSION

1) Autoimmune pancreatitis (AIP) is a distinct form of pancreatitis. Currently, two forms of AIP have been described - Lymphoplasmatic sclerosing pancreatitis (LPSP) and Idiopathic duct-centric pancreatitis (IDCP).

2) Clinically LPSP appears to be the pancreatic manifestation of the group of systemic diseases-IgG4 related disease. IDCP does not appear to be a systemic disease.

3) The main acute clinical symptoms are obstructive jaundice and pancreatic swelling (focal or diffuse). Typical pancreatic pain is very rare.

4) Diagnostic criteria for AIP.

- changes in pancreatic parenchyma and pancreatic duct (CT/MRI,MRCP,ERCP)
- high plasma levels of IgG, IgG4 and ANA
- histopathology of the pancreas
- steroid therapy response

5) Differential diagnosis between pancreatic tumor and AIP is essential. Endosonographically guided pancreatic biopsy is recommended.

ABBREVIATIONS

AIP, Autoimmune pancreatitis; GEL, granulocyte epithelial lesions; IDCP, Idiopathic duct-centric pancreatitis; IgG4 + MOLPS, IgG4-positive multiorgan lymphoproliferative syndrome; IgG4-RSC, IgG4 related sclerosing disease; LPSP, Lymphoplasmatic sclerosing pancreatitis.

ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by the European Regional Development Fund - Project FNUSA-ICRC (No. CZ.1.05/1.1.00/02.0123); Grant sponsor: Ministry of Health (NT13434-4/20012).

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors state there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

1. Andersen BN, Pedersen NT, Scheel J, Worning H. Incidence of alcoholic chronic pancreatitis in Copenhagen. *Scand J Gastroenterol* 1982;17:247-52.
2. De las Heras G, Pns F. Epidemiologia y aspectos etiopatogénicos de la pancreatitis alcohólica crónica. *Res Esp Enferm Dig* 1993;84:253-8.
3. Lankisch PG, Assmus C, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Epidemiology of pancreatic diseases in Luneburg Country. A study in a defined German population. *Pancreatol* 2002;2:469-77.
4. Dite P, Stary K, Novotný I, Precechtelová M, Dolina J, Lata J, Zboril V. Incidence of chronic pancreatitis in Czech Republic. *Eur J Gastroenterol* 2001;13:749-50.
5. Navarro S, Soriano A. Epidemiology of chronic pancreatitis : an infrequent disease or an infrequently diagnosed disease? In Dominguez - Munoz JE (ed). *Clinical Pancreatology for Practising Gastroenterologists and Surgeons*. Blackwell, 2004,pp. 187-91.

6. Spanier BMW, Dijkgraaf MGW, Bruno MJ. Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis. An update. *Best Practice Res Clin Gastroenterol* 2008;22(1):45-53.
7. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001;120:682-97.
8. Sarles H, Sarles JC, Muratore R, Guien C. Chronic anflammatory sclerosis of the pancreas – an autonomous pancreatic disease? *Am J Dig Dis* 1961;6:688-98.
9. Yoshida K, Toki F, Takeuchi T, Watanabe S, Shiratori K, Hayashi N. Chronic pancreatitis caused by an autoimmune abnormality. Proposal of the concept of autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995; 40:1561-68.
10. Okazaki K, Uchida K, Chiba T. Recent concept of autoimmune related pancreatitis. *J Gastroenterol* 2001;36:293-302.
11. Okazaki O, Uchida K, Fukui T. Recent advances in autoimmune pancreatitis: concept, diagnosis, and pathogenesis. *J Gastroenterology* 2008;43:409-18.
12. Nishimori I, Tamakoshi A, Otsuki M. Prevalence of autoimmune pancreatitis in Japan from a nationwide survey in 2002. *J Gastroenterol* 2007;42(Suppl18):6-8.
13. Otsuki M. Autoimmune pancreatitis: a message from Japan. *J Gastroenterol* 2007;42(Suppl18):1-5.
14. Notohara K, Brgart LJ, Yadav D. Idiopathic chronic pancreatitis with periductal lymphoplasmacytic infiltration: clinicopathologic features of 35 cases. *Am J Surg Pathol* 1991;22:1119-27.
15. Zamboni G, Lüttges J, Capelli P. Histopathological features of diagnostic and clinical relevance in autoimmune pancreatitis: a study on 53 resection specimens and 9 biopsy specimens. *Virchows Arch* 2004;445:552-63.
16. Takeda S, Haratake J, Kasai T, Takaeda C, Takazakura E. IgG4-associated idiopathic tubulointerstitial nephritis complicating autoimmune pancreatitis. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:474-6.
17. Yamamoto M, Takahashi H, Sugai S, Imai K. Clinical and pathological characteristics of Mikulicz's disease (IgG4-related plasmacytic exocrinopathy). *Autoimmun Rev* 2005;4:195-200.
18. Komatsu K, Hamano H, Ochi Y, Takayama M, Muraki T, Yoshizawa K. High prevalence of hypothyroidism in patients with autoimmune pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2005;50:1052-105.
19. Taniguchi T, Ko M, Seko S, Nishida O, Inoue F, Kobayashi H. Interstitial pneumonia associated with autoimmune pancreatitis. *Gut* 2004;53:770.
20. Ghazale A, Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ, Topazian MD, Takahashi N. Value of serum IgG4 in the diagnosis of autoimmune pancreatitis and in distinguishing it from pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1646-53.
21. Kamisawa T, Egawa N, Nakajima H, Tsuruta K, Okamoto A. Extrapancratic lesions in autoimmune pancreatitis. *J Clin Gastroenterol* 2005;39:904-7.
22. Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ, Topazian MD, Takahashi N, Zhang L. Diagnosis of autoimmune pancreatitis: the Mayo Clinic experience. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1010-6.
23. Kim MH, Lee TY. Diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: a proposal of revised Kim criteria. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:A104.
24. Okazaki K, Kawa S, Kamisawa T, Naruse S, Tanaka S, Nishimori I. Clinical diagnostic criteria of autoimmune pancreatitis: revised proposal. *J Gastroenterol* 2006;41:626-31.
25. Naitoh I, Nakazawa T, Ohara H, Ando T, Hayashi K, Okumura F, Miyabe K, Yoshida M, Sano H, Takada H, Kanematsu T, Joh T. Comparative evaluation of the Japanese Diagnostic Criteria for autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2010;39:1173-9.
26. Chari ST, Takahashi N, Levy MJ, Smyrk TC, Clain JE, Pearson RK, Petersen BT, Topazian MA, Vege SS. A diagnostic strategy to distinguish autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:1097-103.
27. Inoue H, Miyatani H, Sawada Y, Yoshida Y. A case of pancreas cancer with autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2006;33:208-9.
28. Fukuj T, Mitsuyama T, Takaoka M, Uchida K, Matsushita M, Okazaki K. Pancreatic cancer associated with autoimmune pancreatitis in remission. *Intern Med* 2008;47:151-5.
29. Park DJ, Kim MH, Chari ST. Recent advances in autoimmune pancreatitis. *Gut* 2009;58:1680-9.
30. Erkelens GW, Vleggaar FP, Lesterhuis W, van Buuren HR, van der Werf SD. Sclerosing pancreato-cholangitis responsive to steroid therapy. *Lancet* 1999;354:43-4.
31. Tanaka S, Kobayashi T, Nakanishi K, Okubo M, Murase T, Hashimoto M. Corticosteroid-responsive diabetes mellitus associated with autoimmune pancreatitis. *Lancet* 2000;356:910-1.
32. Kountouras J, Zavos C, Gavalas E, Tzilves D. Challenge in the pathogenesis of autoimmune pancreatitis: potential role of *Helicobacter pylori* infection via molecular mimicry. *Gastroenterology* 2007;133:368-9.
33. Ko SBH, Mizuno N, Yatabe Y, Yoshikawa T, Ishiguro H, Yamamoto A, Azuma S, Naruse S, Yamao K, Muallem S, Goto H. Corticosteroids correct aberrant CFTR localization in the duct and regenerate acinar cells in autoimmune pancreatitis. *Gastroenterology* 2010;138:5:1988-96.
34. Hart PA, Topazian MD, Witzig TE. Treatment of relapsing autoimmune pancreatitis with immunomodulators and rituximab: the Mayo Clinic experience. *Gut Published Online First:30 Aug 2012*, doi:10.1136/gutjnl-2012-302886/
35. Chari ST. Current concepts in the treatment of autoimmune pancreatitis. *JOP* 2007;8:1-3.
36. Kamisawa T, Okamoto A. IgG – related sclerosing disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:3948-55.
37. Kamisawa T. IgG4-positive plasma cells specifically infiltrate various organs in autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2004;29:167-8.
38. Kamisawa T, Funata N, Hayashi Y, Eishi Y, Koike M, Tsuruta K. A new clinicopathological entity of IgG4 – related autoimmune disease. *J Gastroenterol* 2003;38:982-4.
39. Uomo G. Autoimmune pancreatitis: An autonomous disease or a single entity in a complex puzzle of a multi-organ disorder? *JOP (Online)* 2010;5,11(2):191-2.
40. Masaki Y, Dong L, Kurose N, Kitagawa K, Morikawa Y, Yamamoto M, Takahashi H, Shinomura Y, Imai K, Saeki T, Azumi A, Nakada S, Sugiyama E, Matsui S, Origuchi T, Nishiyama S, Nishimori I, Nojima T, Yamada K, Kawano M, Zen Y, Kaneko M, Miyazaki K, Tsubota K, Eguchi K, Tomoda K, Sawaki T, Kawanami T, Tanaka M, Fukushima T, Sugai S, Umehara H. Proposal for a new clinical entity, IgG4-positive multiorgan lymphoproliferative syndrome: analysis of 64 cases of IgG4-related disorders. *Ann Rheum Dis* 2009;68(8):1310-5. doi: 10.1136/ard.2008.089169
41. Chari ST, Kloppel G, Zhang L, Notohara K, Lerch MM, Shimosegawa T. Histopathologic and clinical subtypes of autoimmune pancreatitis: The Honolulu Consensus Document. *Pancreatol* 2010;10:664-72.
42. Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, Kamisawa T, Kawa S, Mino-Kenudson M, Kim MH, Klöppel G, Lerch MM, Löhr M, Notohara K, Okazaki K, Schneider A, Zhang L. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatolgy. *Pancreas* 2011;40(3):352-8. doi: 10.1097/MPA.0b013e3182142fd2.
43. Kamisawa T, Chari ST, Lerch MM, Kim MH, Gress TM, Shimosegawa T. Recent advances in autoimmune pancreatitis type 1 and type 2. *Gut* 2013;62:1373-80. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304224
44. Hart PA, Kamisawa T, Brugge WR, Chung JB, Culvert EL, Czako L, Frulloni L, Go WL, Gress TM, Myung-Hwan K, Kawa S, Lee KT, Lerch MM, Liao W, Lohr M, Okazaki K, Ryu JK, Schleinitz N, Shimizu K, Shimosegawa T, Soetikno R, Webster G, Yadav D, Zen Y, Chari ST. Long-term outcomes of autoimmune pancreatitis: a multicentre, international analysis. *Gut* 2013;62(12):1771-6. doi: 10.1136/gutjnl-2012-303617

Rizikové faktory a prediktory progresse Barrettova jícnu do adenokarcinomu

Pavel Svoboda^{1,2}, Petr Dítě^{1,2}, Pavel Klvaňa^{1,2}, Tomáš Kupka², Martina Bojková², Jana Žmolíková^{3,4,5}, Irena Urbanovská^{3,4,6}, Magdalena Uvírová^{3,4,6}, Petr Buzrla^{7,8}, Jana Dvořáčková^{5,7,8}

¹ Katedra interních oborů LF OU Ostrava, vedoucí katedry MUDr. Ivo Valkovský, Ph.D.

² Interní klinika LF OU a FN Ostrava, přednosta doc. MUDr. Arnošt Martínek, CSc.

³ Vědecký a výzkumný institut Agel, pobočka Ostrava-Vítkovice, CGB laboratoř, ředitelka společnosti RNDr. Magdalena Uvírová

⁴ Katedra biomedicínských oborů LF OU Ostrava, vedoucí katedry doc. RNDr. Kristian Šafářčík, Ph.D.

⁵ Ústav biologie LF UP Olomouc, přednosta ústavu doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.

⁶ Ústav molekulární a translační medicíny LF UP Olomouc, ředitel doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

⁷ Ústav patologie LF OU, vedoucí ústavu doc. MUDr. Jaroslav Horáček, CSc.

⁸ Ústav patologie FN Ostrava, vedoucí ústavu doc. MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D.

Souhrn

Refluxní choroba jícnu je poměrně časté onemocnění, refluxními potížemi strádá během života až 40 % populace. Naštěstí asi polovina nemocných, kteří jsou vyšetřeni pro jasné obtíže, nevykazuje makroskopické poškození sliznice jícnu a jen poměrně malé procento pacientů má závažný endoskopický nález – Barrettův jícen (10 %). Jedná se o závažnou komplikaci – prekancerózu s 30krát vyšším rizikem vzniku adenokarcinomu než u pacientů bez Barrettova jícnu. Článek pojednává o rizikových faktorech a prediktorech progresse Barrettova jícnu do adenokarcinomu. Mužské pohlaví, bílá rasa, refluxní choroba jícnu, Barrettův jícen a obezita jsou rizikovými faktory pro adenokarcinom jícnu. Dostatečný příjem ovoce a zeleniny a užívání nesteroidních protizánětlivých léků a aspirinu představují protektivní faktory. Znalost těchto faktorů se může uplatnit v prevenci vzniku adenokarcinomu jícnu, protože právě selekci pacientů na základě rizik a prediktorů progresse Barrettova jícnu do dysplazie a adenokarcinomu lze vytvořit účelnější a cost-efektivnější dispenzární programy.

Klíčová slova: adenokarcinom jícnu – Barrettův jícen – etiologie reflux

Risk factors and progression predictors of Barrett's oesophagus to adenocarcinoma

Summary

Gastroesophageal reflux disease is a quite common disorder, and the condition affects some 40 per cent of population in the course of their lifetime. Fortunately, about half of the patients examined due to clear symptoms do not manifest macroscopic damage of the oesophageal mucosa, and serious endoscopic findings (Barrett's oesophagus) are observed in only a small percentage of patients (10%). Barrett's oesophagus is a serious complication – precancerous condition with a 30-fold higher risk of development of oesophageal adenocarcinoma when compared with patients without this condition. The article presents risk factors and predictors of progression of the Barrett's oesophagus into the stage of adenocarcinoma. The main risk factors associated with oesophageal adenocarcinoma are male sex, white race, gastroesophageal reflux.

Key words: aetiology – Barrett's oesophagus – oesophageal adenocarcinoma – reflux

Úvod

Barrettův jícen nese jméno britského chirurga Normana Barretta, který jej popsal poprvé v roce 1950 [1]. O 3 roky později byla zjištěna jeho souvislost s gastroezofageálním refluxem [2] a v roce 1975 s adenokarcinomem jícnu [3].

Vzhledem k tomu, že za posledních 40 let vzrostla incidence adenokarcinomu jícnu 4násobně [4] a jeho prognóza je stále nedobrá, roste i zájem o problematiku Barrettova jícnu. Nové techniky endoskopického zobrazení navíc umožňují sledovat časné slizniční změny, a tím zlepšují a zpřesňují jeho diagnostiku. Na Barrettově jícnu lze také modelově sledovat kancerogenezi: akutní zánět – chronický zánět – intestinální metaplazie – lehká a těžká dysplazie – adenokarcinom.

Vzhledem k tomu, že časný adenokarcinom jícnu má lepší prognózu než pokročilý symptomatický adenokarcinom, je snaha vytvářet dispenzární endoskopické programy za účelem detekce progresu Barrettova jícnu do dysplazie a časného adenokarcinomu jícnu. Odhadované riziko progresu Barrettova jícnu do časného adenokarcinomu jícnu je 0,12–0,5 % za rok u pacientů bez dysplazie [5,6]. Abychom při tak relativně nízkém riziku vytvořili efektivní endoskopické dispenzární programy, měli bychom umět selektovat pacienty s vysokým rizikem, tedy mít praktické nástroje ke stratifikaci rizika pacientů s Barrettovým jícnem.

Definice Barrettova jícnu

V současné době existují 2 definice Barrettova jícnu (BJ): v USA a některých evropských státech, včetně ČR (doporučený postup České gastroenterologické společnosti), se používá **guideline American Gastroenterology Association**, který vyžaduje k verifikaci BJ výskyt intestinální metaplazie v povrchovém epitelu a žlázkách sliznice dolního segmentu jícnu. Na rozdíl od toho **britský guideline navržený British Society of Gastroenterology** považuje za Barrettův jícen jen přítomnost kolumnárního epitelu, který vystylá sliznici dolního segmentu i bez intestinální metaplazie [7–9]. Montrealský konsenzus z roku 2006, který je nejaktuálnějším akceptovaným klasifikačním systémem, jej definuje jako makroskopicky patrnou část jícnu, která je namísto běžného vrstevnatého nerohovějšího dlaždicového epitelu kryta epitelem cylindrickým. Podle dřívějších definic byl pro stanovení diagnózy nezbytný průkaz tzv. specializované intestinální metaplazie (SIM). Nová montrealská definice toto pravidlo mění a za Barrettův jícen se nyní považuje jakýkoli typ cylindrického epitelu v jícnu, tedy i tzv. žaludeční metaplazie (gastric metaplasia – GM). Nově se tedy rozlišují 2 základní histologické typy Barrettova jícnu, a to se specializovanou intestinální metaplazií (BJ SIM+) nebo s gastrickou metaplazií (BJ GM+) [10]. Gastroenterologové, resp. patologové v ČR se drží většinou definice České gastroenterologické společnosti, resp. American Gastroenterology Association. Intestinální metaplazií se rozumí přítomnost pohárkových buněk v metaplastickém epitelu sliznice. Co se týká obou výše popsaných doporučení, dosud panují mezi patology

kontroverzní názory, jestli by měla být přítomnost pohárkových buněk kritériem k potvrzení Barrettova jícnu nebo nikoliv. Důvodem je skutečnost, že v malé biopsii z endoskopického odběru jsou pohárkové buňky ve sliznici roztroušeny individuálně, asymetricky a počet žlázek s pohárkovými buňkami je velmi nízký, což může uniknout pozornosti diagnostikujícího patologa při mikroskopickém vyšetření. Tato situace může vést k mylnému stanovení falešně negativní diagnózy. Pravděpodobnost zachytu pohárkových buněk, resp. intestinální metaplazie je závislá na délce segmentu Barrettova jícnu, počtu odebraných vzorků z dolního segmentu jícnu a počtu gastroscopických vyšetření prováděných za určitou dobu u jednoho pacienta [9].

Dysplazie a adenokarcinom a jejich diferenciální diagnóza

Histologické vyšetření je zásadní nejen pro potvrzení diagnózy Barrettova jícnu, ale též pro stanovení léčby a eventuální dispenzarizace, přičemž rozhodujícím kritériem je přítomnost a stupeň dysplazie. V současnosti je vhodnější pro pojem dysplazie používat pojem intraepiteliální neoplazie (IN). Komplikací Barrettova jícnu je vznik dysplazie ve sliznici, která je považována za prekancerózu adenokarcinomu dolního segmentu jícnu, jež se v některých odborných knihách nazývá Barrettův adenokarcinom.

Dysplazie (intraepiteliální neoplazie) v terénu Barrettova jícnu má 2 stupně: nízký (low grade – LGIN) a vysoký (high grade – HGIN) [11]. Histologicky je dysplazie podobná jako u adenomů tlustého střeva.

U nízkého stupně dysplazie jsou žlázy tubulární a architektonicky pravidelné, v jejich epitelu je jádro hyperchromní, zvětšené, doutníkovitého tvaru s drobným jádrem a minimálně změněnou stratifikací. Polarita jádra je většinou zachována. Jádro nedosahuje lumenálního povrchu epitelu žlázek. V cytoplasmě dysplastického epitelu dochází k redukci hlenu. LGIN je patology diagnostikována častěji, než je ve skutečnosti přítomna, shoda mezi patology mnohdy nedosahuje 50 % [12,13], proto je k definitivnímu stanovení LGIN nutné potvrzení diagnózy druhým patologem. Potvrzená LGIN s sebou nese vyšší riziko vzniku adenokarcinomu [12,14]. Až 25 % pacientů s BJ má v době stanovení diagnózy již LGIN [5].

Vysoký stupeň dysplazie je charakterizován nepravidelným tvarem žlázek, které mohou být až kribriřformně uspořádané, vzácně mohou vykazovat i papilární konfiguraci. Často jsou k sobě žlázy stlačeny tzv. back to back. Jádra jsou oválná až kulatá, chromatin nabývá vezikulárního vzhledu s prominujícím jádrem, jádra dále ztrácejí polaritu, obsahují mitotické figury a jsou v těsné blízkosti lumenálního povrchu žlázek. Dysplazie se šíří z bazálních žlázek do povrchového epitelu sliznice. Tyto popsané změny u obou stupňů odpovídají adenomatóznímu (intestinálnímu) typu. Definitivní diagnóza HGIN (ale i LGIN) by měla být stanovena na základě biopsií Barrettova jícnu bez makroskopických známek zánětu. Druhé čtení k diagnóze HGIN

není nutné, protože mezi pathology existuje větší shoda v jejím odečtení než u LGIN.

Nedávno byly popsány a publikovány další typy dysplazie: dysplazie foveolárního typu, dysplazie bazálních krypt a serrated dysplazie, se kterými se v biopstické praxi nesetkáváme často [9].

Foveolární typ je charakterizován buněčnou populací s bohatou cytoplazmou a drobným, kulatým, hyperchromním jádrem, které je uloženo bazálně. Dysplastický epitel je imunohistochemicky pozitivní na MUC5AC a negativní v průkazu MUC2. Architektonika žlázek s touto dysplazií je převážně tubulární, někde až viliformní. Cytologicky může vykazovat nízký nebo vysoký stupeň dysplazie.

U dysplazie bazálních krypt jsou jaderná a architektonická atypie omezeny pouze na bazální žlázy (krypty), zatímco v horních žlázkách a povrchovém epitelu sliznice je maturace zachována. Jedna studie prokázala u tohoto typu dysplazie overexpresi p53 [9].

Poslední typ – serrated dysplazie – je velmi raritní a morfologicky napodobuje serrated adenom u tlustého střeva. Při malém zvětšení je tzv. serrated tvar lumenálního povrchu krypt nápadný a cytoplazma silně eozinofilní, s hyperchromním, doutníkovitým jádrem. Tato jádra mohou být stratifikována.

Odlíšení dysplazie nízkého stupně od reaktivní atypie epitelu, která bývá pozorována v okolí chronického zánětu, není pro histopatologa jednoduchým úkolem. Byly publikovány studie se zaměřením na imunohistochemické markery p53 a AMACR, které by měly pomoci v diferenciální diagnóze, avšak jejich specifita a senzitivita je velmi nízká. Pozitivita p53 byla prokázána také v regeneračním epitelu, stejně tak i mutace TP53, které byly detekovány u 1/3 pacientů s Barrettovým jícnem bez dysplastických změn. Dle jedné studie je exprese p53 v epitelu dysplazie nízkého stupně považována za horší prognostický faktor. Nicméně diferenciální diagnóza mezi reaktivní atypii a dysplazií nízkého stupně stále závisí na morfologickém zhodnocení. U reaktivní atypie jsou jádra kulatá až oválná, vezikulárního vzhledu s drobným jádrem a minimální stratifikací, v okolí je nápadná zánětlivá celulóza. Směrem od místa zánětu pomalu vymizí reaktivní atypie, zatímco u dysplazie nízkého stupně je patrný ostrý přechod mezi normálními jádry a atypickými jádry, která jsou hyperchromní, oválná až doutníkovitá, se stratifikací jader.

Adenokarcinom vznikající v terénu Barrettova jícnu může být intramukózní nebo invadovat do submukózy. Jeho morfologickými znaky jsou splývání žlázek, přítomnost intraluminálních papil a kříbriformní úprava s dilatací lumen, ve kterém se může nacházet nekrotický detritus, dále infiltrace lamina propria mucosae jak dysplastickými žlázkami, tak jednotlivými nádorovými buňkami. Dojde-li k invazi do submukózy, vzniká dezmozplazie stromatu se zánětlivou reakcí.

K přesnější diagnostice nám pomáhají i moderní endoskopické metody, jako např. narrow band imaging (NBI), autofluorescence (AFI) a endoskopie s vysokým

rozlíšením (endoskopie s vysokým rozlišením – HRE) přispívají ke zlepšení makroskopické vizualizace patologicky suspektních oblastí a umožňují cílený odběr biopsie. V NBI modu jsou více patrné slizniční nerovnosti, patologická cévní kresba a vaskulární abnormality, které mohou svědčit pro dysplazii [15]. U dysplazie a karcinomu in situ je fluorescence snižena a je pozorován posun v proporcii od zeleného k červenému světlu [16]. Dalším přínosem je nasazení plastického capu na konec endoskopu, pomocí kterého lze lépe prohlížet jednotlivé metaplastické ostrůvky Barrettova jícnu, precizněji hodnotit cévní kresbu a slizniční nerovnosti a umožňuje lepší cílený odběr biopsií [17]. Podle některých studií mají metody HRE, NBI a AFI větší význam v diagnostice HGIN a EAC [16,18], u nichž úspěšnost dosahuje až 100 % oproti 61 % při použití standardní endoskopie [19]. U LGIN vykazuje NBI i AFI nízkou senzitivitu [16,20], přičemž právě diagnóza LGIN je u pacientů s BJ zásadní pro další intenzivní sledování.

Stefanová et al provedli analýzu shody diagnózy stanovené na základě biopstických vzorků a diagnózy na základě vyšetření endoskopického resektátu a dospěli k závěru, že diagnóza byla odlišná ve 42 % případů [21], k podobným výsledkům dospěli i jiní autoři [22]. Endoskopická resekce je vhodná u pacientů s viditelnými lézemi. Kromě určení diagnózy určí i hloubku invaze, angioinvasi apod, což pomůže v rozhodnutí, zda je endoskopická resekce dostačující či by měla následovat chirurgická léčba [23,24].

Rizikové faktory a prediktory adenokarcinomu jícnu Barrettův jícen

Barrettův jícen bývá označován za prekancerózu jícnu s výskytem 0,1–0,5 % pacientů/rok. Je nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro adenokarcinom jícnu [25,26]. Ve švédské studii Lagergren et al prokázali závislost vzniku adenokarcinomu na frekvenci a stupni závažnosti refluxní choroby jícnu [27]. Na druhou stranu bylo zjištěno, že až 40 % pacientů s adenokarcinomem nemá žádné refluxní potíže [27]. Ačkoli se ukazuje, že chronický gastroezofageální reflux je nejvýznamnějším rizikovým faktorem adenokarcinomu jícnu, potlačení kyselosti se nejeví efektivní v redukci neoplastické progresu BJ. Potlačení nízkého pH v jícnu sice na jednu stranu inhibuje proliferaci, ale na druhou stranu vede k vzestupu hladiny gastrinu, který stimuluje proliferaci BJ [28,29]. Bohužel ani chirurgická léčba refluxní choroby jícnu nedokáže účinně redukovat riziko progresu BJ do adenokarcinomu [30].

Endoskopické ukazatele

I když se zdá, že délka BJ může predikovat riziko progresu [31,32], není známa hranice délky BJ, která by znamenala vysoké riziko. K této problematice budou nutné ještě další studie. Přítomnost **nodularity** nebo viditelných endoskopických lézí u BJ s vysokým stupněm dysplazie koreluje se zvýšeným rizikem progresu do adenokarcinomu, resp. se již může jednat o nerozpoznaný

adenokarcinom, posléze diagnostikovaný v resekátu [33,34].

Stupeň dysplazie

Stupeň dysplazie je považován za základní ukazatel rizika progresu BJ do adenokarcinomu. Nedávná metaanalýza uvádí, že roční míra progresu do adenokarcinomu u nízké dysplazie byla 16,98/1 000 ve srovnání s 5,98/1 000 pacientů bez dysplazie [35]. Jak již bylo řečeno, problémem je malá shoda mezi patologi při stanovování dysplazie nízkého stupně. Stručně řečeno, stupeň dysplazie je nedokonalým, ale snad nejpoužívanějším ukazatelem rizika stratifikace u BJ.

Body mass index

Dvě metaanalýzy studovaly vztah mezi nadváhou (BMI 25–30 kg/m²) a obezitou (BMI > 30 kg/m²) a adenokarcinomem jícnu. Bylo zjištěno, že riziko u těchto osob je 2–3násobné a s rostoucím BMI se dále zvyšuje [36–39]. Vliv tělního tuku na progresi BJ může být dán abdominální tukovou tkání, která je metabolicky aktivní – vytváří prozánětlivé cytokiny [40].

Infekce *Helicobacter pylori*

Infekce *Helicobacter pylori* se ukázala být protektivním faktorem pro vznik adenokarcinomu jícnu, ale zároveň i rizikovým faktorem pro spinocelulární karcinom jícnu [40,41]. Protektivní účinek se vysvětloval tím, že infekce vede ke snížení sekrece žaludeční kyseliny, a tak dochází ke snížení intenzity gastroezofageálního refluxu [42]. To však bylo posléze zpochybněno studií, která vyloučila mechanismus navození atrofie a snížení kyselé sekrece infekcí *Helicobacter pylori* [40]. *Helicobacter pylori* může snížit tvorbu grelinu, který je produkovan buňkami žaludeční sliznice a zvyšuje chuť k jídlu. Díky tomu dochází k menšímu nárůstu obezity, která je rizikovým faktorem pro vznik adenokarcinomu jícnu [43].

Další možné rizikové faktory

Hiátová hernie usnadňuje gastroezofageální reflux, a tím zhoršuje refluxní chorobu jícnu [44] a přispívá tak ke 2–6násobnému riziku adenokarcinomu jícnu [45]. Zdá se, že délka hiátové hernie koreluje s rizikem progresu do adenokarcinomu u BJ [32,46].

Vliv **kouření** na vznik adenokarcinomu jícnu je mnohem menší než na spinocelulární karcinom jícnu, přesto některé studie prokázaly vyšší výskyt adenokarcinomu jícnu u kuřáků v porovnání s nekuřáky [47–52]. Bylo potvrzeno, že riziko narůstá s délkou a intenzitou kouření [53]. Na druhou stranu další práce toto signifikantně neprokázaly [54,55].

Nejsou jasné důkazy, že by vyšší věk byl rizikovým faktorem progresu BJ do těžké dysplazie nebo adenokarcinomu [56].

Nedávné přehledy napovídají, že incidence adenokarcinomu jícnu je **2krát vyšší u mužů** než u žen [54,57,58].

Potrava a výživové doplňky – některé studie udávají vyšší výskyt adenokarcinomu jícnu při vysokotučných

dietách [55] a nižší při příjmu ovoce a zeleniny [59], ale žádná z nich nepoužila kontrolní skupinu s BJ. Další práce ukazuje na pozitivní vliv multivitaminů, vitamínu C a E [60]. Studie prokázaly, že pravidelný příjem ovoce a zeleniny vedl ke snížení rizika karcinomu jícnu [61–64].

Vztah profese – např. dělníků vystavených azbestu nebo cementovému prachu a adenokarcinomu jícnu je velmi slabý [65–67].

Při achalazii jícnu dochází k městnání potravy v jícnu a vzniku zánětu, což vede k vyššímu riziku vzniku nádoru jícnu [68]. 10násobně zvýšené riziko pro oba histologické typy karcinomu jícnu u pacientů s achalazií popisuje švédská kohortová studie [69].

Rada epidemiologických studií nalezla inverzní vztah mezi užíváním **aspirinu a jiných nesteroidních protizánětlivých léků** a rizikem vzniku obou typů karcinomů jícnu. Častější užívání těchto léků snižuje toto riziko asi o 40 % [70]. Studie publikovaná v roce 2010 ukázala, že po 20letém užívání 75 mg acetylsalicylové kyseliny dosahuje snížení rizika karcinomu jícnu 60 % [71].

Adenokarcinom jícnu je převažujícím typem karcinomu jícnu v západních zemích s vysokou **socioekonomickou úrovní**, je spojen s vysokým BMI a s kardiovaskulárními rizikovými faktory [72].

Biomarkery předpovědi u Barrettova jícnu

Progrese intestinální metaplasie do ezofageálního adenokarcinomu (EA) u pacientů s Barrettovým jícnem a přechod mezi jednotlivými grady je asociovan s akumulací genetických a epigenetických alterací v tumor-supresorových genech (např. *CDKN2A*, *p53*) a protoonkogenech (*ERBB2*, *c-MYC*). Tyto změny umožňují nekontrolovatelnou proliferaci, rezistenci buněk k apoptóze a schopnost invaze nádorových buněk [73–76]. Co je spouštěčem přechodu z BJ do EA a tedy vlastním mechanismem kancerogeneze, však není dosud známo a je předmětem intenzivního výzkumu. Byla objevena řada potencionálních biomarkerů, které by mohly pomoci určit stupeň dysplazie a stanovit tak přesnější riziko možného vývoje rakoviny, prognózu a případně predikovat léčbu, nicméně žádný z nich prozatím nenašel rutinní uplatnění v běžné klinické praxi [77].

Jako jeden ze slibných biomarkerů se jeví gen *CDKN2A* (*p16* v oblasti 9p21). Tento tumor-supresorový gen blokuje fosforylaci RB1 proteinu a inhibuje tak postup buňky buněčným cyklem. Hypermetylace promotoru tohoto genu kombinovaná se ztrátou heterozygoty 9p21 vede k inaktivaci tohoto genu a je považována za časnou událost kancerogeneze. Předpokládá se, že postupně dochází k dalším změnám, jako je inaktivace genu *p53* delecí nebo mutací, tím dojde k deregulaci buněčného růstu, klonální expanzi a vývoji dysplazie [78]. Gen *p53* může být inhibován také produktem protoonkogenu *MDM2*. Ten se přesně váže a formuje do komplexu s *p53* a inaktivuje jej [79,80]. Změny v těchto genech jsou asociovány s progresí BJ do EA [81].

Gen *p16* je spolu s geny *c-MYC*, *ERBB2* a *ZNF217* součástí sondy pro fluorescenční hybridizaci in situ (FISH)

firmy Abbott Molecular. FISH je molekulárně-cyto-
genetická metoda, která umožňuje detekovat delece, am-
plifikace genů či aneuploidie přímo v jádrech buněk.
Metodu FISH je možno použít na různých typech pre-
parátů; v molekulární patologii se nejčastěji používají
řezy z tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v para-
finu. Je ale možno ji také aplikovat na cytologické pre-
paráty nebo tzv. brush cytologie [82]. Ztráta funkce
genu *p16* at' už delecí nebo hypermetylací je pozorová-
vána u intestinální metaplazie či low-grade dysplazie
[83]. Amplifikace genu *ERBB2* je považována za nepří-
znivý prognostický faktor, naznačuje progresi onemocně-
ní a nachází se většinou u pacientů s high-grade dys-
plazií a EA stejně jako amplifikace genu *c-myc* [84].
Kromě toho, že má amplifikace genu *ERBB2* (*Her2-neu*)
prognostický význam, je také prediktivním markerem
pro užití cílené biologické léčby, jako je trastuzumab
(Herceptin) [85]. Pomocí této metody je tedy možné vy-
tipovat pacienty s vyšším rizikem vzniku EA, případně
upřesnit grade BJ, prognózu a v některých případech
také predikovat léčbu.

Do popředí zájmu se tak jako u celé řady dalších mal-
ignit v i v případě BJ dostává studium miRNA. miRNA je
skupina malých nekódujících RNA o délce 18–25 nukleo-
tidů, které se mohou vázat do regulačních oblastí mRNA
a inhibovat tak translaci, tedy přepis příslušného genu.
Abnormální exprese různých typů miRNA je pozorová-
vána u všech solidních nádorů i hematologických mal-
ignit [86]. U BJ je v současné době studováno např. využití
kombinace exprese miRNA-192, miRNA-196a a miRNA-
203 jako znaku možné progresse onemocnění [87]. Záro-
věň je miRNA-203 jedním z dalších možných terapeuti-
ckých cílů [88].

Molekulární genetika hraje stále důležitější roli v dia-
gnostice celé řady nádorových onemocnění a prekurzo-
rových lézí včetně BJ – hledají se nejefektivnější možné
kombinace potenciálních biomarkerů, díky kterým by
bylo možné včas zachytit progresi onemocnění, které
by predikovaly terapeutickou odpověď a hledají se po-
tenciální terapeutické cíle pro případnou biologickou
léčbu.

Literatura

1. Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and "oesophagitis". *Br J Surg* 1950; 38(150): 175–182.
2. Allison PR, Johnstone AS. The oesophagus lined with gastric mucous membrane. *Thorax* 1953; 8(2): 87–101.
3. Naef AP, Savary M, Ozzello L. Columnar-lined lower esophagus: an acquired lesion with malignant predisposition. Report on 140 cases of Barrett's esophagus with 12 adenocarcinomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1975; 70(5): 826–835.
4. Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni jr. JF Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 1998; 83(10): 2049–2453.
5. Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM et al. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *N Engl J Med* 2011; 365(15): 1375–1383.
6. Martínek J, Beneš M, Brandtl P et al. Low incidence of adenocarcinoma and high-grade intraepithelial neoplasia in patients with

Barrett's esophagus: a prospective cohort study. *Endoscopy* 2008; 40(9): 711–716.

7. Voltaggio L, Montgomery EA, Lam-Himlin D. A clinical and histo-
pathologic focus on Barrett esophagus and Barrett-related dysplasia. *Arch Pathol Lab Med* 2011; 135(10): 1249–1260.

8. Shepherd NA, Warren BF et al (eds). *Morson and Dawson's Gastro-
intestinal Pathology*. 5th ed. Wiley-Blackwell: Hoboken (NJ) 2013. ISBN
978-1-4051-9943-8.

9. Lisovsky M, Srivastava A. Barrett Esophagus: Evolving Concepts in
Diagnosis and Neoplastic Progression. *Surgical Pathology Clinics* 2013;
6(3): 475–496.

10. Řešení Barrettova jícnu. *Lékařské listy* 2010; 11 (Suppl). Do-
stupné on-line: <[http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/
resi-ni-barrettova-jicnu-452135](http://zdravi.e15.cz/clanek/priloha-lekarske-listy/resi-ni-barrettova-jicnu-452135)>.

11. Montgomery EA, Voltaggio L. *Biopsy Interpretation of the Gastro-
intestinal Mucosa*, Volume 2: Neoplastic. 2nd ed. Lippincott Williams
and Wilkins: Philadelphia 2012. ISBN 9781451109597.

12. Curvers WL, Kate FJ, Krishnadath KK et al. Low-grade dysplasia in
Barrett's esophagus: overdiagnosed and undereestimated. *Am J Gast-
roenterol* 2010; 105: 1523–1530.

13. Pech O, Vieth M, Schmitz D et al. Conclusion from the histological
diagnosis of low-grade intraepithelial neoplasia in Barrett's oesophagus.
Scand J Gastroenterol 2007; 42(6): 682–688.

14. Phoa KN, van Vilsteren RE, Pouw BL et al. Surveillance vs RFA for
Barrett's esophagus with confirmed low grade dysplasia: a european
Multicenter randomized controlled trial. *DDW 2013*, abstract No. 1004.

15. Hamamoto Y, Endo T, Noshio K et al. Usefulness of narrow-band
imaging endoscopy for diagnosis of Barrett's esophagus. *J Gastroen-
terol* 2004; 39(1): 14–20.

16. Stefanová M, Zavoral M, Závada F et al. Přínos autofluorescence
v diagnostice lehké intraepiteliální neoplazie u pacientů s Barretto-
vým jícnem. *Gastroent Hepatol* 2011; 65(5): 249–254.

17. Curvers WL, Herrero LA, Wallace MB et al. Endoscopic tri-modal
imaging is more effective than standard endoscopy in identifying early-
stage neoplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2010;
139(4): 1106–1114.

18. Mannath JJ, Subramanian V, Hawkey CJ et al. Narrow band imaging
for characterization of high grade dysplasia and specialized intestinal
metaplasia in Barrett's esophagus: a meta-analysis. *Endoscopy* 2010;
42(5): 351–359.

19. Kara MA, Bergman JJ. Autofluorescence imaging and narrow-band
imaging for the detection of early neoplasia in patients with Barret's
esophagus. *Endoscopy* 2006; 38(6): 627–631.

20. Wang KK, Okoro N, Prasad G et al. Endoscopic evaluation and
advanced imaging of Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc Clin
N Am* 2011; 21(1): 39–51.

21. Stefanová M, Tučková I, Malušková J et al. Biopsie nejsou dosta-
tečné pro přesnou diagnostiku neoplazie u pacientů s Barrettovým
jícnem. *Gastroent Hepatol* 2013; 67(4): 264–270.

22. Hull MJ, Mino-Kenudson M, Nishioka NS et al. Endoscopic mu-
cosal resection: an improved diagnostic procedure for early gastroesoph-
ageal epithelial neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2006; 30(1): 114–118.

23. Spechler SJ, Sharma P, Souza RF et al. American Gastroenterologi-
cal Association medical position statement on the management of Bar-
rett's esophagus. *Gastroenterology* 2011; 140(3): 1084–1091.

24. Ell C, May A, Gossner L et al. Endoscopic mucosal resection of early
cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroente-
rology* 2000; 118(4): 670–677.

25. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P et al. The Montreal definition and
classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-
based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(8): 1900–1920.

26. Overholt BF, Lightdale CJ, Wang KK et al. Photodynamic therapy
with porfimer sodium for ablation of high-grade dysplasia in Barrett's
esophagus: international, partially blinded, randomized phase III trial.
Gastrointest Endosc 2005; 62(4): 488–498.

27. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A et al. Symptomatic gastro-
esophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma.
N Engl J Med 1999; 340(11): 825–831.

