

Univerzita Karlova v Praze
2. lékařská fakulta

Studijní program: Biologie a patologie buňky



MUDr. Linda Čapková

Histopatologická a molekulární diagnostika nádorů plic a pleury
Histopathologic and molecular diagnostics of lung and pleural neoplasms

Disertační práce

Školitel: Prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

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

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

V Praze, 26.3.2014

LINDA ČAPKOVÁ

Podpis

Identifikační záznam:

ČAPKOVÁ, Linda. *Histopatologická a molekulární diagnostika nádorů plic a pleury. [Histopathologic and molecular diagnostics of lung and pleural neoplasms]*. Praha, 2014. 86 s., 3 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK. Školitel Kodet, Roman.

Klíčová slova: plíce, pleura, karcinom, maligní mezoteliom, molekulární změny, LOH, hTERT, imunohistochemie, karboanhydráza, CAIX

Klíčová slova anglicky: lung, pleura, carcinoma, malignant mesothelioma, molecular changes, LOH, hTERT, immunohistochemistry, carboanhydrase, CAIX

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala v první řadě svému školiteli prof. MUDr. Romanu Kodetovi, CSc., za odborné vedení a cenné rady při zpracování předkládané práce.

Dále děkuji pracovníkům Laboratoře molekulární patologie 2. LF UK a Fakultní nemocnice v Motole pod vedením RNDr. Markéty Kalinové, PhD., kteří mi byli nápomocni při provádění molekulární diagnostiky nádorů plic a jejich prekancerózních lézí, a prim. MUDr. Františku Petříkovi z Pneumologické kliniky 2. LF UK a FN v Motole za spolupráci při odběru bronchoskopického materiálu.

Za spolupráci při imunohistochemické diagnostice maligního mezoteliomu děkuji laborantkám Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole, zejména Vlastimile Forejtové a jejím kolegyním.

Svým blízkým za nekonečnou trpělivost a lásku.

OBSAH

1	<u>ÚVOD</u>	<u>7</u>
2	<u>TEORETICKÁ ČÁST/PŘEHLED PROBLEMATIKY.....</u>	<u>9</u>
2.1	MALIGNÍ EPITELOVÉ NÁDORY PLIC A JEJICH PREKANCERÓZY.....	9
2.1.1	Maligní epitelové nádory plic.....	9
	2.1.1.1 <i>Epidemiologie a etiologie karcinomu plic.....</i>	10
2.1.2	Prekancerózní léze.....	12
2.1.3	Genetické a molekulární změny v karcinomech plic.....	16
2.1.4	Molekulární podstata prekancerózních lézí SCC.....	17
	2.1.4.1 <i>LOH.....</i>	18
	2.1.4.2 <i>hTERT.....</i>	19
2.1.5	Možnosti časně detekce SCC a jeho prekancerózních lézí.....	20
2.2	MEZOTELIÁLNÍ NÁDORY PLEURY.....	22
2.2.1	Mezoteliální nádory pleury – klasifikace.....	22
2.2.2	Difúzní maligní mezoteliom.....	23
	2.2.2.1 <i>Epidemiologie, etiologie a patogeneze.....</i>	23
	2.2.2.2 <i>Genetické a molekulární změny.....</i>	24
	2.2.2.3 <i>Histologická a imunohistochemická diagnostika.....</i>	25
3	<u>OTÁZKY A CÍLE PRÁCE.....</u>	<u>29</u>
4	<u>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – METODIKA.....</u>	<u>31</u>
4.1	ODBĚR A ZPRACOVÁNÍ MATERIÁLU.....	31
4.2	EXTRAKCE NUKLEOVÝCH KYSELIN ZE ZMRAŽENÉ TKÁNĚ A PERIFERNÍ KRVE.....	32
4.3	MARKERY POLYMORFISMU MIKROSATELITŮ A GENOTYPIZACE POMOCÍ FLUORESCENČNĚ ZNAČENÝCH PRIMERŮ.....	32
4.4	REVERZNÍ KVANTITATIVNÍ PCR V REÁLNÉM ČASE	33
4.5	IMUNOHISTOCHEMIE.....	36
4.6	STATISTICKÉ METODY.....	37
5	<u>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – VÝSLEDKY A DISKUZE.....</u>	<u>38</u>
5.1	MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKA PREKANCERÓZNÍCH LÉZÍ NSCLC (Práce A, B).....	38
5.1.1	Vztah mezi endoskopickým AFB/WLB nálezem a přítomností histologických změn.....	38
5.1.2	Vztah mezi přítomností histologických změn a detekcí LOH	41

5.1.3	Vztah mezi přítomností histologických změn a expresí hTERT mRNA.....	43
5.1.4	Vztah mezi přítomností LOH a expresí hTERT mRNA.....	44
5.1.5	Vztah mezi přítomností molekulárních změn a dobou kouření.....	45
5.1.6	Vztah mezi přítomností molekulárních změn a autofluorescenčním obrazem.....	46
5.1.7	Diskuze.....	47
5.2	DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA MALIGNÍHO MEZOTELIOMU (Práce C).....	54
5.2.1	Zhodnocení histologických diagnóz maligního mezoteliomu pomocí imunohistochemického vyšetření	54
5.2.2	Expresse karboanhydrázy IX v maligním mezoteliomu.....	57
5.2.3	Diskuze.....	61
6	<u>ZÁVĚRY.....</u>	65
7	<u>SOUHRN.....</u>	68
8	<u>ABSTRACT.....</u>	70
9	<u>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</u>	72
10	<u>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....</u>	81
11	<u>SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....</u>	83
12	<u>PŘÍLOHY.....</u>	85

Příloha A Capkova L., Kalinova M., Krskova L., Kodetova D., Petrik F., Trefny M., Musil J., Kodet R. (2007) Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. **Cancer**. 109 (11): 2299-307.
IF₂₀₀₇ 4.582

Příloha B Petřík F., Trefný M., Kodetová D., Čapková L., Kalinová M., Krsková L., Musil J. (2007) Detekce morfologických a genetických změn bronchiální sliznice autofluorescenční bronchoskopií u těžkých kuřáků. **Studia pneumologica et phthiseologica: Časopis Slovenskej pneumologickej a ftiseologickej spoločnosti a České pneumologické a ftizeologické společnosti**. 67 (5): 204-209.

Příloha C Capkova L., Koubkova L., Kodet R. (2014) Expression of Carboanhydrase IX (CA IX) in Malignant Mesothelioma. An Immunohistochemical and Immunocytochemical study. **Neoplasma**. 61 (2): 161-169.
IF₂₀₁₂ 1.574

1 ÚVOD

Karcinom plic dlouhodobě zaujímá v celosvětovém měřítku první místo v příčině mortality na maligní nádorová onemocnění, ročně mu celosvětově podlehne přes 1 milion lidí (Alberg A. J. et al., 2005). Česká republika patří k zemím s jeho nejvyšším výskytem, přičemž ročně u nás na toto onemocnění umírá přes 3600 mužů a 1 500 žen (Dušek L. et al., 2010). Současné epidemiologické trendy jsou nepříznivé, zvláště stoupá incidence i mortalita u žen (www.svod.cz). Celkové 5tileté přežití činí zhruba 12 % (Berrino F. et al., 2007). Neuspokojivá prognóza a vysoká mortalita na toto onemocnění jsou v první řadě zapříčiněny pozdní diagnózou. Ve více než 70 % případů je nádor v době detekce inoperabilní a léčba má tudíž pouze paliativní charakter. Trvalou výzvou pro pneumology a patology proto zůstává snaha o časný záchyt onemocnění, případně již ve fázi prekancerózy. Z hlediska patologického se však jedná o vysoce komplexní nádorovou proliferaci s různými cestami vzniku preneoplastických změn a vezmeme-li v úvahu i celkovou plochu plicního parenchymu, je časná diagnostika úkolem velmi náročným. Aby bylo možné identifikovat genetické markery účastníci se nádorové progresi a zlepšit tak časnou detekci tohoto maligního onemocnění a vyvinout nové cílené léčebné postupy včetně chemoprevence (tj. zpomalení či odvrácení postupné progresi v malignitu), je třeba porozumět molekulárním změnám způsobujícím nádorové bujení. Pro zlepšení diagnostických i terapeutických aspektů problematiky karcinomu plic se vkládají velké naděje právě do odhalení molekulární podstaty rozvoje tohoto onemocnění.

Difúzní maligní mezoteliom (MM) je ve srovnání s bronchogenním karcinomem onemocnění vzácné. Představuje pouze 0,16 % všech maligních nádorů, nicméně je nejčastější primární malignitou pleury (Travis W. D. et al., 2004). Z pohledu patologa proto spočívá zásadní význam MM na úrovni diferenciálně diagnostické. MM je nutné spolehlivě odlišit od metastázujícího či na pleuru prorůstajícího adenokarcinomu, a to zejména primárně plicního původu. Přestože je etiologická souvislost MM s expozicí azbestu známá již od 50. let 20. století, v mnoha oblastech světa se azbest zpracovával ve velké míře až do 90. let 20. století. V dnešní době je jeho používání v řadě zemí zakázáno, nicméně incidence a tedy i mortalita MM jsou vzhledem k velmi dlouhé době latence jeho vzniku stále na vzestupu. Vzhledem k narůstající incidenci s předpokládaným vrcholem kolem roku 2020 je tomuto onemocnění věnována velká pozornost a jsou zkoumány nové léčebné možnosti. Přesto zůstává MM pleury díky své rezistenci vůči dostupné terapii onemocněním s velmi špatnou prognózou, 100% letalitou a mediánem přežití bez léčby okolo šesti měsíců (Ismail-Khan R. et al., 2006). Protože prakticky všechny případy MM pleury během nebo po ukončení první linie léčby (chemoterapie, event. kombinovaná s radioterapií či chirurgickým výkonem) progredují, jsou hledány nové modalities léčby druhé linie, pro kterou prozatím neexistují standardizované postupy (Ceresoli G. L. et al., 2010). Tato problematika se tak stala ideální oblastí pro testování nových chemoterapeutik včetně antiangiogenních léků, malých

molekul nebo monoklonálních protilátek, které působí na různé signální dráhy na molekulární úrovni (Kelly R. J. et al., 2011).