28. Fitzgerald RC, Omary MB, Triadafilopoulos G. Dynamic effects of acid on Barrett's esophagus. An ex vivo proliferation and differentiation model. *J Clin Invest* 1996; 98(9): 2120–2128.
29. Haigh CR, Attwood SE, Thompson DG et al. Gastrin induces proliferation in Barrett's metaplasia through activation of the CCK2 receptor. *Gastroenterology* 2003; 124(3): 615–625.
30. Chang EY, Morris CD, Seltman AK et al. The effect of antireflux surgery on esophageal carcinogenesis in patients with Barrett esophagus: a systematic review. *Ann Surg* 2007; 246(1): 11–21.
31. Weston AP, Badr AS, Hassanein RS. Prospective multivariate analysis of factors predictive of complete regression of Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(12): 3420–3426.
32. Weston AP, Sharma P, Mathur S et al. Risk stratification of Barrett's esophagus: updated prospective multivariate analysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(9): 1657–1666.
33. Buttar NS, Wang KK, Sebo TJ et al. Extent of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus correlates with risk of adenocarcinoma. *Gastroenterology* 2001; 120(7): 1630–1639.
34. Montgomery E, Bronner MP, Greenson JK et al. Are ulcers a marker for invasive carcinoma in Barrett's esophagus? Data from a diagnostic variability study with clinical follow-up. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(1): 27–31.
35. Wani S, Puli SR, Shaheen NJ et al. Esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus after endoscopic ablative therapy: a meta-analysis and systematic review. *Am J Gastroenterol* 2009; 104(2): 502–513.
36. Hampel H, Abraham NS, El-Serag HB. Meta-analysis: obesity and the risk for gastroesophageal reflux disease and its complications. *Ann Intern Med* 2005; 143(3): 199–211.
37. Kubo A, Corley DA. Body mass index and adenocarcinomas of the esophagus or gastric cardia: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(5): 872–878.
38. Cook MB, Greenwood DC, Hardie LJ et al. A systematic review and meta-analysis of the risk of increasing adiposity on Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(2): 292–300.
39. Edelstein ZR, Farrow DC, Bronner MP et al. Central adiposity and risk of Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 2007; 133(2): 403–411.
40. Ye W, Held M, Lagergren J et al. Helicobacter pylori infection and gastric atrophy: risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(5): 388–396.
41. Whiteman DC, Parmar P, Fahey P et al. Association of Helicobacter pylori infection with reduced risk for esophageal cancer is independent of environmental and genetic modifiers. *Gastroenterology* 2010; 139(1): 73–83.
42. Chow WH, Blaser MJ, Blot WJ et al. An inverse relation between cagA+ strains of Helicobacter pylori infection and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Cancer Res* 1998; 58(4): 588–590.
43. Whiteman DC, Sadeghi S, Pandeya N et al. Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus. *Gut* 2008; 57(2): 173–180.
44. Lukáš K. Je hiátová hernie synonymem pro refluxní choroby jícnu? *Čes a Slov Gastroent a Hepatol* 2004; 58(3): 110–115.
45. Kamangar F, Chow WH, Abnet CC et al. Environmental causes of esophageal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2009; 38(1): 27–57.
46. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG et al. Hiatal hernia size, Barrett's length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(8): 1930–1936.
47. Menke-Pluymers MB, Hop WC, Dees J et al. Risk factors for the development of an adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett) esophagus. The Rotterdam Esophageal Tumor Study Group. *Cancer* 1993; 72(4): 1155–1158.
48. Gray MR, Donnelly RJ, Kingsnorth AN. The role of smoking and alcohol in metaplasia and cancer risk in Barrett's columnar lined oesophagus. *Gut* 1993; 34(6): 727–731.
49. Freedman ND, Abnet CC, Leitzmann MF et al. A prospective study of tobacco, alcohol, and the risk of esophageal and gastric cancer subtypes. *Am J Epidemiol* 2007; 165(12): 1424–1433.
50. Wu AH, Wan P, Bernstein L. A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States). *Cancer Causes Control* 2001; 12(8): 721–732.
51. Veugeliers PJ, Porter GA, Guernsey DL et al. Obesity and lifestyle risk factors for gastroesophageal reflux disease, Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus* 2006; 19(5): 321–328.
52. Chen Z, Yang G, Zhou M et al. Body mass index and mortality from ischaemic heart disease in a lean population: 10 year prospective study of 220,000 adult men. *Int J Epidemiol* 2006; 35(1): 141–150.
53. Gammon MD, Schoenberg JB, Ahsan H et al. Tobacco, alcohol, and socioeconomic status and adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89(17): 1277–1284.
54. Bani-Hani KE, Bani-Hani BK, Martin IG. Characteristics of patients with columnar-lined Barrett's esophagus and risk factors for progression to esophageal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005; 11(43): 6807–6814.
55. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG et al. Hiatal hernia size, Barrett's length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(8): 1930–1936.
56. Prasad GA, Bansal A, Sharma P et al. Predictors of progression in Barrett's esophagus: current knowledge and future directions. *Am J Gastroenterol* 2010; 105(7): 1490–1502.
57. Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM et al. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008; 168(3): 237–249.
58. de Jonge PJ, Steyerberg EW, Kuipers EJ et al. Risk factors for the development of esophageal adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol* 2006; 101(7): 1421–1429.
59. Mehta S, Johnson IT, Rhodes M. Systematic review: the chemoprevention of oesophageal adenocarcinoma. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(9): 759–768.
60. Dong LM, Kristal AR, Peters U et al. Dietary supplement use and risk of neoplastic progression in esophageal adenocarcinoma: a prospective study. *Nutr Cancer* 2008; 60(1): 39–48.
61. Guo W, Blot WJ, Li JY et al. A nested case-control study of oesophageal and stomach cancers in the Linxian nutrition intervention trial. *Int J Epidemiol* 1994; 23(3): 444–450.
62. Gonzalez CA, Pera G, Agudo A et al. Fruit and vegetable intake and the risk of stomach and oesophagus adenocarcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST). *Int J Cancer* 2006; 118(10): 2559–2566.
63. Sapkota A, Hsu CC, Zaridze D et al. Dietary risk factors for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in central and eastern Europe. *Cancer Causes Control* 2008; 19(10): 1161–1170.
64. Riboli E, Norat T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 2003; 78(Suppl 3): S559–S569.
65. Jansson C, Johansson AL, Bergdahl IA et al. Occupational exposures and risk of esophageal and gastric cardia cancers among male Swedish construction workers. *Cancer Causes Control* 2005; 16(6): 755–764.
66. Engel LS, Vaughan TL, Gammon MD et al. Occupation and risk of esophageal and gastric cardia adenocarcinoma. *Am J Ind Med* 2002; 42(1): 11–22.
67. Jansson C, Jeding K, Lagergren J. Job strain and risk of esophageal and cardia cancers. *Cancer Epidemiol* 2009; 33(6): 473–475.
68. Leeuwenburgh I, Haringsma J, Van Dekken H et al. Long-term risk of oesophagitis, Barrett's oesophagus and oesophageal cancer in achalasia patients. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2006; (243): 7–10.
69. Zendejdel K, Nyrén O, Edberg A et al. Risk of esophageal adenocarcinoma in achalasia patients, a retrospective cohort study in Sweden. *Am J Gastroenterol* 2011; 106(1): 57–61.
70. Corley DA, Kerlikowske K, Verma R et al. Protective association of aspirin/NSAIDs and esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2003; 124(1): 47–56.
71. Rothwell PM, Wilson M, Elwin CE et al. Long-term effect of aspirin on colorectal cancer incidence and mortality: 20-year follow-up of five randomised trials. *Lancet* 2010; 376 (9754): 1741–1750.

72. Smith M, Zhou M, Whitlock G et al. Esophageal cancer and body mass index: results from a prospective study of 220,000 men in China and a meta-analysis of published studies. *Int J Cancer* 2008; 122(7): 1604–1610.
73. Krishnadath KK, Hugo WT, van Blankenstein M et al. Accumulation of Genetic Abnormalities during neoplastic Progression in Barrett's Esophagus. *Cancer Res* 1995; 55(9): 1971–1976.
74. Jankowski JA, Wright NA, Meltzer SJ et al. Molecular evolution of the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus. *Am J Pathol* 1999; 154(4): 965–973.
75. Maley CC, Galipeau PC, Li X et al. Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus. *Cancer Res* 2004; 64(10): 3414–3427.
76. Rauser S, Weis R, Braselmann H et al. Significance of HER2 low-level copy gain in Barrett's cancer: implications for fluorescence in situ hybridization testing in tissues. *Clin Cancer Res* 2007; 13(17): 5115–5123.
77. Illig R, Klieser E, Kiesslich T et al. GERD-Barrett-Adenocarcinoma: Do We Have Suitable Prognostic and Predictive Molecular Markers? *Gastroenterol Res Pract* 2013; 2013: 643084.
78. Brankley SM, Fritcher EG, Smyrk TC et al. Fluorescence in situ hybridization mapping of esophagectomy specimens from patients with Barrett's esophagus with high-grade dysplasia or adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2012; 43(2): 172–179.
79. Saito H, Tsujitani S, Oka S et al. The expression of murine double minute 2 is a favorable prognostic marker in esophageal squamous cell carcinoma without p53 protein accumulation. *Ann Surg Oncol* 2002; 9(5): 450–456.
80. Sanjeev S, Shaomeng W. Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2009; 49: 223–241.
81. Ellsworth E, Jackson SA, Thakkar SJ et al. Correlation of the presence and extend of loss of heterozygosity mutations with histological classifications of Barrett's esofagus. *BMC Gastroenterol* 2012; 12: 181. Dostupné z DOI: <<http://doi:10.1186/1471-230X-12-181>>.
82. Rygiel AM, van Baal JWPM, Milano F et al. Efficient automated assessment of genetic abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization on brush cytology in a Barrett esophagus surveillance population. *Cancer* 2007; 109(10): 1980–1988.
83. Bian YS, Osterheld MC, Fontollet C et al. p16 inactivation by methylation of the CDKN2A promoter occurs early during neoplastic progression in Barrett's esofagus. *Gastroenterology* 2002; 122(4): 1113–1121.
84. Brankley SM, Fritcher EG, Smyrk TC et al. Fluorescence in situ hybridization mapping of esophagectomy specimens from patients with Barrett's esophagus with high-grade dysplasia or adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2012; 43(2): 172–179.
85. Croxtall JD, McKeage K. Trastuzumab: in HER2-positive metastatic gastrin cancer. *Drugs* 2010; 70(17): 2259–2267.
86. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Med* 2009; 60: 167–179.
87. Luzna P, Gregar J, Ueberall I et al. Changes of microRNAs-192,196a and 203 correlate with Barrett's esofagus diagnosis and its progression compared to normal healthy individuals. *Diagn Pathol* 2011; 6: 114. Dostupné z DOI: <<http://doi:10.1186/1746-1596-6-114>>.
88. Saini S, Majid S, Yamamura S et al. Regulatory role of miR-203 in prostate cancer progression and metastasis. *Clin Cancer Res* 2011; 17(16): 5287–5298.

MUDr. Pavel Svoboda, Ph.D.

✉ pavel.svoboda@fno.cz

Interní klinika LF OU a FN, Ostrava-Poruba

www.fno.cz

Doručeno do redakce: 18. 12. 2013

Přijato po recenzi: 18. 3. 2014

Molekulární genetika u gastrointestinálních stromálních tumorů

Magdalena Uvírová^{1,2}, Jarmila Šimová^{1,2}, Barbora Kubová², Jana Žmolíková^{1,2}, Irena Urbanovská^{1,2}, Jana Dvořáčková^{1,2,3}, Arnošt Martínek^{1,4}, Dušan Žiak², Petr Dítě^{1,2,4}

¹Lékařská fakulta Ostravské univerzity v Ostravě

²CGB laboratoř a.s., Ostrava

³Ústav patologie FN Ostrava

⁴Interní klinika FN Ostrava

Gastrointestinální stromální nádory (GISTy) jsou mezenchymální nádory gastrointestinálního traktu (GI), pocházející z intersticiálních Cajalových buněk převážně ze žaludku a tenkého střeva. V posledním desetiletí došlo k rozvoji cílené molekulární léčby mnoha solidních nádorů a s objevem onkogenních mutací kináz u GISTů došlo k rychlému pochopení molekulárně biologické povahy těchto nádorů a přispělo k zavedení inhibitorů tyrozinkináz do klinické praxe i u tohoto typu nádorů. Proto v současné době hraje významnou úlohu molekulární genotypizace těchto lézí, především z hlediska prognózy, léčebné odpovědi, respektive primární nebo sekundární rezistence na cílenou léčbu.

Klíčová slova: gastrointestinální stromální tumor, mutace, *KIT* gen, *PDGFRA* gen.

Molecular genetics in gastrointestinal stromal tumors

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) are mesenchymal tumors of the gastrointestinal tract (GI) arising from the interstitial cells of Cajal, primarily of the stomach and small intestine. During the past decade came up to progress of molecular targeted therapies for many solid tumors and in association with discovery of onkogenic kinase mutations in GISTs to rapid evolution in understanding of molecular biology features of these tumors and to implementation tyrosine kinase inhibitors in clinical practice. Therefore molecular genotyping of this lesions is very important for prognosis, therapy, primary or secondary resistance to targeted therapy respectively.

Key words: Gastrointestinal stromal tumor, mutation, *KIT* gene, *PDGFRA* gene.

Onkologie 2014; 8(6): 257–258

Úvod

Gastrointestinální stromální tumory (GIST) se vyskytují převážně u pacientů staršího věku (medián věku 60–65 let), bez rozdílu pohlaví, s incidencí 1,5/100 000/rok (1). Za jeden z klíčových dějů u onkogenezi GISTů se považují aktivační mutace genů kódujících receptorové tyrozinkinázy *KIT* a *PDGFRA*.

Molekulární genetika

U přibližně 75 % GISTů se vyskytují mutace v *KIT* genu, které způsobují independentní konstitutivní kinázovou aktivaci, přičemž nejčastější je mutace v exonu 11, kódujícího intracelulární juxtamembránovou doménu proteinu. Tyto mutace zahrnují delece, inserce a substituce, případně jejich vzájemnou kombinaci a mají za následek změnu sekundární struktury proteinu v jeho aktivní formě (aktivní konformaci). Delece jsou asociovány s kratším Progression Free (PFS) intervalem a celkovým přežitím (OS) v porovnání s ostatními typy mutací. Kromě mutací v exonu 11 (~ 70 %) se u 7–11 % GISTů vyskytují mutace v exonu 9 a vzácně v exonu 13 a 17 *KIT* genu (2).

Přibližně 80 % *KIT* negativních GISTů nese mutaci v *PDGFRA* genu. V některých studiích byla prokázána spjitost s predominantní žluďeční lokalizací, epitelioidní morfologií *PDGFRA* mutovaných GISTů. Mutace v genu *PDGFRA* se vyskytují přibližně v 8–10 %. Nejčastěji se nacházejí v exonu 18 a raritně v exonech 12 a 14 (3). Mutace v *KIT* genu a *PDGFRA* genu jsou u GISTů vzájemně exkluzivní (2).

KIT gen – oficiální název je “v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog”, (často je uváděn pod jinými názvy, např. *CD117*, *c-kit*, apod.) – je lokalizován na dlouhém ramenu chromozomu 4 v lokusu 4q12. Gen řídí produkci proteinu buněčné membrány patřící do rodiny tyrozinkinázových receptorů (RTKs). Signální dráha stimulovaná *KIT* proteinem kontroluje řadu významných procesů v buňce. Jedná se především o buněčný růst, proliferaci, přežití (resp. apoptózu) a migraci. Signální dráha vedoucí od tohoto proteinu má zásadní význam především pro určité druhy buněk, např. reprodukční buňky, hematopoetické buňky, mastocyty, buňky v gastrointestinálním traktu (Cajalovy buňky) a melanocyty (4).

Mutace *KIT* genu jsou ve srovnání s nádory GIST nesoucími mutace v *PDGFRA* genu spojovány s horší prognózou a vyšším maligním potenciálem (5).

PDGFRA gen – oficiální název – „platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide“ – je lokalizován také na dlouhém ramenu chromozomu 4, lokus 4q12. Gen kóduje alfa podjednotku receptoru tyrozín kinázy *PDGF*, která náleží do podskupiny typu III tyrozín kinázových receptorů. Protein je lokalizován v buněčné membráně a podílí se na transdukcí signálů a ovlivňuje procesy buněčného cyklu, především růst, proliferaci a přežití (4).

Přibližně 10–15 % GISTů nemá mutaci ani *KIT* ani *PDGFRA* genu (tzv. *KIT/PDGFRA* „wild type“ GIST). Jsou klinicky nerozlišitelné od mutantních tumorů – mají identickou morfoloii, vysokou hladinu exprese *KIT* proteinu a mohou se nacházet kdekoli v GI traktu. Recentní studie ukazují, že wild type GIST jsou heterogenní skupinou a vykazují různé druhy mutací jiných genů, např. *BRAF* a jeho mutace V600E (ve 13 % wild type GISTů) a *SDH* (succinate dehydrogenase) (6). Přibližně 50 % wild type GISTů vykazuje ztrátu enzymatické aktivity v mi-

tochondriálním respiračním řetězci komplexu II (SDH-deficientní GISTy). Tento komplex tvoří čtyři podjednotky (SDHA, SDHB, SDHC a SDHD). Ztráta kterékoliv této podjednotky vlivem mutace nebo poruchy posttranskripční regulace vede k akumulaci sukcinátů. Mechanismus, jakým vede ztráta sukcináddehydrogenázového komplexu ke vzniku nádoru není zcela objasněn, předpokládá se zvýšení transkripce HIF1- α (hypoxia-inducible factor 1- α) regulovaných genů a pokles DNA demethylace. Obecně SDH-deficientní GISTy s mutací nebo bez mutace *SDHx* vykazují zvýšení DNA metylace (podobně jako gliomy a leukémie s *IDH1* a *IDH2* mutací) a tvoří skupinu nádorů s odlišnými klinickými projevy od *KIT/PDGFRA* mutovaných GISTů. Mají převážně lokalizaci v žaludku s epiteloidní histologií, vykazují lymfovaskulární invazi a plexiformní fenotyp, jsou multifokální s časným metastázováním do lymfatických uzlin, avšak s pomalým růstem (2, 7).

Raritně byly nalezeny také mutace *HRAS*, *NRAS* a *PIK3CA* genů. Vzhledem k tomu, že BRAF a RAS proteiny jsou součástí MAP kinázové kaskády mohou způsobit KIT independentní stimulaci růstu a tímto způsobit rezistenci na KIT/PDGFRA kinázové inhibitory (2).

Přesto, že onkogenní mutace kináz hrají důležitou roli v rozvoji GISTů, pro progresi a rozvoj onemocnění jsou nutné také další genetické události. Přibližně dvě třetiny GISTů vykazují buďto monosomii chromozomu 14 nebo ztrátu v oblasti 14q. Tyto chromozomové abnormality se vyskytují jak u *KIT* mutovaných, tak *PDGFRA* mutovaných GISTů. U přibližně 50% GISTů se vyskytuje delece dlouhého ramena chromozomu 22 (22q). Ztráty v chromozomových oblastech 1p, 9p, 11p a 17p jsou méně časté než delece 14q avšak jsou významnější pro malignitu. U GISTů byly nalezeny také delece 13q a 15q nebo monozomie chromozomu 10. Zmnožení oblastí 8q (zahrnuje *MYC* gen), 3q a 17q jsou asociována s metastatickým chováním tumoru. Žádná z výše uvedených chromozomových změn se nevyskytuje u dětských typů GISTů, které jsou spíše diploidní. Naproti tomu GISTy vznikající u pacientů s neurofibromatózou typu 1 vykazují časté ztráty 14q a 22q. Signifikantní část GISTů vykazuje inaktivaci tumor supresorového genu *CDKN2A*, kódujícího protein p16 (regulátor buněčného cyklu), ke které dochází buď bíaleickou delecí lokusu p21 na chromozomu 9 nebo v kombinaci s mutací, popřípadě metylací promotoru. Také mutace *TP53* a snížení exprese p53 v imunohistochemii koreluje se špatnou prognózou. Rovněž amplifikace genů *MDM2* a *CCND1* (cyclin D1) jsou asociovány s malignitou (u GIST jsou však málo časté) (2, 8).

MikroRNA

Je známo, že v progresi mnoha typů nádorů hrají významnou roli změny expresních profilů a dysregulace mikroRNA, nádory GIST nejsou výjimkou. Recentní studie prokazují, že mikroRNA přímo regulují KIT expresi a inhibují buněčnou proliferaci u GISTů (11), případně mohou být asociovány s rezistencí na imatinib (11, 9).

Cílená terapie

Před nástupem cílené terapie byla prognóza u pokročilých gastrointestinálních stromálních tumorů špatná vzhledem k jejich rezistenci jak na chemoterapii, tak na radioterapii. Do roku 2000 byla odpověď na léčbu konvenční chemoterapií méně než 5% a medián přežití pacientů s pokročilým onemocněním 18 měsíců. Tyrozinkinázové inhibitory byly původně vyvinuty v 90. letech 20. století pro léčbu chronické myeloidní leukémie (pro jejich schopnost inhibice fúzního onkoproteinu BCR-ABL). Protože *ABL* má strukturální podobnost s *KIT* genem, byl imatinib testován i na buňkách nesoucích mutantní formu *KIT* genu a ověřena jeho účinnost (2).

Přibližně 10% pacientů s GIST však vykazují primární rezistenci na léčbu inhibitory TKs, která je definována jako progres v průběhu prvních 6 měsíců léčby. Podle prvních studií odpověď na léčbu imatinibem koreluje s kinázovým genotypem nádoru. Pravděpodobnost primární rezistence na imatinib pro mutace v exonu 11 *KIT* genu je 5%, v exonu 9 je 16% a pro wild type GIST 23%. Molekulární genotypizace GISTů je důležitá především pro identifikaci *KIT* exon 9 mutantních tumorů, které vyžadují vyšší dávky imatinibu pro optimální léčbu onemocnění. Poddávkování u tohoto typu GISTu je zjevnou příčinou rezistence na léčbu. Na základě in vitro dat je zřejmé, že nejčastější mutace v *PDGFRA* genu, D842V způsobuje absolutní rezistenci na imatinib. Toto je potvrzeno klinickými výsledky. Pacient s *PDGFRA* D842V mutací má nízkou odpověď na léčbu imatinibem a velice krátký PF a OS, zatímco jiné mutace *PDGFRA* vykazují trvalou odpověď na léčbu imatinibem. Sekundární rezistence je způsobena různými mechanismy, zejména získanými mutacemi v *KIT* a *PDGFRA* genu v průběhu léčby, které jsou odlišné od původní onkogenní mutace (2).

Závěr

Molekulárně genetické vyšetření nádorů GIST má význam nejen diferenciálně diagnostický, ale i prediktivní. Genotypování nádorů je důležité pro optimální management pacientů s GIST léčených pomocí inhibitorů tyrozinkináz

(typ, dávka TKI). Pro další molekulární subtypy GIST (např. SDH-deficientní a *PDGFRA* D842V GIST), které neodpovídají na konvenční léčbu TKI inhibitory, by optimální léčebná strategie zahrnovala látky/inhibitory cílené na další molekuly postižené signální dráhy.

Literatura

1. The ESMO/European Sarcoma Network Working Group, Gastrointestinal stromal tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow up., *Annals of Oncology* 23 (Supplement 7):vi49-vi55,2012doi: 10.1093/annonc/mds252.
2. Christopher L Corless, Gastrointestinal stromal tumors: what do we know now?, *Modern Pathology* (2014)27, S1-S16
3. Le Cesne Axel, Domont Julien, Blésius Aurore, Cioffi Angela, Mutational Analysis in gastrointestinal Stromal Tumors, *EJCMO* 2011;3: (1),February 2011.
4. GENETICS HOME REFERENCE <http://ghr.nlm.nih.gov>.
5. Lian Zong and Ping Chen, Prognostic value of KIT/PDGFRA mutations in gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis, *Journal of Surgical Oncology* 2014; 12: 71.
6. Heikki Joensuu, MD; Mikael Erikson, MD; Kirsten Sundby Hall, MD; Jörg Hartmann, MD; Daniel Pink, MD; Jochen Schütte, MD; Giuliano Ramadori, MD; Peter Hohenberger, MD; Justus Duyster, MD; Salah Eddin Al-Batran, MD; Marcus Schlemmer, MD; Sebastian Bauer, MD; Eva Wardelmann, MD; Maarit Sarlomo-Rikala, MD; Bengt Nilsson, MD; Harri Sihto, PhD; Karla V.Ballman, PhD; Mika Leinonen, MSc; Ronald P. DeMatteo, MD; and Peter Reichardt, MD, Risk Factors for Gastrointestinal Stromal Tumor Recurrence in Patients treated With Adjuvant Imatinib, *Cancer*, Month 00,2014.
7. Sospitros A. Boikos, MD. Current Concepts, New Perspectives on the Genetic Basis of GISTs Lacking KIT and PDGFRA Mutations. *The GIST Cancer Journal*, Volume 1, Number 2 Spring 2014, www.thegistcancerjournal.org.
8. Leona A Doyle & Jason L Hornick: gastrointestinal stromal tumors: from KIT to succinate dehydrogenase, *Histopathology* 2014, 64, 53–67.Doi: 10.1111/his.12302.
9. Gao X, Shen K, Wang C, Ling J, Wang H, Fang Y, Shi Y, Hou Y, Qin J, Sun Y, Qin X.: MiR -320a downregulation is associated with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors., *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2014; 46(1): 72–75. doi: 10.1093/abbs/gmt118. Epub 2013 Nov 10.
10. Susie Bae and Jayesh Desai: Personalised Management: Inoperable Gastrointestinal Stromal Tumors, *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2014; 12: 130–134.
11. Ju-Han Lee, Younghye Kim, Jung-Woo Choi, Young-Sik Kim. Correlation of Imatinib Resistance with the Mutational Status of KIT and PDGFRA Genes in Gastrointestinal Stromal Tumors: a Meta-analysis.
12. Jurečková A, Kocáková I, Vyzula R. Klinický registr GIST, *Klin Onkol* 2012; 25(2): 135–138.
13. Kim WK, Yang HK, Kim H. MicroRNA involvement in gastrointestinal stromal tumor tumorigenesis., *Curr Pharm Des* 2013; 19(7): 1227–1235.

Článek přijat redakcí: 29. 8. 2014
Článek přijat k publikaci: 29. 10. 2014

RNDr. Magdalena Uvírová

CGB laboratoř a.s.

Kořenského 10, 703 00 Ostrava

uvirova@pathology.cz

Crohnova nemoc – genetické faktory z pohledu etiopatogeneze

Tomáš Kupka¹, Jarmila Šimová^{2,3}, Lubomír Martínek^{3,4}, Pavel Svoboda¹, Pavel Klvaňa¹, Martina Bojková¹, Magdalena Uvírová^{2,3}, Lenka Dovrtělová⁵, Petr Dítě¹

¹ Akademické centrum gastroenterologie Interní kliniky LF OU a FN Ostrava, přednosta doc. MUDr. Arnošt Martínek, CSc.

² Vzdělávací a výzkumný institut AGEL, o.p.s. – pobočka Ostrava-Vítkovice, CGB laboratoř, a.s., Laboratoř molekulární genetiky a patologie, vedoucí Mgr. Jarmila Šimová

³ LF OU Ostrava, děkan doc. MUDr. Jaroslav Horáček, CSc.

⁴ Chirurgická klinika LF OU a FN Ostrava, přednosta doc. MUDr. Pavel Zonča, Ph.D., FRCS

⁵ Katedra podpory zdraví FSS MU Brno, vedoucí katedry Mgr. Lenka Dovrtělová, Ph.D.

Souhrn

Crohnova nemoc se často projevuje čistě jako zánětlivé onemocnění, ale u mnoha pacientů se vyvine v komplikované onemocnění charakterizované tvorbou striktur nebo píštělí. Přesná etiopatogeneze tohoto závažného onemocnění není zcela jednoznačně objasněna, a to i přes veškeré úsilí výzkumu a přes poznání řady dílčích patogenetických mechanismů. Mnoho studií naznačuje, že se zvýšeným rizikem rozvoje komplikované formy onemocnění souvisí zejména varianty v *NOD2/CARD15* genu. Samotná přítomnost variant v *NOD2* genu je pouze jen jedním z faktorů přispívajících k rozvoji tohoto onemocnění. U geneticky predisponovaných jedinců v kombinaci s působením faktorů prostředí dochází k porušení vrozené (např. porušená střevní bariéra, dysfunkce Panethových buněk) i adaptivní (např. nerovnováha efektorových a regulačních T lymfocytů a cytokinů, migrace a retence leukocytů) imunitní odpovědi vůči snížené pestrosti střevních komenzálů. Data dosud provedených metaanalýz neposkytují jednoznačné důkazy k podpoře top-down strategie terapie závislé pouze na jediné variantě v *NOD2* genu, ale na druhé straně v případě vysoce rizikových pacientů se dvěma variantami v *NOD2* genu data ukazují, že cílená a časná intenzivní terapie by mohla být prospěšná. Na tyto otázky by mohly odpovědět další prospektivní studie.

Klíčová slova: biologická léčba – Crohnova nemoc – fenotypizace – genetika – imunobiologie

Crohn's disease – etiopathogenetic factors

Summary

Crohn's disease is often purely inflammatory, but most patients develop complicated disease with strictures or fistulae. Specific etiopathogenesis of this severe disease is not definitely clear despite research efforts and learning of many pathogenetic mechanisms. Many studies have suggested that *NOD2* mutations are associated with increased risk of complicated disease. Presence of *NOD2* mutation itself is just one of factors contributing to development of this disease. Genetically predisposed individuals in combination with influence of environmental factors result in a disturbed innate (i.e., disturbed intestinal barrier, Paneth cell dysfunction) and adaptive (i.e., imbalance of effector and regulatory T cells and cytokines, migration and retention of leukocytes) immune response towards a diminished diversity of commensal microbiota. Data of meta-analysis made so far provide ambiguous evidence to support top-down therapy based solely on single *NOD2* mutations, but suggest that targeted early-intensive therapy for high-risk patients with two *NOD2* mutations might be beneficial, but more prospective trials could answer these questions.

Key words: biologic treatment léčba – Crohn's disease – fenotypization – genetic – immunobiology

Úvod

Crohnova nemoc a ulcerózní kolitida jsou dva hlavní zástupci nespecifických střevních zánětů. Crohnova nemoc je relabující zánětlivé onemocnění postihující zejména gastrointestinální trakt a projevující se bolestmi břicha,

horečkou a klinickými známkami střevní obstrukce nebo průjmy s příměsí krve, hlenu, nebo obojího.

Patogeneze tohoto onemocnění je multifaktoriální a na rozvoji tohoto onemocnění se podílejí jak genetické faktory, tak i faktory environmentální. Složitě

interakce mezi imunitním systémem a střevní lumenální flórou spouští chronické zánětlivé odpovědi, jejichž výsledkem je vývoj střevní fibrózy. V úvodu se u většiny pacientů vyvinou čistě zánětlivé projevy choroby, ale u mnoha pacientů se časem vyvine střevní fibróza, což může vést k rozvoji těžkých komplikací, jako jsou stenózy střevního lumen, anebo střevní píštěle. Počet pacientů, u kterých se vyvine stenozující nebo fistulující komplikace, se různí. Míra progresse onemocnění se zdá být nepředpověditelná, ačkoliv bylo uskutečněno mnoho pokusů k definování „agresivního fenotypu“ [1,2]. Cílem předpovědi fenotypu choroby je identifikovat pacienty s vysokým rizikem rozvoje závažného onemocnění, kteří by mohli profitovat z časné agresivní terapie. Existují dvě nutné podmínky, které musejí být splněny, aby byla prediktivní strategie úspěšná. První podmínkou je, že prediktivní test musí být senzitivní a specifický pro komplikované onemocnění. Druhou podmínkou je, že skupina pacientů, predikována jako nemocní s komplikovaným onemocněním, musí mít prokazatelnou pozitivní odpověď na velmi nákladnou změnu terapie.

Incidence Crohnovy choroby (CD) se uvádí 4–9 případů na 100 000 obyvatel a prevalence 27–48 případů na 100 000 obyvatel, výskyt je stejně častý u obou pohlaví. Celkový počet onemocnění za období posledních dvaceti let se viditelně zvýšil.

Genetika

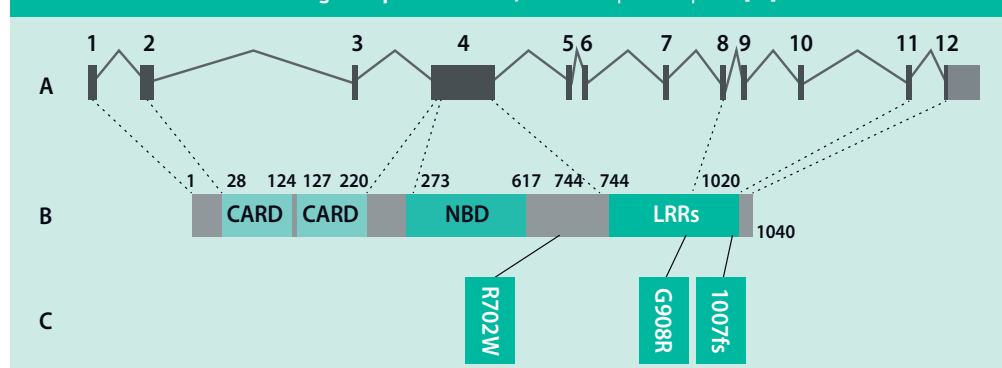
Hromadný familiární výskyt je znám více než 70 let a už velké studie dvojčat v severní Evropě naznačovaly přítomnost spoluúčasti genetické složky. Studie potvrdily, že příbuzní prvního stupně pacientů s CD mají přibližně 10–20% celoživotní riziko rozvoje CD ve srovnání s obecnou populací [3,4]. Na základě celogenomových studií a meta-analýz bylo identifikováno nejméně 70 chromozomálních lokusů, které vykazují spojitost s rozvojem Crohnovy choroby [5].

S Crohnovou chorobou byla asociována celá řada genů. Již v roce 2001 byla nezávisle dvěma skupinami poprvé publikována asociace polymorfizmů/variant v *NOD2* (nucleotide-binding oligomerization domain 2) genu označovaného také jako *CARD15* (caspase recruitment domain 15) se zvýšenou pravděpodobností rozvoje Crohnovy choroby [6,7]. Jako další varianty, velmi významně asociované s rizikem CD, jsou zmiňovány zejména varianty v genech *ATG16L1*, *IBD5*, *IRGM*, *DLG5*, *IL23* a *TLR4* [8–12].

NOD2 gen je umístěn na chromozomu 16 (16q12) a kóduje protein patřící do rodiny Nod2-like receptorů. Tento cytoplazmatický protein, intracelulární receptor, který je exprimován v zejména v monocytech, makrofázích, dendritických buňkách, Panethových buňkách a intestinálních epitelálních buňkách, hraje důležitou roli v imunitní odpovědi na bakteriální infekci [13,14]. Rozpoznává komponenty buněčných stěn bakterií (mikrobiální membrány), jakými jsou například bakteriální lipopolysacharidy a peptidoglykany. Jako ligand *NOD2* byl identifikován muramyl dipeptid (MDP) odvozený od bakteriálních peptidoglykanů. Po vazbě ligandu *NOD2* indukuje aktivaci specifické signální dráhy aktivující NF- κ B, což následně vede k produkci prozánětlivých mediátorů a anti-mikrobiálních molekul [15–17].

Jako jednonukleotidové polymorfismy (sekvenční varianty) v *NOD2* genu asociované s CD jsou označovány dvě jednonukleotidové substituce p.R702W (rs139104022), p.G908R (rs2066845), které vedou ke změně aminokyselinové sekvence v *NOD2* proteinu a jednobázová inserce cytozinu v sekvenci *NOD2* genu p.L1007fs (rs2066847) (označována i c.3019_3020insC, p.Leu1007fsX1008) vedoucí ke vzniku stop kodonu a vzniku zkráceného proteinu [18,19]. Uvádí se, že tyto tři varianty představují přibližně 81 % mutací v *NOD2* genu u pacientů s CD [20]. Uvádí se, že relativní riziko rozvoje CD je ve srovnání se zdravou populací 2–4krát vyšší u nosičů jedné ze

Schéma. Schematické znázornění genu a proteinu NOD2/CARD15. Upraveno podle [22]



A – struktura genu *NOD2/CARD15* (exony, introny) B – předpokládaná struktura proteinu *CARD15* (CARD – caspase recruitment domain NBD – nukleotid binding domain LLR – leucin-rich repeats) C – lokalizace sekvenčních variant (R702W, G908R a 1007fs) asociovaných s rozvojem Crohnovy v *NOD2/CARD15* proteinu

sekvenčních variant v *NOD2* genu (heterozygoti) a přibližně až 17krát vyšší u nosičů dvou variant (homozygoti, složení heterozygoti) [21]. Přesný mechanismus, jak jsou výše uvedené sekvenční varianty v *NOD2* genu spojeny s rozvojem CD zůstává stále nejasný. Výsledkem těchto variant je nejspíše snížená schopnost aktivovat NF- κ B po stimulaci MDP [16].

Byly vytvořeny tři hlavní teorie vysvětlující patogenезi Crohnovy nemoci prostřednictvím mutovaného *NOD2* proteinu. První ukazuje na pozorování zvýšené produkce IL12 na základě stimulace splenických makrofágů myši s *NOD2* mutací bakteriálními peptidoglykany, na rozdíl od makrofágů s divokým typem *NOD2*. Toto dává vzniknout hypotéze, že *NOD2* normálně funguje jako negativní regulátor produkce IL12, což je mutací *NOD2* genu porušeno. Druhá hypotéza vznikla na základě studie s myši s *NOD2* mutací, jejichž makrofágy z kostní dřeně projevovaly zvýšenou produkci IL1 β na základě stimulace MDP, což vedlo k závěru, že mutace *NOD2* spojené s Crohnovou nemocí se mohou projevovat jako alely se získanou funkcí. Třetí teorie vznikla zjištěním, že mutace *NOD2* způsobují nižší expresi α -defenzinu ve sliznici ilea u pacientů s Crohnovou nemocí společně se zvýšenou mírou výskytu extraintestinální infekce *Listeria monocytogenes* u myši s *NOD2* mutací. To vedlo k závěru, že *NOD2* má podíl na hostitelské slizniční obraně. Na základě těchto studií by mutace *NOD2* mohly vést k přetrvávajícímu slizničnímu zánětu [23].

Studie z roku 2002 jasně ukázaly blízkou funkční korelaci mezi *NOD2* a regulací autofagie [24]. Přítomnost variant *NOD2* asociovaných s Crohnovou nemocí má za následek nepřiměřenou odpověď střevního epitelu k bakteriálním antigenům, což vede k nekontrolovanému prozánětlivému působení [25]. Zdá se, že muramyl dipeptid prostřednictvím *NOD2* reprezentuje silný aktivátor autofagie [26,27]. U dendritických buněk je autofagie zprostředkována *NOD2* zásadní pro nakládání s invadujícími bakteriemi stejně jako pro prezentaci antigenu a indukci odpovědi CD4⁺ T-lymfocytů s antigenem. Dendritické buňky u pacientů s mutantním *NOD2* proteinem selhávají ve shlukování autofagozomů a prezentaci antigenů. Jako možný mechanismus ukázali Travassos et al [26], že *NOD2* je nezbytný k iniciaci autofagie na buněčné membráně v místě vstupu bakterií. Buňky s variantami v *NOD2* genu spojenými s Crohnovou nemocí nejsou schopné se přesně nasměrovat na místo imunitní odpovědi v plazmatické membráně. Přítomnost těchto buněk také způsobuje vyšší sekreci prozánětlivých cytokinů IL1 β a IL6 z mononukleárních periferní krve. Tato pozorování silně naznačují, že *NOD2* stejně jako autofagie hrají klíčovou roli ve vrozené imunitní odpovědi a představují funkční mechanismus, jak porušená funkce autofagie může přispět k rozvoji chronického střevního zánětu.

Ačkoliv byla patogenезa Crohnovy nemoci na základě mutace v *NOD2* rozsáhle studována, neexistuje žádná shoda, že by se na patogenезi onemocnění

podílel jediný dominantní mechanismus, ale že k rozvoji nemoci dochází velmi pravděpodobně vlivem několika různých působení.

Podle literárních údajů přibližně 30–50 % pacientů s CD ze západní Evropy a severní Ameriky nese nejméně jednu z uvedených variant v *NOD2* genu (uvádí se, že 10–30 % pacientů s CD jsou heterozygoti – nositelé jedné ze tří sekvenčních variant v *NOD2* genu a 3–15 % CD pacientů jsou homozygoti nebo složení heterozygoti – nositelé dvou variant) [28–30]. Rizikové alely se vyskytují i u zdravé populace, avšak v daleko nižší frekvenci (0,5–20 %) [31]. Studie zahrnující přes 3 500 zdravých osob (z 15 různých skupin ze tří kontinentů) uvádí frekvenci výskytu s CD asociovaných variant v *NOD2* genu následovně p.R702W u zdravé kavkazské populace přibližně 4,3 %, v případě p.G908R je to 1,2 % a p.L1007fs přibližně okolo 2,3 % [32].

Byly publikovány práce zabývající se vztahem mezi mutacemi v *NOD2* genu a závažností projevů CD – např. rozvojem onemocnění v mladším věku, ileálními komplikacemi, ileocekální resekcí, strikturou, vznikem píštělí s možností penetrace, vyšším rizikem postoperativních relapsů a reoperací [28,29,33–38].

Většina studií se zaměřila na riziko vývoje nemoci a příliš nespecifikují tíži onemocnění. Relativně málo studií přímo řešilo otázku tíže onemocnění. Studie, které publikovaly fenotyp onemocnění, ukázaly různorodé stupně rizika, které lze přičíst variantám v *NOD2* genu [39]. Některé se zaměřovaly na rozdíly mezi specifickými mutacemi *NOD2* genu, jiné se soustředily na počet mutantních alel [40,41]. U určitých variant *NOD2* se předpokládalo, že vedou k závažnějším obtížím, a proto predikují agresivnější chování nemoci [38,42]. Dosavadní data si však, co se týče prognostické hodnoty genotypu *NOD2*, odporovala.

U nás Hošek et al [43] vyšetřili skupinu osob s M. Crohn a ulcerózní kolitidou, žijících v České republice a na Slovensku. Prokázali statisticky významný rozdíl v pozitivitě mutace p.L1007fs pro *NOD2* mezi M. Crohn a zdravou populací a podobně statisticky významný rozdíl i pro variantu p.K469E pro *ICAM-1* gen.

Metaanalýza autorů Adlera et al [44] zjistila, že přítomnost jedné varianty v *NOD2* genu má nízkou prediktivní schopnost pro určení fenotypového projevu onemocnění, avšak současný výskyt dvou variant v genu *NOD2* má vysoký stupeň specifity pro agresivní fenotyp onemocnění, ačkoliv senzitivita zůstává nízká. Tyto výsledky ukazují, že přítomnost vícečetných mutací určuje jen částečně vysoce rizikovou skupinu. Naproti tomu přítomnost jedné mutace v *NOD2* není důvěryhodný prediktor fenotypu onemocnění. Ani metaanalýza Solon et al [45] nepotvrdila zvýšené riziko rekurence chirurgických zákroků u pacientů s CD s variantami v *NOD2* genu. Nicméně poslední práce Cleyenen et al [46] publikována na základě výsledků IBD-chip European project, studující varianty asociované s CD a klinickými charakteristikami, uvádí, že přítomnost variant v *NOD2* genu je spojena s agresivnějším

klinickým projevem a je nezávislým prediktivním faktorem pro ileální lokalizaci, stenozující a penetrující formu onemocnění.

Závěr

Je zřejmé, že genetika hraje jednu z důležitých rolí z pohledu rozvoje Crohnovy nemoci a studium genetických variant asociovaných s rozvojem CD přispívá k pochopení patofyziologie tohoto onemocnění. Na vyjádření fenotypu onemocnění se podílí nejen genetika kombinací a interakcí vícečetných rizikových alel, ale i řada faktorů environmentálních. K celkovému určení fenotypu tohoto onemocnění je tedy potřeba multifaktoriální přístup, který zahrnuje faktory prostředí, genetické faktory, vystavení různé medikaci, kouření, první projevy onemocnění atd. Pro pacienty by v praxi bylo užitečné, kdyby bylo jasné definováno, že určení genotypu dokáže odhadnout riziko tíže onemocnění. Kdyby byla metoda předpovědi tíže onemocnění přesná, mělo by to výrazný benefit pro pacienta a péči o něj. Přesný a dostatečně silný prediktor komplikovaného onemocnění následovaný cílenou terapeutickou intervencí by pravděpodobně změnil celkový pohled na Crohnovu nemoc a ospravedlnil by časně použití nákladné biologické léčby u vysoce ohrožených pacientů.