2 TEORETICKÁ ČÁST/PŘEHLED PROBLEMATIKY

2.1 MALIGNÍ EPITELOVÉ NÁDORY PLIC A JEJICH PREKANCERÓZY

2.1.1 Maligní epitelové nádory plic

Téměř všechny zhoubné nádory plic jsou klasifikovány jako karcinomy, přičemž ostatní histologické typy tvoří pod 1 % všech plicních malignit. Dle histologické klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2004 jsou karcinomy rozlišovány na dvě hlavní skupiny, *karcinom malobuněčný* (SCLC) a *nemalobuněčný* (NSCLC). Diagnostická kategorie NSCLC reprezentuje heterogenní skupinu nádorů, zahrnující adenokarcinom, karcinom dlaždicobuněčný (SCC) a velkobuněčný. Dále je mezi karcinomy plic řazeno mnoho dalších vzácnějších typů nádorů (viz panel č. 1).

Panel 1

WHO histologická klasifikace maligních epitelových nádorů a preinvazivních lézí (Travis W. D. et al., 2004 – zjednodušeno).

Dlaždicobuněčný karcinom	Světlobuněčný
Papilární	S rabdoidními rysy
Světlobuněčný	
Z malých buněk	Adenoskvamózní karcinom
Bazaloidní	
Malobuněčný karcinom	Sarkomatoidní karcinom
Kombinovaný SCLC	Pleomorfní karcinom
Adenokarcinom	Vřetenobuněčný
Smíšený podtyp	Obrovskobuněčný
Acinární	Karcinosarkom
Papilární	Plicní blastom
Bronchioloalveolární	Karcinoid
Non-mucinózní	Typický
Mucinózní	Atypický
Smíšený/neurčený	Nádory typu ze slinných žláz
Solidní s hlenotvorbou	Mukoepidermoidní karcinom
Fetální	Adenoidně cystický karcinom
Mucinózní	Epiteliální-myoepiteliální karcinom
Mucinózní cystadenokarcinom	
Z buněk pečetního prstenu	Preinvazivní léze
Světlobuněčný	Dlaždicobuněčný karcinom in situ
Velkobuněčný karcinom	Atypická adenomatózní hyperplázie
Velkobuněčný neuroendokrinní	Difúzní idiopatická hyperplázie plicních neuroendokrinních buněk
Smíšený velkobuněčný neuroendokrinní	
Bazaloidní	Metastatické epiteliální nádory
Lymphoepithelioma-like	

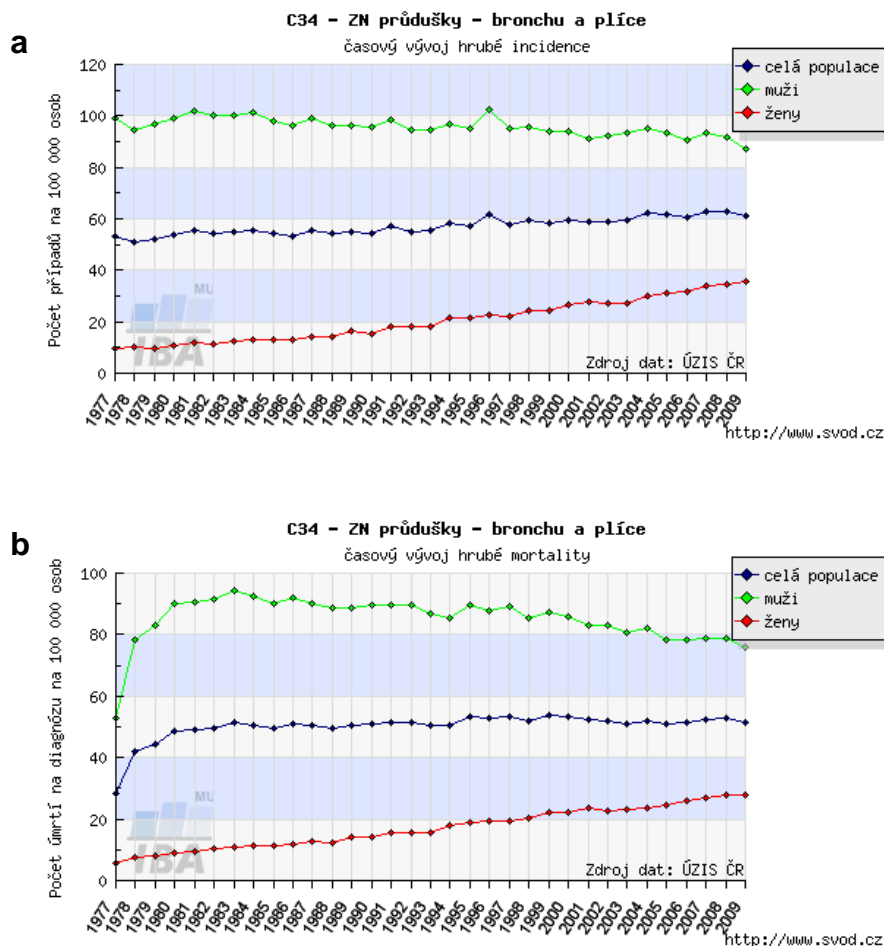
Plíce je jedním z mála orgánů, kde existují různé anatomické a funkční kompartmenty, které dávají vzniknout specifickým typům nádorů (Sun S. et al., 2007). Centrální kompartment