Literatura

- Louis E, Collard A, Oger A F et al. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut* 2001; 49(6): 777–782.
- Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I et al. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 130(3): 650–656.
- Lakatos L, Mester G, Erdelyi Z et al. Striking elevation in incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in a province of western Hungary between 1977–2001. *World J Gastroenterol* 2004; 10(3): 404–409.
- Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I et al. Predictors of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2006; 130(3): 650–656.
- Franke A, McGovern DP, Barrett JC et al. Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* 2010; 42(12): 1118–1125.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837): 599–603.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837): 603–606.
- Silverberg MS, Duerr RH, Brant SR et al. NIDDK IBD Genetics Consortium. Refined genomic localization and ethnic differences observed for the IBD5 association with Crohn's disease. *Eur J Hum Genet* 2007; 15(3): 328–335.
- Stoll M, Corneliusen B, Costello CM et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36(5): 476–480.
- Duerr RH, Taylor KD, Brant SR et al. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006; 314(5804): 1461–1463.
- Prescott NJ, Dominy KM, Kubo M et al. Independent and population-specific association of risk variants at the IRGM locus with Crohn's disease. *Hum Mol Genet* 2010; 19(9): 1828–1839.
- Weersma RK, Stokkers PC, van Bodegraven AA et al. Dutch Initiative on Crohn and Colitis (ICC). Molecular prediction of disease risk and severity in a large Dutch Crohn's disease cohort. *Gut* 2009; 58(3): 388–395.
- Ogura Y, Inohara N, Benito A et al. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 2001; 276(7): 4812–4818.
- Lala S, Ogura Y, Osborne C et al. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003; 125(1): 47–57.
- Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14(3): 390–400.
- Inohara N, Y. Ogura, A. Fontalba et al. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2: implications for Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003; 278(8): 5509–5512.
- Kobayashi K, S., M. Chamaillard, Y. Ogura, O et al. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005; 307(5710): 731–734.
- Derakhshan F, Naderi N, Farnood A et al. Frequency of three common mutations of CARD15/NOD2 gene in Iranian IBD patients. *Indian J Gastroenterol* 2008; 27(1): 8–11.
- Hugot JP, Zaccaria I, Cavanaugh J et al. for the IBD International Genetics Consortium. Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am J Gastroenterol* 2007 Jun; 102(6): 1259–1267.
- Lesage S, Zouali H, Cezard JP. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002; 70(4): 845–857.
- Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, et al. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(12): 2393–2404.
- Mathew CG, Lewis CM. Genetics of inflammatory bowel disease: progress and prospects. *Hum Mol Genet* 2004; 13(Spec No 1): R161–R168.
- Zelinková Z. Individualizácia liečby nešpecifických zápalových ochorení čreva. Habilitačná práca v oboru „Vnútorné lekárstvo“. Lekárska fakulta Univerzity Komenského: Bratislava 2012.
- Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 122(4): 854–866.
- Biswas A, Liu YJ, Hao L et al. Induction and rescue of NOD2-dependent Th1-driven granulomatous inflammation of the ileum. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(33): 14739–14744.
- Travassos LH, Carneiro LA, Ramjeet M et al. NOD1 and NOD2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010; 11(1): 55–62.
- Homer CR, Richmond AL, Rebert NA et al. ATG16L1 and NOD2 interact in an autophagy-dependent antibacterial pathway implicated in Crohn's disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2010; 139(5): 1630–1641.
- Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Miquel S et al. Crohn's disease patients carrying NOD2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg* 2005; 242(5): 693–700.
- Henckaerts L, Vermeire S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. *Infl amm Bowel Dis* 2007; 13(2): 235–241.
- Brant SR, Wang MH, Rawsthorne P et al. A population-based case-control study of CARD15 and other risk factors in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2007; 102(2): 313–323.
- Hugot JP, I. Zaccari, J. Cavanaugh J et al. (IBD International Genetics Consortium). Prevalence of CARD15/NOD2 mutations in Caucasian healthy people. *Am. J. Gastroenterol* 2007; 102(6): 1259–1267.
- Pascoe L, Zouali H, Sahbatou M et al. Estimating the odds ratios of Crohn disease for the main CARD15/NOD2 mutations using a conditional maximum likelihood method in pedigrees collected via affected family members. *Eur J Hum Genet* 2007; 15(8): 864–871.
- Bianchi V, Maconi G, Ardizzone S et al. Association of NOD2/CARD15 mutations on Crohn's disease phenotype in an Italian population. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19(3): 217–23.
- Van der Linde K, Boor PP, Houwing-Duistermaat JJ et al. CARD15 mutations in Dutch familial and sporadic inflammatory bowel

- disease and an overview of European studies. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19(6): 449–459.
35. Heliö T, Halme L, Lappalainen M et al. CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut* 2003; 52(4): 558–562.
36. Seiderer J, Brand S, Herrmann KA et al. Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(12): 1114–1121.
37. Laghi L, Costa S, Saibeni S et al. Carriage of CARD15 variants and smoking as risk factors for resective surgery in patients with Crohn's ileal disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22(6): 557–564.
38. Annese V, Lombardi G, Perri F et al. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease – an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol* 2005; 100(1): 84–92.
39. Louis E, Michel V, Hugot J P et al. Early development of stricturing or penetrating pattern in Crohn's disease is influenced by disease location, numbers of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. *Gut* 2003; 52(4): 552–557.
40. Abreu M T, Taylor K D, Lin Y C et al. Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosis disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002; 123(3): 679–688.
41. Economou M, Trikalinos T A, Loizou K T et al. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(12): 2393–2404.
42. Jurgens M, Brand S, Laubender R P et al. The presence of fistulas and NOD2 homozygosity strongly predict intestinal stenosis in Crohn's disease independent of the IL23R genotype. *J Gastroenterol* 2010; 45(7): 721–731.
43. Hošek J, Bartošová L, Gregor P et al. Frequency of representative single nucleotide polymorphism associated with inflammatory bowel disease in the Czech Republic and Slovak Republic. *Folia Biol (Praha)* 2008; 54(3): 88–96.
44. Adler J, Rangwala S C, Dwamena B A et al. The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's Disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011; 106(4): 699–712.
45. Solon JG, Burke JP, Walsh SR et al. The effect of NOD2 polymorphism on postsurgical recurrence in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of available literature. *Inflamm Bowel Dis* 2013 Apr; 19(5): 1099–1105.
46. Cleynen I, González JR, Figueroa C et al. Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. *Gut* 2013 Nov; 62(11): 1556–1565.

MUDr. Tomáš Kupka

✉ tomas.kupka@fno.cz

Interní klinika LF OU a FN, Ostrava-Poruba

<http://www.fno.cz/interni-klinika>

Doručeno do redakce 9. 5. 2014

Gastrointestinální stromální tumory, morfologická a imunohistochemická vyšetření z pohledu bioptického a cytologického odběru

Dušan Žiak^{1,2}, Jana Dvořáčková^{1,2,3}, Pavel Hurník^{1,2,3}, Vladimír Židlík², Jarmila Šustíková², Jarmila Šimová², Magdalena Uvírová², Radoslava Tomanová¹, Martin Kliment⁵, Ondřej Urban⁵, Vincent Zoundjekpon⁵, Oldřich Motyka⁴, Petr Dítě⁶

¹Ústav patologie Fakultní nemocnice Ostrava

²CGB laboratoř a.s., Vzdělávací a výzkumný institut AGEL, o.p.s. – pobočka Ostrava-Vítkovice

³Lékařská fakulta Ostravské univerzity, Ostrava

⁴Oddělení anorganické analýzy, Centrum nanotechnologií, Vysoká škola báňská – Technická univerzita, Ostrava

⁵Centrum péče o zažívací trakt Vítkovická nemocnice, Vzdělávací a výzkumný institut AGEL, o.p.s. – pobočka Ostrava-Vítkovice

⁶Interní klinika Fakultní nemocnice Ostrava

Gastrointestinální stromální tumory (GIST) jako nejčastější mezenchymální tumory trávicího traktu vycházejí z Cajalových intersticiálních buněk. Ke confirmaci morfologické diagnózy jsme použili panel imunohistochemických protilátek CD117, desmin, S100 a DOG1. Při hodnocení biologických vlastností jsme vycházeli z Miettinenovy klasifikace pro GIST, rozdělující tumory do tří skupin podle rizika agresivního chování. Klasifikace tumoru sleduje tři parametry: lokalizaci, velikost a mitotický index. Mitotický index je definován jako počet mitóz v nádorové tkáni na celkové ploše 5 mm². Provedli jsme srovnání metod odběru tenkojehlové, navigované aspirační cytologie – EUS FNA a klešťové endoskopické biopsie či resekátu nádorové tkáně z pohledu patologa se zaměřením na stanovení všech potřebných morfologických a prognostických parametrů této neoplázie. Naše závěry a zkušenosti ukazují, že výsledky cytologického vyšetření jsou pro diagnostiku GIST srovnatelné s bioptickým vyšetřením. Hlavní limitací cytologické metody je nemožnost v 75 % případů stanovit mitotický index z důvodů málo množství nádorové tkáně. Tento nedostatek lze nahradit vyšetřením nukleárního proteinu asociovaného s buněčnou proliferací Ki-67, který se dle literárních zdrojů ukazuje jako významný prognostický parametr progresu onemocnění.

Klíčová slova: gastrointestinální stromální tumor, tenkojehlová aspirační cytologie – EUS FNA, klešťová biopsie, mitotický index, Ki-67, prognóza.

Gastrointestinal stromal tumors, morphological and immunohistochemical study. Forceps versus endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) belong to the most common mesenchymal tumors of digestive tract deriving from Cajal interstitial cells. A panel of immunohistochemical antibodies CD117, desmin, S100 and DOG1 is used to confirm the morphological diagnosis. When evaluating the biological characteristics we used a Miettinen classification for GIST which divides tumors into three groups according to a risk of aggressive behaviour. This classification observes three parameters – tumor localisation, its size and mitotic index. Mitotic index is defined as a number of mitoses in the tumor tissue on the overall area of 5 mm². We performed a comparison of sampling methods – biopsy forceps, resection versus endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology (EUS FNA) from the point of view of a pathologist, focusing on the assessment of all necessary morphological and prognostic parameters of neoplasia. The study conclusions and experience show that when diagnosing GISTs, results of cytological examination of a sample using EUS FNA are comparable to those using forceps endoscopic biopsy. The main limitation of EUS FNA method is that in 75 % of cases it is impossible to state the mitotic index due to insufficient amount of tumor tissue. This tissue deficit may be replaced with an examination of a nuclear protein associated with cell proliferation Ki 67 which appears to be an independent prognostic parameter of disease progression.

Key words: gastrointestinal stromal tumor, fine needle aspiration cytology – EUS FNA, biopsy forceps, mitotic index, Ki-67, prognostic.

Onkologie 2014; 8(6): 259–263

Úvod

Gastrointestinální stromální tumory (GIST) jsou nejčastější mezenchymální tumory trávicího traktu, vycházejí z Cajalových (nebo Cajal-like) intersticiálních buněk, respektive jejich prekurzorů mezodermálního původu,

normálně přítomných ve stěně těchto orgánů (1,2). V četných studiích bývá udáván největší výskyt těchto nádorů v žaludku (60–70%), dále v tenkém střevě (20–25 %), tlustém střevě (5 %) a jícnu (< 5 %) (3, 4). Vyjimečně se stromální tumory nacházejí mimo trávicí trubici, někteří

autoři je nazývají EGIST, tedy extragastrointestinální stromální tumory. Roční incidence GIST se odhaduje na 10 až 20 případů na 106 obyvatel. Průměrný věk při stanovení diagnózy je 60 let. Vzácně se vyskytují tyto nádory u mladých dospělých, u dětí jsou naprosto ojedinělé (2, 5,

Tabulka 1. Panel protilátek použitých v této studii

Antigen	Klon	Ředění	Výrobce/Dodavatel
Desmin	Monoklonální D33	1:50	DakoCytomation
Vimentin	Polyklonální 3B4	1:100	DakoCytomation
CD34	Monoklonální QBEnd 10	1:25	DakoCytomation
CD117 (c-kit)	Polyklonální A4502	1:500	DakoCytomation
S-100 protein	Polyklonální	1:100	DakoCytomation
SMA	Monoklonální 1A4	1:200	DakoCytomation
DOG 1	Monoklonální	1:00	Roche, Ventana
Ki-67	Monoklonální Ki-S5	1:50	DakoCytomation

6). Makroskopický vzhled GIST se velmi liší jak ve velikosti, tak v morfologii. Velikost GIST může být od několika milimetrů až po více než 30 cm (7, 8). Morfologicky se GIST rozděluje na dvě hlavní skupiny: vřetenobuněčné a epitelioidní. Navíc četné tumory mají smíšený fenotyp. Miettinen et al. v roce 2005 navrhl bližší subklasifikaci. Vřetenobuněčné se dále dělí na sklerózující, palisádované vakuolizované, hypercelulární a sarkomatózní. Epitelioidní jsou diferencovány na sklerózující syncytiální, dyskohezivní, hypercelulární a sarkomatózní (9). Podle rizika biologického chování se GIST dělí do tří skupin, přičemž tato klasifikace sleduje tyto parametry: lokalizaci tumoru, jeho velikost a mitotický index (MI), který je definován jako počet mitóz v nádorové tkáni na celkové ploše 5 mm² (10, 11).

Přestože konvenční světelná mikroskopie ve většině případů umožňuje s vysokou mírou jistoty GIST určit, pro jednoznačnou diagnózu je vždy nutné provést další imunohistochemická vyšetření. K této konfirmaci by rutinně měla sloužit sada tří protilátek (CD117, desmin, S100), přičemž pozitivní exprese CD117 a negativní exprese desminu a S100 proteinu potvrzují diagnózu GIST. Jiný než tento typický výsledek by měl vést k odeslání případu na specializované pracoviště se zkušenostmi v diagnostice GIST, vybavené dalšími imunohistochemickými markery, zejména DOG1 (ANO-1), SDHB a SDHA a provádějící molekulárně genetické vyšetření genu KIT a PDGFRA (12, 13).

Nová klasifikace GIST

GIST jsou v současné době vnímány jako skupina molekulárně geneticky heterogenních nádorů, které spojuje obdobná morfologie a imunorexprese proteinu KIT. GIST lze dále dělit podle imunorexprese beta podjednotky sukcinátdehydrogenázy (SDHB) na SDHB-pozitivní (zahrnující GIST s mutací KIT, PDGFRA, NF1) a SDHB-deficientní (zahrnující syndrom Carneyho a Stratakisov, Carneyho trias a některé sporadické dětské i adultní GIST). Jednotlivé

molekulární podtypy se od sebe liší jak biologickým chováním, tak také odezvou na terapii inhibitory tyrozinkináz, která je indikována v případě metastatického rozsevu nebo v případě nádoru s vysokým rizikem agresivního chování. I přes existenci několika prognostických systémů však dosud není algoritmus indikace pacienta k systémové terapii jednoznačně stanoven (10).

Algoritmus vyšetření

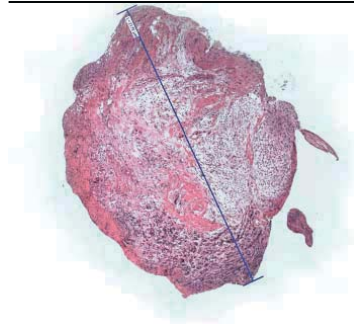
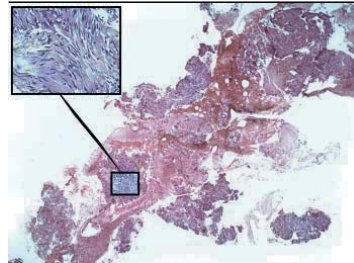
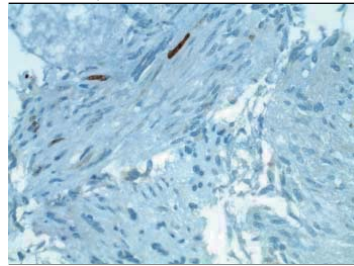
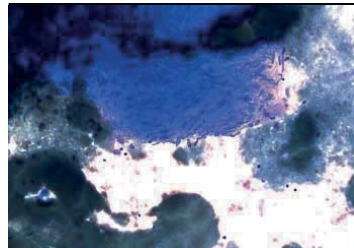
Odborná Společnost českých patologů vydala „Doporučený postup pro vyšetření GIST“, v němž nabízí diagnostický algoritmus, jehož cílem bylo maximálně zefektivnit diagnostiku mezenchymálních nádorů trávicího traktu. Cytologický odběr a vyšetření v něm byly uvedeny jako možné a často kliniky používané, nicméně bylo zdůrazněno, že stále chybí rozsáhlejší studie se statistickým zhodnocením spolehlivosti cytologického vyšetření (11).

V předložené studii jsme provedli srovnání metod odběru nádorové tkáně z pohledu patologa se zaměřením na stanovení všech potřebných morfologických, imunofenotypických a molekulárně genetických parametrů neoplázie, které tvoří základní informační vstup pro následnou terapii. Položili jsme si otázku, zda EUS FNA jako cytologická metoda byla diagnosticky rovnocenná nebo v jiném vztahu k biotickému odběru jako je kleštová endoskopická biopsie a resekce tumoru.

Materiál a metody

V průběhu 6 let jsme vyšetřovali gastrointestinální stromální tumory, kde nádorová tkáň byla odebrána kleštovou biopsií, tenkojehlovou aspirační cytologií a z resekátů. Sledovali jsme věk a pohlaví pacientů, topografii tumoru a morfologicky jsme zhodnotili tři typy růstových vzorů: vřetenobuněčný, epitelioidní a smíšený.

Materiál z resekátů a kleštových biopsií byl po fixaci v 10% neutrálním formalínu odvodněn a zalit do parafinových bloků. Následně byly zhotoveny tkáňové řezy a preparát byl obarven

Obrázek 1. Histologický preparát GISTu z kleštové biopsie, barvení hematoxylin eozin, zvětšení 40 x. Délka pravítka 2,2 mm**Obrázek 2.** Histologický preparát z cytobloku, barvení hematoxylin eozin, zvětšení 40 x, odběr EUS FNA, průměrná plocha nádorové tkáně GISTu v jednom preparátu 1,8 mm² tj. 8 zorných polí HPF. V rámečku jedno HPF**Obrázek 3.** Imunohistochemické vyšetření Ki-67, nukleární exprese u 3% buněk, zvětšení 400 x**Obrázek 4.** GIST v cytologickém nátěru z EUS FNA jako trs atypických vřetenitých elementů, barvení MGG, zvětšení 200 x

hematoxylinem a eozinem. Další řezy byly použity k imunohistochemické analýze. Bylo provedeno

Tabulka 2. Souhrn výsledků studie

Pacient	Pohlaví	Věk	Lokalizace	Způsob odběru	Buněčná morfologie	Mitotická aktivita (m/50 HPF)	Ki 67 (%)	DOG 1	CD117	CD34	Desmin	Vimentin	S 100	SMA
1	žena	60	žaludek	biopsie	epiteloidní	< 5	15	none	+	+	-	-	+	-
2	žena	66	jiná	biopsie	epiteloidní	< 5	3	none	+	none	none	none	-	none
3	muž	60	žaludek	biopsie	vřetenobuněčná	< 5	1	none	+	+	-	none	-	-
4	muž	62	jiná	biopsie	epiteloidní	< 5	20	none	+	-	+	-	+	+
5	muž	77	žaludek	resekce	vřetenobuněčná	< 5	20	+	+	none	-	+	-	-
6	muž	78	jícen	biopsie	epiteloidní	X	10	+	+	+	-	none	none	+
7	žena	51	tenké střevo	resekce	smíšená	< 5	10	+	+	-	-	+	+	+
8	žena	64	tenké střevo	biopsie	vřetenobuněčná	< 5	20	none	+	-	-	+	none	+
9	muž	40	jiná	biopsie	smíšená	> 5	50	+	+	+	-	+	-	+
10	muž	72	žaludek	biopsie	smíšená	X	7	none	+	+	none	+	+	+
11	muž	70	jiná	biopsie	smíšená	< 5	1	none	+	+	none	none	+	-
12	žena	47	žaludek	biopsie	smíšená	X	17	none	+	+	-	+	-	+
13	žena	87	žaludek	biopsie	smíšená	< 5	4	none	+	+	+	none	-	+
14	žena	69	žaludek	biopsie	vřetenobuněčná	X	9	+	+	+	none	none	-	+
15	žena	46	tlusté střevo	biopsie	vřetenobuněčná	> 5	3	+	+	+	-	none	+	-
16	muž	54	tenké střevo	biopsie	vřetenobuněčná	X	1	none	+	+	-	none	-	+
17	muž	74	žaludek	biopsie	vřetenobuněčná	X	1	none	+	+	-	none	-	+
18	žena	64	žaludek	biopsie	epiteloidní	X	1	none	+	-	none	none	+	+
19	muž	43	tenké střevo	biopsie	vřetenobuněčná	X	5	+	+	+	none	none	-	none
20	muž	60	žaludek	biopsie	vřetenobuněčná	< 5	10	+	+	+	none	+	none	-
21	žena	86	tenké střevo	biopsie	vřetenobuněčná	< 5	1	+	+	+	none	none	+	-
22	žena	73	žaludek	biopsie	jiná (poznámka)	> 5	4	+	+	+	none	none	+	-
23	žena	72	tenké střevo	resekce	smíšená	X	10	+	+	-	-	none	+	-
24	muž	47	jiná	resekce	epiteloidní	> 5	10	+	+	+	-	+	-	+
25	žena	75	žaludek	resekce	vřetenobuněčná	> 5	10	+	+	+	-	+	-	-
26	žena	58	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	X	1	+	+	+	-	-	-	nelze
27	muž	49	tenké střevo	resekce	vřetenobuněčná	< 5	2	+	+	+	-	+	none	+
28	žena	84	žaludek	resekce	epiteloidní	< 5	15	nelze	+	+	-	none	-	-
29	žena	69	tenké střevo	resekce	smíšená	< 5	2	nelze	+	-	-	+	-	+
30	žena	80	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	< 5	1	+	+	+	none	none	none	-
31	muž	65	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	X	4	none	+	none	-	none	-	+
32	muž	84	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	X	3	+	+	+	none	none	-	+

Tabulka 2. Souhrn výsledků studie

33	žena	62	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	X	4	none	+	+	none	none	none	+
34	žena	76	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	< 5	20	none	+	+	-	none	-	+
35	žena	65	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	X	nelze	nelze	nelze	nelze	nelze	nelze	nelze	nelze
36	muž	67	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	X	nelze	none	+	+	-	none	none	-
37	muž	50	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	X	nelze	none	+	+	-	none	-	-
38	žena	83	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	< 5	3	none	+	+	-	none	none	+
39	žena	66	žaludek	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	X	5	none	+	+	-	none	none	+
40	muž	67	jiná	EUS-FNAB	vřetenobuněčná	X	5	none	+	+	-	none	none	+

Pozn.: > 5 více než 5, < 5 méně než 5, nelze - nelze stanovit, none - nevyšetřeno, + pozitivní, - negativní, EUS-FNAB - endoskopicky ultrasonograficky navigovaná navigační biopsie tenkou jehlou

vyšetření proteinů DOG1, CD117, CD34, desmin, vimentin, S100, hladkosvalového aktinu a proliferační marker Ki-67. Expresi proteinů jsme hodnotili kvalitativně jako pozitivní nebo negativní. Expresi Ki-67 byla hodnocena kvantitativně jako počet pozitivních jader na 100 jader nádorové tkáně vyjádřená v %. Mitotický index představuje počet mitóz na 5 mm² nádorové tkáně v histologickém řezu. Protílátky, klony a ředění v tabulce 1.

Cytologický materiál získaný z EUS FNA jsme zpracovali formou cytologických nátěrů barvených metodikou May – Grünwald – Giemsa (MGQ QUICK STAIN 04 – 090805 – Bio-Optica) a Periodic Acid Schiff (PAS). Část materiálu byla zpracována metodou cytobloků, kde fixovaný centrifugát materiálu z tenké jehly byl zalit do parafinového bloku a dále byl zpracován metodou biopsie včetně možnosti využít imunohistochemickou analýzu. Pro diagnostiku tohoto typu nádorových lézí bylo zpracování materiálu technologií cytobloků nutností.

Materiál ze všech typů odběru byl dále podroben molekulárnímu genetickému vyšetření (KIT, PDGFRA), které není předmětem tohoto sdělení.

Výsledky

V průběhu 6 let byl diagnostikován GIST u 40 pacientů (2008–2014). Průměrný věk pacienta při stanovení diagnózy byl 65 let s krajními hodnotami 40 a 84 let. Soubor tvořilo 22 žen a 18 mužů. Vyšetřovaný materiál byl získán třemi způsoby: z resekátů (n = 8), klešťovou biopsií (n = 20) a navigovanou tenkojehlovou aspirací EUS FNA (n = 12). Lokalizace tumoru byla v jícnu (n = 1), v žaludku (n = 24), tenkém střevě (n = 8), tlustém střevě (n = 1) a v jiných lokalizacích mimo trávicí trubici (n = 6). Vřetenobuněčný typ GIST reprezentovalo 25

případů, epiteloidní a smíšený typ jsme našli u 8 případů. Získaná data jsme přehledně uvedli v tabulce 2. Mitotickou aktivitu nebylo možné stanovit v 18 případech 18/40 (45%) z celkového počtu GIST a to z důvodu malého množství nádorové tkáně. Z toho 9 vzorků 9/12 (75%) bylo odebráno metodou EUS FNA a 9 klešťovou biopsií 9/20 (45%). Stanovení počtu mitóz u resekátů bylo možné ve 100% případů. Základní diagnostickou expresi proteinů (CD117, desmin, S100, CD34) a molekulární vyšetření (KIT, PDGFRA) nebylo možné stanovit z jednoho odběru EUS FNA, což odpovídá 2,5% z celkového počtu vyšetřených případů. U klešťových biopsií a materiálu z resekátů byly stanoveny exprese proteinů a molekulární genetické vyšetření ve 100% případů. Proliferační aktivitu v Ki-67 nebylo možné stanovit u tří odběrů EUS FNA, což činí z celého souboru 7,5%. Výsledky jsme podrobili statistickému vyhodnocení a pro přehlednost jsme se zaměřili na analýzu vzorků Ki-67. Rozdíl mezi zjištěnými hodnotami proliferačního indexu Ki-67 u pacientů s biopsií a odběrem a pacientů s odběrem tenkou jehlou byl hodnocen pomocí Welchova t-testu pro neshodné rozptyly. Ze statistického zpracování vyplynulo, že nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi typy odběrů na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (graf 1). Lze tedy předpokládat, že způsob odběru neměl vliv na stanovení Ki-67.

Diskuze

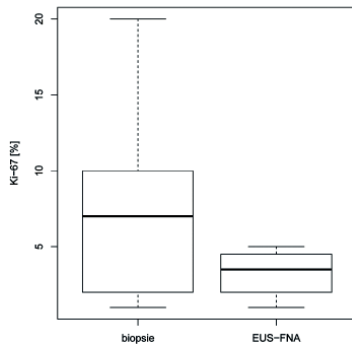
Výsledky analýzy souboru potvrdily náš předpoklad, že typ odběru materiálu neměl vliv na stanovení potřebných morfologických, imunofenotypických a molekulárně genetických parametrů GIST s výjimkou mitotického indexu. Limitací cytologické metody bylo malé množství nádorové tkáně, z níž v 75% případů

nebylo možno stanovit MI. Tato limitace platila v menší míře i pro klešťové odběry, kde nebylo možné stanovit tento parametr ve 45% případů. Při klešťové biopsii se zpravidla odebírá série vzorků s dostatečným množstvím materiálu k určení MI (obrázek 1). Je nutno poznamenat, že v našem souboru některé odebrané vzorky obsahovaly také nereprezentativní, regresivně změněné oblasti tumoru či tumorózní tkáň neobsahovaly vůbec.

Udává se, že ke stanovení MI je zapotřebí 5 mm² plochy nádorové tkáně v histologickém řezu. Jedno pole vysokého zvětšení HPF (high power field, zvětšení 400x) s objektivem světelného mikroskopu se zorným polem průměru 0,54 mm představuje plochu 0,23 mm² (10, 11). Z toho vyplývá, že k určení MI bylo třeba zhodnotit alespoň 21 polí HPF nádorové tkáně. V našem souboru ve zpracovaném materiálu z cytobloku byl průměrný počet zorných polí (HPF) tumoru pouze 8 s průměrným počtem 240 nádorových buněk na jedno zorné pole (obrázek 2). Tento počet byl pro stanovení MI nedostačující. Nicméně stanovení proliferačního markeru Ki-67 lze v mezích případů stanovit „jen“ ze 100 buněk. Ki-67 je nukleární protein asociovaný s buněčnou proliferací a je exprimován u všech buněk, které nejsou ve fázi G0 buněčného cyklu (14) (obrázek 3). V našem souboru z odběru EUS FNA jsme měli k dispozici v průměru 8 zorných polí nádorové tkáně a to představovalo přibližně 8 × 240 = 1 920 nádorových buněk. Tento počet byl dostatečný pro přesné stanovení proliferačního markeru Ki-67.

V současnosti přibývá studií, které se věnují proliferačnímu indexu Ki-67 jako významnému prognostickému parametru u GIST. Mezní hodnoty indexu Ki-67 se ve statistických analýzách studií pohybují v intervalu 6–8% (14, 15, 16). Tumory

Graf 1. Rozdíl hodnot Ki-67 mezi pacienty s biopsickým odběrem a pacienty s cytologickým odběrem tenkou jehlou (EUS FNA) byl hodnocen pomocí Welchova t-testu pro neshodné rozptyly. Z grafu jsou vypuštěny extrémní hodnoty, nicméně do analýzy zahrnuti byly. Nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi výběry na hladině významnosti



s indexem Ki-67 pod mezní hodnotou jsou označovány jako GIST s nízkým rizikem progresu doposud lokalizovaného onemocnění a nad tuto hodnotu s rizikem vysokým. Vzhledem k tomu, že zobrazovací metody urč velikost tumoru a jeho lokalizaci, jsou tyto údaje spolu s indexem Ki-67 a morfologií neoplázie schopny poskytnout všechna potřebná data pro určení prognózy a managementu terapie. Malé množství nádorové tkáně z cytobloku dostačující k určení proliferativního indexu Ki-67 je hlavní výhodou této metody vůči stanovení mitotického indexu z 5 mm² nádorové tkáně, který se doposud používá k rozlišení biologické povahy těchto nádorů. Vzhledem k rostoucí oblibě málo invazivních odběrových metod, lze předpokládat rostoucí tlak na zařazení indexu Ki-67 do standardních prognostických a terapeutických postupů.

Jelikož podmínkou pro imunohistochemické vyšetření je zpracování části cytologického materiálu získaného při EUS FNA metodou cytobloků, osvědčil se nám v praxi odběr materiálu nejméně ze dvou vpichů do léze při jednom endoskopickém výkonu. Z prvního vpichu byly vyhotoveny cytologické nátěry. Materiál z dalších tenkojehlových odběrů byl zpracován nátěrem i formou cytobloků. Přítomnost cytologa na odběrovém sálku (tzv. on site cytology) umožnila okamžitě zhodnocení kvality odběru a reprezentativnosti vzorků (obrázek 4). Tímto způsobem se výrazně snížil počet falešně negativních vyšetření a počet

opakovaných vpichů. Nádorová tkáň v našem souboru nebyla zastížena pouze v jednom odběru.

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že výsledky cytologického vyšetření materiálu z EUS FNA byly pro diagnostiku GIST srovnatelné s klešťovou endoskopickou biopsií, ev. resekci. Nemožnost stanovení mitotického indexu z cytologického materiálu v 75 % případů byla limitací v určení prognostických parametrů tumoru, nicméně tato limitace platila i pro klešťové odběry, kde nebylo možné stanovit tento parametr ve 45 % případů. Recentní studie potvrzují expresi nukleárního proteinu asociovaného s buněčnou proliferací Ki-67 u GIST jako významný, samostatný prognostický parametr progresu onemocnění. Ze statistického zpracování souboru vyplynulo, že nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi typy cytologických a biopsických vyšetření na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ a lze tedy předpokládat, že způsob odběru neměl vliv ani na stanovení Ki-67. Vzhledem k rostoucí oblibě málo invazivních odběrových metod, lze předpokládat rostoucí tlak na zařazení indexu Ki-67 do standardních prognostických a terapeutických postupů.

Citace použitého statistického programu: R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria URL <http://www.R-project.org/>

Tento článek byl vypracován v rámci projektu Nové kreativní týmy v prioritách vědeckého bádání, reg. č. CZ.1.07/2.3.00/30.0055 podpořeno Operačním programem Vzdělávání pro konkurenceschopnost a spolufinancovaného Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.

Literatura

1. Rosai J. Ackerman's surgical pathology. 8. Vydání. St. Louis, MO: mosby, 1996. Sv. 1.
2. WHO. Mezinárodní klasifikace nemocí pro onkologii: česká verze. 3. vydání. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky, 2004.
3. Koh JS, Trent J, Chen L, et al. Gastrointestinal stromal tumors: Overview of pathologic features, molecular biology, and therapy with imatinib mesylate. *Histopathology* 2004; 9(2): 565–574.
4. Miettinen M, Sarlomo-Rikala M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: recent advances in understanding of their biology. *Hum Pathol* 1999; 30(10): 1213–1220.

5. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors—definition, clinical, histological, immunohistochemical, and molecular genetic features and differential diagnosis. *Virchows Arch* 2001; 438(1):
6. Goettsch WG, Bos SD, Breekveldt-Postma N, Casparie M, Herings RM, Hogendoorn PC. Incidence of gastrointestinal stromal tumours is underestimated: results of a nation-wide study. *Eur J Cancer*. 2005; 41: 2868–2872.
7. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors (GISTs): definition, occurrence, pathology, differential diagnosis and molecular genetics. *Pol J Pathol*. 2003; 54: 3–2.
8. Miettinen M, Sobin LH, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors of the stomach: a clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 1765 cases with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol*. 2005; 29(1): 52–68.
9. Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): A review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005; 13(3): 205–220.
10. Miettinen M, Lasota J. Gastrointestinal stromal tumors: pathology and prognosis at different sites. *Semin Diagn Pathol* 2006; 23: 70–83.
11. Daum O, Šedivcová M. Doporučený postup pro histologické vyšetření gastrointestinálních stromálních tumorů. *CZ1401164954-01/2014*.
12. Rossi G, Valli R, Bertolini F, Marchioni A, Cavazza A, Mucciari C, Migaldi M, Federico M, Trentini GP, Gambato A. PDGFR expression in differential diagnosis between KIT-negative gastrointestinal stromal tumours and other primary soft-tissue tumours of the gastrointestinal tract. *Histopathology*. 2005; 46(5): 522–531.
13. Doyle LA, Hornick JL. Gastrointestinal stromal tumors: From KIT to succinate dehydrogenase. *Histopathology*. 2014; 64(1): 53–67.
14. Belevy B, Brčić I, Prejac J, Golubić ZA, Vrbanc D, Božikov J, Alerić I, Boban M, Razumović JJ. Role of Ki-67 as a prognostic factor in gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol*. 2013; 19(4): 523–7.
15. Wen-Yi Zhao, Jia Xu, Ming Wang, Zi-Zhen Zhang, Lin Tu, Chao-Jie Wang, Tian-Long Lin, Yan-Yin Shen, Qiang Liu, Hui Cao. Prognostic value of Ki67 index in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(5): 2298–2304.
16. Jiang J, Jin MS, Suo J, Wang YP, He L, Cao XY. Evaluation of malignancy using Ki-67, p53, EGFR and COX-2 expressions in gastrointestinal stromal tumors. *J Gastroenterol*. 2012; 18(20): 2569–2575.

*Článek přijat redakcí: 31. 8. 2014
Článek přijat k publikaci: 20. 10. 2014*

MUDr. Dušan Žiak

*CGB laboratoř a.s.
Kofenského 10, 703 00 Ostrava
ziak@pathology.cz*

doc. MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D.

*Ústav patologie FNO Ostrava
17. listopadu 1 790, Ostrava-Poruba
jana.dvorackova@fno.cz*

Differentiating autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer

P. DÍTE¹, M. UVÍROVÁ², M. BOJKOVÁ¹, I. NOVOTNÝ³, J. DVORÁČKOVÁ⁴, B. KIANICKÁ⁵,
H. NECHUTOVÁ⁵, L. DOVRTELOVÁ⁶, K. FLOREÁNOVÁ⁷, A. MARTÍNEK¹

Differential diagnosis between autoimmune pancreatitis (AIP) and pancreatic cancer can be very difficult. The main clinical symptoms in patients with autoimmune pancreatitis are jaundice, weight loss, abdominal pain and new onset of diabetes mellitus. Unfortunately, the same symptoms could be observed in patients with pancreatic carcinoma too. Imaging methods as computed tomography (CT) scan, magnetic resonance imaging (MRI) and endosonography (EUS); together with serological examination (IgG4 and Ca 19-9) play the important role in differentiation autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer. Extrapaneatic findings are distinctive in patients with autoimmune pancreatitis. In some cases the pancreatic biopsy is indicated, mainly in patients with focal or multifocal form of autoimmune pancreatitis. Response to steroids (decreased pancreatic or extrapancreatic lesion or damage) is distinctive to AIP. In clinical practice, CT scan seems to be the most reasonable tool for examining the patients with obstructive jaundice with or without present pancreatic mass. Stratification the patients with possible AIP versus pancreatic cancer is important. In patients with AIP it may avoid pancreatic resection, as well as incorrect steroid treatment in patients with pancreatic carcinoma.

KEY WORDS: Immunoglobulin G - Pancreatitis- Autoimmune diseases - Pancreatic neoplasms.

Corresponding author: Prof. MUDr. P. Dítě, DrSc, Academic Centre of Gastroenterology, Medicine Department, University Hospital and the Faculty of Medicine of the University of Ostrava, Czech Republic, 17. listopadu str. 1790, Ostrava, Poruba, Czech Republic.
E-mail: pdite.epc@gmail.com

¹Academic Centre of Gastroenterology
Department of Internal Medicine
University Hospital and Faculty of Medicine
of the University of Ostrava, Ostrava

²Cytogenetic and Cytobiologic Laboratory
Agel Ostrava, Czech Republic

³Masaryk Memorial Institute Brno
Brno, Czech Republic

⁴Department of Pathology
of the University Hospital and Faculty of Medicine
of the University of Ostrava
Ostrava, Czech Republic

⁵II. Department of Internal Medicine
of University Hospital USA Brno
Brno Czech Republic

⁶Department of Health Promotion
the Faculty of the Sports Studies

Masaryk University Brno, Czech Republic

⁷Department of Internal Gastroenterological
Medicine of the University Hospital in Brno
Brno, Czech Republic

Autoimmune pancreatitis is classified in the group of diseases referred to as immunoglobulin G4-associated disease - IgG4-related disease.¹ IgG4-associated disease etiology is not specified exactly, a number of organs are affected.² Epidemiological data are poor. According to a Japanese study, the incidence of the disease ranges between 0.28 and 1.08/100,000 inhabitants/year, with 336-1300 newly diagnosed persons per year.² Autoimmune pancreatitis is one of the most frequently occurring diseases within this group. Its type-1 is com-

monly referred to as a manifestation of pancreatic disease in IgG4-associated diseases, while type 2 is due to the clinical and histomorphological differences referred to as systemic affection.

Clinical symptoms

In the Vlachou *et al.*³ study, the most common clinical symptom was low intensity abdominal pain, characterized as abdominal discomfort (58%), obstructive icterus (54%), a decrease in body weight (51%) and newly established diabetes mellitus (38%). In general, obstructive icterus is typically the most common first symptom that leads patients to come for the examination. The autoimmune form of pancreatitis most often occurs as a form diffusely affecting the entire pancreas; another form is focal affection, or multifocal lesion.⁴ The most common problem in differential diagnostics between pancreatic cancer and autoimmune form of pancreatitis (hereinafter referred to as AIP) is the focal form (Figure 1).

The autoimmune form of pancreatitis is

a form diagnosed by consensus according to changes in the blood serum, histomorphologic changes, radiodiagnostic findings (CT of the pancreas, endosonography and pancreatogram), a marker of the correct diagnosis of AIP is a response to steroid therapy.⁵

Blood serum markers

It is typically highly difficult to make differential diagnostics between AIP and pancreatic cancer. This is particularly true for the differentiation of the focal form of AIP, when the pancreatic head is enlarged, especially when the first symptom is a painless obstructive icterus. As stated above, diagnosis of autoimmune pancreatitis is characterized by histological changes, radiological signs, increased level of IgG4 serum over the limit of 135.0 mg/dL,⁶ with a portion of the persons, a positive response to steroid therapy, which, however, must not be started until it is certain that we are not dealing with carcinoma. In practice, however, such criteria are not so specific to avoid over-

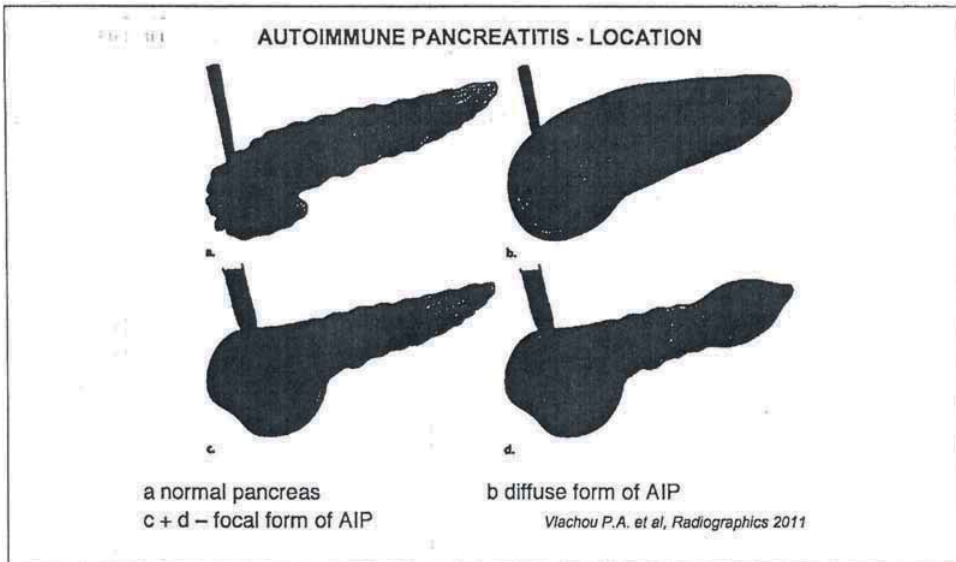


Figure 1.—Autoimmune pancreatitis - location.

laps, and this impedes the distinction between AIP and pancreatic cancer. Very specific diagnostic characters for AIP include a two-fold increase to IgG4 serum. However, about 10% of patients with pancreatic cancer may also demonstrate IgG4 serum in an excess of 135 mg/dL⁷⁻¹⁰ while roughly 10% of patients with pancreatic cancer have a value of twice the standard.¹¹ CA 19-9 levels higher than 200 mL are rare in AIP, and they usually rank among pancreatic adenocarcinoma.¹² We examined a group of 116 patients with histologically confirmed pancreatic cancer and detected higher levels of IgG4 in 11 persons (10.1%); out of these 11 persons, 6 patients had twice the amount of the standard (IgG4>270.0 mg/dL) (4.0%) out of all individuals with pancreatic cancer.¹³ In two individuals of the examined group, the current AIP was found besides pancreatic cancer. In the literature, the works appeared showing that the general IgG4 related disease is a risk factor for cancers of various localization, including the above-mentioned relationship between AIP and pancreatic cancer. In 11 patients out of 106 persons with IgG4-associated disease, Yamamoto et al found the simultaneous presence of malignancy. The detected malignant tumors were sialadenitis and autoimmune pancreatitis,¹⁴ the location of the colon, lung, and non-Hodgkin's lymphoma was found in patients with Mikulicz Syndrome, Kuttner tumor. In spite of this, publications dealing with the occurrence of autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer are still casuistic.¹⁵⁻¹⁷

Imaging methods

Imaging methods are important for diagnosing AIP and pancreatic cancer. CT is characterized by the AIP characteristics.¹⁸ In the so-called diffuse form of AIP, one of the characteristics is the diffuse enlargement of the gland in a sausage-like form, the pancreatic duct is irregular, non-dilated lumen, to the extent of at least 1/3 of the length of the duct. A typical finding is a hypodense (capsule-like) rim on the outer edges of the

pancreas. This symptom probably results from inflammation with fibrotic changes to peripancreatic fat. Compared to the diffuse type, the focal form of AIP is very difficult to distinguish from pancreatic cancer.¹⁹ The problem is that the number of signs at CT examination is present in both AIP and pancreatic cancer. Naturally, metastases diagnosed by imaging methods support the diagnosis of pancreatic cancer. FDG-PET magnetic resonance appeared to be a promising method. However, this method turned out to be more effective than computed tomography with respect to distinguishing between cancer and AIP.¹² The promise, however, is the use of magnetic resonance elastography,²⁰ especially as a method excluding the presence of cancer. Endoscopic retrograde cholangiopancreatography ranks among the so-called the Asian diagnostic criteria for AIP.²¹ The changes demonstrable on the pancreatic duct in persons with AIP include diffuse, rather insignificant irregularities of the pancreatic duct of at least one third of the duct length. In the case of segmental stenosis of the pancreatic duct, poststenotic dilatation of the duct is very rare, apart from pancreatic cancer, where the finding of poststenotic dilatation is frequent.^{22, 23} In general, the length of stenosis of the pancreatic duct is longer than in pancreatic cancer, and a typical finding for AIP is imaging with secondary branches coming from the area of the duct stenosis. There are controversial views on the diagnostic importance of biopsy findings in the area of the papilla of Vater, when IgG4-positive is reported as a possible supporting sign of autoimmune pancreatitis.^{24, 25}

Histomorphology

Lymphoplasmatic (LPSP)ytic sclerosing form, referred to as type 1 or autoimmune pancreatitis granulocyte epithelial lesion (GEL) negative has the following typical characteristics in the histomorphological image: a) storiform fibrosis; b) periductal infiltration by plasma cells and lymphocytes; c) venulitis and vascular obliteration on the

basis of the oppression of blood vessels by massive cellular infiltration of the parenchyma, abundant infiltration of pancreatic parenchyma immunoglobulinG4 by positive plasma cells (>29 of the cells in the evaluated HPF field).⁵

Type 2 of autoimmune pancreatitis, termed IDCP (idiopathic duct central pancreatitis), or as a form of AIP GEL positive, differs from type 1 of AIP in terms of exclusive GEL positivity and the presence of intraluminal and intraepithelial neutrophils. The massive presence of neutrophils in pancreatic acini and small pancreatic ducts causes their obliteration and subsequent destruction.²⁶ The presence of IgG4 positive plasma cells in the tissue is very low, the level of IgG4 in the serum is typically normal. Clinical differences between both types of autoimmune pancreatitis are shown in Table I.