sestává z velkých a středně velkých bronchů a účastní se vedení vzduchu. Periferní kompartment je tvořen menšími bronchioly a alveoly. Histologické struktury těchto kompartmentů jsou velmi odlišné. Výstelka centrálních dýchacích cest je tvořena víceřadým respiračním epitelem s bazálně umístěnými buňkami bazálními a neuroendokrinními a luminálně orientovanými cylindrickými buňkami řasinkovými a hlenotvornými. Výstelku terminálních bronchiolů naopak tvoří nižší ciliální epitelie a sekreční Clara buňky. Alveoly jsou lemovány plochými alveolárními pneumocyty I. typu a surfaktant secernujícími pneumocyty II. typu. Jediné buňky schopné trvalého dělení jsou Clara buňky a pneumocyty II. typu, které zřejmě vznikají ze společné prekursorové bronchioloalveolární kmenové buňky (Kim C. F. et al., 2005). Primordiální plicní kmenová buňka zřejmě dává vzniknout sekundárním kmenovým buňkám centrálního a periferního kompartmentu. Karcinom plic vychází jak z epitelu velkých či středních bronchů (tzv. centrální typ), tak z malých bronchů, bronchiolů či alveolů (tzv. periferní typ). Dlaždicobuněčné karcinomy a SCLC obvykle vznikají centrálně, zatímco převážná část adenokarcinomů a velkobuněčných karcinomů na periférii. Některé adenokarcinomy vznikají též centrálně z povrchového epitelu či z bronchiálních žlázek.

2.1.1.1 Epidemiologie a etiologie karcinomu plic

Karcinom plic je již po několik desetiletí v celosvětovém měřítku nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním. Představuje 12,7 % všech nově diagnostikovaných malignit a 18,2 % všech úmrtí na malignitu. V roce 2008 se jednalo o 1,61 miliónu nových případů a 1,38 miliónu úmrtí. U mužů je karcinom plic dlouhodobě nejčastějším zhoubným novotvarem (1,1 miliónu případů, 16,5 % z celkového počtu malignit). U žen je incidence celkově nižší, ale ve světě karcinom plic přesto zaujímá 4. místo (516 000 případů, 8,5 % všech malignit), a co do mortality na malignitu dokonce 2. místo (427 000 úmrtí, 12,8 % všech úmrtí) (Jemal A. et al., 2011). Relativně vyšší výskyt byl dříve pozorován v zemích rozvinutých než rozvojových (22 % vs. 14,6 %), nicméně nyní se již většina případů diagnostikuje právě v zemích rozvojových (55 % z celkového počtu), což reflektuje změny v expozici dané populace cigaretovému kouři (Curado M. P. et al., 2007).

Česká republika patří k zemím s nejvyšším výskytem karcinomu plic, přičemž zde ročně umírá přes 3600 mužů a 1 500 žen. Zhoubné nádory plic u mužů stojí co do incidence na 3. místě za karcinomem prostaty a kolorekta, u žen se pak dělí o místo 3. až 4. (za karcinomem prsu, kolorekta) se zhoubnými nádory dělohy. Mortalita na karcinom plic zaujímá u mužů v ČR 1. místo, u žen 3. místo (za karcinomy prsu a kolorekta) (Dušek L. et al., 2010). Současné epidemiologické trendy jsou podle dat Národního Onkologického Registru (NOR) nepříznivé. Zatímco incidence nádorů průdušnice, průdušek a plic u mužů v ČR v posledních letech klesá, u žen jak incidence, tak i mortalita stoupají (<http://www.svod.cz>) (obr. 1).



Obr. 1 Vývoj incidence (a) a mortality (b) karcinomu průdušek a plic v České republice (<http://www.svod.cz>).

Rozdíly v zastoupení jednotlivých hlavních histologických typů jsou silně ovlivněny vývojem epidemie karcinomu plic souvisejícího s kouřením (Curado et al., 2007). Zpočátku převažoval SCC, následovaný SCLC, avšak postupně došlo ke vzestupu výskytu adenokarcinomu, který již nyní tvoří většinu všech karcinomů plic (Devessa S. S. et al., 2005; Toh C. K., 2009). V současné době v mnoha západoevropských zemích počet všech typů karcinomu plic u žen a adenokarcinomu u mužů setrvale stoupá, a to i přes pokles kouření a posun k výrobě nízkodehtových cigaret či cigaret s filtry. Vyšší počet pacientů s adenokarcinomem plic je dán jednak vyšším zastoupením bývalých kuřáků, u nichž riziko vzniku SCC klesá rychleji než riziko vzniku adenokarcinomu, ale také změnou složení cigaret. Kouření cigaret se sníženým obsahem dehtu a nikotinu totiž vede ke změně způsobu inhalace cigaretového kouře a větší expozici periferních částí plic, kde se predilekčně vyskytuje adenokarcinom (Alberg A. J. et al., 2005).

Hlavním rizikovým faktorem vzniku karcinomu plic, zejména SCC a SCLC, je vystavení respiračního epitelu účinku rozličných karcinogenů, které vedou ke vzniku celé řady mutací v různých kompartmentech plic. Zhruba 80 % karcinomů plic lze přičíst působení karcinogenů cigaretového kouře, ve kterém je obsaženo téměř 4800 chemických látek, z nichž přes 60 je mezinárodní organizací IARC (*International Agency for Research on Cancer*) klasifikováno jako

karcinogenní. Jedná se např. o polycyklické aromatické uhlovodany, nitrosaminy, aromatické aminy, heterocyklické aromatické aminy, aldehydy, nitrosloučeniny a těžké kovy (Hecht S. S., 2003). V cílových buňkách je většina z nich přeměněna cytochromem P450 na intermediární produkty a dále glutathion-S-transferázou na solubilní produkty, což představuje efektivní detoxifikační mechanismus. Nicméně část intermediátů je vysoce elektrofilní a reaguje s DNA za vzniku DNA adduktů. Tyto addukty se buňka snaží eliminovat z genomu pomocí systému nukleotidové excizní reparace (NER), reparace chybného párování bazí (BER) či speciálního reparačního systému přes O6-metylguanin-DNA-metyltransferázu. Mnoho z těchto enzymů jeví v populaci polymorfizmy a tudíž je jejich detoxifikační a reparační schopnost, a tím i riziko vzniku karcinomu plic, u každého jedince odlišné. Podle epidemiologických studií (Amos C. I. et al., 1999) onemocní touto chorobou pouze 11 % kuřáků. Studie genetických polymorfismů a rizika vzniku karcinomu plic identifikovaly kandidátní geny hrající roli v metabolismu xenobiotik (cytochrom P450 a glutathion-S-transferáza) a účastníci se na reparaci DNA (8-oxoguanin-DNA-glykosyláza 1). Rovněž byly identifikovány varianty genu pro nikotinový acetylcholinový receptor na chromozomu 15q24, které jsou spojovány s vyšším rizikem vzniku karcinomu plic či závislosti na nikotinu (Thorgeirsson T. E. et al., 2008). Obecně je relativní riziko u kuřáků 20x až 30x vyšší než u nekuřáků, přičemž dále záleží na počtu vykouřených cigaret, délce kouření, době od zanechání kouření, věku v době začátku kouření, typu produktu a způsobu inhalace. Význam pro vznik tohoto maligního onemocnění má též pasivní kouření, s prokázaným vzrůstem rizika asi o 20 až 25 %. Dále se uplatňuje i expozice jiným karcinogenům (azbest, krystalické křemičitany, radon, polycyklické aromatické uhlovodíky a těžké kovy) v zaměstnání. Pro většinu těchto chemických látek byl prokázán synergistický účinek s kouřením (Boffeta P. a Trichopoulos D., 2002). Navíc pozitivní rodinná anamnéza zvyšuje riziko vzniku bronchogenního karcinomu zhruba 2,5krát (Amos C. I. et al., 1999).

Kromě kuřáků existuje velká skupina pacientů, preferenčně ženy zejména asijského etnika, kteří nikdy nekouřili, a příčina onemocnění u nich není známa. Karcinomy se u těchto pacientů vyskytují převážně na periférii plicního parenchymu a histologicky se jedná spíše o adenokarcinomy. Molekulárně genetické studie, zkoumající geny TP53, KRAS a EGFR, poukazují u těchto nádorů na zcela odlišné genetické změny než u karcinomů spojených s kouřením (Sun S. et al., 2007). Navíc se tato skupina nádorů liší klinickým chováním i odpovědí na cílenou terapii a je tedy opodstatněné považovat karcinom plic u nekuřáků za samostatnou etiopatogenetickou i klinickou jednotku (Subramanian J. a Govindan R., 2007).