The above mentioned histological image distinguishes AIP from pancreatic cancer,

however the presence of the pancreatic cancer in the field of AIP has been observed (Table II).

Extrapancreatic features

The autoimmune form of pancreatitis is accompanied by extra-pancreatic symptoms. Naitoh *et al.*²⁷ revealed that the presence of extrapancreatic symptoms is an important factor in differential diagnosis, suggesting the diagnosis of AIP against cancer.

On the basis of the published findings of clinical, biochemical, imaging methods, histology and effect of steroid therapy, Psarras *et al.*¹¹ have summarized the characteristic signs for the differential diagnosis of autoimmune pancreatitis *vs.* pancreatic cancer in the following table (Table III), but even this scheme cannot be fully applied, for example, if IgG4 positive in

TABLE I.—Overview of the clinical characteristics of autoimmune pancreatitis of type 1 and 2

	Type 1 autoimmune pancreatitis	Type 2 autoimmune pancreatitis
Histological image	Lymphoplasmacytic pancreatitis (LPSP)	Idiopathic centroductal sclerosing pancreatitis (IDCP)
Average age	The sixth decennium	From the fourth to fifth decennium
Symptoms	Icterus (75%) Acute pancreatitis (5%) > Diffuse edema (40%) Focal lesions (60%)	Icterus (50%) Acute pancreatitis (33%) Diffuse edema (20%) Focal lesions (80%)
IgG4	Increased serum concentration IgG4+ plasma cell in the infiltrate	No connection with IgG4
Participation of other organs	50%	40%
Prognosis	No connection with IBD Relapse in 15 - 65 %	IBD 16% Relapse very rare

IBD - inflammatory bowel disease

TABLE II.—Histopathological criteria for diagnosing autoimmune pancreatitis, type 1 and 2

	Histological finding	type 1 (LPSP)	type 2 (IDCP)
Common criteria	Periductal lymphoplasmacytic infiltrate	Yes	Yes
	Stroma rich in inflammatory cells	Yes	Yes
	Storiform fibrosis	Very strong	Rare
	Obliterative phlebitis	Yes	Rare
	Prominent lymphoid follicles	Yes	Rare
	IgG4 plasma cells	Increased number	Not increased number
	Granulocytic epithelial lesions /GEL)	No	Yes
	Neutrophil periacyinar infiltration	No	Very numerous

LPSP - lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis, IDCP - Idiopathic centroductal pancreatitis

TABLE III.—*Differential diagnosis between aip and pancreatic cancer: important points.*

	AIP	Pancreatic cancer
Clinical features		
Exocrine insufficiency	Frequently	Rarely
Cachexia, anorexia	Rarely	Frequently
Pain	Rarely	Frequently
Extrapancreatic disease	Non-metastatic lesions	Metastatic lesions
Serology		
Autoantibodies	IgG4>135 mg/dL	IgG4<100 mg/dL
CA 19-9	<200 U/mL	>200 U/mL
Amylase, lipase	Mild elevation (2 or 3-fold)	Usually normal
Imaging		
CT	Diffuse (sausage-shaped pancreas with hypotense rim) or focal	Focal
	Diffuse or focal stenosis of the pancreatic duct	Focal stenosis of the duct Infiltration of adjacent tissues and distant metastases
MR-elasticity	Homogenous stiffness pattern	Heterogenous stiffness pattern
ERCP	Diffuse or focal narrowing of the duct > 3.5 cm	Focal narrowing or obstruction of the duct <3.4 cm
	No post-stenotic duct dilatation	Post-stenotic duct dilatation>5.2 mm
	Strictures in the proximal half of the common bile duct	No strictures in the proximal half of the common bile duct
Secretion-enhanced MRCP	Duct-penetrating sign	No specific sign
EUS	Hypochoic diffuse or focal enlargement with hyperechoic spots	Absence of hyperechoic spots
EUS-elasticity	Homogenous stiffness pattern	Heterogeneous stiffness pattern
Contrast-enhanced EUS	Homogeneously hypervascular	Mainly hypovascular
Histology	Pattern of lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis or idiopathic duct-destructive pancreatitis	Ductal adenocarcinoma
Treatment	Response to corticosteroids	No response to corticosteroids

blood serum is also possible in malignancies of the pancreas, or in the case of a finding of IgG4 in the tissue of the papilla of Vater, which is not entirely reliable for diagnosing AIP.

Conclusions

Differential diagnostics between pancreatic cancer and the focal form of autoimmune pancreatitis is often difficult, sometimes even impossible. Consensually approved and published criteria for AIP rank as significant benefits in the diagnostics, and from a practical point of view they make it possible to determine the correct treatment strategy, including the possibility to protect patients from unnecessary pancreatic resection, as well as allowing for pancreatic cancer to be diagnosed. Nevertheless, it should be noted that there are

two strategic views of how to approach differential diagnostics of AIP.

The differential diagnostic approach recommended by Chari *et al.*²⁸ logically follows from HISORt diagnostic criteria for AIP²⁹ and recommends the use of a pancreatic biopsy (core biopsy). The initial role with respect to the decision to select a diagnostic scheme is played by computed tomography. For persons with significant signs of AIP, *i.e.* including the presence extra pancreatic organ lesions and positive serology, steroid therapy is started without further examination, and its therapeutic effect is monitored. In persons, where findings can be described as vague, incomplete, boundary, and if none of the typical markers of AIP is present, it is recommended to perform a biopsy of the pancreas. In the case of high clinical and laboratory susceptibility of pancreatic cancer, the procedure is the same as if it were cancer and not potential AIP. The

absence of extra-pancreatic organ lesions, supporting the diagnosis of pancreatic cancer is regarded as particularly important for these persons.

The Japanese approach to differential diagnostics of AIP *vs.* pancreatic cancer is of course based on the criteria for diagnosing AIP²³ used in Japan. The Japanese recommendation consists of an evaluation of data changes to medical history, radiology (CT, ERCP) changes, changes to serology (IgG4), and expressing the number of so-called positive markers. It is therefore evident that the Japanese approach counts on a significant diagnostic role of endoscopic retrograde cholangiopancreatography. If none of the major diagnostic criteria of AIP is found, the patient is further examined and treated as if it were pancreatic cancer. In the case of ambiguous finding, *i.e.* 1-2 symptoms suggestive of AIP, and negative IgG4 levels or high levels of IgG4 and only one sign of AIP is present, a fine needle biopsy of the pancreas is recommended due to suspected AIP. If the biopsy is negative, or if two typical features are present and IgG4 levels in the serum are high, or if three typical features of AIP are found, the steroid therapy is started. If the response to steroids is not relevant, it is necessary to repeat the diagnostic algorithm. The general conclusion is that neither approach gives an absolute guarantee of the accuracy of the diagnosis; the Japanese approach is simpler, but is, naturally, highly dependent on the competence of the examining radiologist and endoscopist. It is likely that Chari's approach is more complex, however there are also limitations in the effectiveness of a core-biopsy of the pancreas.³⁰ Based on our own experience, a patient presenting typical features of AIP and a negative finding in terms of malignancy in the fine needle biopsy of the pancreas was treated with steroids, with an obvious improvement in clinical and laboratory findings. At a check-up six months after diagnosing AIP, suspected pancreatic malignancy was stated as a result of the endosonographic examination. During an operation, adenocarcinoma was proven, although the serum IgG4 level was

more than three times that of the standard (417.0 mg/dL).

From the above mentioned facts, it can be concluded that despite the clearly stated AIP diagnostic criteria, the differential diagnosis between AIP and pancreatic cancer has become a phenomenon *ARS MEDICAE*, requiring a multidisciplinary approach to ensure the highest diagnostic confidence.³¹⁻³³

References

- Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T *et al.* Comprehensive diagnostic criteria for IgG4. *Mod Rheumatol* 2012;22:22-30.
- Umehara H, Okazaki K, Masaki Y, Kawano M, Yamamoto M, Saeki T *et al.* A novel clinical entity, IgG4-related disease (IgG4RD): general concept and details. *Mod Rheumatol* 2012;22:1-14.
- Vlachou PA, Khalili K, Jung-Jang J. IgG4-related sclerosing disease: autoimmune pancreatitis and extra-pancreatic manifestation. *Radiographics* 2011;31:13279-402.
- Kamisawa T, Egawa N, Nakajima H, Tsuruta K, Okamoto A, Kamata N. Clinical difficulties in the differentiation of autoimmune pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2694-9.
- Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L, Kamisawa T, Kawa S, Mino-Kenudson M *et al.* International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2011;40:352-8.
- Hamano H, Kawa S, Horiuchi A, Unno H, Furuya N, Akamatsu T *et al.* High serum IgG4 concentration in patients with sclerosing pancreatitis. *N Engl J Med* 2001;344:732-8.
- Ghazale A, Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ, Topazian MD, Takahashi N *et al.* Value of serum IgG4 in diagnosing autoimmune pancreatitis and in distinguishing it from pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1646-53.
- Raina A, Krasinskas A, Greer JB, Lamb J, Fink E, Moser AJ *et al.* Serum immunoglobulin G fraction 4 levels in pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:48-53.
- Kamisawa T, Chen PY, Tu Y, Nakajima H, Egawa N, Tsuruta K *et al.* Pancreatic cancer with a high IgG4 serum concentration. *World J Gastroenterol* 2006;12:6225-8.
- Sugumar A, Takahashi N, Chari ST. Distinguishing pancreatic cancer from autoimmune pancreatitis. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12:91-7.
- Psarras K, Baltatzis ME, Pavlidis ET, Lalountas MA, Pavlidis TE, Sakantamis AK. Autoimmune pancreatitis versus pancreatic cancer: a comprehensive review with an emphasis on differential diagnosis. *Hepato-Biliary Pancreat Dis Int* 2011;10:465-85.
- Wakabayashi T, Kawaura Y, Satomura Y, Watanabe H, Motoo Y, Okai T *et al.* Clinical and imaging features of autoimmune pancreatitis with focal pancreatic swelling or mass formation: comparison with so-called tumor forming pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2679-87.

13. Yamamoto M, Takahashi H, Tabeya T, Suzuki C, Nishihiro Y *et al.* Risk of malignancies in IgG4-related disease. *Mod Rheumatol* 2012;22:414-8.
14. Shiokawa M¹, Kodama Y, Yoshimura K, Kawanami C, Mimura J, Yamashita Y *et al.* Risk of cancer in patients with autoimmune pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2013;108:610-6.
15. Pezzilli R¹, Vecchiarelli S, Di Marco MC, Serra C, Santini D, Calculli L *et al.* Pancreatic ductal adenocarcinoma associated with autoimmune pancreatitis. *Case Rep Gastroenterol* 2011;5:378-85.
16. Loos M¹, Esposito I, Hedderich DM, Ludwig L, Fingerle A, Friess H *et al.* Autoimmune pancreatitis complicated by carcinoma of the pancreatobiliary system: a case report and review of literature. *Pancreas* 2011;40:151-4.
17. Witkiewicz AK¹, Kennedy EP, Kenyon L, Yeo CJ, Hruban RH. Synchronous autoimmune pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma: case report and review of literature. *Hum Pathol* 2008;39:1548-51.
18. Kawamoto S¹, Siegelman SS, Hruban RH, Fishman EK. Lymphoplasmacytic sclerosing pancreatitis (autoimmune pancreatitis), evaluation with multidetector CT. *Radiographics* 2008;28:157-70.
19. Takahashi N¹, Fletcher JG, Fidler JL, Hough DM, Kawashima A, Chari ST. Dual-phase CT of autoimmune pancreatitis: a multireader study. *Am J Roentgenol* 2008;190:280-6.
20. Mariappan YK, Gleser KJ, Eman RL. A review magnetic resonance elastography. *Clin Anat* 2010;23:497-511.
21. Otsuki M, Chung JB, Okazaki K, Kim MH, Kamisawa T, Kawa S *et al.* Asian diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: consensus of the Japan-Korean Symposium on autoimmune pancreatitis. *J Gastroenterol* 2008;43:403-8.
22. Sugumar A, Levy MJ, Kamisawa T, Webster GJ, Kim MH, Enders F *et al.* Endoscopic retrograde pancreatography criteria of diagnosed autoimmune pancreatitis: an international multicentre study. *Gut* 2011;60:666-70.
23. Kamisawa T¹, Imai M, Yui Chen P, Tu Y, Egawa N, Tsuruta K *et al.* Strategy for differentiating autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer. *Pancreas* 2008;37:e62-c67.
24. Rebourts V, Le Baleur V, Cazals-Hatem D. ImmunoglobulinG4 immunostaining of gastrin, duodenal or sponic biopsy is not helpful for diagnosing autoimmune pancreatitis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;1091-4.
25. Kim MH, Moon SH, Kamisawa T. Major duodenal papilla in autoimmune pancreatitis. *Dig Surg* 2010;27:110-4.
26. Chari ST¹, Kloppel G, Zhang L, Notohara K, Lerch MM, Shimosegawa T, Autoimmune Pancreatitis International Cooperative Study Group (APICS). Histopathologic and clinical subtypes of autoimmune pancreatitis: the Honolulu consensus document. *Pancreas* 2010;32:549-54.
27. Naitoh I, Nakazawa T, Ohara H. Clinical significance of extra-pancreatic lesions in autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2010;39:e1-e5.
28. Chari ST, Takahashi N, Levy MJ, Smyrk TC, Clain JE, Pearson RK *et al.* A diagnostic strategy to distinguish autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:1097-103.
29. Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ, Topazian MD, Takahashi N *et al.* Diagnosis of autoimmune pancreatitis the Mayo Clinic experiences. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006;4:1010-6.
30. Agrawal S, Daruwala C, Khurana J. Distinguishing autoimmune pancreatitis from pancreatobiliary cancers. *Ann Surgery* 2012;255:248-58.
31. Khalid A, Dewitt J, Ohori NP, Chen JH, Fasanella KE, Sanders M *et al.* EUS.FNA mutational analysis in differentiating autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreatol* 2011;11:482-6.
32. Kim JH, Kim MH, Byun JH, Lee SS, Lee SJ, Park SH *et al.* Diagnostic strategy for differentiating autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer: Is an endoscopic retrograde pancreatography essential? *Pancreas* 2012;41:639-47.
33. Nishino T, Oyama H, Toki F, Shiratori K. Differentiation between autoimmune pancreatitis and pancreatic carcinoma based on endoscopic retrograde cholangiopancreatography findings. *J Gastroenterol* 2010;45:988-96.

Epub ahead of print on October 7, 2014.

Immunoglobulin G4, Autoimmune Pancreatitis and Pancreatic Cancer

Martina Bojková^{a,d} Petr Dítě^{a,d} Jana Dvořáčková^{b,d} Ivo Novotný^e
Katarina Floreánová^f Bohuslav Kianička^{g,h} Magdalena Uvírová^{c,d}
Arnošt Martínek^{a,d}

^aAcademic Centre of Gastroenterology, Department of Internal Medicine and ^bDepartment of Pathology, University Hospital Ostrava, ^cCytogenetic and Cytobiologic Laboratory AGEL Ostrava, and ^dFaculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava, ^eDepartment of Gastroenterology, Masaryk Oncological Institute, ^fDepartment of Internal Gastroenterological Medicine, University Hospital Brno, ^g2nd Department of Internal Medicine, St. Ann's University Hospital, and ^hFaculty of Medicine, Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic

Key Words

Immunoglobulin G4 · Autoimmune pancreatitis · Pancreatic cancer

Abstract

Background: Immunoglobulin G4 (IgG4)-related diseases are a group of diseases characterized by enlargement of the affected organs, elevation of serum IgG4, massive infiltration of affected organs with lymphocytes and plasma cells with IgG4 positivity and tissue fibrosis. Type I autoimmune pancreatitis is one form of IgG4-related disease. For IgG4-related diseases, various localizations are described for up to 10% of malignancies. The aim of our study was to examine IgG4 serum levels and pancreatic tissue with respect to the simultaneous presence of autoimmune pancreatitis in patients with pancreatic cancer. **Methods:** IgG4 serum levels were examined in 106 patients with histologically confirmed pancreatic cancer. The level of 135 mg/dl was considered as the normal value. Pancreatic tissue was histologically examined with respect to the presence of markers of autoimmune pancreatitis. **Results:** A higher IgG4 level than the cut-off value of 135 mg/dl was proven in 11 patients with pancreatic cancer. Of these 11 patients, 7 had levels twice the normal limit (65.6%). Autoimmune pancreatitis was diagnosed in these

individuals. In the case of 1 patient, it was basically an unexpected finding; another patient was initially diagnosed with autoimmune pancreatitis. Repeated biopsy of the pancreas at the time of diagnosis did not confirm the presence of tumour structures, therefore steroid therapy was started. At a check-up 6 months after starting steroid therapy, the condition of the patient improved subjectively and IgG4 levels decreased. However, endosonographically, malignancy was suspected, which was subsequently confirmed histologically. This patient also demonstrated an IgG4 level twice the normal limit. **Conclusion:** IgG4-related diseases can be accompanied by the simultaneous occurrence of malignancies, which also applies to autoimmune pancreatitis. Chronic pancreatitis is considered a risk factor for pancreatic cancer. It cannot be reliably confirmed whether this also applies to autoimmune pancreatitis. In accordance with other works, however, it is evident that, despite the described high sensitivity and specificity for IgG4 elevation in the case of autoimmune pancreatitis, even levels twice the normal limit are demonstrable in some individuals with pancreatic cancer, without the presence of autoimmune pancreatitis. We believe that patients with IgG4-related disease, including autoimmune pancreatitis, must be systematically monitored with respect to the potential presence of malignancy.

© 2014 S. Karger AG, Basel

Introduction

Immunoglobulin G4 (IgG4)-related diseases are characterized by enlargement of the affected organs, elevated IgG4 serum levels, abundant infiltration of affected tissues with plasma cells containing IgG4, and significant tissue fibrosis [1]. Typical representations of IgG4-related diseases include Mikulicz syndrome and an autoimmune form of pancreatitis [2]. A level of IgG4 higher than 135 mg/dl, or its 2-fold elevation rank, is among the criteria in diagnosing autoimmune pancreatitis [3]. In recent years, however, a number of conditions have appeared with elevated IgG4 levels which were not IgG4-related diseases. Such diseases also include pancreatic cancer, therefore differential diagnostics is gaining importance in order to rule out or confirm cancer [4].

In 2012, Yamamoto et al. [5] published a report evaluating a representative group of persons with IgG4-related diseases in terms of the simultaneous presence of malignancy. In the studied group of 106 persons, the presence of a malignant tumour was detected in 11 cases (10.6%). Localization of tumours was in the lungs and intestine, and lymphoma was also present – both non-Hodgkin and MALToma. Although no pancreatic cancer was detected in this study, the potential relationship between autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer has been described in other studies [6, 7]. However, IgG4 levels, corresponding to the values reported as one of the criteria for diagnosing autoimmune pancreatitis, were detected not only in patients with autoimmune pancreatitis but also in a portion of the persons with primary pancreatic carcinoma [8].

The aim of our study was to examine a group of persons with histologically confirmed pancreatic cancer and to test the IgG4 serum levels – and specifically to investigate whether histomorphometric signs of autoimmune pancreatitis are present in the pancreatic tissue.

Materials and Methods

In our study, during the years 2011–2013, we examined the IgG4 serum level and pancreatic tissue samples for the presence of criteria for autoimmune pancreatitis in a group of 106 people with histologically confirmed pancreatic cancer.

The evaluated group consisted of 88 men (75.8%) with an average age of 61.4 years and 28 women (24.2%) with an average age of 58.7 years. We detected a number of comorbidities for which the patients with pancreatic cancer were treated. Some comorbidities, however, are a risk factor for pancreatic carcinogenesis (table 1).

In the studied group of 106 persons, 11 patients (10.1%) demonstrated IgG4 serum levels higher than 135 mg/dl, this level being

Table 1. Comorbidities in 106 persons with proven pancreatic cancer

	Men	Women
Diagnosis, n	86	20
Average age, years	61.4	59.8
Diabetes mellitus, n	12 (12.8%)	4 (20.0%)
Chronic pancreatitis, n	3 (3.5%)	1 (5.0%)
Ulcerative disease, n	2 (2.3%)	0
Hepatopathy, n	10 (11.6%)	2 (10.0%)
Ischaemic heart disease, n	6 (6.9%)	1 (5.0%)
Arterial hypertension, n	8 (9.3%)	4 (20.0%)
Obesity (BMI >30), n	5 (5.8%)	3 (15.0%)

Table 2. Elevated IgG4 serum levels in patients with pancreatic cancer

Patient	Age, years	Sex	IgG4, mg/dl	Autoimmune pancreatitis
1	51	M	151.0	No
2	71	M	280.4	No
3	64	F	308.6	No
4	52	M	514.2	Yes
5	60	M	148.4	No
6	59	F	203.6	No
7	65	M	487.0	Yes
8	70	M	149.4	No
9	62	M	274.0	No
10	55	F	288.6	No
11	53	M	390.3	No

Average age: men, 60.5 years (range 51–71); women, 59.3 years (range 55–64). Average IgG4 in 11 persons with serum IgG4 level ≥ 135 mg/dl was 263 mg/dl.

considered a diagnostic criterion for autoimmune pancreatitis. A 2-fold increase was found in 7 of the 11 persons (65.6%; table 2).

The group of patients with elevated IgG4 levels consisted of 8 men with an average age of 61.5 years (range 51–71) and 3 women with an average age of 59.3 years (range 55–64). None of these persons had sought treatment for diseases with immune changes, rheumatological disease or allergy. The average value of IgG4 in all patients with pancreatic cancer and elevated IgG4 levels was 263 mg/dl.

In 2 persons with elevated IgG4 serum levels, pancreatic cancer besides those typical for pancreatic cancer were proven at histological examination, characterizing autoimmune pancreatitis.

Patient 1

Patient 1 was a 52-year-old man. He was a regular smoker of 10–15 cigarettes daily since the age of 25 and only occasionally drank alcohol. He had never been seriously ill, but since 30 years of age he had been treated for gastroduodenal peptic ulcer disease.

In his family profile, his father was treated for arterial hypertension, his mother was healthy and his grandfather died of colorectal cancer.

He was examined due to dyspepsia, dull epigastric pain and subicterus, resulting in a suspected diagnosis of a focal form of autoimmune pancreatitis. However, with the consent of the patient, fine needle biopsy of the pancreatic head was performed under endosonographic guidance with negative results in terms of malignancy. The IgG4 serum level was increased – 514.2 mg/dl. Steroid therapy was started for the patient at a dose of 40 mg of prednisone per os daily, and the dose was reduced by 5 mg weekly to 10 mg/day; this dose was administered for 3 months. When the patient came for a check-up, subjectively he was feeling better, but he had lost 2 kg in weight – jaundice was not present; the IgG4 level had decreased to 281.5 mg/dl, but it was not normalized. At a check-up endosonographic examination, suspected malignancy of the pancreatic head was stated. The patient underwent surgery and adenocarcinoma was found with metastasis to the lymph nodes, and at the same time there were histological signs of autoimmune pancreatitis.

Patient 2

Patient 2 was a 65-year-old man. He was obese, an occasional smoker and an abstainer from alcohol consumption. He had been treated for arterial hypertension, autoimmune thyroiditis and type 2 diabetes mellitus, which had been proven 4 years before the diagnosis of pancreatic cancer. The reason for the examination was painless obstructive jaundice. In his family profile, there was no cancer or autoimmune disease.

During IgG4 examination, a high value of 487 mg/dl was detected in the blood serum at the endosonographic examination; the finding was evaluated as carcinoma of the pancreatic head. Surgery was performed, and adenocarcinoma of the pancreatic head was histologically proven, together with histomorphometric features of autoimmune pancreatitis.

While the first patient was initially diagnosed with autoimmune pancreatitis, in the case of the second patient it was basically an unexpected appearance of autoimmune pancreatitis with pancreatic cancer.

Discussion

IgG4-related diseases affect many organs such as the pancreas, biliary tract, liver, central nervous system, thyroid gland, prostate, kidney, retroperitoneum, and lymph nodes [9]. The clinical symptomatology is logically dependent upon the particular affected organ. Clinical symptomatology is typically insignificant; it affects mainly middle-aged and elderly men, and the effect of steroid therapy is frequent. Infiltration of affected organs with IgG4-positive plasma cells and high IgG4 serum levels are typical signs of the disease. The intensity of fibrotic changes varies according to the nature of the affected organ. The diagnostic problem is that a number of other conditions that do not rank among the IgG4-related dis-

eases show elevated IgG4 serum levels. The presence of IgG4-positive plasma cells is a frequent finding in patients with rheumatoid synovitis or inflammatory diseases of the skin or oral cavity. Elevated IgG4 serum levels have also been reported in some cancers, including pancreatic cancer [10].

Autoimmune pancreatitis is one of the conditions where an elevated IgG4 serum level exceeding the value of 135 mg/dl is included in the diagnostic characteristics [11]. In the study by Hamano et al. [3], the sensitivity and specificity of serum level exceeding 135 mg/dl was higher than 95%. The diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis are determined on the basis of a consensus published in 2011 by a group of experts [12]. Currently, there are two clinically significant forms of autoimmune pancreatitis which, in addition to some common features, have characteristics typical of their differential diagnosis. Type 1 autoimmune pancreatitis, known as lymphoplasmacellular pancreatitis, mainly affects individuals aged about 60 years, and its course is often initially presented with obstructive jaundice and only mild belly pain or discomfort. Most patients have elevated IgG4 serum levels and tissue infiltration with plasma cells and lymphocytes in the presence of IgG4. More than half of all type 1 autoimmune pancreatitis cases are accompanied by a finding of extrapancreatic organ lesions.

Type 2 autoimmune pancreatitis affects people a decade younger than type 1. IgG4 positivity is very low, about 40% of cases are simultaneously diagnosed with idiopathic intestinal inflammation (which does not apply to type 1 autoimmune pancreatitis) and in about one third of the persons, clinical symptoms may mimic acute pancreatitis [13] (table 3).

The autoimmune form occurs either in the form of diffuse involvement of the gland or as a focal or multifocal form [14]. The focal form of autoimmune pancreatitis, especially if painless obstructive jaundice is present simultaneously, is often difficult to distinguish from pancreatic cancer. Ghazale et al. [15] examined IgG4 serum levels in 135 patients with pancreatic cancer and a value higher than 135 mg/dl was detected in 13 persons (10%). None of the examined patients with pancreatic cancer, however, showed a level of IgG4 higher than twice the normal limit. Raina et al. [8] detected higher IgG4 serum levels in 5 patients (7%) out of 71 persons with pancreatic carcinoma; none of those 5 patients was diagnosed with autoimmune pancreatitis. In this group of people with pancreatic carcinoma, the average IgG4 value was 160.8 mg/dl. Kamisawa et al. [4] detected a high level of IgG4, which exceeded the normal limit of 135 mg/dl twice

Table 3. Differential diagnosis between autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer: important points

	Autoimmune pancreatitis	Pancreatic cancer
<i>Clinical features</i>		
Exocrine insufficiency	Frequently	Rarely
Cachexia, anorexia	Rarely	Frequently
Pain	Rarely	Frequently
Extrapancreatic disease	Non-metastatic lesions	Metastatic lesions
<i>Serology</i>		
Autoantibodies	IgG4 >135 mg/dl	IgG4 <100 mg/dl
Carbohydrate antigen 19-9	<200 U/ml	>200 U/ml
Amylase, lipase	Mid-elevation (2- or 3-fold)	Usually normal
<i>Imaging</i>		
CT	Diffuse (sausage-shaped pancreas with hypointense rim) or focal Diffuse or focal stenosis of the pancreatic duct	Focal Focal stenosis of the duct Infiltration of adjacent tissues and distant metastases
MR elastography	Homogeneous stiffness pattern	Heterogeneous stiffness pattern
ERCP	Diffuse or focal narrowing of the duct >3.5 cm No post-stenotic duct dilatation Strictures in the proximal half of the common bile duct	Focal narrowing or obstruction of the duct <3.4 cm Post-stenotic duct dilatation >5.2 mm No strictures in the proximal half of the common bile duct
Secretion-enhanced MRCP	Duct-penetrating sign	No specific sign
EUS	Hypoechoic diffuse or focal enlargement with hyperechoic spots	Absence of hyperechoic spots
EUS elastography	Homogeneous stiffness pattern	Heterogeneous stiffness pattern
Contrast-enhanced EUS	Homogeneously hypervascular	Mainly hypovascular
<i>Histology</i>	Pattern of lymphoplasmacytosis, sclerosing pancreatitis or idiopathic duct-destructive pancreatitis	Ductal adenocarcinoma
<i>Treatment</i>	Response to corticosteroids	No response to corticosteroids

(433 mg/dl), in a patient with pancreatic cancer. Immunohistochemical examination showed a high occurrence of IgG4-positive plasma cells in the tumour tissue and low positivity of these cells in the surrounding pancreatic tissue. Abundant IgG4 positivity was also proven in the nearby lymph nodes.

Incidences of adenocarcinoma of the pancreas with simultaneous autoimmune pancreatitis are usually published as case reports [6, 7, 10]. In the case report by Loos et al. [11], a 67-year-old woman was diagnosed with autoimmune pancreatitis. However, it was not possible to clearly distinguish it from carcinoma of the head of the pancreas; therefore, pylorus-preserving pancreaticodu-

odenectomy was performed. The histological examination of the biopsy showed no signs of malignant process. Changes in the sense of autoimmune pancreatitis were proven, and 18 months after the diagnosis of autoimmune pancreatitis the woman was re-examined for ascites. The examination confirmed metastatic adenocarcinoma of the pancreas in the area of autoimmune pancreatitis. In 2012, Siokawa et al. [16] showed that not only IgG4-related diseases in general, but also autoimmune pancreatitis in particular (as one of the IgG4-related diseases), represent a risk factor in inducing carcinogenesis. In a group of 108 persons with a diagnosis of autoimmune pancreatitis – according to Asian criteria –

a total of 18 cancers were detected in 15 persons (13.9%). The highest risk of cancers was found in the first year after diagnosis of autoimmune pancreatitis. In 6 out of 8 people treated with steroids with a diagnosis of autoimmune pancreatitis, a cancerous lesion was detected before starting steroid therapy. Most frequently, malignancy was detected in the stomach, lungs and prostate. It is evident that patients with autoimmune pancreatitis are at risk of malignant tumours of various localizations. In our study we have found an increase in IgG4 in 10% of patients; in more than 65% of these patients, the value was more than twice the normal limit. In 1 patient who was initially observed for autoimmune pancreatitis and treated with steroids, we also confirmed pancreatic can-

cer histologically 5 months after the diagnosis of autoimmune pancreatitis. In another patient with a finding of pancreatic cancer, IgG4 autoimmune pancreatitis was surprisingly identified as well at histological revision of pancreatic tissue; IgG4 positivity was not detected in the tumour tissue. Although chronic pancreatitis is a potential risk factor for pancreatic cancer, it cannot be clearly confirmed that autoimmune pancreatitis or IgG4-related diseases in general were the cause of pancreatic cancer. However, patients with a diagnosis of autoimmune pancreatitis should be regularly monitored and the armamentarium of tests should be supplemented with examinations that may reveal potential cancerous changes.

References

- 1 Takahashi H, Yamamoto M, Suzuki C, et al: The birthday of a new syndrome: IgG4-related disease constitutes a clinical entity. *Autoimmune Rev* 2010;9:591–594.
- 2 Vlachou PA, Khalili K, Jang H-J, et al: IgG4-related sclerosing disease: autoimmune pancreatitis and extrapancreatic manifestations. *Radiographics* 2011;31:1379–1402.
- 3 Hamano H, Kawa S, Hirouchi A, et al: High serum IgG4 concentration in patients with sclerosing pancreatitis. *N. Engl. J. Med* 2001; 344:732–738.
- 4 Kamisawa T, Chen PY, Tu Y, et al: Pancreatic cancer with a serum IgG4 concentration. *World J Gastroenterol* 2006;12:6225–6228.
- 5 Yamamoto M, Takahashi H, Tabeya T, et al: Risk of malignancies in IgG4-related disease. *Mod Rheumatol* 2012;22:414–418.
- 6 Inoue H, Miyatani H, Sawada Y: A case of pancreatic cancer with autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2006;33:208–209.
- 7 Wilkiewicz AK, Kennedy EP, Keneyon I, et al: Synchronous autoimmune pancreatitis and infiltrating pancreatic ductal adenocarcinoma: case report and review of the literature. *Human Pathol* 2008;39:1548–1551.
- 8 Raina A, Krasinskas AM, Greer JB, et al: Serum immunoglobulin G fraction 4 levels in pancreatic cancer: elevations not associated with autoimmune pancreatitis. *Arch Pathol Lab Med* 2007;112:48–53.
- 9 Umehara M, Okazaki K, Masaki Y, et al: Comprehensive diagnostic criteria for IgG4-related disease. *Mod Rheumatol* 2012;22:21–30.
- 10 Pezzilli R, Vecchiarelli S, DiMarco MC, et al: Pancreatic ductal adenocarcinoma related with autoimmune pancreatitis. *Case Rep Gastroenterol* 2011;5:378–385.
- 11 Loos M, Esposito I, Hedderich DM, et al: Autoimmune pancreatitis complicated by carcinoma of the pancreatobiliary system. *Pancreas* 2011;40:151–154.
- 12 Shimozegawa T, Chari ST, Frulloni L, et al: International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas* 2011;40:352–358.
- 13 Kamisawa T, Chari ST, Lerch MM, et al: Recent advances in autoimmune pancreatitis type 1 and type 2. *Gut* 2013;62:1373–1380.
- 14 Psarras K, Baltatris MF, Pavlidis ET: Autoimmune pancreatitis versus pancreatic cancer a comprehensive review with emphasis on differential diagnosis. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2011;10:465–473.
- 15 Ghazale A, Chari ST, Smyrk TC, et al: Value of serum IgG4 in the diagnosis of autoimmune pancreatitis and in distinguishing it from pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1646–1653.
- 16 Siokawa M, Kodama Y, Ypshimura K, et al: Risk of cancer in patients with autoimmune pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 2013;108: 610–618.

Article

The Changes of Angiogenesis and Immune Cell Infiltration in the Intra- and Peri-Tumoral Melanoma Microenvironment

Vladimir Zidlik ¹, Svetlana Brychtova ^{2,*}, Magdalena Uvirova ¹, Dusan Ziak ¹ and Jana Dvorackova ^{1,3}

¹ CGB Laboratory, a.s., Laboratory of Molecular Genetics and Pathology, AGEL Research and Training Institute—Ostrava-Vitkovice Branch, Korenskeho 10, Ostrava 71000, Czech Republic; E-Mails: zidlik@pathology.cz (V.Z.); uvirova@pathology.cz (M.U.); ziak@pathology.cz (D.Z.); jana.dvorackova@fno.cz (J.D.)

² Institute of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, Hnevotinska 3, Olomouc 77515, Czech Republic

³ Department of Pathology, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Syllabova 19, Ostrava 70300, Czech Republic

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: svetlana.brychtova@seznam.cz; Tel.: +420-585-632-449; Fax: +420-585-632-966.

Academic Editor: Bruno Vincenzi

Received: 25 November 2014 / Accepted: 24 March 2015 / Published: 9 April 2015

Abstract: Malignant melanoma (MM) urgently needs identification of new markers with better predictive value than currently-used clinical and histological parameters. Cancer cells stimulate the formation of a specialized tumor microenvironment, which reciprocally affects uncontrolled proliferation and migration. However, this microenvironment is heterogeneous with different sub-compartments defined by their access to oxygen and nutrients. This study evaluated microvascular density (MVD), CD3⁺ lymphocytes (TILs) and FOXP3⁺ T-regulatory lymphocytes (Tregs) on formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections using light microscopy. We analyzed 82 malignant melanomas, divided according to the AJCC TNM classification into four groups—pT1 (35), pT2 (17), pT3 (18) and pT4 (12)—and 25 benign pigmented nevi. All parameters were measured in both the central areas of tumors (C) and at their periphery (P). A marked increase in all parameters was found in melanomas compared to nevi ($p = 0.0001$). There was a positive correlation between MVD, TILs, FOXP3⁺ Tregs and the vertical growth phase. The results show that MVD, TILs and FOXP3⁺ Tregs substantially influence cutaneous melanoma microenvironment.

We found significant topographic differences of the parameters between central areas of tumors and their boundaries.

Keywords: malignant melanoma; angiogenesis; nestin; microvascular density; CD90/Thy1; FOXP3

1. Introduction

Cutaneous malignant melanoma (CMM) is highly aggressive with poor prognosis and high resistance to therapy. Further, prognosticators remain controversial and are generally based on the evaluation of the mitotic rate, regression, tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and growth phase [1]. Hence, there is an urgent need to identify new markers with more reliable predictive values than traditional clinical and histological parameters. Currently, potential reliable markers are a theme of intensive research. In malignant melanoma, like other solid cancers, tumor-stroma interactions that involve complex multiple cellular and molecular factors substantially affect their biological behavior [2,3]. Interactions between melanoma cells and other cell types in the microenvironment are mediated by endocrine and paracrine communication or through direct contact via cell-cell and cell-matrix adhesion, gap or tight junctional intercellular communication. Within a tumor, there are subcompartments with different microenvironmental milieus defined by their access to oxygen and nutrients. Therefore, different cancer cells within a tumor face different microenvironments [4].

A hallmark of solid tumor is abnormal vasculature, known as tumor angiogenesis, which is characterized by the new formation of vascular channels that enhance tumor cell proliferation, local invasion and distant metastasis. Tumor angiogenesis is uncontrolled and, in time, an unlimited process, involving the transition from the avascular to the vascular phases [5,6]. Tumor angiogenesis enhances the supply of oxygen and nutrients to solid tumor cells, which enables them to grow more rapidly and easily when vessels are formed in close proximity. It has been documented that new blood vessel formation is required after tumors attain a size of 1–2 mm [5]. Melanoma neovascularization has been correlated with poor prognosis, ulceration and an increased rate of relapse [6]. Recent studies showed that an effective marker for *in vivo* tumor angiogenesis is nestin, an intermediate filamentous protein that is considered to be a marker of endothelial proliferation [7]. Furthermore, it is also a marker of neuroectodermal stem and progenitor cells, because it is abundantly expressed in proliferating cells during embryonic development [8,9]. As a novel marker for activated blood, as well as lymphatic vessels, thymus cell antigen (CD90/Thy1) has been identified. CD90/Thy1 is a glycoposphatidylinositol-anchored, strongly-glycosylated protein that is expressed on the cell surface and belongs to the class of the immunoglobulin superfamily. It was originally identified as a thymocyte antigen and is a pan T-cell marker in mice. It is also known to be expressed by neurons and fibroblasts [10]. The molecule is expressed exclusively on endothelial cells (EC) at sites of inflammation or tumors, showing signs of activation. In contrast, there was no expression of Thy1 on the cell surface of resting EC in healthy tissues [11–13]. Today, it is thought to be an activation-associated cell adhesion molecule of human dermal microvascular endothelial cells to tumor cells. The mechanisms of tumor cell adhesion to the

endothelium and the subsequent invasion into the surrounding tissue share similarities with the interaction occurring during leukocyte extravasation at sites of inflammation [11,13].

The morphological gold standard for assessing the neovasculature in human tumors has become microvascular density (MVD). This method requires the use of specific markers that highlight the vascular endothelium using immunohistochemical procedures. MVD in primary tumors is significantly associated with metastasis and poorer prognosis in several tumors and is the most predictive in those tumors that induce significant angiogenesis, namely carcinomas of breast and prostate and hematological malignancies [4].

An integral component of the tumor microenvironment is an inflammatory infiltrate, with a wide range of effects, which can act as a double-edged sword. On the one hand, immune cells have been reported to regulate malignant cells, and on the other hand, they may also have tumor-promoting effects. It has been reported that the infiltration of different human malignancies, e.g., ovarian, colorectal and breast with CD8⁺ T lymphocytes is associated with favorable prognosis [14]. Natural killers, dendritic cells and macrophages may also be considered as independent good prognostic indicators in different human cancers [14,15]. Conversely, malignant cells have been documented to create an immunosuppressive microenvironment. In this way, immune cells may help them escape immune surveillance and promote tumor progression. Increasing attention is currently paid to regulatory T-cells (Tregs), which are a subpopulation of CD25⁺CD4⁺ T lymphocytes with suppressive functionality [16]. The forehead transcriptional factor FOXP3 has been identified as a key regulator in the development and proper function of these cells, and it is also the only definitive marker [11,17]. In healthy individuals, the role of Treg is necessary in maintaining immunological tolerance and preventing autoimmune diseases. Activation of Tregs has been shown to lead to inhibition of cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes and NK cells [17]. However, the role of Tregs in cancer development and progression is not clear. A large number of studies have shown that Tregs promote tumor growth by inducing host tolerance against tumor antigens by dampening the T-cell-mediated immune response against the tumor cells and enabling tumor cells to evade anti-tumor immunity. FOXP3 expression in cancers is thus associated with worse overall survival. Moreover, therapeutic inhibition of Tregs was shown to weaken their immunosuppressive effect and improve the course of the disease [14,18]. In malignant melanomas, FOXP3⁺ Treg is thought to be predictive of patient survival as a marker of early metastatic propagation [14].

The objectives of this study were to evaluate MVD with a focus on nestin, CD90-positive vessels and quantification of FOXP3⁺ Tregs in comparison to the numbers of CD3⁺ tumor infiltrating lymphocytes. To examine topographic differences, two distinct areas were analyzed in each lesion, the central area and the peripheral one, at the edge of the tumor adjacent to normal tissues.

2. Results and Discussion

2.1. Results

All obtained results with the Mann–Whitney *U*-test statistical analysis are summarized in Table 1.

Table 1. The table shows a comparison of the results between groups of melanomas (Stages pT1–pT4) and pigmented nevi in the central (C) and at the peripheral (P) areas. The results were statistically evaluated using the Mann–Whitney *U*-test (*p*-values).

Evaluated Parameters	Melanomas (<i>n</i> = 82)					Nevi (<i>n</i> = 25)					<i>p</i>
	Median	Q ₁	Q ₃	Min.	Max.	Median	Q ₁	Q ₃	Min.	Max.	
Nestin C (mm ²)	10	6.75	20	0	62	4	2	9	0	26	0.0001
Nestin P (mm ²)	22	13.75	38	2	78	4	1.5	8.5	0	17	<0.0001
FOXP3 C (mm ²)	30	6.75	75.75	1	192	5	2	10.5	1	36	<0.0001
FOXP3 P (mm ²)	9.5	2	18	1	160	1	1	1	1	21	<0.0001
CD3 C (mm ²)	141	66	425	5	1330	38	21	55	2	158	<0.0001
CD3 P (mm ²)	233.5	153	480	40	980	22	10	31	2	125	<0.0001
CD90 C (mm ²)	0	0	3	0	15	0	0	0	0	4	<0.0001
CD90 P (mm ²)	0	0	1	0	15	0	0	0	0	2	<0.0001
CD3 C/FOXP3 C	6.12	2.21	19.03	0.08	265	7.67	3.32	14.00	0.18	58	0.611
CD3 P/FOXP3 P	33.25	12.23	101.07	2.97	630	20.00	4.70	30.00	2.00	52	0.002

Abbreviations in the table: Q₁ = the first quartile, Q₃ = the third quartile, Min. = minimal value, Max. = maximal value.