2.1.2 Prekancerózní léze

Vývoj preneoplastických lézí SCC centrálního typu je poměrně dobře prostudovaný. Jejich *grading* definovala WHO klasifikace v roce 1999 (Travis W. D. et al., 1999). U periferních adenokarcinomů se též podařilo popsat prekurzorovou lézi, a to atypickou adenomatózní

hyperplázii (Westra W. H., 2000). Znalosti o prekursorových lézích ostatních typů karcinomu plic, včetně SCLC, jsou velmi omezené a je třeba pracovat na jejich bližším poznání (Kerr K. M., 2001). Zatím nejnovější WHO klasifikace nádorů plic a pleury (Travis W. D. et al., 2004) klasifikovala tři základní typy prekanceróz: dlaždicobuněčnou dysplázií bronchiálního epitelu a karcinom in situ (CIS), dále atypickou adenomatózní hyperplázií (AAH) a difúzní idiopatickou hyperplázií plicních neuroendokrinních buněk (DIPNECH). Tyto léze se však uplatňují v patogenezi pouze části plicních karcinomů a u některých nádorů proto zůstává jejich prekursor dosud neznámý.

Dlaždicobuněčná dysplázie a karcinom in situ (CIS)

Spektrum slizničních změn předcházejících SCC je známé již desítky let (Auerbach O. et al., 1979). Existuje celá řada bronchiálních epiteliálních hyperplázií a metaplázií, které sice nejsou považovány za léze preneoplastické, ale v jejich terénu mohou prekancerózy vznikat. Jsou jimi hyperplázie pohárkových buněk, hyperplázie bazálních (rezervních) buněk a nezralá a zralá dlaždicobuněčná metaplázie. Dlaždicobuněčná dysplázie různého stupně (včetně angiogenní skvamózní dysplázie) a CIS jsou preinvazivní léze spojené se signifikantně vyšším rizikem vzniku karcinomu, což ovšem neznamená, že nutně musí do invazivní léze přejít (Jeanmart M. et al., 2003). Frekvence vzniku těchto prekanceróz koreluje s počtem vykouřených cigaret. Progrese dysplázie nižšího stupně do invazivního karcinomu pravděpodobně trvá řadu let. Opakované následné bronchoskopie a biopsie pacientů s bronchiální dysplázií ukázaly, že zhruba 25 % dysplastických lézí progreduje do invazivního karcinomu v průběhu 36 měsíců a více než 50 % pacientů s CIS vyvine invazivní karcinom v průběhu 30 měsíců (Wistuba I. I. et al. 1997, 1999). Léze typu těžké dysplázie progredují signifikantně častěji do invazivního karcinomu ve srovnání s lehkou či střední dysplázií a dlaždicobuněčnou metaplázií (ve 32 %, resp. 9 % a 9 %) (Breuer R. H. et al., 2005). Breuer et al. zároveň prokázal, že i léze typu dlaždicobuněčné metaplázie a lehké či střední dysplázie progredují do CIS a invazivního karcinomu přímo, a tudíž model postupných změn nelze aplikovat obecně a současná klasifikace premaligních dlaždicobuněčných lézí není spolehlivým ukazatelem rizika vzniku karcinomu plic. Proto je třeba hledat nové biomarkery, včetně molekulárně genetických, které by umožnily lepší predikci přirozeného vývoje těchto lézí.

Zlatým standardem v diagnostice dlaždicobuněčných premaligních lézí bronchiální sliznice je jejich morfologické posouzení, neboť imunohistochemické či jiné vyšetření zpřesňující informace nepřináší. Posuzována je šířka epitelu, velikost, vyzrávání a orientace buněk a jejich jaderné rysy. Vývoj těchto změn je však kontinuální, a tak existují překryvy mezi jednotlivými definovanými kategoriemi. Společným rysem dlaždicobuněčných prekanceróz je intaktní bazální membrána epitelu. Morfologické jednotky zahrnované pod dlaždicobuněčné změny potenciálně předcházející neoplázií v širším slova smyslu jsou popsány v panelu č. 2, od stadia dysplázie pak v tabulce č. 1.

S rozsahem a stupněm dysplázie koreluje lineární nárůst proliferační aktivity stanovené imunohistochemicky protilátkou proti Ki-67 (MIB-1). Barvení na kolagen IV ukazuje postupnou

ztrátu kontinuity bazální membrány od hyperplázie rezervních buněk po dysplázii, až k její progredující destrukci v CIS a v invazivním karcinomu. S progredujícím stupněm dysplastických změn a s rozvojem CIS a invazivního karcinomu též dochází ke zvýšení exprese metaloproteináz matrix a jejich inhibitorů (Galateau-Salle F. B. et al., 2000).

Panel 2

Histologické spektrum bronchiálních hyperplázií a metaplázií.

- **hyperplázie pohárkových buněk** - zmnožené pohárkové buňky v bronchiální sliznici, pohárkové buňky často těsně vedle sebe, jádra uložena bazálně, chromatin denzní, cytoplazma hojná
 - **hyperplázie rezervních (bazálních) buněk** - expanze bazální vrstvy bronchiálního epitelu, jádra malá, kulatá, stratifikovaná na spodině epitelu, cytoplazma chudá, pohárkové a řasinkové buňky při lumenálním povrchu sliznice
 - **nezralá dlaždicobuněčná metaplázie** - podobná hyperplázii rezervních buněk, metaplasticky změněné buňky zaujímají celou šíři epitelové vrstvy, na rozdíl od zralé dlaždicobuněčné metaplázie mají buňky méně cytoplazmy a nekeratinizují
 - **dlaždicobuněčná metaplázie** - nahrazení cylindrických buněk s řasinkami zralým dlaždicobuněčným epitelem s kreatinizací, buňky orientovány paralelně k bazální membráně, bez atypií
-

Atypická adenomatózní hyperplázie (AAH)

V poslední době je věnována pozornost AAH, která zřejmě představuje pomyslný „adenom“ v sekvenci „adenom - karcinom“ na periférii plic a která je prekurzorem periferního adenokarcinomu (Westra W. H., 2000). WHO (Travis W. D. et al., 2004) definuje AAH jako lokalizovanou proliferaci mírně až středně atypických buněk podobných Clara buňkám či pneumocytům II. typu, jejíž velikost nepřesahuje 5 mm v průměru. Tyto léze jsou detekovatelné počítačovou tomografií s vysokým rozlišením (HR-CT) jako malé denzity vzhledu mléčného skla („*ground glass opacities*“). AAH je však většinou náhodným nálezem zejména na periférii plicního parenchymu resekovaného z jiného důvodu. Asociaci AAH a adenokarcinomu (dříve tzv. bronchioloalveolárního) poprvé nezávisle na sobě popsali Shimosato a Milller (Shimosato Y. et al., 1982; Miller R. R., 1993) a jejich původ z progenitorové buňky periferních cest dýchacích Kitamura a Osanai (Kitamura H. et al., 1999; Osanai M et al., 2001). S progresí AAH dochází k mírnému ztluštění alveolárních sept a překrývání buněk, které tvoří papilární struktury a vykazují poměrně výrazné buněčné atypie (Mori M. et al., 2001). Tento model však platí pouze pro část adenokarcinomů. Pro většinu z nich (např. mucinózní adenokarcinomy a zejména velkou skupinu centrálně lokalizovaných adenokarcinomů) je buňka původu (tzv. „*cell of origin*“) stále neznámá.

Tabulka 1

Mikroskopické rysy dlaždicobuněčné dysplázie a CiS (Travis W. D. et al., 2004 - zjednodušeno).

	šíře epitelu	velikost buňky	vyzrávání epitelu	jaderné rysy
lehká dysplázie	mírně zvětšena	mírně zvětšena, mírná anizocytóza a pleomorfie	epitel vyzrává, bazální zóna rozšířená do spodní 1/3 epitelu, zřetelná střední zóna, povrchově oploštění buněk	mírné změny N/C poměru, jemně granulární chromatin, jádérka nenápadná, mitózy chybí či jsou velmi vzácné
střední dysplázie	středně zvětšena	mírně zvětšena, buňky často malé, střední anizocytóza a pleomorfie	částečné vyzrávání epitelu, bazální zóna rozšířená do 2/3 šíře epitelu, intermediární zóna až v horní 1/3 epitelu, povrchové buňky oploštělé	střední změny poměru N/C, jemně granulární chromatin, lobulovaná jádra, jádérka nenápadná, jádra orientovaná vertikálně ve spodních 2/3 epitelu, mitózy ve spodní 1/3 epitelu
těžká dysplázie	výrazně zvětšena	výrazně zvětšena, výrazná anizocytóza a pleomorfie možné	nízký stupeň vyzrávání epitelu, bazální zóna rozšířená až do horní 1/3 epitelu, intermediární zóna zeslabená, povrchové buňky oploštělé	N/C poměr vysoký a kolísá, chromatin hrubý, jádra laločnatá, jádérka častá a nápadná, jádra vertikálně orientovaná ve spodních 2/3 epitelu, mitózy ve spodních 2/3 epitelu
karcinom in situ	může či nemusí být zvětšena	mohou být zvětšené, může být výrazná anizocytóza a pleomorfie	ztráta vyzrávání epitelu, bazální zóna v celé šíři epitelu, chybí intermediární vrstva, ploché pouze zcela povrchové buňky	N/C často vysoký a kolísá, chromatin hrubý, jádra laločnatá, se záhyby, jádérka nápadná či naopak, není zachována orientace jader, mitózy v celé šíři epitelu