2.1.1. Microvascular Density with Anti-Nestin Antibody

The microvascular density was quite low in benign nevi, ranging from 0 to 26 (median 4/mm²). A marked increase was observed in a group of melanomas, with MVD from 2 to 78, median 10 in the center and 22 at the edge, confirming a significantly higher density of nestin-positive vessels (*p* = 0.0001) both in the center and at the edge of tumors (Figure 1; Scheme 1).

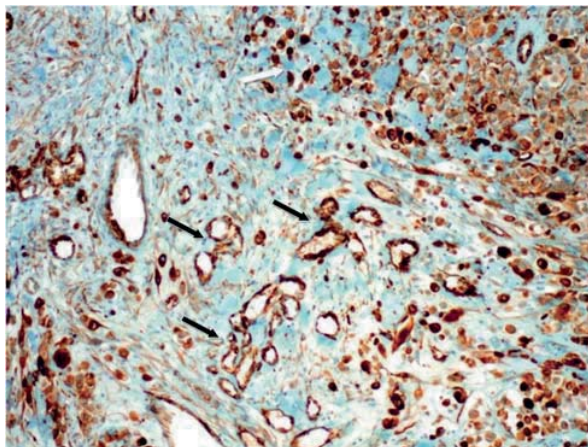
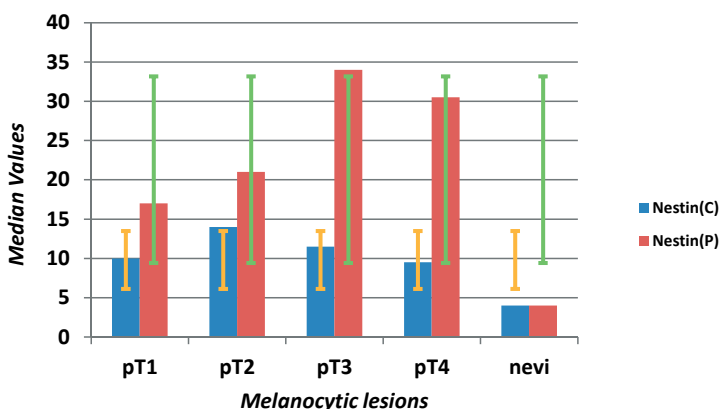


Figure 1. Strong nestin positivity in blood vessels (black arrows) at the edge of malignant melanoma (pT4 stage) (melanoma cells marked by white arrow); original magnification: 100 \times .



Scheme 1. Evaluation of median values (y-axis) and error bars with the standard deviation of microvascular density (MVD) using anti-nestin antibody in the center (C) and at the periphery (P) in different stages of melanomas (pT1–4) and benign nevi (x-axis).

Positive correlation ($p = 0.0001$) was found between MVD at the tumor periphery and the depth of invasion, with median values of 17, 21, 34, 31 for pT1, pT2, pT3 and pT4 groups, respectively. Central areas exhibited very similar MVD values in each group, with a median of 10–14 and no statistical significance.

2.1.2. Microvascular Density with Anti-CD90 Antibody

No CD90 positive vessels were detected in nevi. In melanomas of the pT1 and pT2 stages, we found only individual vessels, both in the center and at the periphery (median zero). A significant increase ($p = 0.0001$) in CD90+ vasculature found for advanced tumors was predominantly intra-tumor vessels. Medians for pT3: three for the center, one for the periphery, pT4: 5.5 for the center and one for the periphery (Figure 2, Scheme 2).

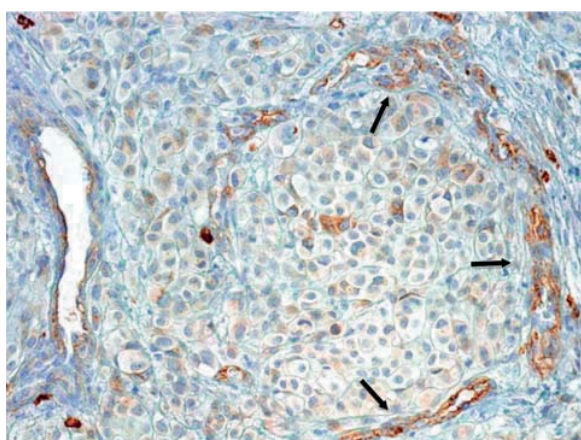
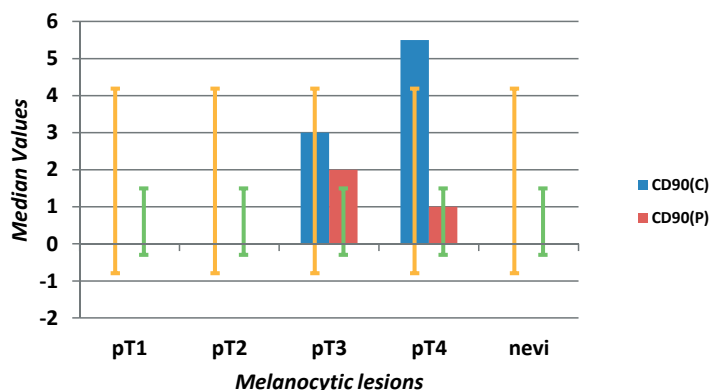


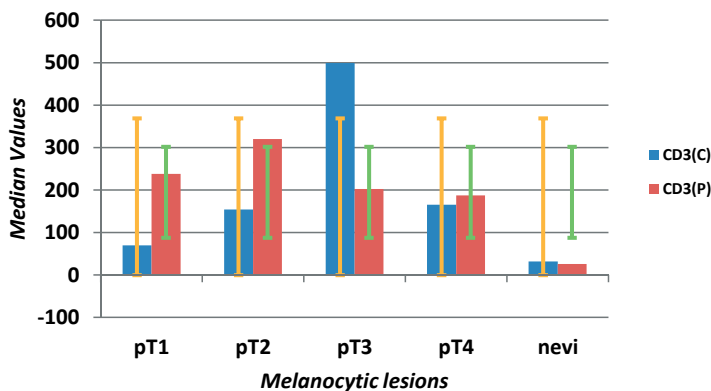
Figure 2. Moderate CD90 positivity of blood vessels (black arrows) in the central area of malignant melanoma (pT4 stage); original magnification: 100×.



Scheme 2. Evaluation of median values (y-axis) and error bars with the standard deviation of MVD using the anti-CD90 antibody in the center (C) and at the periphery (P) in different stages of melanomas (pT1–4) and benign nevi (x-axis).

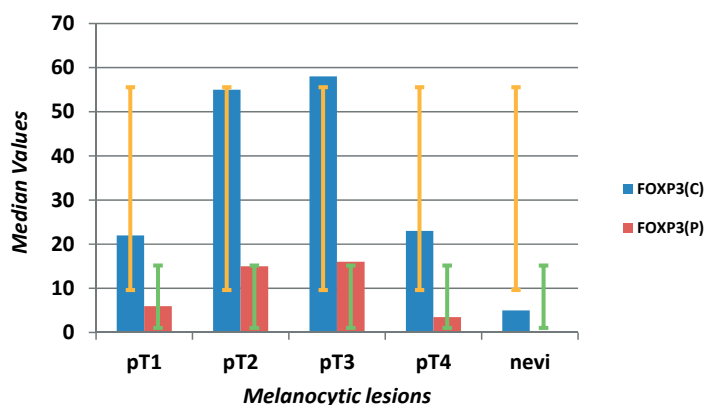
2.1.3. Tumor-Infiltrating Lymphocytes

The numbers of CD3⁺ T lymphocytes in nevi ranged from one to 158, median 38, inside the lesion and 22 at the edge. In melanomas, there was a significant increase from 2 to 1330 elements per 1 mm² ($p = 0.0001$), with a median of 141 in central areas and 234 at the periphery. A significant increase in CD3⁺ tumor infiltrating lymphocytes was found in pT2, pT3 and pT4 *versus* pT1 melanomas ($p = 0.0005$) (Scheme 3). The peripheral area revealed even lymphocytic numbers, without any variations.



Scheme 3. Evaluation of median values (y-axis) and error bars with the standard deviation of CD3⁺ T lymphocytes in the center (C) and at the periphery (P) of the microenvironment in different stages of melanomas (pT1–4) and benign nevi (x-axis).

FOXP3⁺ Tregs were rare in pigmented nevi, with a median of five cells in the center, and one cell at the periphery. The numbers significantly increased in melanomas ($p = 0.0001$), from 1 to 192, median 30 in the center and 10 at the periphery (Scheme 4).



Scheme 4. Evaluation of median values (y-axis) and error bars with the standard deviation of FOXP3⁺ T-regulatory lymphocytes in the center (C) and at the periphery (P) of the microenvironment in different stages of melanomas (pT1–4) and benign nevi (x-axis).

We also found differences in Tregs among individual melanoma groups, where the median Tregs for the pT1 group of melanomas was 22 in the center and six at the periphery, for pT2, 55 in the center, 15 at the periphery, for pT3, 58 in the center, 16 at the periphery and for pT4, 23 in the center and 3.5 at the periphery (Figure 3).

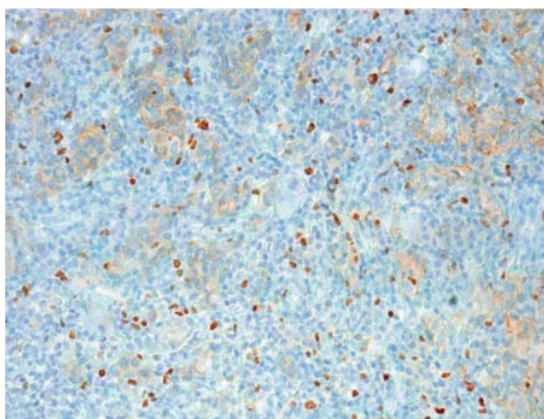
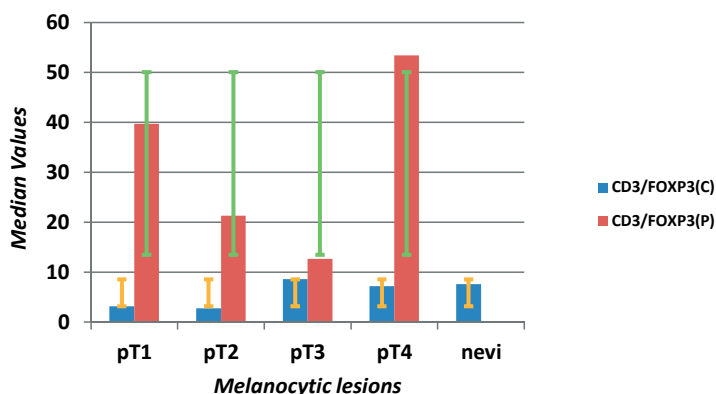


Figure 3. FOXP3-positive T-regulatory lymphocytes in the central region of malignant melanoma (pT3 stage); original magnification: 100×.

We found a significant higher number of Tregs in melanomas of pT2 *versus* pT1 ($p = 0.015$) and pT3 *versus* pT1 ($p = 0.03$). Surprisingly, in the pT4 group, a decrease in Tregs was observed in the center, as well as at the periphery.

The ratio of CD3/FOXP3⁺ Treg showed a significant shift for Tregs in pT2 and pT3 groups at the periphery of lesions ($p = 0.005$) (Scheme 5).

No associations were found with lymph node status or distant metastases.



Scheme 5. Evaluation of median values (y-axis) and error bars with the standard deviation of the CD3/FOXP3 ratio in the center (C) and at the periphery (P) of the microenvironment of different stages of melanomas (pT1–4) and benign nevi (x-axis).

2.2. Discussion

It has been determined that cancer progression is not solely determined by the characteristic of the tumor, but also by the host response [19]. CD8⁺ T-cells can be unquestionably heralded as one of the principal subsets of T-cells constitutively mediating an effective antitumor response. Activated T-cytotoxic lymphocytes can mediate specific destruction of tumor cells by the release of perforin and several types of granzymes, which are loaded in modified lysosomes [20,21]. CD4⁺ T lymphocytes are also an integral part of immunity, but their specific role in antitumor response remains unclear. They are known to facilitate cytotoxic T-cell (CTL) induction, although these cells have also been shown able to eliminate tumor cells in the absence of CD8⁺ T lymphocytes [22]. CD4⁺ T-cells have been documented to maintain a CTL response, too. During the last decade, a possible negative regulatory role of CD4⁺ T-cells has been described, and the existence of regulatory T-cells has been identified [14,17]. These cells represent about 6% of CD4⁺ T-cells and are present in peripheral blood and within the tumor environment. Antigen-specific activation and cell-cell contact were required for these clones of Tregs to exert suppressive activity. The presence of Tregs at tumor sites suggest that they could have a profound effect on the inhibition of T-cell effector responses against human cancers [17]. Besides anti-inflammatory cytokines, Tregs inside the tumor may repress immunity via other mechanisms. For example, they may inhibit T-cell proliferation. Whether the regulatory cells naturally exist in the host or whether they initially arrive as helper T-cells and only convert later is not altogether clear. Anti-tumor lymphocytes migrating to the tumor site may become compromised or may adversely adapt to the suppressive environment to promote growth instead of regression [16]. In agreement with these data, recent studies have revealed that the type, not the quantity of tumor-infiltrating cells seems to be a more critical determinant of prognosis. Since cancer is a disease caused by an array of various types of mutations, differences in T-cell subsets are not altogether surprising. Melanoma is one of those tumors known to possess the ability to elicit a profound immune response. Some data show that the induction of a strong immune response in patients with melanoma may improve survival [18,23]. Numerous immune-based therapies (involving cytokines, antibodies, cancer vaccines, adoptive

immunotherapy and combinations of these therapeutic agents and modalities) are the focus of studies on alternative therapeutic approaches. Although cancer vaccines and adoptive T-cell transfer have been shown to increase the levels of the circulating tumor antigen-specific T-cells, these approaches produce clinical responses in only a few patients [17]. Recent studies have suggested that the presence of FOXP3⁺ Tregs in the tumor microenvironment, the expression of inhibitor ligands on melanoma cells, the secretion of immunosuppressive factors by melanoma cells and the activity of nutrient-catabolizing enzymes may contribute to the resistance of the tumor to immune destruction. It has been reported that high numbers of circulating Tregs are associated with rapid tumor progression in experimental animal models of melanoma and in patients with melanoma. In these patients, the presence of FOXP3⁺ cells in primary tumor has also been associated with a higher frequency of metastases in the sentinel lymph node [12,24]. On the other hand, the blocking of normal mechanisms responsible for the downregulation of immune responses has been shown to improve melanoma outcome efficiently [14]. In our study, we focused on evaluating the FOXP3⁺ Tregs, as well as the CD3⁺/Treg ratio. While the density of these cells was very low in benign nevi, we confirmed their increase in melanomas, both inside and at the tumor edge. It was postulated that a major determinant of immune cell infiltration may be the stage of disease, where host immune response may decrease with increasing tumor growth [25]. In agreement with this finding is increased FOXP3⁺ Tregs in pT2 and pT3 melanoma stages in our study, with the most pronounced changes in the CD3⁺/Treg ratio at the periphery of tumors. The increase in Tregs density may represent a mechanism of tumor resistance to immune destruction, creating an immunosuppressive melanoma microenvironment. Surprisingly, pT4 melanomas exhibited lower Tregs values and high a CD3⁺/Treg ratio, particularly at the periphery. We suggest that low numbers of FOXP3⁺ accompanied by high TIL numbers may paradoxically be a feature of tumor progression, as was described for colorectal carcinomas [26]. The presence of cytotoxic T lymphocytes in advanced tumors may be a consequence of the greater production of abnormal peptides resulting in altered DNA repair, a typical feature of the genetic instability of malignancies [26,27]. Moreover, genetically-unstable tumors are often HLA class I-negative and might escape T-cell-mediated immune killing [19].

It has been well documented that angiogenesis is crucial for cutaneous melanoma progression, where melanoma neovascularization has been correlated with poor prognosis and an increased rate of relapse [6]. A possible explanation is that the increased vasculature enhances the chance for tumor cells to enter the circulation. Moreover, newly-formed vessels or capillaries have leaky and weak basement membranes, through which tumor cells can penetrate more easily than mature vessels [28]. Angiogenesis is a complicated and dynamic process, whose measurement in tissue provides only a snapshot, not straightforward views of tumors. Despite its limitation, microvascular density (MVD) counting has become the morphological standard for assessing the neovasculature in human tumors, with prognostic and predictive impact [4]. MVD seems to correlate with outcome, especially in high-grade tumors. It is widely assumed that tumors with high MVD are good candidates for clinical trials of antiangiogenic therapies, whereas tumors with typically low MVD are thought to be poor candidates for such clinical trials. Nevertheless, despite the initial confirmatory publications, numerous reports fail to show a positive association between increasing tumor vascularity and reduced tumor outcome [4,29]. One has to consider that heterogeneous methodologies used to calculate MVD among different studies might play a role. However, other factors have to be considered, too, such as tumor

topography and functional changes in the endothelium. Topography is important in the differentiation of tumor vessels into those supplying the invading tumor edge and those serving the inner tumor area.

As adhesive interactions between tumor cells and endothelium are critical steps in tumor metastasis, it is not surprising that functionally- and phenotypically-changed endothelium may substantially contribute to cancer progression. In accordance with previous explorations, we confirmed significantly higher MVD counts in melanomas *versus* benign tissue [30]. Moreover, we found markedly-enhanced vascularization in advanced pT3 and pT4 melanomas. As far as the predictive role of MVD is concerned, we cannot confirm a direct association, as none of our tumors within a five-year follow-up formed either distant metastasis or relapsed. However, a lack of correlation between MVD and tumor outcome was described in sinonasal, oral and canine melanomas, too [14,31]. In our study, we focused on activated, proliferating endothelium, using antibodies to highlight it—nestin and CD90/Thy1—instead of the widely-used CD31 or CD34 [28,32].

In this study, we found higher MVD of nestin-positive vessels in melanomas *versus* nevi, especially in advanced tumors. Although areas of hot spots were not infrequently seen within the inner tumor area, they usually predominated at the tumor edge—the zone of tumor/normal tissue interaction. Peripheral tumor areas are composed of typical capillaries derived from pre-existing vessels. Central areas of tumors, on the other hand, are at least partly made up of tube-like endothelial structures, known as vasculogenic mimicry (VM), that are generated directly by the tumor cells [15]. The molecular mechanisms that underlie VM are not fully clear, but metalloproteinases via their cleavage of laminin, E-cadherin by promoting adherence of the VM channel wall to tumor cells, tumor cell dedifferentiation and tumor microenvironment have been shown to play a role in VM. A three-stage phenomenon among VM channels, mosaic blood vessels and endothelium-dependent blood vessels has been proposed, where all three patterns participate in tumor blood supply. These facts may explain why therapeutic strategies targeting endothelial cells have no effect on tumor cells [6]. They may also partly explain why MVD measurement is not a direct predictor of anti-angiogenic therapy [4].

A good candidate for the detection of functionally-altered vessels seems to be CD90/Thy1. This molecule plays an important role in the adhesion of tumor cells to the endothelium and is associated with the specific interaction of the $\alpha v \beta 3$ integrin on melanoma cells. This interaction mediates the binding of melanoma cells to the endothelium. Blocking $\alpha v \beta 3$ reduced the adhesion of $\alpha v \beta 3$ -expressing melanoma cells to the level of melanoma cells lacking $\alpha v \beta 3$ [13]. Except for blood vessels, CD90/Thy-1 was found to be highly expressed on lymphatic endothelial cells [11,12]. We found no CD90 expression on endothelium of normal skins and nevi. Similarly, early-stage melanomas pT1 and pT2 had only very low numbers of CD90⁺ vessels. Advanced melanomas in pT3 and pT4 groups showed a significantly higher density of CD90-positive vessels, especially in central regions. These findings confirm phenotypically- and functionally-altered vascularization, especially in advanced-stage melanomas, and suggest a potential negative prognostic role of the protein in the disease.

3. Experimental Section

Archival cases of 82 cutaneous malignant melanomas and 25 benign pigmented compound or intradermal nevi were evaluated. Adult patients of both sexes, aged from 42 to 69, were included. The melanomas were divided according to the AJCC TNM classification for melanoma staging into

four groups—pT1 ($n = 35$ melanomas), pT2 ($n = 17$ melanomas), pT3 ($n = 18$ melanomas) and pT4 ($n = 12$ melanomas) [33]. The corresponding H&E slides were first reviewed by the pathologist for confirmation of diagnosis and adequacy of the material. All selected tissue samples were formalin-fixed and paraffin-embedded. The study was performed on 5 μm -thick tissue sections by an indirect immunohistochemical method and stained in an automated immunostainer (VENTANA BENCHMARK XT, Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA), in which all steps of the procedure were done. After deparaffinization, rehydration and blocking of endogenous peroxidase activity, all sections were incubated with a primary antibody at a room temperature. We used monoclonal mouse anti-nestin antibody (Millipore, Darmstadt, Germany, clone 10C2, Cat. #MAB5326, dilution 1:75, incubation time 20 min), monoclonal rabbit anti-FOXP3 antibody (Novus Biologicals, Cambridge, UK, clone SP97, NBP2-12498, dilution 1:150, incubation time 20 min), anti-CD3 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark, polyclonal Rabbit Anti-human, Code 1580, dilution 1:50, incubation time 32 min) and rabbit monoclonal anti-CD90 antibody (RabMAbs, Abcam, Cambridge, UK, clone EPR3133, ab133350, dilution 1:100, incubation time 28 min). No primary antibody needed an antigen retrieval step. For detection, we used the VENTANA detection kit (VENTANA iVIEW™ DAB Detection Kit, Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA, Catalogue No. 760-091), which is standardized to detect mouse IgG, IgM and rabbit IgG antibodies, without any further requirements on dilution or titration of the solutions. As a part of the kit, there is streptavidin-horseradish peroxidase complex conjugated to the biotin-bound secondary antibody, as well as hydrogen peroxide substrate and DAB (diaminobenzidine) for visualization. The whole set of cases was used for each analyzed marker. All parameters were evaluated by light microscopy counting capillary lumens, FOXP3⁺ and CD3⁺ lymphocytes per unit area of 1 mm² in a “hot spot”—a field with the highest capillary density or the highest lymphocytic infiltrate. We counted at least two fields for each tumor. Both the central areas of tumors (C) and their periphery (P) were measured. The differences between malignant and benign melanocytic lesions were evaluated. In a group of melanomas, obtained data were compared with the depth of invasion, lymph node and distant metastases status.

The results were statistically evaluated using the Mann–Whitney *U*-test and Kruskal–Wallis test with Bonferroni correction. *p*-values of 0.05 or less were considered to be statistically significant.

4. Conclusions

In summary, the results show that MVD, TILs and FOXP3⁺ Tregs are substantially involved in the alteration of the cutaneous melanoma microenvironment. More marked changes were observed, especially in advanced stages of the disease. We also confirmed that there are significant topographic differences of the parameters between central areas of tumors and their boundaries. However, for determination of the analyzed parameters as unequivocal prognostic and predictive factors of melanoma, further studies are needed.

Acknowledgments

This work was supported by Grant IGA LF 2014 003.

Author Contributions

Vladimir Zidlik: wrote the paper, analyzed the data; Svetlana Brychtova: conceived and designed the experiments, wrote the paper; Magdalena Uvirova: contributed reagents/materials/analysis tools; Dusan Ziak: performed the experiments; Jana Dvorackova: contributed reagents/materials/analysis tools.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Eriksson, H.; Frohm-Nilsson, M.; Järås, J.; Kanter-Lewensohn, L.; Kjellman, P.; Månsson-Brahme, E.; Vassilaki, I.; Hansson, J. Prognostic factors in localized invasive primary cutaneous malignant melanoma: Results of a large population-based study. *Br. J. Dermatol.* **2015**, *172*, 175–186.
2. Brandner, J.M.; Haass, N.K. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology* **2013**, *45*, 443–452.
3. Mao, Y.; Poschke, I.; Wennerberg, E.; de Coana, P.; Brage, S.E.; Schultz, I.; Hansson, J.; Masucci, G.; Lundqvist, A.; Kiessling, R. Melanoma-educated CD14+ cells acquire a myeloid-derive suppressor cell phenotype through COX-2-dependent mechanisms. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3877–3887.
4. Nico, B.; Benagiano, V.; Mangieri, D.; Maruotti, N.; Vacca, A.; Ribatti, D. Evaluation of microvascular density in tumors, pro and contra. *Histol. Histopathol.* **2008**, *23*, 601–607.
5. Matsuda, Y.; Hagio, M.; Ishiwata, T. Nestin: A novel angiogenesis marker and possible target for tumor angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* **2013**, *19*, 42–48.
6. Ria, R.; Reale, A.; Castrovilli, A.; Mangialardi, G.; Dammacco, F.; Ribatti, D., Vacca, A. Angiogenesis and prognosis in human melanoma. *Dermatol. Res. Pract.* **2010**, *2010*, Article ID 185687.
7. Ehrmann, J.; Kolar, Z.; Mokry, J. Nestin as a diagnostic and prognostic marker: Immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J. Clin. Pathol.* **2005**, *58*, 222–223.
8. Brychtova, S.; Fiuraskova, M.; Hlobilkova, A.; Brychta, T.; Hirnak, J. Nestin expression in cutaneous melanomas and melanocytic nevi. *J. Cutan. Pathol.* **2007**, *34*, 370–375.
9. Janikova, M.; Skarda, J.; Dziechciarkova, M.; Radova, L.; Chmelova, J.; Krejci, V.; Sedlakova, E.; Zapletalova, J.; Langova, K.; Klein, J.; *et al.* Identification of CD133+/nestin+ putative cancer stem cells in non-small cell lung cancer. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech Repub.* **2010**, *154*, 321–326.
10. Kretschmer, S.; Dethlefsen, I.; Hagner-Benes, S.; Marsch, L.M.; Garn, H., König, P. Visualization of intrapulmonary lymph vessels in healthy and inflamed murine lung using CD90/Thy-1 as a marker. *PLoS ONE* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0055201.
11. Jurisic, G.; Iolyeva, M.; Proulx, S.T.; Halin, C.; Detmar, M. Thymus cell antigen 1 (Thy1, CD90) is expressed by lymphatic vessels and mediates cell adhesion to lymphatic endothelium. *Exp. Cell Res.* **2010**, *316*, 2982–2992.
12. Schubert, K.; Gutknecht, D.; Köberle, M.; Anderegg, U.; Saalbach, A. Melanoma cells use Thy-1 (CD90) on endothelial cells for metastasis formation. *Am. J. Pathol.* **2013**, *182*, 266–276.

13. Saalbach, A.; Wetzel, A.; Hausteiner, U.F.; Sticherling, M.; Simon, J.C.; Anderegg, U. Interaction of human Thy-1 (CD90) with the integrin $\alpha\beta3$ (CD51/CD61): An important mechanism mediating melanoma cell adhesion to activated endothelium. *Oncogene* **2005**, *24*, 4710–4720.
14. Gerber, A.L.; Müntz, A.; Schalpbach, C.; Shafingi, M.; Kiermeir, D.; Hüsler, R.; Hunger, R.E. High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression. *Br. J. Dermatol.* **2014**, *170*, 103–109.
15. Zhang, S.; Zhang, D.; Sun, B. Vasculogenic mimicry: Current status and future prospects. *Cancer Lett.* **2007**, *254*, 157–164.
16. Wilke, M.C.; Wu, K.; Zhao, E.; Wand, G.; Zou, W. Prognostic significance of regulatory T cells in tumor. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 748–758.
17. Niu, J.; Jiang, C.H.; Li, C.H.; Liu, L.; Li, K. Foxp3 expression in melanoma cells as a possible mechanism of resistance to immune destruction. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 1109–1118.
18. Baumgartner, J.; Wilson, C.; Palmer, B.; Richter, D.; Banerjee, A.; McCarter, M. Melanoma induces immunosuppression by upregulating FOXP3⁺ regulatory T cells. *J. Surg. Res.* **2007**, *141*, 72–77.
19. Deschoolmeester, V.; Baay, M.; Marc, V.E.; Weyler, J.; Vermeulen, P.; Lardon, F.; Vermorken, J.B. Tumor infiltrating lymphocytes: An intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol.* **2010**, *12*, 11–19.
20. Titu, L.V.; Monson, J.R.; Greenman, J. The role of CD8⁺ T cells in immune responses to colorectal cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2002**, *51*, 235–247.
21. Loose, D.; van de Wiele, C. The immune system and cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24*, 369–376.
22. Yu, P.; Fu, Y. Tumor-infiltrating T lymphocytes: Friends or foes? *Lab. Investig.* **2006**, *86*, 231–245.
23. Lizee, G.; Overwijk, W.W.; Radvanyi, L.; Gao, J.; Sharma, P.; Hwu, P. Harnessing the power of the immune system to target cancer. *Annu. Rev. Med.* **2013**, *64*, 71–90.
24. Ma, M.W.; Medicherla, R.C.; Qian, M.; Vega-Saenz de Miera, E.; Friedman, E.B.; Berman, R.S.; Shapiro, R.L.; Pavlick, A.C.; Ott, P.A.; Bhardwaj, N.; *et al.* Immune response in melanoma: An in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod. Pathol.* **2012**, *25*, 1000–1010.
25. Koch, M.; Beckhove, P.; Op den Winkel, J.; Autenrieth, D.; Wagner, P.; Nummer, D.; Specht, S.; Antolovic, D.; Galindo, L.; Schmitz-Winnenthal, F.H.; *et al.* Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity *in situ*. *Ann. Surg.* **2006**, *244*, 986–992.
26. Prall, F.; Dührkop, T.; Weirich, V.; Ostwald, C.; Lenz, P.; Nizze, H.; Barten, M. Prognostic role of CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum. Pathol.* **2004**, *35*, 808–816.
27. Casati, C.; Dalerba, P.; Rivoltini, L.; Gallino, G.; Deho, P.; Rini, F.; Belli, F.; Mezzanzanica, D.; Costa, A.; Andreola, S.; *et al.* The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Res.* **2003**, *63*, 4507–4515.
28. Teranishi, N.; Naito, Z.; Ishiwata, T.; Tanaka, N.; Furukawa, K.; Seya, T.; Shinji, S.; Tajiri, T. Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* **2007**, *30*, 593–603.

29. Pastushenko, I.; Vermuelen, P.B.; Carapeto, F.J.; van den Eynden, G.; Rutten, A.; Ara, M.; Dirix, L.Y.; van Laere, S. Blood microvessel density, lymphatic microvessel density and lymphatic invasion in predicting melanoma metastases: Systematic review and meta-analysis. *Br. J. Dermatol.* **2014**, *170*, 66–77.
30. Kerr, E.H.; Wang, D.; Lewis, J.S.; Said-Al-Naief, N.; Hameed, O. Lack of correlation between microvascular density and pathological features and outcomes in sinonasal and oral mucosal melanomas. *Head Neck Pathol.* **2011**, *5*, 199–204.
31. Cuitino, M.C.; Massone, A.R.; Idiart, J.R. Lack of prognostic significance of angiogenesis in canine melanocytic tumours. *J. Comp. Pathol.* **2012**, *147*, 147–152.
32. Ishiwata, T.; Matsuda, Y.; Naito, Z. Nestin in gastrointestinal and colorectal cancers: Effects on cells and tumor angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* **2011**, *17*, 409–418.
33. Gershenwald, E.J.; Soong, S.; Balch, M.Ch.; On behalf of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Melanoma Staging Committee. 2010 TNM staging system for cutaneous melanoma and beyond. *Ann. Surg. Oncol.* **2010**, *17*, 1475–1477.

© 2015 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Detection of nano- and micro-sized particles in routine biopsy material - pilot study

Jana Dvorackova^a, Hana Bielnikova^b, Jana Kukutschova^{c,d}, Pavlina Peikertova^e, Peter Filip^{c,e}, Karol Zelenik^b, Pavel Kominek^b,
Magdalena Uvirova^f, Jana Pradna^g, Zuzana Cermakova^h, Igor Dvoracek^a

Background. Nanotechnology is receiving enormous funding. Very little however is known about the health dangers of this technology so far. Chronic tonsillitis is one of a number of diseases called idiopathic. Among other factors, the tonsils are exposed to suspended particles in inhaled air including nano particles. The objective of this study was to detect and evaluate metallic particles in human tonsil tissue diagnosed with chronic tonsillitis and in amniotic fluid as a comparison.

Methods. Scanning electron microscopy with energy dispersive X-ray spectroscopy (SEM-EDX) was used for identification of solid particles in a total of 64 samples of routinely analyzed biopsy and cytologic material.

Results. Almost all samples were found to contain solid particles of various metals. The most frequent, regardless of diagnosis, were iron, chromium, nickel and aluminium. The size, determined using SEM, varied from around 500 nm to 25 µm. The majority formed aggregates of several micrometers in size but there were a significant number of smaller (sub-micrometer or nano-sized) particles present. The incidence of metallic particles was similar in child and adult tissues. The difference was in composition: the presence of several metals in adults was due to occupational exposure.

Conclusions. The presence of metallic particles in pathologically altered tissues may signal an alternative causation of some diseases. The ethiopathogenic explanation of these diseases associated with the presence of nano-sized particles in the organism has emerged into a new field of pathology, nanopathology.

Key words: pathologic processes, inflammation, metals, particles

Received: July 9, 2012; Accepted: November 13, 2012; Available online: December 10, 2012
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2012.104>

^aFaculty of Medicine, University of Ostrava, Syllabova 19, 703 00 Ostrava, Czech Republic

^bFaculty Hospital Ostrava, 17. listopadu 1790, 708 52 Ostrava

^cNanotechnology Center, VSB - Technical University Ostrava, 17. listopadu 15, 70833 Ostrava

^dRegional Materials Science and Technology Centre, VSB - Technical University Ostrava, 17. listopadu 15, 70833 Ostrava

^eCenter for Advanced Friction Studies, Southern Illinois University at Carbondale, Carbondale, IL 62901, USA

^fCGB Laboratory Ltd., Korenskeho 10, 703 00 Ostrava

^gInstitute of Pathology, Ceske Budejovice Hospital, B. Nemcove 585/54, 370 01 Ceske Budejovice

Corresponding author: Jana Dvorackova, e-mail: jana.dvorackova@fno.cz

INTRODUCTION

Nano-sized particles (< 100 nm) have properties that may pose risks to human health and the environment. An Italian research team has discussed the potential association between some oncological changes, inflammatory responses, cardiovascular and other cryptogenic diseases and the presence of nano-sized particles deposited in various tissues within the human body¹. Nano-sized particles have been described in many studies to be significantly different in terms of their reactivity and behavior in various environmental media (air, water, and soil). This particle fraction settles by gravitation very slowly when emitted into the atmosphere, and thus the risk of inhalation exposure is higher than micrometer particles. These particles below 100 nm in diameter are referred to as nanoparticles or ultrafine particles. The term nanoparticle is used for engineered particles, i.e. products of nanotechnologies with a wide range of applications in medicine, electronics, cosmetics, drug delivery, the food industry, automotive industry and many others. The term ultrafine particles denotes

unintentionally produced particles, which are most often emitted by anthropogenic activities². Road traffic was found to contribute significantly to nano-particulate air pollution caused by diesel emissions³, and wear of brakes⁴ and tires⁵. Pyrometallurgical plants produce particulate emissions down to 10 nm in size containing Fe, Cr, Mn, Ni, Cu, Zn and W (ref.⁶). Various metals are abundant components of particulate air pollution, e.g. wear of automotive brake pad releases Fe, Cu, Ba, and Sb into the environment⁷. Various anthropogenic processes, such as cigarette smoking, may produce these metal-containing particles where the smoke may contain metals such as Al, Cd, Ni, Pb, and Cu in the form of very fine particles¹. Metals, such as Fe, Cu, Zn, Sn, Ba, Sb and Ti are being emitted as nano-sized particles by the combustion of fossil fuels. Nano-sized particles are also being produced by natural sources, such as volcanic activity and forest fires. Whether these nano-sized particles pose any health risk, and what particle size, shape and composition is the most harmful to human health, are unclear.

Nanopathology deals with interactions between

the organism and nano-sized particles from several nanometers in size to several hundreds of nanometers. Nanopathologic diseases, are referred to as diseases which originate in the penetration of nano-sized, mainly inorganic, particles and deposition of micro-sized aggregates in the human and animal body. The first references to these nanopathologies were associated mainly with military patients who developed illness in connection with war conflicts like the "Gulf War Syndrome" and "Balkan Syndrome", etc. Medical examination data of firefighters and rescuers exposed to fine and ultrafine dust emitted after the World Trade Center collapse in New York have also contributed to knowledge on the health impact of fine metallic particle inhalation¹. Metals are known for their carcinogenic potential due to inhibition of the DNA repair mechanisms⁸. A number of studies also confirm the ability of some metals (e.g. Fe) to induce inflammation, tissue damage and cancer by production of reactive oxygen species - free radicals⁹. However, most studies on the health impact of nanomaterials use animal models or cell cultures.

There is current research on the preparation, application and characterization of nano-sized particles, but very little on the potential health risks associated with the production and emissions of these particles into the environment. Nano-sized particles may enter the body via inhalation, digestion and skin penetration. In the body, they can be translocated via the blood and lymphatic system to sensitive target tissues/organs^{1,2,10}. Transport of nano-sized particles across the blood-brain barrier and/or olfactory pathway has been found in some animal studies^{11,12}. The health effects of nano-sized particles are well-documented in various clinical and epidemiological studies. However, the toxicity has been studied using animal models such as rats, rabbits, and monkeys or tissue cultures¹³⁻¹⁷.

The aim of this study was to evaluate the presence of metal-bearing particles in human tonsil tissues and amniotic fluid samples which were chosen for the potential exposure of fetuses to particles suspended in these fluids.

EXPERIMENTAL

Several types of paraffin-fixed human tissues and un-fixed body fluid samples taken from routine biopsies carried out at the Faculty Hospital in Ostrava were analyzed. Tissue samples taken for further analysis were approximately 1 cm³ in size. In order to remove the paraffin, the samples were treated with xylene and acetone and then heated in a thermostat at 58 °C for 48 h to dry the sample for microscopic analysis. All chemicals used for tissue processing were of analytical grade.

During the sample processing for microscopic analysis, ceramic knives were used to prevent contamination of samples by wear particles from stainless steel instruments. These samples were coated with Au and Pd for microscopic analysis using a scanning electron microscope with energy dispersive spectroscopy (SEM-EDX PHILIPS XL 30) operating at 30 keV allowing for analysis of elemental composition. Samples were analyzed in back-scattered

electron mode (BSE), which enables visual detection of different elemental composition compared to the background, i.e. tissue. Body fluid samples (amniotic fluids) were analyzed in the same way after centrifugation and desiccation at room temperature on a glass plate.

Selection of tissue samples was focused mainly on the respiratory tract and nasopharynx due to the assumption that this is the main entrance route of inhaled particles into an organism. Amniotic fluids were selected after the finding that metallic particles may be detected in the tonsil tissue of stillborn fetuses. The most abundant tissues analyzed were tonsil tissues diagnosed with tonsillitis. Within the group, almost one third of samples were tissues from patients diagnosed with chronic tonsillitis, living in a non-industrial region of the Czech Republic with significantly lower pollution. The second group of samples was tonsillar squamous cell carcinoma samples. Further, stillborn fetal tonsils, pulmonary tissue diagnosed with interstitial fibrosis, one sample of brain tissue diagnosed with glioblastoma, and twelve samples of amniotic fluids were analyzed. A summary of single types of samples is presented in Table 1.

Table 1. Number and percentage of single sample types.

Type of tissue	Number of samples analyzed	Percentage [%]
Tonsillar tissue with tonsillitis	39	61
Tonsillar squamous cell carcinoma	11	17
Tonsillar tissue of stillborn fetuses	2	3
Amniotic fluids	12	19

RESULTS

Various metal-bearing solid particles were detected in all samples analyzed as single micro-sized particles or aggregates consisting of many submicron particles reaching the nano-scale. The incidence of metallic particles in tissues with tonsillitis (e.g. from children and adolescent patients) was comparable to tumor samples of tonsillar tissue, mainly from patients over 40 years old. Elemental analysis using EDX determined the presence of metals; however, we can assume that metals, such as Fe, Zn, Pb, Sn, and Al, are present in the form of their oxides or other compounds. Several examples of particles detected are presented in Fig. 1 - 4. The most abundant element was iron separately or in the form of iron alloys together with Cr and Ni. When compared to detected elemental iron, steel particles were also different in morphology. While iron aggregates were relatively round and formed of submicron particles, the steel particles were up to several micrometers in size with sharp edges, which is typical for

Table 2. Metals and metalloids detected in particular sample types.

Sample	Characteristics	Metals and semi-metals detected
Tonsillar tissue	Chronic tonsillitis - children	Fe, Fe-Cr-Ni, Fe-Cr, Fe-Mn-Ni, Fe-Ni, Fe-Mn, Si-Al-Fe, Si-Al, Cu, Al, Zn, Sn, Pb, Ti, Ni, Ba
	Chronic tonsillitis - adults	Fe, Fe-Cr-Ni, Fe-Cr, Fe-Ni, Cu, Al, Zn, Mn, Ti
	Squamous cell carcinoma	Fe, Fe-Cr-Ni, Fe-Cr, Al, Co, Cu, Ni, Sn, Ti, Zn, W
	Stillborn fetuses	Fe, Cu, Zn, Al, Ba

Fe-Cr-Ni, Fe-Cr, Fe-Mn-Ni, Fe-Ni, Fe-Mn - metals present in form of alloys

Si-Al, Si-Al-Fe - elements indicating presence of aluminosilicates

particles produced by mechanical wear⁴. We can see from Fig 1 and 2 that the aggregates consisted of nanoparticles. Based on SEM-EDX analysis of tissue cross sections it is evident from the experimental data that metallic aggregates are located inside the lymphoid elements and epithelial cells of tumors. Uniquely, tungsten particles were detected inside red blood cells or blood vessels. A summary and the frequency of metals and metalloids detected in particular groups of samples are shown in Table 2.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Tissue from chronic tonsillitis, squamous cell carcinoma and several other tissue types were found to contain various metal-bearing solid particles. One hypothesis is that tissue irritation by nano- and micro-sized particles leads to inflammation and/or cell proliferation. In 57 samples of a total 64 analyzed by SEM, various metal-bearing solid particles were found. The size of detected particles/aggregates varied approximately from several hundreds of nanometers to 25 μm . A large number of aggregates contained nano-sized particulate matter (Fig. 1a and 2a). The real size of the smallest particles present can be determined using transmission electron micros-

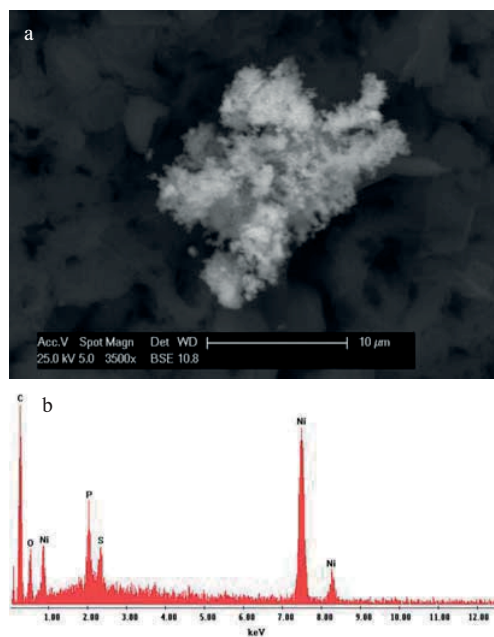


Fig. 1. SEM image (a) with corresponding EDX spectrum (b) of agglomerate detected in squamous cellular carcinoma tissue of 56 year old patient working as driver, previously as miner.

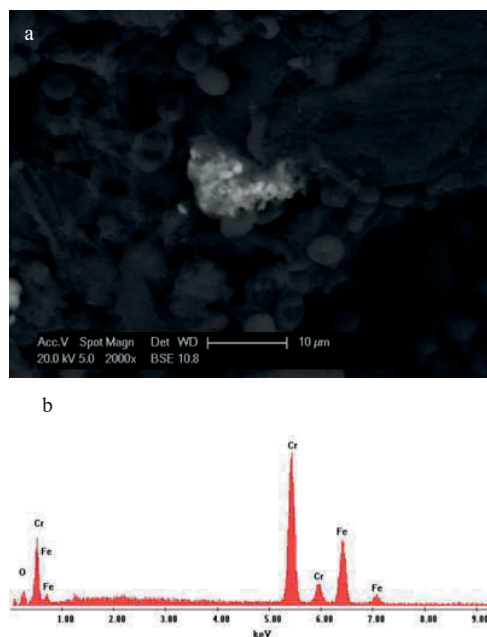


Fig. 2. SEM image of particle/agglomerate (a) with corresponding EDX spectrum (b) revealing chromium and iron detected in tissue diagnosed with tonsillitis chronica of 38 year old patient working as locksmith.

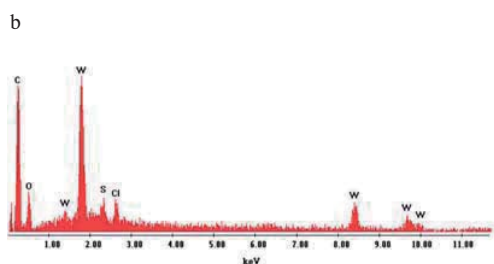
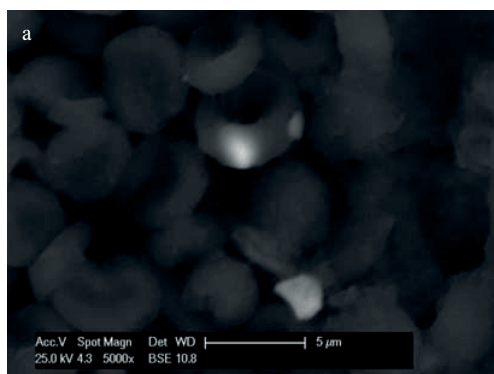


Fig. 3. SEM image of erythrocyte (a) with corresponding EDX spectrum (b) of point analysis in bright spot detecting tungsten (W) inside the cell in glioblastoma cerebri of 62 year old patient working as welder.

copy (TEM). However, there are significant difficulties in detecting these metallic particles in tissue samples using this technique. Samples prepared for purposes of TEM analysis are in the form of ultrathin sections, and there is a much lower probability that solid particles or their aggregates will be found. We found that particles were not distributed homogeneously within tissues and therefore; SEM analysis using the BSE mode is more suitable for analysis of the higher surface area of a sample.

The most abundant element in all tissues was iron together with chromium and nickel, which indicates the presence of alloy particles (Fig. 2). Nevertheless, it is not clear what the origin of these particles is. The next most abundant element was iron (without chromium or nickel), which is probably present in the form of various oxides and may be derived from various anthropogenic sources, e.g. braking of automobiles⁴ and pyrometallurgy. Iron in the form of alloys or alone was detected in almost all sample types analyzed (tonsillitis, carcinoma, amniotic fluids). Several particles containing Si together with Al were found, which may signalize the presence of aluminosilicates from soil. Elements such as Cu and Al are known to be emitted with cigarette smoke¹. These elements were found in the tonsils of children whose parents smoke or actively smoking adolescents and adults. Copper was also detected in tissues in children and adults living near busy roads as well as in tissues of several drivers

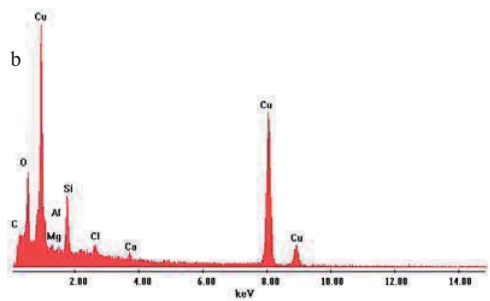
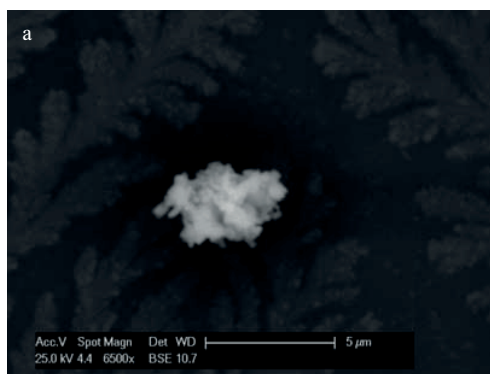


Fig. 4. SEM image (a) with corresponding EDX spectrum (b) of agglomerate detected in dried amniotic fluid.

and traffic police officers. This may be among others due to environmental and occupational exposure to particles generated by the braking of automobiles⁷. Surprisingly, the elemental composition of particles detected in tissues with tonsillitis was comparable to elements detected in tissues with squamous cell carcinoma. The only difference was presence of tungsten in the tonsil tissue of a welder what was not detected in any sample of child tissue or tissue of adults with different occupation. Gas tungsten arc welding is being used for many industrial applications. The temperature during welding may reach up to 6000 °C and the melting point of the tungsten is about 3500 °C. Therefore, we can assume that tungsten may evaporate and form the finest particles (10-100 nm) by condensation¹⁸. Moreover, one glioblastoma (grade IV) of a patient working as a welder contained tungsten particles inside a red blood cell (Fig. 3). Tjalve and Henriksson reported that welding particles that deposit in the nasal/head airway region may reach the brain via olfactory transport and thus bypass the blood-brain barrier¹⁹.

The assumption that tonsils of stillborn fetuses would be free from nano-sized particles was incorrect. In accordance with the literature^{20,21}, the presence of nano-sized particles in amniotic fluid samples, as a proof of transplacental transport, helped to explain nano-sized particles detected in tonsillar tissue samples of stillborn fetuses. However, tonsils of a fetus are in direct contact

with amniotic fluid due to digestion. Metals such as Cu (Fig. 4), Fe, and Zn were detected in amniotic fluids analyzed. Blood circulation of nano-sized particles and their translocation to sensitive target tissues within the body was experimentally proved by tungsten particles detected inside an erythrocyte of glioblastoma (Fig. 3) and the presence of agglomerates of various metal-based particles in lung septa of fibrotic tissue.

It is unknown whether the presence of detected metal-based particles will lead to health problems and the diseases diagnosed. Nevertheless, Hunt et al. analyzed archival autopsy tissues from persons who died from smog exposure during a London smog event in 1952. Using electron microscopy analysis they revealed a predominance of retained soot and metal-bearing particles. Based on the experimental data, they stated that exposure to atmospheric particulate matter, even at low concentrations, is clearly linked to increased mortality and morbidity²². Phillips et al. analyzed autopsy samples of a patient operating a metal arc process for spraying nickel onto bearings who died of respiratory failure 13 days after exposure. Microscopic analysis using TEM revealed nickel particles from 4 to 25 nm inside macrophages in the lung tissue²³. Recent studies described the health impact of nano-sized particles in terms of genotoxicity, i.e. chromosomal aberrations, DNA breakage, point mutations and alteration of gene expression^{8,24-27}.

Recently, some studies have shown that nano-sized particles are able to cross pores of the nuclear membrane of a cell, which indicates potential risk of genetic information damage and subsequent carcinogenesis²⁶. The presence of metallic nano-sized particles in the structures of spinocellular carcinoma supports the hypothesis of a number of studies regarding their potential cancerogenic effect. However, the exact mechanism is not understood.

Based on the experimental data, it can be concluded that chemical analysis of various human tissue samples may be a useful tool for predicting the potential causes of disease, especially idiopathic diseases.

ACKNOWLEDGEMENT

The paper was written in the framework of the "Regional Materials Science and Technology Centre" supported by the Operational Programme "Research and Development for Innovations" project reg. No. CZ.1.05/2.1.00/01.0040, and under the project Nanotechnology - the basis for international cooperation, supported by the Operational Programme 'Education for competitiveness' and financed by the Structural Funds and from the state budget of the Czech Republic, reg. No. CZ.1.07/2.3.00/20.0074. The authors thank Mr. Chad Waters and Mr. Daniel Casten for English corrections and Mrs. Marie Heliova for SEM analyses.

Authorship contributions: ZC, ID, MU: literature search; JD, HB: manuscript writing; JD: study design; KZ, PK, JP: data collection; JK, PP: data analysis; JD,

JK, HB, PP: data interpretation; JK, PP, HB: figures; JD, PF: final approval.

Conflict of interest statement: The authors stated that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

- Gatti AM, Montanari S. Nanopathology: the health impact of nanoparticles. Singapore: Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.;2007. p. 312.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, *Environ Health Perspect* 2005;113:823-39.
- Liatl A, Eggenschwiler PD. Characterization of particulate matter deposited in diesel particulate filters: Visual and analytical approach in macro-, micro- and nano-scales. *Combust Flame* 2010;157:1658-70.
- Kukutschová J, Moravec P, Tomášek V, Matějka V, Smolík J, Schwarz J, Seidlerová J, Šafářová K, Filip P. On airborne nano/micro-sized wear particles released from low-metallic automotive brakes. *Environ Pollut* 2011;159:998-1006.
- Kreider ML, Panko JM, McAtee BL, Sweet LI, Finley BL. Physical and chemical characterization of tire related particles: Comparison of particles generated using different methodologies. *Sci Tot Environ* 2010;408:652-9.
- Cheng YH, Chao YC, Wu CH, Tsai CJ, Uang SN, Shih TS. Measurements of ultrafine particle concentrations and size distribution in an iron foundry. *J Hazard Mater* 2008;58:124-30.
- Kukutschová J, Roubíček V, Malachová K, Pavlíčková Z, Holuša R, Kubačková J, Mička V, MacCrimmon D, Filip P. Wear mechanism in automotive brake materials, wear debris and its potential environmental impact. *Wear* 2009;267:807-17.
- Hartwig A. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol Lett* 1998;102-103:235-9.
- Okada S. Iron-induced tissue damage and cancer: The role of reactive oxygen species-free radicals. *Pathol Internat* 1996;46:311-32.
- Gatti AM, Montanari S, Monari E, Gambarelli A, Capitani F, Parisini B. Detection of micro- and nano-sized biocompatible particles in the blood. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:469-72.
- Claderon-Garciduenas L, Azzarelli B, Acuna H, Garcia R, Gambling TM, Osnaya N, Monroy S, Tizapanzti MDR, Carson J, Villarreal-Calderon A, Rewcastle B. Air pollution and brain damage. *Toxicol Pathol* 2002;30(3):373-89.
- Geiser M, Kreyling WG. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Part Fib Toxicol* 2010;7(2):1-17.
- Hu X, Cook S, Wang P, Hwang H, Liu X, Williams QL. *In vitro* evaluation of cytotoxicity of engineered carbon nanotubes in selected human cell lines. *Sci Tot Environ* 2010;408:1812-7.
- Shvedova AA, Kisin ER, Porter D, Schulte P, Kagan VE, Fadeel B, Castranova V. Mechanism of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: Two face of Janus? *Pharmacol Therap* 2009;121:192-204.
- Firme CP, Bandaru PR. Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems. *Nanomed Nanotech Biol Med* 2010;6:245-56.
- Peters K, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Gatti AM, Monari E. Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: Studies on viability, proliferation and inflammation. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:321-5.
- Hansen T, Clermont G, Alves A, Eloy R, Brochhausen C, Boutrand JP, Gatti AM, Kirkpatrick CJ. Biological tolerance of different materials in bulk and nanoparticulate form in a rat model: Sarcoma development by nanoparticles. *J Roy Soc Interface* 2006;3:767-75.
- Antonini JM, Santamaria AB, Jenkins NT, Albini E, Lucchini R. Fate of manganese associated with the inhalation of welding fumes: Potential neurological effects. *Neurotoxicology* 2006;27:304-10.
- Tjalve H, Henriksson J. Uptake of metals in the brain via olfactory pathways. *Neurotoxicology* 1999;20:181-96.
- Reichrtová E, Dorociak F, Palkovicová L. Sites of lead and nickel accumulation in the placental tissue. *Hum Exp Toxicol* 1998;17(3):176-81.

21. Kaiglová A, Reichrtová E, Adamčáková A, Wsóllová L. Lactate dehydrogenase activity in human placenta following exposure to environmental pollutants. *Physiol Res* 2001;50(5):525-8.
22. Hunt A, Abraham JL, Judson B, Berry CL. Toxicologic and epidemiologic clues from the characterization of the 1952 London smog fine particulate matter in archival autopsy lung tissues. *Environ Health Perspect* 2003;111(9):1209-14.
23. Phillips JI, Green FY, Davies JCA, Muray J. Pulmonary and systemic toxicity following exposure to nickel nanoparticles. *Amer J Ind Med* 2010;53(8):763-7.
24. Mehta M, Chen LCh, Gordon T, Rom W, Tang MS. Particulate matter inhibits DNA repair and enhances mutagenesis. *Mutat Res* 2008;657:116-21.
25. Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X. Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem* 2001;222:183-8.
26. Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 2008;82:493-512.
27. Stone V, Johnston H, Clift MJD. Air Pollution, Ultrafine and Nanoparticle Toxicology: Cellular and Molecular Interactions. *IEEE Transact Nanobiosci* 2007;6(4):331-40.

Comparison of the prevalence of *KRAS*-LCS6 polymorphism (rs61764370) within different tumour types (colorectal, breast, non-small cell lung cancer and brain tumours). A study of the Czech population

Magdalena Uvirova^{a,b}, Jarmila Simova^{a,b}, Barbora Kubova^a, Nina Dvorackova^{a,b}, Hana Tomaskova^b, Monika Sedivcova^c, Petr Dite^{a,b}

Aims. A germline SNP (rs61764370) is located in a let-7 complementary site (LCS6) in the 3'UTR of *KRAS* oncogene, and it was found to alter the binding capability of the mature let-7 microRNA to the *KRAS* mRNA. The aim of the study was to evaluate the frequency of the *KRAS*-LCS6 variant allele in different cancer types that included patients with colorectal cancer (CRC), breast cancer (BC), non-small cell lung cancer (NSCLC) and brain tumour patient subgroups from the Czech Republic. The occurrence of this genetic variant was correlated with the presence of selected somatic mutations representing predictive biomarkers in the respective tumours.

Methods. DNA of tumour tissues was isolated from 428 colorectal cancer samples, 311 non-small cell lung cancer samples, 195 breast cancer samples and 151 samples with brain tumour. Analysis of SNP (rs61764370) was performed by the PCR+RFLP method and direct sequencing. *KRAS*, *BRAF* and *EGFR* mutation status was assessed using real-time PCR. The status of the *HER2* gene was assessed using the FISH method.

Results. The *KRAS*-LCS6 TG genotype has been detected in 16.4% (32/195) of breast cancer cases (in *HER2* positive breast cancer 3.3%, in *HER2* negative breast cancer 20.1%), in 12.4% (53/428) of CRC cases (*KRAS/BRAF* wild type CRC in 10.6%, *KRAS* mutant CRC in 10.1%, *BRAF*V600E mutant CRC in 18.5%), in 13.2% (41/311) of NSCLC samples, (*EGFR* mutant NSCLC patients in 8%, *EGFR* wild type NSCLC in 12.9%), and 17.9% (27/151) of brain tumour cases. The *KRAS*-LCS6 TG genotype was not significantly different across the studied tumours. In our study, the GG genotype has not been found among the cancer samples.

Conclusions. Based on the findings, it is concluded that the occurrence of the *KRAS*-LCS6 TG genotype was statistically significantly different in association with status of the *HER2* gene in breast cancer. Furthermore, significant association between the mutation status of analysed somatic variants in genes of the EGFR signalling pathway (*KRAS*, *BRAF*, *EGFR*) and the *KRAS*-LCS6 genotype in colorectal cancer and NSCLC has not been established.

Key words: *KRAS*-LCS6, *KRAS*, *BRAF*, colorectal cancer, breast cancer, non-small cell lung cancer, brain tumour, genotype, miRNA, polymorphism, FISH

Received: September 30, 2014; Accepted with revision: May 22, 2015; Available online: June 11, 2015
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2015.029>

^aCGB laboratory, Ostrava, Czech Republic

^bDepartment of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Ostrava, Ostrava

^cBiopticka laboratory, Plzen

Corresponding author: Magdalena Uvirova, e-mail: uvirova@pathology.cz

INTRODUCTION

Germline SNP (rs61764370) has been recently extensively studied in relation to several types of cancer, especially in connection with associated risk, prognosis, and/or treatment response/resistance to therapy¹⁻¹¹. The let-7 family of miRNAs has been found to play an important role in tumorigenesis by regulating the expression of multiple oncogenes, including *KRAS*. The *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) gene is one of the most frequently mutated oncogenes in human cancer¹², with almost a quarter of different tumour types showing altered functions of the *KRAS* gene. It encodes a protein, which plays a major role in signal transduction and cell proliferation, is a crucial target of let-7 microRNAs (miRNAs) and is downregulated by these miRNAs (ref.^{3,13,14}). Let-7 miRNAs downregulate the *KRAS* protein expres-

sion by binding to a specific site in the 3'-untranslated region (3'-UTR) of the *KRAS*mRNA (ref.¹³). Altered expression of the let-7 family of microRNAs is implicated in many human cancers¹⁵⁻¹⁷. The SNP (rs61764370), also known as *KRAS*-LCS6, is located in the 3'-untranslated region of the *KRAS* oncogene, consists in a T-to-G base change, and it was found to alter the binding capability of the mature let-7 to *KRAS*mRNA, which resulted in both increased *KRAS* expression and reduced let-7 levels¹⁴. Another group of authors has reported that cancer associated non-coding SNP (rs61764370) variant exerts biological effect not through transcriptional modulation of *KRAS* but rather by tuning the expression of microRNA let-7 (ref.¹⁸).

On the basis of the current evidence and the importance of both miRNA let-7 and *KRAS* oncogenes in human solid tumours, the purpose of our study was to

investigate the frequency of the *KRAS*-LCS6 variant allele in different cancer types that included the following subgroups: colorectal cancer (CRC), breast cancer (BC), non-small cell lung cancer (NSCLC) and brain tumours. Furthermore, the occurrence of this genetic variant was correlated with the presence of selected somatic mutations representing predictive biomarkers in the respective tumour types in Czech population.

MATERIAL AND METHODS

A retrospective analysis was used to test 1085 samples of DNA of tumour tissue from patients in whom *KRAS*, *BRAF*, *HER2* and *EGFR* predictive markers (gene status) were analysed in our laboratory between 2008 and 2014 to determine their eligibility for targeted biological treatment. Furthermore, prognostic markers were analysed to determine brain tumour prognosis. The material for the tumour DNA extraction was collected from 428 samples with a diagnosis of metastatic colorectal cancer confirmed histologically, stage III-IV: 277 male subjects (64.7%) aged 35-91 years / 151 female subjects (35.3%) aged 31-94 years; the median age of the CRC cohort was 65 years. The NSCLC group consisted of 311 samples of tumour DNA: 202 male subjects (65.0%) aged 34-99 years / 109 female subjects (35.0%) aged 32-89 years; the median age of the NSCLC cohort was 67 years. A total of 195 samples of the BC included 121 samples of tumour DNA of invasive ductal carcinoma (62.0%), 15 samples of invasive lobular carcinoma (7.7%), 59 other BC samples (30.3%): 2 male subjects (1.0%) aged 51-77 years / 193 female subjects (99.0%) aged 25-87 years; the median age of the BC cohort was 60 years. A total of 151 samples of tumour DNA in the brain tumour cohort included 117 samples of gliomas, grade I-IV (77.5%), 23 samples of meningiomas (15.2%), 11 samples of other brain tumours (7.3%): 75 male subjects (49.7%) aged 10-77 years / 76 female subjects (50.3%) aged 1-81 years; the median age of the brain tumour cohort was 56.5 years.

The DNA of tumour tissues was isolated from different types of materials: fresh-frozen tissue, formalin-fixed paraffin-embedded tissue and cytology specimens. The commercial kits cobas[®] DNA Sample Preparation Kit or MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche Diagnostics Corporation, GmbH, Mannheim, Germany) were used to isolate the DNA. The DNA quality and quantity was assessed using the NanoPhotometer[™] IMPLLEN (Implen, GmbH, München, Germany).

Analysis of SNP (rs61764370) (*KRAS*-LCS6) was performed by polymerase chain reaction (PCR) and enzymatic digestion. Twenty microliters of PCR reaction mixture contained: PCR water (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), PCR Master Mix (2x) (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), specific primers (0.2 pmol of sense and antisense primers) and DNA. The primers used were as follows: sense, 5'- CCTGAGTAGCTGGGATTACA-3' and antisense, 5'- GGATACCATATACCCAGTGCCTT-3' for the *KRAS*-LCS6 polymorphism (amplify a fragment

of 232 bp). The PCR conditions were as follows: the initial denaturation was at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 95 °C for 20 s, 60 °C for 15 s and 72 °C for 10 s; the final amplification was at 72 °C for 5 min, PCR products (232 bp) were checked by electrophoresis on 3% agarose gel.

Following the PCR, the enzymatic digestion was performed with the FastDigest *HinfI* enzyme (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) for the *KRAS*-LCS6 polymorphism at 37 °C in accordance with the manufacturer's instructions. The reaction was analysed on agarose gel (3%). The gel was stained in an ethidium bromide solution and visualized on Transilluminator UVT-20 (Herolab GmbH, Germany). On the basis of the observed fragments, genotypes were identified as follows: *KRAS*-LCS6 polymorphism; TT genotype: (117 bp + 115 bp), TG (232 bp + 117 bp + 115 bp), and GG (232 bp).

Some positive results were confirmed by direct sequencing. The sequencing reaction was performed using the BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA). 5 µL of PCR products were cleaned with *Exonuclease I* and FastAP *Thermosensitive Alkaline Phosphatase* (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) by incubating at 37 °C for 15 min, followed by 15 min at 80 °C, and held at 4 °C. The reaction mix consisted of 3 µL BigDye[®] Terminator v3.1, 0.5 µL of Big Dye[®] Terminator Sequencing buffer (5x), 2.5 µL of primer at a final concentration 1.25 pmol/µL and 4 µL of cleaned template in a total volume of 10 µL. The reactions were performed according to the following protocol: 96 °C for 1 min; 25 cycles of 96 °C for 10 s, 50 °C for 5 s, 60 °C for 3 min.

The products of the sequencing reaction were cleaned using the BigDye[®] XTerminator Purification Kit (Life Technologies, Foster City, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. After purification, samples were run on Applied Biosystems[®] 3130 Genetic Analyzer and analysed using Sequencing Analysis Software version 5.2 (both Life Technologies, Foster City, CA, USA).

The *KRAS* (mutations in codons 12, 13 and 61) and *BRAF* (V600E) mutation statuses were assessed using real-time PCR (cobas[®] 4800 *KRAS* Mutation Test, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany; cobas[®] 4800 *BRAF* V600 Mutation Test, Roche Molecular Systems, Inc., Branchbury, NJ, USA respectively). Analysis of 40 mutations within the *EGFR* gene (29 deletions in exon 19, L858R, T790M, G719X including G719S, G719A, G719C; S768I, 5 insertions in exon 20) was performed using the real-time PCR method with cobas[®] *EGFR* Mutation Test (CE IVD; Roche) in the NSCLC group. Analysis of the *HER2* gene status was performed by fluorescence in situ hybridisation method (FISH) using the PathVysion *HER-2* DNA probe kit (Abbott Molecular).

The statistical analyses were performed using the chi-squared test and Fisher's exact test, the level of significance 5% (when at least one expected value is < 5, Fisher exact tests are recommended rather than chi square). The statistical evaluation was performed using the Stata software, version 13.

RESULTS

We assessed the frequency of the *KRAS*-LCS6 variant allele in 1085 samples of DNA of different cancer types, including CRC, BC, NSCLC and brain tumour. Using the chi-squared test, there was found a significant difference in the distribution of the G-allele (the TG genotype) across individual groups of BC samples divided into two groups on the basis of the *HER2* gene status, ($P = 0.026$). Table 1.

The 95% confidence interval (CI) for occurrence of the TG genotype was determined (Fig. 1).

Further statistical analysis of the *KRAS*-LCS6 (rs61764370) polymorphism in relation to the mutation status of the *KRAS* and *BRAF* genes was performed in patients with colorectal cancer (Table 3). Using the chi-squared test, no significant statistical difference was found in the distribution of the G-allele (the TG/GG genotype) across individual groups of CRC samples divided into three subgroups on the basis of the mutation status of the *KRAS* and *BRAF* genes, ($P = 0.081$).

A statistical analysis of the *KRAS*-LCS6 (rs61764370) polymorphism in relation to the mutation status of the *EGFR* gene was performed in patients with non-small cell lung cancer (Table 4).

The Fisher's exact test indicated no significant statistical difference in the distribution of the G-allele (the TG

genotype) across individual groups of NSCLC samples divided into two groups on the basis of the mutation status of the *EGFR* gene, ($P = 0.752$).

DISCUSSION

In selected groups of BC depending on the *HER2* gene status, our results show a significant difference in the distribution of G allele (TG genotype) of the *KRAS*-LCS6 polymorphism. The *KRAS*-LCS6 TG genotype SNP

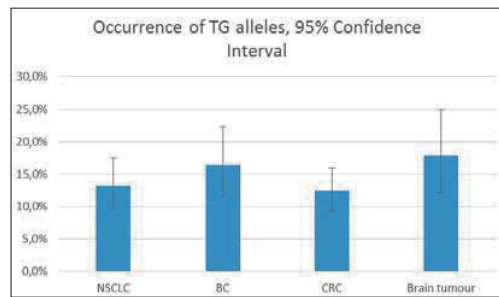


Fig. 1. Distribution of the TG genotype of the *KRAS*-LCS6 (rs61764370) polymorphisms in cancer groups.

Table 1. Distribution of the *KRAS*-LCS6 (rs61764370) genotype in BC patients depending on the *HER2* gene status.

<i>KRAS</i> -LCS6	TT genotype		TG genotype		Total	
	count	%	count	%	count	%
<i>HER2</i> positive breast cancer	29	96.7	1	3.3	30	100
<i>HER2</i> negative breast cancer	123	79.9	31	20.1	154	100

chi-squared test, $P = 0.026$

Table 2. *KRAS*-LCS6 (rs61764370) genotype in experimental groups.

<i>KRAS</i> -LCS6	TT genotype		TG genotype		Total	
	count	%	count	%	count	%
CRC	375	87.6	53	12.4	428	100
NSCLC	270	86.8	41	13.2	311	100
BC	163	83.6	32	16.4	195	100
Brain tumour	124	82.1	27	17.9	151	100

chi-squared test, $P = 0.273$

Table 3. Distribution of the *KRAS*-LCS6 (rs61764370) genotype in CRC patients depending on the mutation status of the *KRAS* and *BRAF* genes.

<i>KRAS</i> -LCS6	TT genotype		TG genotype		Total	
	count	%	count	%	count	%
<i>KRAS</i> / <i>BRAF</i> wild type CRC	135	89.4	16	10.6	151	100
<i>KRAS</i> mutant CRC	152	89.9	17	10.1	169	100
<i>BRAF</i> V600E mutant CRC	88	81.5	20	18.5	108	100

chi-squared test, $P = 0.081$

Table 4. Distribution of the *KRAS*-LCS6 (rs61764370) genotype in NSCLC patients depending on the mutation status of the *EGFR* gene.

<i>KRAS</i> -LCS6	TT genotype		TG genotype		Total	
	count	%	count	%	count	%
<i>EGFR</i> mutant NSCLC	23	92.0	2	8.0	25	100
<i>EGFR</i> wild type NSCLC	249	87.1	37	12.9	286	100
Fisher's exact test, $P = 0.752$						

(rs61764370) was found to be 20.1% in the *HER2* negative subgroup compared to 3.3% in the *HER2* positive breast subgroup. These results can implicate that *KRAS*-LCS6 TG genotype SNP (rs61764370) may lead to an alteration in the *HER2* gene expression profile.

These results are inconsistent with the findings published by Cerne¹⁰, who reported no significant association of the TG/GG genotype in group of BC selected depending on the *HER2* status (the authors analysed 506 cases of BC/ 63 cases were *HER2* positive). In addition, they found a positive association of SNP (rs61764370) only in *HER2* positive tumours, high histopathological grade and both associations were detected only in the HRT users.

In the non-selected group of breast cancer samples, the frequency of the TG genotype of SNP (rs61764370) was shown to be 16.4%, and the results are in line with Cerne¹⁰, who found a frequency of 17.2% for the TG genotype in a group of sporadic breast cancers. Furthermore, there is no significant difference in the frequency of the G-allele (TG/GG genotype) *KRAS*-LCS6 polymorphisms either across cancer groups or between cancer and general population reported in study by Chin LJ¹. Similarly, Paranjape⁶ found no difference in the overall frequency distributions of the *KRAS*-variant genotype in cases of breast cancer and controls. In this study, a significant association of the *KRAS*-LCS6 was only found in a group with breast cancer in premenopausal patients with oestrogen/ progesterone-negative tumours.

In the group of colorectal cancers, a total of 428 histologically confirmed samples were examined and the frequency of the TG genotype SNP (rs61764370) was found to be 12.4%. No statistically significant difference in the distribution of the TG genotype, 10.6% *KRAS*/*BRAF* wild-type, 10.1% *KRAS* mutant, 18.5% *BRAF* mutant was found for individual groups of the CRC samples divided into three subgroups depending on the mutation status of the *KRAS* and *BRAF* genes. Despite an evident tendency of the given allele to be present nearly twice as often in the *BRAF* mutant CRC patients compared to *KRAS*/*BRAF* wild-type and *KRAS* mutant patients, the chi-squared test indicated no statistically significant difference. The identified frequency of the *KRAS*-LCS6 G-allele (TG genotype) in the *KRAS*/*BRAF* wild-type group is in line with the data published by Páez¹⁹. A different result was found in the case of patient stratification to *KRAS* wild-type group and *KRAS* mutant group by Graziano³. These authors found significantly greater frequency of the *KRAS*-LCS6 G allele in the *KRAS* mutant group. Previous studies have shown that SNP is a negative prognostic marker in late-stage co-

lon cancer², a positive prognostic indicator in early-stage colon cancer⁴ and a predictor of response to treatment in colon cancer^{2,5,9}. However, the systematic review and meta-analysis of Langevin and Christensen²⁰ indicated no clear evidence to support an association between the *KRAS*-LCS6 genotype and an overall or progression-free survival among colorectal cancer patients; even after analyses of subgroups stratified by stage and anti-EGFR treatment status. In our analysis, no such result was found and no significant association between the *KRAS* and *BRAF* mutation status and the *KRAS*-LCS6 genotype for the colorectal carcinoma group was established. This is in line with the results published in a Norwegian study²¹ and in Sha²².

In the group of non-small cell lung cancer, a total of 311 histologically confirmed samples were examined. The variant TG genotype was observed in 13.2%. Our results are in line with the results published by Nelson HH²³, whose group of adenocarcinoma patients exhibited a frequency of variant alleles of 14.7%. No statistically significant difference in the distribution of the G allele (TG genotype) was found between individual groups of the NSCLC samples divided into two subgroups depending on the mutation status of the *EGFR* gene.

In a group of patients with brain tumours, constituting a heterogeneous group of 151 histologically confirmed samples, the TG genotype of SNP (rs61764370) was detected in 17.9%. Even in this group, no significant difference in comparison with other types of tumour was found. In the literature available to date, no study has been published so far making a comparison with a similar group of brain tumours possible.

The occurrence of this SNP varies geographically across the global population. This follows from the ALFRED (The ALlele FREquency Database) expected heterozygosities (rs61764370) for persons of European descent²⁴ are 0.05-0.25. Chin LJ¹ reported that in the general population the frequency of the G-allele of *KRAS*-LCS6 is 5.8% and about 7.6% in populations of European descent, based on the genotyping of 2.433 samples (representing 46 geographic populations).

CONCLUSION

The determination of risk factors for cancer provides improved tools for its diagnosis and treatment. Because of the importance of both miRNA let-7 and *KRAS* oncogenes in human solid tumours and their potential use

as a prognostic/predictive marker, the frequency of the G-allele of the SNP (rs61764370) *KRAS*-LCS6 in different types of solid tumours was evaluated. Based on the findings, it is concluded that there is a significant difference in the *KRAS*-LCS6 TG genotype associated with gene *HER2* status in breast cancer. This result can implicate that the *KRAS*-LCS6 G-allele (TG/GG genotype) may lead to alteration in *HER2* gene expression profile (could be a potential genetic marker of a developing *HER2* negative breast cancer). A further analysis of BC patients is necessary to confirm these results.

However, no significant difference in the occurrence of the *KRAS*-LCS6 G-allele (TG/GG genotype) across the studied tumour types (CRC, NSCLC, BC and brain tumour) was found.

ABBREVIATIONS

CRC, Colorectal cancer; NSCLC, Non-small cell lung cancer; BC, Breast cancer; PCR, Polymerase Chain Reaction; RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism; SNP, Single Nucleotide Polymorphism; EGFR, Epidermal growth factor receptor; DNA, Deoxyribonucleic acid; HRT, Hormone replacement therapy; FISH, Fluorescence in situ hybridisation.

ACKNOWLEDGEMENT

Supported by TE - The Technology Agency programme "Competence Centres", TE02000058, Center of competence for molecular diagnostics and personalized medicine.

Author contributions: MU, JS, BK: literature search; MU, JS, BK, PD: manuscript writing and study design; JS, BK, MS: performing analysis and data collection; HT: statistical analysis; MU, JS, BK, ND: data analysis; MU, PD: final approval.

Conflict of interest statement: The authors state there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

REFERENCES

- Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Muller RU, Straka E, Su L, Burki EA, Crowell RE, Patel R, Kulkarni T, Homer R, Zelterman D, Kidd KK, Zhu Y, Christiani DC, Belinski SA, Slack FJ, Weidhaas JB. A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the *KRAS* 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Research* 2008;68(20):8535-40.
- Graziano F, Canestrari E, Loupakis F, Ruzzo A, Galluccio N, Santini D, Rocchi M, Vincenzi B, Salvatore L, Cremolini C, Spoto C, Catalano V, D'Emidio S, Giordani P, Tonini G, Falcone A, Magnani M. Genetic modulation of the Let-7 microRNA binding to *KRAS* 3'-untranslated region and survival of metastatic colorectal cancer patients treated with salvage cetuximab-irinotecan. *Pharmacogenomics Journal* 2010;10(5):458-64.
- Christensen BC, Moyer BJ, Avissar M, Ouellet LG, Plaza SL, McClean MD, Marsit CJ, Kelsey KT. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in the *KRAS* 3' UTR is associated with reduced survival in oral cancers. *Carcinogenesis* 2009;30(6):1003-7.
- Smits KM, Paranjape T, Nallur S, Wouters KA, Weijnenberg MP, Schouten LJ, van den Brandt PA, Bosman FT, Weidhaas JB, van Engeland M. A let-7 microRNA SNP in the *KRAS* 3'UTR is prognostic in early-stage colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2011;17(24):7723-31.
- Sebio A, Paré L, Páez D, Salazar J, González A, Sala, N, Baiget M. The LCS6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA to the *KRAS* 3'-untranslated region: its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Pharmacogenetics and genomics* 2013;23(3):142-7.
- Paranjape T, Heneghan H, Lindner R, Keane FK, Hoffman A, Hollestelle A, Dorairaj J, Geyda K, Pelletier C, Nallur S, Martens JW, Hooning MJ, Kerin M, Zelterman D, Zhu Y, Tuck D, Harris L, Miller N, Slack F, Weidhaas J. A 3'-untranslated region *KRAS* variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis. *Lancet Oncology* 2011;12 (4):377-86.
- Pilarski R, Patel DA, Weitzel J, McVeigh T, Dorairaj JJ, Heneghan HM, Miller N, Weidhaas JB, Kerin MJ, McKenna M, Wu X, Hildebrandt M, Zelterman D, Sand S, Shulman LP. The *KRAS*-Variant Is Associated with Risk of Developing Double Primary Breast and Ovarian Cancer. *PLOS One* 2012;7(5): e37891.
- Ryan BM, Robles AL, Harris CC: *KRAS*-LCS6 Genotype as a Prognostic Marker in Early-Stage CRC-Letter. *Clinical Cancer Research* 2012;18(12):3487-8.
- Zhang W, Winder T, Ning Y, Pohl A, Yang D, Kahn M, Lurje G, LaBonte MJ, Wilson PM, Gordon MA, Hu-Lieskovan S, Mauro DJ, Langer C, Rowinsky EK, Lenz HJ. A let-7 microRNA-binding site polymorphism in 3'-untranslated region of *KRAS* gene predicts response in wild-type *KRAS* patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab monotherapy. *Annals of Oncology* 2011;22(1):104-9.
- Cerne JZ, Stegel V, Gersak K, Novakovic S. *KRAS* rs61764370 is associated with *HER2*-overexpressed and poorly-differentiated breast cancer in hormone replacement therapy users: a case control study. *BMC Cancer* 2012;12:105.
- Chung CH, Lee JW, Slebos RJ, Howard JD, Perez J, Kang H, Fertig EJ, Considine M, Gilbert J, Murphy BA, Nallur S, Paranjape T, Jordan RC, Garcia J, Burtness B, Forastiere AA, Weidhaas JB. A 3'UTR *KRAS* variant is associated with cisplatin resistance in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Annals of Oncology* 2014 Jul 31. pii: mdu367 [Epub ahead of print].
- Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Research* 2012;72(10):2457-67.
- Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120(5):635-47.
- Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. *Trends in Cell Biology* 2008;18(10):505- 16.
- Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocrine-Related Cancer* 2010;17(1):F19-F36.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomir-microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2006;6(4):259-9.
- Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, Jacks T. Suppression of non-small cell lung tumour development by the let-7 micro-RNA family. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2008;105(10):3903-8.
- Crowley EH, Arena S, Lamba S, Nicolantirino F, Bardelli A. Targeted Knock-in of the Polymorphism rs61764370 does not affect *KRAS* Expression but reduces let-7 levels. *Human Mutation* 2014;35(2):208-14.
- Páez D, Paré L, Salazar J, Sala N, Del Rio E, Barnadas A, Marcuello E, Baiget M. Let-7 microRNA complementary site polymorphism in the *KRAS* 3'-UTR region as a genetic regulator in advanced colorectal cancer. Conference: 35th European-Society-for-Medical-Oncology (ESMO);2010, 8-12 October, Milan, Italy. *ANNALS OF ONCOLOGY* Volume: 21, Supplement: 8, p.213-213
- Langevin SM, Christensen BC. Let-7 microRNA-binding-site polymorphism in the 3'UTR of *KRAS* and colorectal cancer outcome: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Medicine* 2014;3(5):1385-95.
- Kjersem JB, Ikdahl T, Guren T, Skovlund E, Sorbye H, Hamfjord J, Pfeifer P, Glimelius B, Kersten CH, Solvang H, Tveit KM, Kure EH. Let-7 miRNA-binding site polymorphism in the *KRAS* 3' UTR; colorectal cancer screening population prevalence and influence on clinical outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated

- with 5-fluorouracil and oxaliplatin+/-cetuximab. *BMC Cancer* 2012;12(1):1-8.
22. Sha D, Lee AM, Shi Q, Alberts SR, Sargent DJ, Sinicrope FA, Diasio RB. Association Study of the let-7miRNA-Complementary Site Variant in the 3'Untranslated Region of the KRAS Gene in Stage III Colon Cancer (NCCTG N0147 Clinical Trial). *Clinical Cancer Research* 2014;20:3319.
23. Nelson HH, Christensen BC, Plaza SL, Wiencke JK, Marsit CJ, Kelsey KT. KRAS mutation, KRAS-LCS6 polymorphism, and non- small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2010;69(1):51-3.
24. Rajeevan H, Soundararajan U, Kidd JR, Pakstis AJ, Kidd KK. "ALFRED: an allele frequency resource for research and teaching." *Nucleic Acids Res* 2012;40(Database issue):D1010-5. doi: 10.1093/nar/gkr924.

Original article

NOD2/CARD15 mutations and the risk of reoperation in patients with Crohn's disease

L. Martinek¹, T. Kupka², J. Šimová³, P. Klvová², M. Bojková²,
M. Uvírová³, P. Dítě², J. Dvoracková⁴, J. Hoch¹, P. Zonca⁵

¹Department of Surgery, 2nd Faculty of Medicine, Charles University Prague and Motol University Hospital, Prague, Department Head: prof. J. Hoch, MD, PhD.

²Department of Gastroenterology, Metabolism and Nutrition, Clinic of Internal Medicine, University Hospital Ostrava, Department Head: ass. prof. A. Martinek, MD, PhD

³Educational and Research Institute AGEL, CGB laboratory Inc, Laboratory for Molecular Genetics and Pathology, Ostrava, Department Head: J. Šimová, M.Sc.

⁴Institute of Pathology, University Hospital Ostrava, Department Head: ass. prof. J. Dvoracková, MD, PhD

⁵Department of Surgery, University Hospital Ostrava and Faculty of Medicine, University of Ostrava, Department Head: ass. prof. P. Zonca, MD, PhD, FRCS

Summary

Introduction: Three NOD2/CARD15 gene variants (3020insC, R702W, G908R) have been identified as genetic risk factors for Crohn's disease patients. However the diagnostic and therapeutic relevance for clinical practice remains limited. The aim of this study was to evaluate the association between these variants, the risk of reoperation and disease phenotype.

Methods: In 76 Crohn's disease patients (41 female, 35 male) with a minimum 5 year follow-up, three polymorphisms of the NOD2/CARD15 gene (R702W, G908R, 3020insC) were tested. Detailed clinical and medical history including surgical procedures and reoperations were obtained by reviewing the medical charts and completed prospectively. Association between the need for reoperation, disease phenotypes and gene variants were analyzed.

Results: 24 patients (32%) showed at least one NOD2/CARD15 mutation. 25 patients (33%) required reoperation, 51 (67%) represented the control group. The expected trend that patients with NOD2/CARD15 variants have a higher frequency of reoperations was not confirmed to a level of statistical significance ($p=0.2688$). Two of the four patients (50%) with the 3020insC variant required further surgery. We did not confirm any association between NOD2/CARD15 mutations and age at diagnosis ($p=0.4356$), behavior ($p=0.6610$), or localization ($p=0.4747$) according to the Montreal classification.

Conclusion: NOD2/CARD15 polymorphisms did not significantly affect the reoperation rate. Homozygosity for the 3020insC variant in the NOD2/CARD15 gene is associated with a high risk of reoperation. NOD2/CARD15 gene variants are not significantly associated with specific disease phenotypes.

Key words: Crohn's disease – NOD2/CARD15 – reoperations

Souhrn

Polymorfismy NOD2/CARD15 genu a riziko reoperací u Crohnovy nemoci

L. Martínek, T. Kupka, J. Šimová, P. Klvaňa, M. Bojková, M. Uvírová, P. Dítě, J. Dvořáčková, J. Hoch, P. Zonča

Úvod: Tři jednonukleotidové polymorfismy (SNP) v NOD2/CARD15 genu (3020insC, R702W, G908R) jsou pro Crohnovu chorobu významným rizikovým faktorem. Jejich diagnostické a terapeutické využití v klinické praxi je však doposud limitované. Cílem studie byla analýza možné asociace těchto polymorfismů s rizikem reoperací a posouzením souvislosti s fenotypem onemocnění.

Metody: U 76 pacientů s Crohnovou chorobou a minimální délkou trvání nemoci 5 let byly testovány tři sekvenční varianty NOD2/CARD15 genu (R702W, G908R, 3020insC). Anamnestická a klinická data, včetně chirurgické léčby byly retrospektivně získány ze zdravotnické dokumentace a prospektivně doplňovány podle protokolu studie. Analyzovány byly souvislosti mezi vybranými genovými polymorfismy, nutností reoperací a fenotypem nemoci.

Výsledky: U 24 pacientů (32 %) se našla alespoň jedna sledovaná varianta v NOD2/CARD15 genu. 25 pacientů (33 %) bylo reoperováno, 51 (67 %) představovalo kontrolní skupinu. Trend vyšší četnosti reoperací ve skupině s genovou mutací nedosáhl statistické významnosti ($p=0,2688$). Dva ze čtyř homozygotů (50 %) nesoucích variantu 3020insC byli opakovaně operováni. Neprokázali jsme signifikantní rozdíly mezi soubory s wild formou a mutovanou formou NOD2/8CARD15 genu s ohledem na věk v době diagnózy ($p=0,4356$), formu onemocnění ($p=0,6610$) a lokalizaci ($p=0,4747$) podle Montrealské klasifikace.

Závěr: Polymorfismy v NOD2/CARD genu signifikantně neovlivnily četnost reoperací, homozygoti nesoucí mutaci 3020insC genu však představovaly výsoce rizikovou skupinu. Fenotyp onemocnění signifikantně nesouvisel s přítomností vyšetřovaných sekvenčních variant.

Klíčová slova: Crohnova choroba – NOD2/CARD15 – reoperace

Rozhl Chir 2015;94:242–246

INTRODUCTION

Crohn's disease is a chronic relapsing inflammatory disease which may affect any part of the gastroin-

testinal tract, most often the terminal ileum and the ileocecal valve. A varied clinical presentation is characteristic, with an unforeseeable course due to complicated interactions between the organism of a ge-

netically predisposed individual and the surrounding environment. Genetic factors have therefore become a focus of intensive study.

Studies on twins [1,2] and works studying the familial incidence of Crohn's disease [3,4] initiated interest in the genetics of this disease. One of the first specific results was establishing an increased incidence of Crohn's disease in association with variants of the CARD15 gene located on chromosome 16q12 coding NOD2 published in 2001 [5]. After that other genes have been associated with Crohn's disease. To date, more than 100 gene mutations associated with Crohn's disease have been identified [6]. Despite intense research, the most significant genetic risk factors remain variants of the NOD2/CARD15 gene and the strongest association with the development of Crohn's disease is the trio of mutations/variants: 3020insC, R702W and G908R [6,7,8]. Carriers of one mutated allele (heterozygote) of the NOD2/CARD15 gene have a 2–4x increased risk of developing Crohn's disease, mutations of two alleles (homozygotes, compound heterozygotes) present an increased risk of 20–40x [7,9].

Based on these findings, other possible associations have been sought. Several studies have analyzed mutations in the NOD2/CARD15 gene and their association with an earlier onset of the disease [6,10], specific localization and behaviour of the disease [6,18,10,11] or complicated disease course [6,12]. Attention has been paid to the prediction of therapeutic response to a specific treatment, which takes into account an individual's genetic variability, aiming to move away from rigid therapeutic regimens to personalized treatment of Crohn's disease [9,13]. The obtained results, however, are inconsistent and do not enable valid and reliable conclusions.

From a surgical viewpoint, it is significant that 70–80% of patients with Crohn's disease undergo surgical intervention in their lifetime [14] and 25–38% of patients require repeated surgical intervention [15]. A number of studies describes an association between NOD2/CARD15 mutations and surgical intervention [6,8,11,12]. The most significant association seems to be with the 3020insC mutation (also termed 1007fs) [8,16,17,18]. The association between mutations in the NOD2/CARD15 gene and repeated surgical interventions has only rarely been studied [11,19]. The possibility of identifying patients with an increased risk for repeated surgical interventions could represent a theoretical basis for future work in tailoring therapy to the individual, either in the sense of primarily aggressive regimens or in the so-called top-down approach (early application of biological therapy).

This work is primarily aimed to analyze the incidence of disease recurrence requiring repeated surgical intervention in association with the selected mutations in the NOD2/CARD15 gene. The secondary goal is to evaluate the association between the studied polymorphisms (3020insC, R702W, G908R) and characteristics of the disease as defined by the Montreal classification.

METHODS

After signing an informed consent form, 76 patients were included in the study, 41 women (54%) and 35 men (46%). Diagnosis of Crohn's disease was based on the results of standard clinical, radiological, endoscopic and histological examinations. The study had a retrospective-prospective character. The data were collected retrospectively from medical documentation of patients diagnosed with Crohn's disease and prospectively supplemented according to the study protocol. The parameters included gender, age, body mass index, comorbidities, smoking (smoker, non-smoker, ex-smoker), disease presentation (primary presentation, recurrence), duration of symptoms, extraintestinal manifestations, Montreal classification for Crohn's disease, CDAI (Crohn's disease activity index), endoscopic findings, medication (5-ASA, corticoids, azathioprine, methotrexate, infliximab, adalimumab), operations (none, acute, elective), type of surgical procedure, operation technique, intraoperative complications, postoperative complications (Clavien-Dindo classification), reoperations, mortality, length of hospital stay, histological findings (macroscopic, microscopic), genetic examination (NOD2/CARD15 – R702W, G908R, 3020insC).

25 patients (33%) underwent more than one surgical intervention. The patients without surgery (24 patients) and patients with only one surgical procedure (27 patients) in the least five years of follow-up represented the control group. The primary surgical procedure included a bowel resection or stricturoplasty. Repeated surgical interventions included any kind of subsequent intervention associated with the primary disease including anorectal procedures with histological confirmation of Crohn's disease. Surgical procedures due to surgical complications (bowel obstruction, bleeding...) or associated with the primary procedure (stoma reversal...) were logically not included into the group of disease recurrence and reintervention. Minimal follow-up for inclusion in the study was five years. Patients with incomplete data were excluded from the study.

A peripheral blood sample was collected from all the patients to test for single nucleotide polymorphisms (SNPs) p.R702W (rs139104022) and p.G908R (rs2066845) in the NOD2/CARD15 gene, which lead to a change in the protein's amino acid sequence and a single base insertion of cytosine in the p.L1007fs sequence (rs2066847, also termed c.3019_3020insC, p.Leu1007fsX1008) leading to the creation of a stop codon and development of a shortened protein. Analysis of these sequence variants was performed from a sample of deoxyribonucleic acid (DNA) isolated from approximately 5 ml of venous blood collected into a sterile test tube containing anticoagulant (EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid). The method used to detect the above-mentioned SNP was by amplification of the targeted areas of the NOD2/CARD15 gene located on chromosome 16q12 using polymerase chain reaction (PCR) followed by cleavage of the created PCR products using restriction enzymes and separation of the resulting fragments in polyacrylamide gel. The group

of patients with the studied variants (24 patients) was represented by patients who had at least one mutation of the three studied variants in the NOD2/CARD15 gene. Results of the clinical study, including the course of the disease and possible recurrences, were blinded in relation to the genetic testing.

The results were presented using descriptive statistic methods – average, standard deviation, median, range for continuous variable, absolute values and relative frequency for categorical variables. Categorical variables were compared using the Fisher exact test, continuous variables were analyzed by the Mann-Whitney test. All tests were two-sided and a p value less than 0.05 was considered statistically significant. Analyses were performed using the STATISTICA program, version 8.

RESULTS

76 patients fulfilled the inclusion criteria and were included in the study. The average age of the included patients was 34 years (standard deviation ±11, median 33 years, range 18–70 years). There were 24 (32%) patients without surgery, 27 (36%) patients underwent one operation based on the study methodology (bowel resection, stricturoplasty). There were 25 (33%) patients with reoperation. Thirteen patients underwent two surgical procedures, 5 patients underwent three procedures, 2 patients underwent four procedures, and 5 or more procedures were required in five patients.

At least one variant of the three studied variants in the NOD2/CARD15 gene was found in 24 patients

(32%) with a confirmed diagnosis of Crohn's disease. Four patients (5%) were compound heterozygotes, meaning patients who had mutations on both alleles of the gene (R702W + 3020insC and 3020insC + G908R), four patients (5%) were homozygotes for the 3020insC mutation, one patient (1%) was homozygote for the R702W mutation.

Demographic and clinical data comparing the group of patients required reoperation with the control group (without or one surgery) are shown in Tab. 1.

The group of patients required further operation was significantly older. There were no differences observed concerning smoking habits and extraintestinal manifestations between the groups. Data from the Montreal classification did not confirm a difference in the age at diagnosis of Crohn's disease or a difference in the localization of the disease in association with disease recurrence and repeated surgical interventions. A significant difference was seen in the disease behaviour with a predominance of stricturing form in the group with need for further surgery.

A trend of a higher relative frequency of the studied variants in the NOD2/CARD15 gene (R702W, G908R, 3020insC) in the group of reoperated patients did not reach statistical significance at the level of significance $p=0.05$.

Two of the four homozygotes (50%) for the 3020insC variant were reoperated.

Results analyzing the parameters of the Montreal classification, smoking and the presence of extraintestinal manifestations were obtained from a subgroup of 54 patients with complete data. Of this subgroup, 16

Tab. 1: Demographic and clinical variables of patients with reoperations and control group

Characteristic	Reoperations (n=25)	Control group (n=51)	p
Gender (men/women)	10 (40%)/15 (60%)	25 (49%)/26 (51%)	0.4587
Age: mean ± SD median, range	40±12; 36 (22–70)	31±10; 28 (18–69)	0.0005
Smoker/nonsmoker/exsmoker (n=54)	1 (6%)/15 (94%)/0 (0%)	2 (5%)/36 (95%)/0 (0%)	0.8848
Montreal classification (n=54):	Reoperations (n=16)	Control group (n=38)	
A1/A2/A3	5 (31%)/11 (69%)/0 (0%)	11 (29%)/25 (66%)/2 (5%)	0.6450
B1/B2/B3/P	3 (19%)/12 (75%)/1 (6%)/0 (0%)	25 (66%)/13 (34%)/0 (0%)/0 (0%)	0.0037
L1/L2/L3/L4	10 (63%)/2 (12%)/4 (25%)/0 (0%)	24 (63%)/6 (16%)/8 (21%)/0 (0%)	0.9222
Extraintestinal manifestations (yes/no)	0 (0%)/16 (100%)	1 (3%)/37 (97%)	0.5125
Mutation NOD2/CARD15	10 (40%)	14 (27%)	0.2688

Tab. 2: Montreal classification and NOD2/CARD15 variants

Montreal classification	Wild form NOD2/CARD15 gene n = 39	Mutation in NOD2/CARD15 gene n = 15	p
Age at diagnosis (A1/A2/A3)	10 (26%)/27 (69%)/2 (5%)	6 (40%)/9 (60%)/0(0%)	0.4356
Behaviour (B1/B2/B3/P)	19 (49%)/19 (49%)/1 (2%)/0 (0%)	9 (60%)/6 (40%)/0 (0%)/0 (0%)	0.6610
Localization (L1/L2/L3/L4)	26 (67%)/6 (15%)/7 (18%)/0 (0%)	8 (54%)/2 (13%)/5 (33%)/0 (0%)	0.4747

patients (30%) need reoperation and 38 patients (70%) represented the control group.

Disease characteristics based on the variants in the NOD2/CARD15 gene are shown in Tab. 2.

Analysis was performed on the set of 54 patients with complete data; 39 patients (72%) had a non-mutated wild-type form of the NOD2/CARD15 gene and 15 (28%) had at least one of the three variants/mutations (R702W, G908R, 3020insC) in the NOD2/CARD15 gene. There was no significant association between the studied polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene and the age at diagnosis, behavior or localization of the disease. Analysis of the results shows a tendency towards earlier disease onset and a more frequent incidence of the ileocolic form in patients with Crohn's disease with NOD2/CARD15 mutation.

DISCUSSION

Crohn's disease is an illness with a complex pathogenesis, which is a reflection of the complicated interaction of many factors, especially genetic predisposition, congenital and acquired immunity, microbial triggers and the surrounding environment. This results in a disease with a highly unpredictable course and with a great risk of recurrence. Research regarding the association between the studied variants in the NOD2/CARD15 gene and Crohn's disease was conducted in two stages. First, the incidence of Crohn's disease and its association with the specific genetic variants was studied. Subsequently, associations between the genetic variants in the NOD2/CARD15 gene and the course of the disease, including response to treatment aiming at possibilities of personalized therapy were analyzed. Although there are a number of known variants significantly associated with the risk of Crohn's disease, the exact mechanisms remain unclear to date. Among those mentioned are dysregulations of the antibacterial response, changes in bowel permeability, and changes in the regulation of congenital and acquired immunity.

In our set of patients, at least one of the three studied variants (R702W, G908R, 3020insC) in the NOD2/CARD15 gene were found in 24 patients (32%) with a confirmed diagnosis of Crohn's disease. In general, there are great ethnic and geographical differences in the incidence of the individual mutations. The relative incidence in European countries ranges from 36–50% [7]; contrarily, these polymorphisms are rarer in Japan, China or Korea [7]. Our result seems to be at the lower end of the range of presented incidence in Europe. A higher incidence in the Czech population was described by authors Hradsky et al. who presented an incidence of at least one polymorphism of the NOD2/CARD15 gene in 46% of adults affected with Crohn's disease [20].

Surgical treatment of Crohn's disease represents a treatment of disease's complications [21,22]. In the literature, the risk of repeated surgical procedures for patients with Crohn's disease ranges from 11–32% within 5 years, 20–44% within 10 years and 46–55% within 20 years [23]. Our group of patients with repeated surgical pro-

cedures was significantly older than the control group, which may be naturally explained by a longer follow-up in these patients. A significantly more frequent incidence of the stricturing form in reoperated patients may also be expected, since stenosis is the most common indication for surgical intervention in Crohn's disease and is a strong predictor of repeated interventions [19,24].

With respect to the presence of the studied variants in the NOD2/CARD15 gene in our group of patients, the expected trend of a higher relative frequency of mutations in the NOD2/CARD15 gene in the group of reoperated patients did not reach a level of statistical significance. This may be due to a type II error (sample size is not large enough to detect a difference). Despite this fact, the tendency towards a more complicated disease course was confirmed [8,16,17,18]. In three independent studies [11,19,25], patients with mutation in the NOD2/CARD15 gene presented an increased risk for repeated surgical interventions and operations were performed earlier. A higher risk of reoperations would theoretically support an indication for more aggressive medication; on the other hand, reliable information regarding the association between genetic risk factors and the response to specific treatment regimes is sparse [6,9,13]. In contrast, in a study published by Maconi et al., where out of 253 patients operated for complications of Crohn's disease 35% of patients underwent at least one reoperation, mutations in the NOD2/CARD15 gene were not associated with a higher risk of reoperation [19].

A comparison of patients-carriers of any of the studied variants in the NOD2/CARD15 gene with patients with a non-mutated (wild-type) form did not show a statistically significant difference in the age at diagnosis, in the behaviour or in the localization of the disease. The only observed trend was earlier incidence and ileocolic localization in patients with the mutation, which, however, did not reach statistical significance. There is a great variability in the literature regarding these findings. The incidence of Crohn's disease at an earlier age, a predominant localization in the ileum, and a stricturing form in patients carrying the mutation in the NOD2/CARD15 gene have been published [6,12,26,27]. In contrast, a meta-analysis by Adler et al. concludes that the NOD2/CARD15 gene is a fairly unreliable predictor of a complicated course including surgical interventions [12]. Similarly a meta-analysis by authors Solon et al., 2013 did not confirm an increased risk of repeated surgical interventions in patients with Crohn's disease and variants in the NOD2/CARD15 gene [28].

A significant limitation of the study is the small number of patients and therefore the possibility of a type II error. Another limitation is the retrospective character of the study. The control group consisting patients without surgery and with only one surgical procedure is also questionable. The purpose of this grouping was to gain a sufficient number of patients for a more objective analysis of the results. The mandatory minimal follow-up interval of five years should eliminate this potential misrepresentation. Another limitation may also be the fact that most studies, including ours, analyze only the selected three sequence

variants (3020insC, R702W and G908R) in the NOD2/CARD15 gene. Only a few authors have attempted to fully sequence the NOD2/CARD15 gene, although it seems that complete sequencing may not be beneficial for predicting complications [7]. On the other hand, it may be expected that only the combination of clinical and genetic factors together with consideration of the surrounding environment may provide clinicians with guidelines for personalizing therapy for patients with Crohn's disease. To date, despite the importance of genetics in the pathogenesis of inflammation, they have not yet played a significant role in clinical practice, neither in the diagnostic process nor in the prediction of the course of the disease and response to medication and surgical treatment.

CONCLUSION

In our group of patients, the studied sequence variations in the NOD2/CARD15 gene were not a definite predictor of a complicated course of Crohn's disease with surgical recurrence - reoperation; however, the results are limited by the small number of patients. Ho-

mozygotes with a mutation in the 3020insC sequence in the NOD2/CARD15 gene represent a high risk group of patients who could profit from personalized aggressive therapy. Prospective multicentric studies with large numbers of patients and a clearly defined unified protocol may help understand the influence of genetic factors on the course of Crohn's disease.

List of abbreviations

5-ASA	5 aminosalicilic acid
CDAI	Crohn's Disease Activity Index
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
NOD2/CARD15	nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 (NOD2) /caspase recruitment domain-containing protein 15 (CARD15)
PCR	polymerase chain reaction
SNP	single nucleotide polymorphism

Conflict of Interests

The authors declare that they have not conflict of interest in connection with the emergence of and that the article was not published in any other journal.

REFERENCES

- Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, et al. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996;312:95–6.
- Spehlmann ME, Begun AZ, Burghardt J, et al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* 2008;14:968–76.
- Kyle J. Crohn's disease in the northeastern and northern Isles of Scotland: an epidemiological review. *Gastroenterology* 1992;103:392–9.
- Lapidus A. Crohn's disease in Stockholm County during 1990-2001: an epidemiological update. *World J Gastroenterol* 2006;12:75–81.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of NOD2 leucinerich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599–603.
- Cleynen I, González JR, Figueroa C, et al. Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. *Gut* 2013;62:1556–65.
- Bhullar M, Macrae F, Brown G1, et al. Prediction of Crohn's disease aggression through NOD2/CARD15 gene sequencing in an Australian cohort. *World J Gastroenterol* 2014;20:5008–16.
- Seiderer J, Brand S, Herrmann KA, et al. Predictive value of the CARD15 variant 1007fs for the diagnosis of intestinal stenoses and the need for surgery in Crohn's disease in clinical practice: results of a prospective study. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:1114–21.
- Niess JH, Klaus J, Stephani J, et al. NOD2 polymorphism predicts response to treatment in Crohn's disease - first steps to a personalized therapy. *Dig Dis Sci* 2012;57:879–86.
- Lesage S, Zouali H, Cézard JP, et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* 2002;70:845–57.
- Alvarez-Lobos M, Arostegui JI, Sans M, et al. Crohn's disease patients carrying Nod2/CARD15 gene variants have an increased and early need for first surgery due to stricturing disease and higher rate of surgical recurrence. *Ann Surg* 2005;242:693–700.
- Adler J, Rangwala SC, Dwamena BA, et al. The prognostic power of the NOD2 genotype for complicated Crohn's disease: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:699–712.
- Freire P, Portela F, Donato MM, et al. CARD15 mutations and perianal fistulating Crohn's disease: correlation and predictive value of antibiotic response. *Dig Dis Sci* 2011;56:853–9.
- Sachar DB. Recurrence rates in Crohn's disease: predicting the future and predicting the past. *Gut* 2006;55:1069–70.
- Vannozzi G, Fontana R, Milla M, et al. Disease history in 382 Italian patients with Crohn's disease. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1997;29:525–32.
- Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJ, et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet* 2001;357:1925–8.
- Annese V, Lombardi G, Perri F, et al. Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease—an IG-IBD study. *Am J Gastroenterol* 2005;100:84–92.
- Ferreira AC, Almeida S, Tavares M, et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005;11:331–9.
- Maconi G, Colombo E, Sampietro GM, et al. CARD15 gene variants and risk of reoperation in Crohn's disease patients. *Am J Gastroenterol* 2009;104:2483–91.
- Hradsky O, Lenicek M, Dusatkova P, et al. Variants of CARD15, TNFA and PTPN22 and susceptibility to Crohn's disease in the Czech population: high frequency of the CARD15 1007fs. *Tissue Antigens* 2008;71:538–47.
- Šerclová Z. Historie chirurgické léčby nespecifických zánětů střevních. *Vnitř Lék* 2014;60:645–8.
- Kala Z, Marek F, Válek VA, et al. Chirurgická léčba Crohnovy choroby. *Vnitř Lék* 2014;60:617–23.
- Yamamoto T. Factors affecting recurrence after surgery for Crohn's disease. *World J Gastroenterol* 2005;11:3971–9.
- Hutan M, Huťa M., ml. Úloha chirurgického výkonu v léčbě Crohnovy choroby. *Rozhl Chir* 2009;88:185–8.
- Büning C, Genschel J, Bühner S, et al. Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:1073–8.
- Newman B, Siminovich KA. Recent advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005;21:401–7.
- Radford-Smith G, Pandeya N. Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease - Are we there yet? *World J Gastroenterol* 2006;12:7097–103.
- Solon JG, Burke JP, Walsh SR, et al. The effect of NOD2 polymorphism on post-surgical recurrence in Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis of available literature. *Inflamm Bowel Dis* 2013;19:1099–105.

MUDr. Lubomír Martinek, Ph.D.
 Odboje 1164
 739 32 Vratimov
 e-mail: lubomir.martinek@fnmotol.cz

Autoimunitní pankreatitida – diagnostický konsenzus

Petr Dítěl¹, Ivo Novotný², Bohuslav Kianička³, Martin Rydlo¹, Hana Nechutová³, Arnošt Martínek¹, Magdalena Uvírová⁴, Martina Bojková¹, Jana Dvořáčková⁵

¹ Akademičké centrum gastroenterologie Interní kliniky LF Ostravské univerzity a FN Ostrava, přednosta doc. MUDr. Arnošt Martínek, CSc.

² Gastroenterologické oddělení MOÚ Brno, vedoucí pracoviště MUDr. Milana Šachlová, CSc. et Ph.D.

³ Gastroenterologické oddělení II. interní kliniky LF MU a FN u sv. Anny Brno, přednosta prof. MUDr. Miroslav Souček, CSc.

⁴ Vědecký a výzkumný institut Agel, pobočka Ostrava-Vítkovice, CGB laboratoř, ředitelka společnosti RNDr. Magdalena Uvírová

⁵ Ústav patologie LF OU a FN Ostrava, vedoucí ústavu doc. MUDr. Jaroslav Horáček, CSc.

Souhrn

Autoimunitní forma pankreatitidy patří mezi specifickou formu onemocnění slinivky břišní s významným podílem autoimunitní složky v etiopatogenezi. V současné době existují 2 formy onemocnění, které jsou definované klinicky i histomorfologicky a jsou laboratorně popsány. Přes řadu společných rysů histomorfologických se obě formy zásadně odlišují přítomností tzv. endoteliálních granulárních lézí (GEL) u typu 2, resp. absencí GEL u typu 1. Abundantní přítomnost gamaglobulinu a imunoglobulinu G4 charakterizuje 1. formu nemoci, podobně jako častá přítomnost IgG4 pozitivních extrapancreatických lézí. Subtyp 2 bývá typicky spojen s nálezem idiopatických střevních zánětů, především ulcerózní kolitidy. Oba typy autoimunitní pankreatitidy se vyznačují rychlou odpovědí na terapii steroidy. Vzhledem k různým diagnostickým kritériím autoimunitní formy pankreatitidy byl v roce 2011 zveřejněn diagnostický konsenzus sjednocující stávající kritéria a vycházející z klinických symptomů, biochemických nálezů, nálezů při použití zobrazovacích metod, histomorfologie žlázy a pozitivní odezvy na podání steroidů. Stálým problémem zůstává včasná diferenciální diagnostika mezi fokální formou autoimunitní pankreatitidy a karcinomem hlavy pankreatu. MRI/CT, MRCP a v Japonsku ERCP, s cílenou biopsií žlázy pod EUS kontrolou, jsou doporučeny jako metody volby.

Klíčová slova: autoimunitní pankreatitida – CT/MRI – ERCP – granulární endoteliální léze (GEL) – imunoglobulin G4 – MRCP – steroidy

Autoimmune pancreatitis – diagnostic consensus

Summary

The autoimmune type of pancreatitis represents the specific disease of pancreas, with significant contribution of autoimmune processes in its etiopathogenesis. Currently, there are two proved subtypes of this particular pancreatopathy, which are defined clinically, histomorphologically and serologically. They have many histomorphological signs in common, but differ in the presence of so-called granulocytic epithelial lesions (GEL), which are absent in subtype 1. The subtype 1 is characterized by the presence of gammaglobulines, esp. immunoglobuline G4 and IgG4 positive extrapancreatic lesions. The subtype 2 is typically associated with the inflammatory bowel diseases, esp. ulcerative colitis. But the common characteristic of both subtypes is the fact response to applied steroid treatment. Due to diverse diagnostic criteria in the past, in 2011 the consensus for the diagnosis of autoimmune pancreatitis was announced. It is based on clinical symptoms, biochemical results, the results got by using of imaging methods, histomorphology and positive response to steroid treatment. The matter to be solved is the question of early differential diagnosis between focal autoimmune pancreatitis and adenocarcinoma of pancreatic head. From imaging methods are MRI/CT, MRCP (in Asia ERCP), EUS with targeted biopsy of the gland (under EUS control), are recommended as the methods of choice.

Key words: autoimmune pancreatitis – CT/MRI – endoscopic retrograde cholangio-pancreatography – granulocytic endothelial lesion (GEL) – immunoglobulin G4 – MRCP – steroids

Úvod

Autoimunitní forma pankreatitidy (AIP) je definována jako zvláštní forma pankreatitidy, charakterizovaná klinicky, sérologicky a histomorfologicky [1]. Jedná se o difuzní nebo ložiskový (fokální) zánět, jehož nejčastějším klinickým symptomem je obstrukční, bezbolestný ikterus, který při fokální formě nemoci imituje obstrukční ikterus při nádorovém postižení hlavy slinivky břišní. Pankreatická bolest bývá většinou jen diskretní [1], ale její přítomnost onemocnění nevylučuje, spíše však lze hovořit u osob s AIP o břišním diskomfortu. Dalšími klinickými znaky mohou být nově vzniklý diabetes mellitus, hubnutí a vzácně akutní bolest břicha. Z klinického pohledu je charakteristickým znakem promptní efekt terapie steroidy, který je patrný, jestliže je diagnóza správná, ve většině případů do 14 dnů od nasazení steroidů.

Přestože klinická manifestace nemá specifické rysy, je dle klinických a histologických nálezů je AIP dělena do 2 forem [2–4], jejichž rozlišení má význam nejen pro odhad dalšího průběhu nemoci, ale i pro potvrzení správné diagnózy AIP [5]. AIP typ1 je označována jako lymfoplazmocytární sklerozující pankreatitida (LPSP), nebo díky ab-

senci granulocytárních epitelových lézí jako forma GEL negativní. Právě přítomnost, nebo absence GEL je důležitým diferenciativním diagnostickým znakem mezi AIP typu 1 a typu 2 [3], přičemž 2. typ je označen jako centroduktální zánět (IDCP) a vyznačuje se specifickou pozitivitou GEL lézí. Podrobnosti a charakteristiky obou typů uvádí tab. 1.

Histomorfologické markery autoimunitní pankreatitidy patří k významným diagnostickým ukazatelům, přitom některé znaky jsou shodné pro obě formy nemoci, např. přítomnost lymfoplazmatických elementů, a naopak, některé znaky jsou zásadními při rozlišení obou typů AIP, jak ukazuje tab. 2.

V sérologickém vyšetření lze prokázat zvýšení bilirubinemie a cholestatických enzymů, zvýšenou sérovou hladinu gamaglobulinu, zvláště frakce G4, spíše výjimečně je zvýšena lipazemie. V některých případech bývá vyšší hladina CA 19–9, která se po terapii steroidy normalizuje.

Zobrazovací metody prokazují difuzní, fokální nebo multifokální změny žlázy, která je zvětšena a její echo-genita je nápadně snížena. Pankreatický vývod je difuzně nerovný, nebo jen mírně rozšířen před stenózou.

Tab. 1. Přehled klinických charakteristik autoimunitní pankreatitidy 1. a 2. typu

	autoimunitní pankreatitida 1. typu (LPSP)	autoimunitní pankreatitida 2. typu (IDCP)
histologický obraz	lymfoplazmocytární pankreatitida	idiopatická centroduktální sklerozující pankreatitida
průměrný věk	6. decennium	4.–5. decennium
příznaky	ikterus (75 %) akutní pankreatitida (5 %)	Ikterus (50 %) akutní pankreatitida (33 %)
zobrazovací vyšetření	difuzní edém (40 %) fokální léze (60 %)	difuzní edém (20 %) fokální léze (80 %)
IgG4	zvýšená sérová koncentrace IgG4 + plazmatické buňky v infiltrátu	není spojitost s IgG4
účast jiných orgánů	50 % není spojitost s IBD	40 % IBD 16–31 %
prognóza	recidiva v 15–65 %	recidiva velmi vzácná

IBD – inflammatory bowel disease/chronické zánětlivé onemocnění střev

Tab. 2. Histopatologická kritéria pro diagnostiku autoimunitní pankreatitidy 1. a 2. typu

	histologický nález	1. typ (LPSP)	2. typ (IDCP)
společná kritéria	periduktální lymfoplazmocytární infiltrát	ano	ano
	stroma bohaté na zánětlivé buňky	ano	ano
	storiformní fibróza	velmi výrazná	vzácná
	obliterující flebitida	ano	vzácná
	prominující lymfatické folikuly	ano	vzácná
	IgG4 plazmatické buňky	zvýšený počet	nezvýšený počet
	granulocytární epitelální léze (GEL)	ne	ano
	neutrofilní periacinární infiltrát	ne	velmi četný

LPSP – lymfoplazmocytární sklerozující pankreatitida IDCP – idiopathic duct-centric pancreatitis/idiopatická centroduktální pankreatitida

Změny pankreatického vývodu jsou pro diagnózu relevantní při postižení minimálně 1/3 délky pankreatického vývodu. Typický je nález uzlin v okolí pankreatu.

Významným klinickým projevem, charakteristickým především pro AIP typu 1, je přítomnost extrapancreatických lézí provázených pozitivitou IgG4 a patřících tak do skupiny stavů označených jako IgG4 asociovaná onemocnění (IgG4 related disease). Nejčastěji je AIP asociována s IgG4 pozitivní cholangiitidou, Mikuliczovým syndromem a IgG4 pozitivní retroperitoneální fibrózou. AIP 1. typu postihuje starší muže s maximem diagnostikovaných případů ve věku kolem 60 let.

AIP typ 2 byla popsána v Evropě a ve Spojených státech amerických, je významně méně častou formou než AIP typ 1, postihuje o dekádu mladší jedince než 1. typ AIP a histomorfologický nález, v řadě znaků shodný s typem 1, má zásadní odlišnost v pozitivitě GEL. Tato forma autoimunitní pankreatitidy je označena jako idiopatická dukto-centrální pankreatitida (IDCP). Granulární intraepiteliální nebo intraluminální neutrofilie (GEL) je prokazována ve středně velkých a malých pankreatických vývodech, včetně pankreatických acínů [2,6]. Právě přítomnost GEL pozitivity často vede k obliteraci až destrukci lumen pankreatických vývodů. IDCP není provázena ani zvýšením IgG4 v krevním séru ani přítomností IgG4 pozitivních plazmatických buněk v pankreatickém parenchymu [7]. Asi ve 30 % onemocnění AIP typ 2 bývá spojena s nálezem idiopatických střevních zánětů – zvláště ulcerózní kolitidy, spíše ojediněle je popsáno spojení s autoimunitní tyreoiditidou. Zdá se proto, že AIP typu 2 lze označit za systémové onemocnění, na rozdíl

od AIP typu 1, která je někdy označována jako jedna z forem IgG4 asociovaných onemocnění. Definitivní diagnóza IDCP je možná pouze histologicky.

Zatímco klinicky, sérologicky a histomorfologicky jsou oba typy autoimunitní pankreatitidy náležitě definovány, diagnostická kritéria jsou stále určitým problémem. Prvá diagnostická kritéria uvedená v roce 2002 Japonskou pankreatologickou společností byla v roce 2006 revidována [1]. Osobně tato kritéria považuji, z praktického pohledu, za reálně použitelná v běžné klinické praxi. Další kritéria diagnostiky AIP, označená jako HISORT, byla zveřejněna skupinou z Mayo Clinic, rovněž v roce 2006 [8]. Tato kritéria se chtěla vyhnout možným komplikacím diagnostické ERCP, která je součástí asijských kritérií. Při použití klasifikace HISORT je jako vyšetřovací metoda doporučena biopsie pankreatu (core biopsy). V roce 2007 Korejská společnost pankreatobiliárních onemocnění vydala další modifikaci kritérií, podle níž je význam přikládán nálezu difuzních, drobných nerovností pankreatického vývodu při MRCP [9]. V průběhu dalších let byla všechna výše uvedená kritéria opět modifikována, ale rozdílné diagnostické pohledy tím nebyly odstraněny [10]. Tato nejednotnost v diagnostice iniciovala jednání skupiny odborníků a výsledkem byl vznik mezinárodního diagnostického konsenzu [5] (tab. 3). Maximálně od nasazení steroidů ústup radiologických znaků pankreatických nebo extrapancreatických [12].

AIP – typ 2

Mezi zásadní diagnostická kritéria autoimunitní pankreatitidy 2. typu patří nálezy histomorfologické. Kromě po-

Tab. 3. AIP 1. typu

AIP 1. typu (LPSP)	
diagnostická úroveň 1	diagnostická úroveň 2
PARENCHYMOVÉ ZMĚNY	
difuzní zvětšení – „sausage-like“ tvar	segmentální/fokální změny
projasnění pod pouzdem pankreatu	
ZMĚNY PANKREATICKÉHO VÝVODU	
nerovnosti pankreatického vývodu > 1/3 délky ↘	segment/fokální nerovnosti pankreatického vývodu ↙
bez prestenotické dilatace (vývod < 5,0 mm)	
SÉROLOGIE	
IgG4 > 2násobek normy	IgG4 – normální až < 2násobná hladina
EXTRAPANCREATICKÉ POSTIŽENÍ	
A.	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ lymfoplazmatická infiltrace žlázy s fibrózou ▪ abundantní pozitivitou IgG4 plazmatických buněk ▪ obliterativní flebitida (alespoň 3 znaky jsou přítomné) 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ lymfoplazmatická infiltrace GEL negativní ▪ storiformní fibróza
B.	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ jeden z následujících radiodiagnostických znaků ▪ segmentární/vícečetné striktury pankreatického vývodu ▪ retroperitoneální fibróza 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ symetrické zvětšení slizných/slinných žláz ▪ radiologické známky postižení ledvin – při AIP

zitivity granulocytárních epiteliálních lézí je typickým nálezem minimální přítomnost IgG4 pozitivních buněk. Zajímavý je efekt steroidů, podobně jako je tomu u AIP typu 1, když imunologická pozitivita ve smyslu IgG4 je u AIP 2. typu negativní a i proto AIP nebývá řazena jako projev IgG4 asociovaných onemocnění, ale možná samostatná systémová choroba (tab. 4).

V případech, v nichž nenacházíme výše uvedená histologická kritéria pozitivní, ale klinický obraz je pro autoimunitní formu charakteristický, je doporučeno v diagnóze uvést, že AIP je „pravděpodobná“.

Srovnávací studie všech dosud publikovaných kritérií diagnostiky AIP s výše uvedenými konsenzuálně stanovenými kritérii (ICDC) byla provedena u skupiny 61 osoby s AIP. Senzitivita kritérií ICDC byla zjištěna v 95,1 %, u tzv. korejských kritérií v 90,2 %, klasická japonská kritéria v 86,9 % a nejnižší senzitivita byla nalezena při použití HISORTS kritérií – 83,6 %, vesměs při 100% specifitě [11].

V této japonské studii (v Japonsku je v diagnostice AIP preferována endoskopická retrogradní pankreatografie proti magnetické rezonanci) byla nejvyšší diagnostická výtečnost u difuzního typu AIP při použití CT, u fokální formy nemoci se jako nejefektivnější prokázala kombinace CT a endoskopické retrogradní pankreatografie.

V diferenciální diagnostice zůstává stále nejednoduché rozlišení mezi fokální formou AIP a pankreatickým karcinomem většinou v hlavě slinivky břišní. Asi u 3 % osob, operovaných pro diagnózu pankreatického karcinomu, byla nakonec konečnou diagnózou autoimunitní pankreatitida a ne pankreatický karcinom [13]. Klinicky bývá u obou forem nemoci prvním příznakem obstrukční ikterus. U osob s bezbolestným obstrukčním ikterem, u nichž CT/MRI prokazuje difúzně zvětšený pankreas, ev. přítomnost subkapsulárního projasnění (capsule like-rim), bez dilatace pankreatického vývodu nebo nálezu pankreatické masy s nízkou densitou, je vysoce pravděpodobná diagnóza AIP. Osoby s obstrukčním bezbolestným ikterem, se zvětšením hlavy pankreatu a násled-

nou dilatací pankreatického vývodu, nebo při nálezu úplného přerušení pankreatického vývodu, bez atrofie žlázy, je na prvním místě třeba potvrdit, nebo vyloučit, zda přítomné změny nejsou způsobeny maligním postižením pankreatu [14].

Biopsie pankreatické masy v hlavě pankreatu, pod endosonografickým navedením, je indikována, i když negativní nález diagnózu malignity zcela nevylučuje [15,16].

Naitoh et al v roce 2012 [17] provedli retrospektivní hodnocení klinických a laboratorních nálezů u skupiny osob s AIP, u nichž bylo v oblasti hlavy pankreatu nalezeno zvětšení hlavy, a u skupiny osob s pankreatickým karcinomem bez metastáz. Jako marker nejvyššího specifického rozlišení obou stavů prokázali autoři přítomnost mimopankreatických postižení, která nejsou přítomna u osob s karcinomem pankreatu. Mezi tyto exopankreatické zánětlivé projevy u 1. typu patří: sialoadenitida, Mikulicizův syndrom, IgG cholangiitida, tubulointesticiální nefritida, retroperitoneální fibróza, chronická tyreoiditida, prostatitida, IgG4 pneumonitida a lymfodenopatie. AIP 2. typu má jako extrapankreatickou manifestaci zánět proximální části žlučového, tyreoiditidu v 16 % a v 30 % IBD.

Závěr

Autoimunitní forma pankreatitidy je, dle současných znalostí, dělena na 2 klinicky a histomorfologicky rozdílné subtypy. Dělení má praktický význam, protože jeho znalost v klinické praxi umožní stanovit včas správně diagnózu nemoci, nasadit adekvátní terapii a mj. zabránit u těchto osob stále zbytečným operacím pankreatu.

Diagnostická kritéria AIP jsou založena na hodnocení tzv. základních nálezů:

- změna textury parenchymu pankreatu a změny pankreatického vývodu (zobrazovací metod)
- extrapankreatická postižení
- histopatologie pankreatu
- promptní odpověď na steroidy

Tab. 4. Diagnostická kritéria autoimunitní pankreatitidy 2. typu

kritérium	úroveň 1	úroveň 2
P zobrazovací vyšetření parenchymu	typický nález difúzní zvětšení (často s okrajovým lemem)	nejasný až atypický nález – fokální zvětšení s late enhancement
D zobrazení vývodu (ERP)	striktury dlouhé (> 1/3 délky) nebo vícečetné striktury bez proximální dilatace	striktury segmentální/fokální s proximální dilatací (< 5 mm)
OOI účast jiných orgánů		klinická diagnóza IBD
H histologické vyšetření pankreatu infiltrát acinů	obě kritéria pozitivní GEL ± granulocytární infiltrát acinů IgG4 + plazmatické buňky žádné nebo nečetné (< 10 v zorném poli)	obě kritéria pozitivní granulocytární nebo lymfoplazmocytární IgG4 + plazmatické buňky žádné nebo nečetné (< 10 v zorném poli)
Rt úspěch steroidní léčby	rychlá odpověď (≤ 2 týdny) na terapeutický pokus s průkazem vyléčení nebo zřetelného zlepšení dle CT	

GEL – granulocytární epiteliální léze IBD – chronické zánětlivé onemocnění střev

V současné době pro diagnózu AIP platí mezinárodní konsenzuální diagnostická kritéria používající výše uvedené diagnostické znaky.

Diferenciální diagnostika mezi fokální formou AIP a pankreatickým karcinomem bývá obtížná. CT-vyšetření s kontrastem a MRI, a to vše se zhodnocením klinického obrazu, je doporučeno iniciálně provést. Biopsie pankreatické masy pod endosonografickým navedením je cenná, i když negativní nález možnost malignity nevylučuje.

Diagnostika autoimunitní formy pankreatitidy a jejich subtypů není vždy jednoduchá, ale znalost diagnostických kritérií umožní na autoimunitní formu pankreatitidy v klinické praxi alespoň pomýšlet a při správně stanovené diagnóze nemoc účinně léčit.

Kdy pomýšlet na možnost přítomnosti autoimunitní pankreatitidy:

- nejasný bezbolestný obstrukční ikterus po vyloučení malignity
- diskrétní bolesti v epigastriu s nově vzniklým diabetem
- nechtěný úbytek hmotnosti při nevýrazných břišních bolestech – břišním diskomfortu
- výše uvedené příznaky u osob s již diagnostikovaným autoimunitním onemocněním
- nejasná akutní pankreatitida v anamnéze
- zvýšení markerů cholestázy, zvýšení gamaglobulinu a IgG4
- při zobrazovacích metodách obraz zvětšeného pankreatu, často „párkovitého“ tvaru
- segmentární změny pankreatického vývodu v rozsahu více než jeho 1/3 délky, bez prestenotické dilatace

Literatura

1. Okazaki K, Kawa S, Kamisawa T et al. Clinical diagnostic criteria of autoimmune pancreatitis: revised proposal. *J Gastroenterol* 2006; 41(7): 626–631.
2. Sugumar A, Kloepfel G, Chari ST et al. Autoimmune pancreatitis: pathologic subtypes and their implications for the diagnosis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104(9): 2308–2310.
3. Chari ST, Kloepfel G, Zhang Let al. Histopathologic and clinical subtypes of autoimmune pancreatitis: the Honolulu consensus document. *Pancreas* 2010; 39(5): 549–554.
4. Levy MJ, Reddy RP, Wiersena MJ et al. EUS-guided trucut biopsy in establishing autoimmune pancreatitis as the cause of obstructive jaundice. *Gastrointest Endosc* 2005; 61(3): 467–472.

5. Shimosegawa T, Chari ST, Frulloni L et al. International consensus diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: guidelines of the International Association of Pancreatology. *Pancreas* 2011; 40(3): 352–358.
6. Zamboni G, Lunges J, Capelli P et al. Histopathological features of diagnostic and clinical relevance in autoimmune pancreatitis: a study on 53 resection specimens and 9 biopsy specimens. *Virchow Arch* 2004; 445(6): 552–563.
7. Kloepfel G, Detlefsen S, Chari ST et al. Autoimmune pancreatitis: the clinicopathological characteristics of the subtype with granulocytic epithelial lesions. *J Gastroenterol* 2010; 45(8): 787–793.
8. Chari ST, Smyrk TC, Levy MJ et al. Diagnosis of autoimmune pancreatitis: the Mayo Clinic experience. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(8): 1010–1016.
9. Kwon S, Kim MH, Choi EK. The diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: i tis time to make consensus. *Pancreas* 2007; 34(3): 279–286.
10. Otsuki M, Chung JB, Okazaki Ket al. Asian diagnostic criteria for autoimmune pancreatitis: Consensus of the Japan-Korea Symposium on Autoimmune Pancreatitis. *J Gastroenterol* 2008; 43(6): 403–408.
11. Sumimoto K, Uchida K, Mitsuyama Tet al. A proposal of a diagnostic algorithm with validation of International Consensus Diagnostic Criteria for autoimmune pancreatitis in a Japanese cohort. *Pancreatology* 2013; 13(3): 230–237.
12. Moon SH, Kim MH, Park DH et al. Is a 2-week steroid trial after initial negative investigation for malignancy useful in differentiating autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer? A prospective outcome study. *Gut* 2008; 57(12): 1704–1712.
13. Naitoh I, Nakazawa T, Ohara Het al. Clinical significance of extrapancreatic lesions in autoimmune pancreatitis. *Pancreas* 2010; 39(1): e1–e5. Dostupné z DOI: <<http://dx.doi.org/10.1097/MPA.0b013e3181bd64a1>>.
14. Tauchefeu Y, Le Rhun M, Coron E. Endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for the diagnosis of solid pancreatic masses: the impact on patient-management strategy. *Aliment Pharmacol Ther* 2009; 30(10): 1070–1077.
15. Napoleon B, Alvarez-Sanchez MV, Gincoul Ret al. Contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasound in solid lesions of the pancreas: results of a pilot study. *Endoscopy* 2010; 42(7): 564–570.
16. Chari ST, Takahashi N, Levy MJ et al. A diagnostic strategy to distinguish autoimmune pancreatitis from pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009; 7(10): 1097–1103.
17. Naitoh I, Nakazawa T, Hayashi K et al. Clinical differences between mass-forming autoimmune pancreatitis and pancreatic cancer. *Scand J Gastroenterol* 2012; 47(5): 607–613.

prof. MUDr. Petr Dítě, DrSc.

✉ pdite.epc@gmail.com

Akademické centrum gastroenterologie Interní kliniky
LF Ostravské univerzity a FN Ostrava

<http://lf.osu.cz/>

Doručeno do redakce 5. 9. 2014

Přijato po recenzi 25. 11. 2014

Racionální diagnostika cholangiokarcinomu

Martin Rydlo¹, Jana Dvořáčková², Tomáš Kupka¹, Pavel Klvaňa¹, Jaroslav Havelka³, Magdaléna Uvírová⁴, Edvard Geryk⁵, Daniel Czerný³, Tomáš Jonszta³, Martina Bojková¹, Vladimír Hrabovský¹, Veronika Jelínková¹, Arnošt Martinek¹, Petr Dítě¹

¹ Interní klinika LF OU a FN Ostrava

² Ústav patologie LF OU a FN Ostrava

³ Ústav radiodiagnostický LF OU a FN Ostrava

⁴ CGB laboratoř, Ostrava

⁵ Oddělení pro vědu a výzkum FN Brno

Souhrn

Cholangiokarcinom (CC) je vzácný maligní nádor vznikající z cholangiocytů. Prognóza CC bývá většinou nepříznivá. Zásadní podíl na této skutečnosti má pozdní diagnóza nádoru. Současná incidence CC v České republice činí asi 1,4 na 100 000 obyvatel za rok; u méně než 30 % pacientů s CC lze identifikovat některý ze známých rizikových faktorů, nejčastěji primární sklerozující cholangitidu. Naději na delší dobu přežití mají pacienti s časně diagnostikovaným, chirurgicky řešitelným CC, u kterých dosahuje 5letá doba přežití asi 20–40 %. Pro časnou diagnózu CC mají zásadní význam zobrazovací metody a histopatologické zhodnocení, zatímco časně diagnostický význam onkomarkerů je omezený. Racionální časná diagnostika CC spočívá v účelném využití diferencovaných výhod jednotlivých zobrazovacích metod – optimální se jeví MRI s DSA, EUS je citlivou metodou pro identifikaci malignit v oblasti jaterního hilu nebo distálního choledochu, zatímco MRCP (magnetic resonance cholangiopancreatography) spíše při zobrazení patologických změn biliárního stromu, ERCP (endoscopic retrograde cholangiopancreatography) umožňuje odběr materiálu pro histopatologické vyšetření. Přínosem jsou i novější diagnostické metody, např. IDUS – intraduktální ultrasonografie biliárních cest anebo SPY-GLASS, umožňující vyšetřit žlučové cesty přímým pohledem s možností odběru cíleného bioptického vzorku. Specifitu i senzitivitu histologického a cytologického vyšetření lze zvýšit využitím molekulárně cytogenetické metody FISH, tj. fluorescenční in situ hybridizací, u níž specifita dosahuje 97 %.

Klíčová slova: epidemiologie – cholangiokarcinom – racionální diagnostika – rizikové faktory

The rational diagnostic of cholangiocarcinoma

Summary

Cholangiocarcinoma (CC) is a rare malignant tumour arising from cholangiocytes, and its prognosis is usually unfavourable, mostly as a result of late diagnosis of the tumour. The current incidence of cholangiocarcinoma in the Czech Republic is 1.4/100,000 inhabitants per year; in less than 30 % of patients with CC, one of the known risk factors can be identified, most frequently, primary sclerosing cholangitis. Only patients with early diagnosed and surgically amenable cholangiocarcinoma are likely to have a longer survival time; in their case, survival for more than five years has been achieved in 20 % to 40 %. From the perspective of the need for early diagnosis of CC, a significant part is played by imaging and histopathologic evaluation; the early diagnostic significance of oncomarkers is limited. The rational early diagnosis of CC consists in effective use of differentiated advantages of different imaging modalities – MRI with DSA appears to be the optimal method, endosonography is a sensitive method for the identification of malignancy in the hepatic hilum or distal common bile duct, MRCP (magnetic resonance cholangiopancreatography) is used to display pathological changes in the biliary tree, ERCP (endoscopic retrograde cholangiopancreatography) allows material removal for histopathological examination. Other new approaches are also beneficial, such as IDUS – intraductal ultrasonography of biliary tract or SPY-GLASS, enabling examination of the bile ducts by direct view with the possibility of taking targeted biopsies. Sensitivity and specificity of histology and cytology can be increased by using the molecular cytogenetic FISH method, i.e. fluorescence in situ hybridization, with a specificity of 97 %.

Key words: epidemiology – cholangiocarcinoma – rational diagnostic – risk factors

Epidemiologie

Cholangiokarcinom (číslo diagnózy C22.1) zaujímá 10–15 % všech hepatobiliárních malignit a je druhým nejčastějším primárním nádorem jater ve světě [1]. Epidemiologická data prokazují mírný a konstantní nárůst nových onemocnění CC [2]. V USA je incidence cholangiokarcinomu asi 7 na 1 milion obyvatel [3], ve Velké Británii v roce 2012 zemřelo na toto nádorové onemocnění 1 500 nemocných [4]. V České republice v průběhu let 1991–2010 byl cholangiokarcinom zjištěn u 996 mužů, což představuje 9,7 % ze všech 10 293 jaterních novotvarů, u žen dokonce v 15,5 % všech jaterních novotvarů. Dle věkových kategorií se CC vyskytuje u mužů nejčastěji v 7. dekádě (31,9 %), zatímco u žen v dekádě 8. (33,9 %) [5], graf 1.

Rizikové faktory

Rizikové faktory jsou nalézány v méně než 30 % všech případů CC; kromě primární sklerozující cholangitidy (PSC), která je považována za nejčastější známý rizikový faktor pro vznik CC, jsou mezi dalšími rizikovými faktory uváděny věk (více než 2/3 pacientů je starších 65 let) [6,8], chronické hepatitidy B a C [7], intraduktální konkrementy [6–8]; Caroliho nemoc [6,8], cysty, adenomy a papilomatóza žlučových cest [6–8], parazitární infekce (*Opisthorcis viverrini*, *Clonorchis sinensis*) [7,9], metabolický syndrom, obezita, NAFLD (Non-alcoholic fatty liver disease – nealkoholová steatóza jater), diabetes mellitus [10], nosičství *Salmonella typhi* [8,9], expozice thorotrastu [8,11], Lynchův syndrom a další [9]. Ale jak uvedeno výše, nejčastějším predispozičním faktorem pro vznik CC je primární sklerozující cholangitida [12,13]. V Claessenově studii z roku 2009 [12] bylo sledováno 211 osob s PSC, z nichž 60 % bylo současně postiženo ulcerózní kolitidou. U 41 % sledovaných osob

vznikl následně kolorektální karcinom a u 39 % osob byl později prokázán CC. Ze sledovaného souboru celkem 41 % nemocných zemřelo následkem maligního onemocnění. Přitom medián intervalu mezi diagnózou CC a diagnózou PSC činil 2,5 roku, nejdelší interval mezi diagnózou PSC a diagnózou CC činil 9,8 roku.

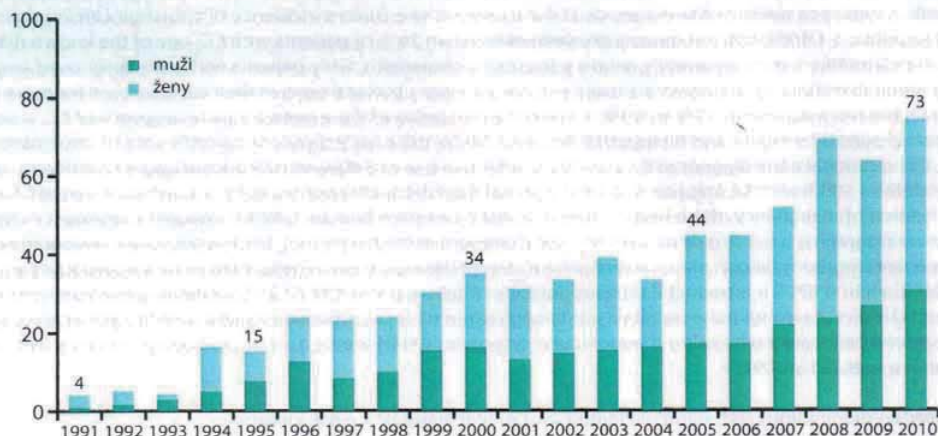
Anatomická klasifikace

Pod pojem cholangiokarcinom jsou zahrnovány všechny karcinomy žlučových cest; asi 20 % všech CC je lokalizováno intrahepatálně; 50–60 % CC se nachází perihilózně (tyto CC jsou řazeny k extrahepatickým CC), téměř 20 % patří k distálním extrahepatálním tumorům a 5 % CC je klasifikováno jako multifokální nádory. Asi 70 % všech CC se nachází mimo jaterní parenchym, predilekční lokalitou je proximální ductus choledochus v oblasti junkce. Tento typ CC je označován jako Klatskinův tumor. Různé lokalizované typy CC se liší nejen četností, ale i biologickým chováním i volbou následného léčebného postupu. Ve smyslu Bismuthovy-Corlettovy klasifikace z roku 1975 [14] jsou perihilózní tumory dále děleny do následujících podskupin:

- I. typ: postižen je d. choledochus distálně od bifurkace
- II. typ: je postižena bifurkace (aniž jsou významně postiženy pravý či levý ductus hepaticus)
- III. typ: je postižen d. hepaticus communis a buď pravý (IIIa) nebo levý (IIIb) hepaticus
- IV. typ: multicentrické či oboustranné intrahepatické segmentální postižení nebo postižení bifurkace a obou hepaticů [12]

V roce 2011 Deoliveira et al [15] představili novější klasifikaci perihilózních CC, která oproti uvedené klasifikaci Bismuthově-Corlettově zahrnuje další prognostické faktory, jako jsou angioinvasze do jaterní tepny či

Graf 1. Trend prevalence nemocných s cholangiokarcinodem. Upraveno podle [5]



portální žily, metastatický rozsev, postižení uzlin, velikost tumoru, další jaterní onemocnění i předpokládaný postresekční objem jaterní tkáně. Deoliveirova klasifikace by měla přesněji identifikovat faktory, které jsou významné pro další léčebnou péči i prognózu jednotlivých nemocných s CC.

Diagnostika

Diagnostika časných, chirurgicky řešitelných stadií cholangiokarcinomu je velmi obtížná, a tím i prognóza dlouhodobého přežití osob s CC je většinou nepříznivá. Pacienti s časně diagnostikovaným CC, který je řešitelný chirurgicky, mívají 5letou dobu přežití v 20–40 % [14]. V současné době je v době stanovení diagnózy CC indikováno k chirurgickému řešení pouze asi 15–35 % pacientů [16]. Je proto zásadní otázkou, jaké diagnostické postupy mohou pozitivně ovlivnit naši diagnostickou efektivitu, resp. přispět k časné a přesné diferenciální diagnostice. Náš příspěvek vychází z doporučení Britské gastroenterologické společnosti z roku 2013 [10], která jsou revizí doporučení této společnosti z roku 2002 [17].

Pro CC bývá typickým iniciálním klinickým nálezem bezbolestný obraz obstrukčního ikteru, který je dán progredující okluzí žlučových cest nádorem [18]. Ale klinické projevy jsou často obdobné jako u primární biliární cirhózy, např. pruritus či známky cholangiitidy [19]. Současně mohou být již přítomny obecné příznaky maligního onemocnění, jako je únavnost a ztráta tělesné hmotnosti. V diagnostice CC není žádné laboratorní vyšetření krve dostatečně specifické; zvýšení obstrukčních jaterních enzymů je logické, v počínající fázi nemoci lze nalézt např. i zvýšení CRP či hypalbuminemii [20]. Z nádorových markerů je nejčastěji používáno stanovení CA19–9 a CA125. Avšak jak senzitivita

CA19–9 (40–70 %), tak specifita (50–70 %), včetně pozitivní prediktivní hodnoty (16–40 %), jsou nízké [21], navíc zvýšení CA19–9 provází další hepatobiliární choroby (PSC, nemaligní obstrukční ikterus, cirhózu, tumory pankreatu atd) [21].

CA125 bývá pozitivní asi u 65 % osob s CC, přičemž nelze vyloučit, že CA125 může být potenciálním perspektivním markerem pro hodnocení délky přežití těchto nemocných [22]. Význam některých novějších onkomarkerů (např. insulin-like growth factor 2, metalloproteináza 7 nebo mucin MUC5AC) je nyní validizován v klinických studiích [23].

V diagnostice rizikových prekancerózních stavů může být problémem diferenciální diagnostika PSC vzhledem k dalším cholestatickým chorobám – např. k primární biliární cirhóze (diferenčními parametry mohou být i AMA, pANCA, MRCP, ERCP, biopsie atd), problémem může být i odlišení PSC od cholangiitidy s pozitivitou IgG4 jak v krevním séru, tak ve tkáni žlučového [25]. V tomto případě může být určitým vodítkem fakt, že ve většině případů bývá PSC diagnostikována spíše u mladších osob ve věku mezi 30–40 lety, zatímco IgG4 cholangiitida postihuje spíše jedince starší 50 let. Je třeba také zmínit, že zatímco výskyt cholangiokarcinomu u nemocných s PSC je udáván u 10–30 % nemocných, tak u pacientů s IgG4 cholangiitidou dosud taková souvislost prokázána nebyla [8].

Zobrazovací metody

Zásadní význam v diagnostice CC mají zobrazovací metody, které často současně umožňují i cílené odběry tkáně k histologickému vyšetření; na druhé straně ani tyto metody nemusí být dostatečně citlivé v diagnostice časných stadií. Ultrazukové vyšetření břicha má sice vysokou negativní prediktivní hodnotu (90 %), ale jeho senzitivita, včetně pozitivní prediktivní hodnoty, nepřesahuje 50 % [25].

Spirální multislice CT vyšetření v časné diagnostice CC má senzitivitu až 80 %, umožňuje zobrazit i lymfadenopatii, extrahepatické metastázy nebo lokalizaci nádorové masy intrahepaticky. Kombinace CT vyšetření a pozitronové emisní tomografie není výtečnější než CT vyšetření, ale tato kombinace vyšetření by snad mohla být výhledově využívána pro zhodnocení předoperačního stágingu [26,27].

MRCP (magnetic resonance cholangiopancreatography/MR cholangiopancreatografie) je neinvazivní metoda, která slouží k zobrazení a hodnocení intrahepatických a extrahepatických žlučových cest a pankreatického vývodu. Na rozdíl od endoskopické retrogradní cholangiopancreatografie (ERCP, obr. 1) při MRCP (obr. 2) není potřeba aplikovat kontrastní látku do biliárního systému. Jsou tak vyloučena rizika spojená s endoskopickým výkonem a aplikací jodové kontrastní látky. Při MRCP se používají techniky silně T2 vážených obrazů, které díky dlouhému T2 relaxačnímu času tekutin dávají vysoký signál stacionární nebo pomalu tekoucí tekutiny v hepatikobiliárním systému a signál z cév a ostat-

Obr. 1. Pacient (1964): vyšetření ERCP

Obraz PSC s typickými segmentárními stenózami a dilatacími převážně na intrahepatálních větvích (nález nevylučuje současnou přítomnost CC)

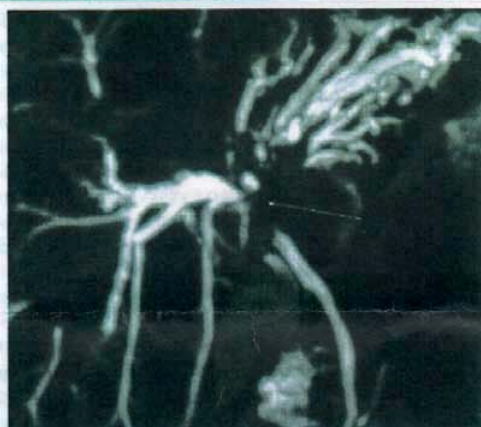


ních měkkých tkání je potlačen (obr. 3). MRCP lze provádět technikami 2D zobrazení během zadržení dechu v trvání 5–15 s, nebo technikami 3D (obr. 4), s volným dýcháním a monitoringem pohybu bránice, okolo 3–5 min, navíc s možností multiplanárních rekonstrukcí.

Neinvasivní magnetická rezonance (non invasive magnetic resonance imaging) a digitální subtrakční angio-

Obr. 2. Pacient (1960): patrný štíhlý ductus choledochus,

Hepatocholedochus, defekt v oblasti junkce hepatiků a dilatace intrahepatických žlučových cest, výraznější jsou změny v oblasti levého hepatiku. MRCP, MIP (maximum intensity projection) rekonstrukce



Obr. 3. Pacient (1960): nasycení patologických hmot v oblasti junkce hepatiků i podél levého hepatiku.

Postkontrastní T1 vážené, 3D gradientní USG, breath hold, sagitální rovina



grafie (DSA) se v současné době zdají být optimálními metodami v časně diagnostice suspekčního cholangiokarcinomu. MRI a DSA [28,29], zvláště v kombinaci s ERCP, která umožňuje odběr tkáně k histopatologickému zhodnocení, poskytují nejpřesnější informace o lokalizaci nádoru, jeho rozsahu i metastatickém rozsevu, tj. přinášejí zásadní podklady pro rozhodnutí o možnostech chirurgického řešení. MR cholangiopancreatografie (MRCP) představuje neinvasivní zobrazovací metodu (bez aplikace kontrastní látky) umožňující zobrazení intrahepatických a extrahepatických žlučových cest včetně pankreatického ductus Wirsungi. Další možností, jak zpřesnit diagnostiku CC, je výše uvedená vyšetření doplnit ještě klasickým nativním eventuálně postkontrastním MRI vyšetřením jater a DWI (diffusion weighted imaging).

Možnosti využití CT pozitronové emisní tomografie (PET-CT) v diagnostice časných stadií CC je limitováno velmi často se vyskytující současnou cholangitidou, která mnohdy znemožňuje správnou interpretaci [29–31].

Endosonografické vyšetření má vysokou citlivost v diagnostice nálezů v oblasti jaterního hilu, distálního choledochu, žlučníku a při posuzování regionálních lymfatických uzlin [32,33]. Vyšetření umožňuje cílený odběr tkáně, čímž jeho pozitivní prediktivní hodnota narůstá téměř ke 100 %. Bohužel nízká negativní prediktivní hodnota nevyklučuje malignitu při negativním histologickém nálezu.

Zobrazení žlučového stromu je možné rovněž pomocí perkutánní transhepatální cholangiografie (PTC). V diferenciální diagnostice mezi cholangiokarcinomem a benigní biliární stenózou byla prokázána v retrospektivní srovnávací studii senzitivita MRCP v 96 %, specificita 85 %, zatímco při ERCP byla senzitivita 80 % a specificita 75 %. Zásadní předností ERCP (i PTC) je možnost získání vzorku žluči k cytologickému vyšetření. PTC je v současnosti ale prováděna méně často vzhledem k invazivitě výkonu i riziku možných komplikací [35].

Obr. 4. Pacient (1960): nasycení patologických hmot v oblasti junkce hepatiků.

Postkontrastní T1 vážené, 3D gradientní USG, breath hold, axiální rovina



Endoskopické vyšetření žlučových cest (obr. 5) je historicky možné od roku 1976, kdy byl zaveden systém *mother-baby*. Ultratenký endoskop neboli *babyscop* byl zaváděn pracovním kanálem duodenoskopu. Tento systém potvrdil správnost konceptu, ale nikdy nedosáhl širokého uplatnění pro vysokou fragilitu instrumentaria. Od roku 2008 je dostupný Spy Glass™ Direct Visualisation system. Speciální ultratenký (10 Fr) katétr je zaváděn jedním endoskopistou pracovním kanálem duodenoskopu. Katétr obsahuje svazek světelných vláken pro osvit a přenos obrazu, 2 kanálky pro oplach a jeden instrumentační kanál o průměru 1,2 mm. Distální konec katétru je ohebný ve 2 na sebe kolmých rovinách.

Obr. 5. Intraduktální endosonografie: adenom žlučovodu

Použito se svolením prim. MUDr. Urbana, Ph.D., Vítkovická nemocnice v Ostravě



Obr. 6. Cholangioskopie Spyglass: polypoidní nádorová masa v terminálním úseku žlučovodu – histologicky adenom

Použito se svolením prim. MUDr. Urbana, Ph.D., Vítkovická nemocnice v Ostravě



Instrumentačním kanálkem lze zavést speciální biopstické kleště a provést odběr biopsie pod endoskopickou kontrolou. Cholangioskopie (obr. 6) je přínosná v případech tzv. neurčených stenóz, tedy v případech, v nichž ERCP s brushingem a biopsií neobjasní diagnózu. Hlavními indikacemi cholangioskopie jsou tedy diagnostika nejasné léze žlučových cest a zaměření sondy pro elektrohydraulickou litotrypsi obtížné choledocholithiázy [33,36].

Indikace k chirurgickému řešení závisí na lokalizaci a velikosti (rozsahu) nádoru i na eventuálním metastatickém rozsevu: souhrnně lze říci, že v současné době nejpřesnější údaje k chirurgické indikaci vyplývají z kombinace vyšetření MRI s kontrastní angiografií a dalším vyšetření, při kterém lze odebrat tkáňový vzorek pro histologické nebo cytologické vyšetření (ERCP, PTC, EUS, IDUS, cholangioskopie) [17,29].

Histologické a cytologické vyšetření

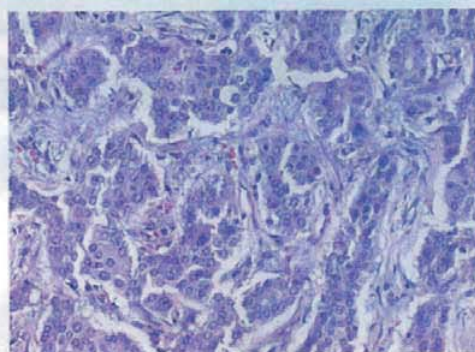
Histologické anebo cytologické vyšetření je součástí diagnostického armentaria. Cholangiocelulární karcinomy vyrůstají z buněk bilárního stromu, a proto se mohou nacházet kdekoli od Vaterské papily až po nejmenší intrahepatální žlučovody. Dle WHO klasifikace 2010 [37] dělíme tyto nádory na 2 základní skupiny, a to na karcinomy intrahepatální a extrahepatální. Jejich další rozdělení dle typu a topografie demonstruje schéma 1.

Mikroskopicky jsou cholangiogenní karcinomy charakterizovány převážně tubulární strukturou s nápadnou fibroprodukcí (obr. 7) a v imunohistochemickém vyšetření pak pozitivitou CK7 a CK19 (obr. 8 a obr. 9). Ostatní histologické typy karcinomů jako karcinom mucinózní, skvamózní, adenoskvamózní, intestinální, papilární, drobnobuněčný nebo karcinom z prstenčitých buněk se vyskytují méně často. Asi v 1 % všech karci-

Obr. 7. Histologie: hematoxylin-eozin (HE):

trabekulárně uspořádané struktury maligního nádoru s desmoplastickou komponentou odpovídající obrazu cholangiocelulárního karcinomu

Zvětšeno 200krát, Olympus DP73



nomů jater se vyskytuje kombinovaný hepatocelulární cholangiokarcinom (HCCC), u kterého se rozlišují další podtypy, a to: HCCC klasický typ, HCCC subtyp s rysy kmenových buněk, HCCC s rysy kmenových buněk, tzv. intermediální buněčný typ, a HCCC s rysy kmenových buněk, tzv. cholangiocelulární typ. Jednotlivé typy se liší expresí biliárních markerů, jako jsou c-kit, CD56, EpCAM a vimentin. Toto rozlišení zatím nemá větší klinický význam, jelikož nejsou známy žádné rozdíly v jejich biologickém chování [38–40].

V diagnostice CC (HCCC) lze použít tkáňové vzorky, které byly získány:

- standardní biopsií formou excize patologické tkáně, jehlové biopsie nebo biopsie získané při endoskopickém vyšetření
- peroperační biopsií
- tenkojehlovou aspirační biopsií (FNAB)
- kartáčkovým stěrem na cytologické vyšetření

Kritéria malignity jsou obecně dána empiricky, avšak liší se pro každou lokalitu. Vždy jde o skládání komplexu znaků, jako je posouzení struktury, zhodnocení cytologických znaků, charakteru buněk či jader, proliferace a posouzení jejich růstových schopností.

Diferenciální diagnóza mezi CC a HCC je důležitá i proto, že cholangiokarcinomy mají velmi nepříznivou prognózu, a to i v případě jaterní transplantace, a tak diagnóza cholangiokarcinomu je v mnoha transplantacích center považována za kontraindikaci transplantace [40,41]. Naopak, protože hepatocelulární karcinom (HCC) má (při splnění určitých kritérií) příznivé transplantační výsledky, tak by z klinického hlediska měla být histopatologická diagnostika jednoznačným klíčem k dalšímu rozhodování o léčebném postupu. Bohužel toto rozhodování na úrovni histopatologie není a nemůže být jednoznačné, protože hepatocyty i cholangiocyty vznikají pravděpodobně v oblasti Heringových kanálků z tzv. progenitorových buněk, které se mohou diferencovat jak v hepatocyty, tak cholangiocyty, a tak velká skupina nádorů jater vykazuje pozitivitu imunohistochemických markerů obou skupin. Protože diagnóza cholangiocelulárního karcinomu má, jak výše uvedeno, důležité konsekvence týkající se výběru

dalšího léčebného postupu, většina transplantačních center vyžaduje k diagnóze cholangiokarcinomu nejen jednoznačnou morfologii s fibroprodukcí a struktury tubulárního adenokarcinomu, ale též pozitivní imunohistochemický průkaz CK19.

Problematika histologického ověření ložiskových jaterních lézí je primárně závislá i na skutečnosti, zda léze se nachází v cirhotickém terénu či nikoli. Klíčové je odlišení CC od hepatocelulárního karcinomu (HCC). Diagnóza může být problematická i u dobře diferencovaných HCC; pro tuto lokalitu nejsou definována jednoznačná kritéria malignity a rozhodnutí o biologickém chování těchto afekcí je často arbitrární [9,41]. S pomocí peroperačního kryostatického vyšetření („nazmrzlo“) lze většinou vyloučit metastatický původ ložiska. Protože epitel žlučových ductů exprimuje „svě“ markery shodně nejen v celém průběhu (včetně pankreatické části žlučového ductu), ale také i v části pankreatických vývodů, tak v současnosti neexistuje metoda, která by dokázala jednoznačně odlišit primární cholangiogenní či metastatický pankreatický původ tumoru v játrech.

V oblasti extrahepatálních žlučových cest je obtížná diferenciální diagnostika primárních a sekundárních cholangiitid oproti karcinomu žlučových cest, protože kontakt žluči s intersticiem v oblasti poškozeného epitelu žlučových ductů vyvolá v intersticiální tkáni komplexní zánětlivou reakci, při níž iritace žlučovými kyselinami a dalšími složkami žluči stimuluje tkáň k fibroprodukcii. Vzniklé fibrotické změny jsou nejen makroskopicky, ale mnohdy i mikroskopicky neodlišitelné od fibroplazie doprovázející maligní nádor. Při mikroskopickém vyšetření jde o komplikovaný problém, který v malé excizi vede k diagnostickým rozpakům s vysokým procentem nejasných nebo „nesprávných“ závěrů [42].

Z endoskopických biopsií lze diagnostikovat nádorové afekce z oblasti Vaterské papily, pokud jsou histopatologické změny přítomny v odebraných povrchových partiích epitelu. Problém nastává, pokud je tumor lokalizován v těsném sousedství odebraného biopsického vzorku; pak epitel papily vykazuje pravidelně „pouze“ výrazné zánětlivé iritační změny a ani při opakovaných endoskopických odběrech nebývá ve

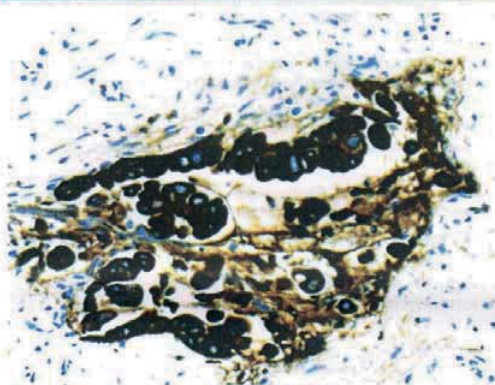
Schéma 1. Rozdělení cholangiocelulárního karcinomu dle typu a topografie



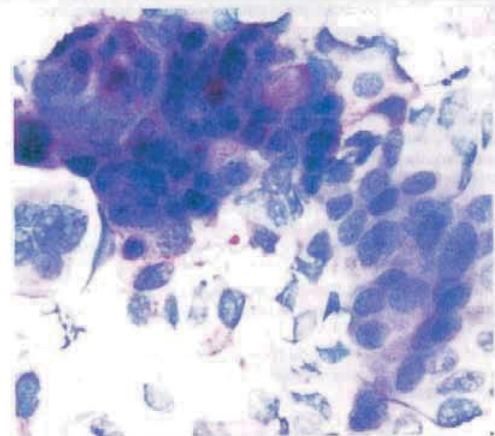
vzorcích tumor zastížen. V takových případech může být výhodnější aspirační biopsie tenkou jehlou (FNAB – fine needle aspiration biopsy) a cytologické vyšetření. Cytologické vzorky jsou získávány jednak při přímém odběru žluči v průběhu ERCP vyšetření, jednak pomocí FNAB pod endosonografickým navedením bioptické jehly. Standardní cytologie v materiálu získaném při ERCP vyšetření vykazuje (u pacientů s CC) v méně než 50 % pozitivitu nálezů cholangiokarcinomu, avšak jestliže je současně ještě provedena cílená biopsie tkáně, zvýší se pozitivita záchytu až na 70 %. Při využití molekulárně cytogenetické metody FISH (fluorescenční

in situ hybridizace) pro stanovení polysomie chromozomů 3,7 a 17, případně delece oblasti 9p21 (tumorsupresorový gen *CDKN2A*), se zvyšuje senzitivita až na 98 % [46]. Při fluorescenční in situ hybridizaci pro stanovení polysomie chromozomů 3,7 a 17, případně delece oblasti 9p21 (tumorsupresorový gen *CDKN2A*) hybridizuje fluorescenčně značená molekula nukleové kyseliny – sonda s hledanou a analyzovanou sekvencí nukleové kyseliny přímo v buňce, „na místě“, na histologických řezech tkáně či na izolovaných buňkách v cytologickém preparátu (obr. 10). Specifická FISH je uváděna 97 % [43]. FISH metoda je u nás dostupná ve většině cytogenetických laboratoří.

Obr. 8. Imunohistochemický průkaz CK 7 v nádorových buňkách v řezech z cytobloku. Barvení IHC CK7, zvětšení 100krát, foto Olympus DP 70



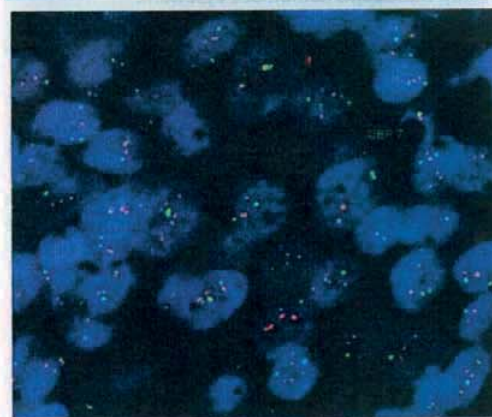
Obr. 9. Cytologický nátěr maligních buněk z tenkojehlové aspirační cytologie s průkazem PAS reakce (Periodic Acid Schiff) pozitivních vakuol. Barvení PAS, zvětšení 200krát, foto Olympus DP 70



Molekulární genetika (obr. 10)

Mezi rizikové faktory, které mohou mít zásadní vliv na patogenesi cholangiogenního karcinomu, náleží zánětlivé procesy – např. zmíněná PSC. Zánětlivé buňky jsou asociovány s oxidativním stresem, který může vést ke genetickým mutacím, poškození DNA a inhibici DNA repair enzymů, nadprodukcí vaskulárního endoteliálního faktoru (VEGF), což může způsobovat angiogenezi a generování cytokinů, které vedou k vyloučení apoptózy a podpoře buněčné proliferace [47]. Kancerogeneze u cholangiogenního karcinomu se tedy zúčastňují geny ovlivňující buněčný cyklus a apoptózu. Patří sem *KRAS* gen ovlivňující mechanismus buněčného růstu a diferenciace. Tento protoonkogen konvertuje v aktivní onkogen bodovou mutací v kodonech 12, 13 nebo 61. Frekvence výskytu mutovaného genu *KRAS* je v závislosti na rase velice variabilní a má také vysokou geografickou variabilitu (např. 50–56 % v japonské populaci pacientů s CC vs 0–8 % u thajských pacientů s CC). Je uváděn větší výskyt mutací u periduktálních a spikulárních karcinomů než u „mass forming“ tumorů. Dalším významným tumorsupresorovým

Obr. 10. Polysomie chromozomu 7, použitá sonda KREATECH Diagnostic, DN EGFR, Her-1 (7p11)/SE 7



genem, který má zásadní význam v karcinogenezi obecně, je gen *TP53*. K jeho inaktivaci může docházet mutací genu nebo delecí lokusu chromozomu 17p13, na kterém je gen lokalizován. Incidence mutace genu *TP53* u intrahepatálního cholangiogenního karcinomu je 11–37 % a delece oblasti 17p13 38 % případů. V posledních studiích je prokázán také významný vliv epigenetických změn na vznik cholangiogenního karcinomu, které vedou k hypermetylaci promotorů mnoha genů. S těmito změnami bývají asociovány především mutace genů *IDH1* a *IDH2* (kódují izocitrátdehydrogenázu), které bývají přítomny u 10–23 % cholangiogenních karcinomů. Mutace *IDH1* a *IDH2* genů vedou k nadprodukcí 2-hydroxyglutarátu, který se takto jeví jako potenciální biomarker pro monitorování terapie specifickými inhibitory *IDH* mutace, které jsou v současnosti testovány na zvířecích modelech [47]. Ve studiích cholangiogenních karcinomů jsou popisovány také genetické a epigenetické změny genu *CDKN2A*, který je regulátorem inhibitorů cyklinependentních kináz. Metylace CpG ostrůvků v oblasti 5', která způsobí inaktivaci genu *CDKN2A*, je přítomna v 54 %, alelická ztráta *CDKN2A* genu (lokus 9p21) ve 20 % a bi-alelická delece genu *CDKN2A* u 5 % cholangiogenních karcinomů [45]. Aktivace genu *EGFR* koreluje s rekurencí tumoru a horší prognózou, také ERBB2 exprese je asociována s progresí tumoru. Intracelulární mechanismy mají za následek aktivaci RAS-RAF-MAPK nebo COX2 signální dráhy. Významnou roli hraje při vzniku cholangiogenního karcinomu také NOTCH signální dráha. U většiny cholangiogenních karcinomů dochází k telomerázové aktivaci. Mikrosatelitová instabilita je málo frekventní [46].

Závěr

Cholangiokarcinom je relativně vzácný nádor, který má příznivou prognózu pouze v případech, že je včas diagnostikován. Jen včasná diagnóza umožňuje adekvátní chirurgické řešení jako v současné době jedinou efektivní možnost úspěšné léčby pacienta. Při podezření na cholangiokarcinom se jeví jako optimální diagnostický postup následující kombinace vyšetření:

- nativní a postkontrastní vyšetření magnetickou rezonancí (jehož součástí je i MRCP) a vyšetření digitální subtrakční angiografie
- výše uvedené zobrazovací metody je nutno doplnit některým z vyšetření, která umožňují odběr vzorků k histologickému nebo cytologickému vyšetření (ERCP, EUS, PTC, IDUS, Spy-Glass)
- senzitivitu i specifitu histologického a cytologického vyšetření lze zvýšit využitím molekulárně cytogenetické metody FISH (fluorescenční hybridizace in situ), jejíž specifita dosahuje hodnoty až 97 %, senzitivita 98 %.

Literatura

1. Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma. *Semin Liv Dis* 2004; 24(2): 115–125.
2. Patel T. Increase incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States. *Hepatology* 2001; 33(6): 1353–1357.
3. Shaib YH, Davila JA, Mc Glynn K et al. Rising incidence of intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States: a true increase? *J Hepatol* 2004; 40(3): 472–477.
4. Taylor-Robinson SD, Toledano MB, Arora S et al. Increase in mortality rates from intrahepatic cholangiocarcinoma in England and Wales 1968–1998. *Gut* 2001; 48(6): 816–820.
5. ÚZIS. Novotvary ČR 1991–2010. Zdravotnická statistika. Ediční řada. ÚZIS ČR: Praha. Dostupné z WWW: <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary>.
6. Blechacz B, Komuta M, Roskams T et al. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011; 8(9): 512–522.
7. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2011; 54(1): 173–184.
8. Khan SA, Thomas HC, Davidson BR et al. Cholangiocarcinoma. *Lancet* 2005; 366(9493): 1303–1314. Erratum in *Lancet* 2006; 367(9523): 1656.
9. Khan SA, Toledano MB, Taylor-Robinson SD. Epidemiology, risk factors, and pathogenesis of cholangiocarcinoma. *HPB (Oxford)* 2008; 10(2): 77–82.
10. Khan SA, Davidson BR, Goldin RD et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update. *Gut* 2012; 61(12): 1657–1669.
11. Adenuga A, Khan SA, Taylor-Robinson SD et al. Polychlorinated biphenyls in bile of patients with biliary tract cancer. *Chemosphere* 2009; 76(6): 841–846.
12. Claessen MM, Vlegaar FP, Tytgat KM et al. High lifetime risk of cancer in primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 2009; 50(1): 158–164.
13. Abbas G, Lindor KD. Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *J Gastrointest Cancer* 2009; 40(1–2): 19–25.
14. Bismuth H, Castaing D. Hepatobiliary malignancy. Edward Arnold: London 1994.
15. Deoliveira ML, Schulick RD, Nimura Y et al. New staging system and a registry for perihilar cholangiocarcinoma. *Hepatology* 2011; 53(4): 1363–1371.
16. Endo I, Gonen M, Yopp AC et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection. *Ann Surg* 2008; 248(1): 84–96.
17. Khan SA, Davidson BR, Goldin R et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: consensus document. *Gut* 2002; 51(Suppl 6): VI1–VI9.
18. Skipworth JR, Keane MG, Pereira SP. Update on the management of cholangiocarcinoma. *Dig Sci* 2014; 32(5): 570–578.
19. Ehrmann J, Hůlek P et al. *Hepatology*. Grada: Praha 2014: 602–604. ISBN 978–80–247–5510–6.
20. Patel AH, Harnois DM, Klee GG et al. The utility of CA 19–9 in the diagnoses of cholangiocarcinoma in patients without primary sclerosing cholangitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(1): 204–207.
21. Bonney GK, Craven RA, Prasad R et al. Circulating markers of biliary malignancy: opportunities in proteomics? *Lancet Oncol* 2008; 9(2): 149–158.
22. Hultcrantz R, Olsson R, Danielsson A et al. A 3-year prospective study on serum tumor markers used for detecting cholangiocarcinoma in patients with primary sclerosing cholangitis. *J Hepatol* 1999; 30(4): 669–673.
23. Charatcharoenwithaya P, Enders FB, Halling KC et al. Utility of serum tumor markers, imaging, and biliary cytology for detecting cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis. *Hepatology* 2008; 48(4): 1106–1117.
24. Ghazale A, Chari ST, Zhang L et al. Immunoglobulin G4-associated cholangitis: clinical profile and response to therapy. *Gastroenterology* 2008; 134(3): 706–715.
25. Kuszyk BS, Soyfer P, Bluemke DA et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: the role of imaging in detection and staging. *Crit Rev Diagn Imaging* 1997; 38(1): 59–88.
26. Kluge R, Schmidt F, Caca K et al. Positron emission tomography with [(18)F]fluoro-2-deoxy-D-glucose for diagnosis and staging of bile duct cancer. *Hepatology* 2001; 33(5): 1029–1035.

27. Kim JY, Kim MH, Lee TY et al. Clinical role of 18F-FDG PET-CT in suspected and potentially operable cholangiocarcinoma: a prospective study compared with conventional imaging. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(5): 1145–1151.
28. Maccioni F, Martinelli M, Al Ansari N et al. Magnetic resonance cholangiography: past, present and future: a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; 14(8): 721–725.
29. Romagnuolo J, Bardou M, Rahme E et al. Magnetic resonance cholangiopancreatography: a meta-analysis of test performance in suspected biliary disease. *Ann Intern Med* 2003; 139(7): 547–557.
30. Corvera CU, Blumgart LH, Akhurst T et al. 18F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography influences management decisions in patients with biliary cancer. *J Am Coll Surg* 2008; 206(1): 57–65.
31. Furukawa H, Ikuma H, Asakura K et al. Prognostic importance of standardized uptake value on F-18 fluorodeoxyglucose-positron emission tomography in biliary tract carcinoma. *J Surg Oncol* 2009; 100(6): 494–499.
32. Weynand B, Deprez P. Endoscopic ultrasound guided fine needle aspiration in biliary and pancreatic diseases: pitfalls and performances. *Acta Gastroenterol Belg* 2004; 67(3): 294–300.
33. Chen YK, Parsi MA, Binmoeller KF et al. Single-operator cholangioscopy in patients requiring evaluation of bile duct disease or therapy of biliary stones (with videos). *Gastrointest Endosc* 2011; 74(4): 805–814.
34. Sharma AK. Role of MRCP versus ERCP in bile duct cholangiocarcinoma and benign stricture. *Biomed Imaging Interv J* 2007; 3(1): e12–e545.
35. DeWitt J, Misra VL, Leblanc JK et al. EUS-guided FNA of proximal biliary strictures after negative ERCP brush cytology results. *Gastrointest Endosc* 2006; 64(3): 325–333.
36. Urban O, Arnelo U, Kliment M et al. Cholangiopancreatioskopie pomocí SpyGlass™ direct visualization system: seznámení s metodou a první vlastní zkušenosti. *Gastroent Hepatol* 2013; 67(2): 124–126.
37. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH et al. WHO classification of tumours of the digestive system. 4th ed. IARC: Lyon 2010. ISBN 9789283224327.
38. Akiba J, Nakashima O, Hattori S et al. Clinicopathologic analysis of combined hepatocellular-cholangiocarcinoma according to the latest WHO classification. *Am J Surg Pathol* 2013; 37(4): 496–505.
39. Hytioglou P, Theise ND. Differential diagnosis of hepatocellular nodular lesions. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15(4): 285–299.
40. Gores GJ. Cholangiocarcinoma: current concepts and insights. *Hepatology* 2003; 37(5): 961–969.
41. Honsová E. Úloha patologa v diagnostice a léčbě onemocnění v hepatobiliární oblasti. *Bulletin HPB* 2004; 12(1–2): 1–2.
42. Honsová E. Histopatologická diagnóza hepatocelulárního karcinomu. *Gastroent Hepatol* 2012; 66(2): 93–98.
43. Levy MJ, Baron TH, Clayton AC et al. Prospective evaluation of advanced molecular markers and imaging techniques in patients with indeterminate bile duct strictures. *Am J Gastroenterol* 2008; 103(5): 1263–1273.
44. Gonda TA, Glick MP, Sethi A et al. Polysomy and p16 deletion by fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of indeterminate biliary strictures. *Gastrointest Endosc* 2012; 75(1): 74–79.
45. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. Dostupné z WWW: <<http://atlasgeneticsoncology.org/>>
46. Cheng L, Eble JN. Molecular surgical pathology. Springer: New York 2013. ISBN 978–1461448990.
47. Rizvi S, Gores GJ. Molecular pathogenesis of cholangiocarcinoma. *Dig Dis* 2014; 32(5): 564–569.

MUDr. Martin Rydlo, Ph.D.

✉ drrydlo@seznam.cz

Interní klinika LF OU a FN Ostrava

www.fnbrno.cz

Doručeno do redakce 29. 7. 2015

Přijato po recenzi 15. 10. 2015