N/C – nukleocytoplazmatický poměr

Difúzní idiopatická plicní neuroendokrinní hyperplázie (DIPNECH)

DIPNECH byla poprvé popsána v 50. letech 20. století, ale uvedeným názvem byla pojmenována až v roce 1992 (Aguayo S. M. et al., 1992). Jedná se o difúzní proliferaci jednotlivých plicních neuroendokrinních buněk, malých shluků (tzv. neuroendokrinní tělíška) či lineární proliferaci těchto buněk, která je omezena na bronchiální či bronchiolární epitel. Neuroendokrinní buňky mohou též tvořit lokální extraluminální proliferace ve formě tumorletů o průměru do 5 mm či přecházet do tvorby karcinoidů velikosti nad 5 mm (Travis W. D. et al., 2004). DIPNECH a tumorlety jsou často pozorovány společně s chronickými zánětlivými změnami a fibrózou a jsou v těchto případech považovány za reaktivní změny. Protože se ale vyskytují též v blízkosti skutečných neuroendokrinních nádorů, mohly by být jejich prekurzorovou lézí. Momentálně nejsou známy žádné genetické markery, které by odlišily reaktivní neuroendokrinní proliferace od nádorových či preneoplastických. Stejně tak zůstávají velkou neznámou premaligní změny specifické pro SCLC, v jehož blízkosti vykazuje i histologicky normální sliznice četné hrubé molekulární změny, a tudíž je možný vznik těchto nádorů bez morfologicky odlišitelné preinvazivní léze (Kerr K. M., 2001).

2.1.3 Genetické a molekulární změny v karcinomech plic

Současná hypotéza karcinogeneze vychází z faktu, že fenotyp buněk zodpovědných za maligní proces je následkem poškození různých genů účastnících se regulace buněčného cyklu, proliferace a dělení, reparace DNA, přenosu růstových signálů a apoptózy. Jedná se o známé či domnělé tumor supresorové geny (TSG) či některé onkogeny. Protoonkogeny jsou geny dominantní, tzn. k jejich aktivaci v onkogeny dochází při mutaci či amplifikaci jedné alely, zatímco TSG jsou geny recesivní, tedy inaktivovány musí být alely obě. Knudson (Knudson A., 2001) ve své hypotéze navrhnul, že v tomto procesu je často prvním krokem bodová mutace, druhým pak inaktivace zbývající alely chromozomální delecí, translokací či metylací promotoru daného genu. Dalším mechanismem může být přítomnost mikroRNA, vedoucí k *annealingu* mRNA a tím k její degradaci či blokádě translace. Rovněž v plicní karcinogenezi dochází zároveň se změnami morfologickými (od normálního epitelu přes preneoplastické léze k lézím neoplastickým) k akumulaci minimálně 10 až 20 genetických změn jako jsou mutace, delece, epigenetické modifikace či polysomie, které vedou k iniciaci, rozvoji a udržování nádorového růstu (Sekido Y. et al., 2003). Tyto změny postihují epitel celého bronchiálního stromu (tzv. „*field cancerization*“), který je difúzně exponován účinku vdechovaných karcinogenů, probíhají postupně a jejich počet a frekvence se zvyšuje se závažností morfologických atypií v sekvenci metaplázie - dysplázie – CIS, resp. AAH - adenokarcinom (Wistuba I. I. et al., 2000; Mao L. et al., 1997). Výsledkem tohoto procesu je selekce klonálních buněk, které unikly kontrole regulace buněčného cyklu a případně mají i zvýšenou schopnost migrace. Od toho se odvíjí riziko progresu nádoru charakterizované jeho růstem a schopností metastázovat.

Nádorové buňky a k nim přilehlé části respiračního epitelu vykazují zvýšenou expresi celé řady růstových faktorů a regulátorových peptidů a jejich receptorů a zajišťují tak rozličné autokrinní a parakrinní stimulační zpětné vazby pro další růst nádorových buněk (Viallet V. a Sausville E. A., 1996). Mezi onkogeny účastnící se patogeneze karcinomu plic patří geny C-MYC (zejména u SCLC) či KRAS (u 10 až 20 % všech karcinomů, zejména adenokarcinomů). Významnou úlohu hraje zvýšená exprese genu CCDN1 kódujícího cyklin D1, genu BCL-2 a mutace v rodině ERBB genů, jako např. EGFR (kódující receptor pro epidermální růstový faktor) a HER2/neu. Z tumor supresorových genů jsou to především geny TP53 (17p13), RB (13q14), p16^{INK4a} (9p21) a nové kandidátní TSG v různých chromozomálních oblastech, zejména na krátkém raménku 3. chromozomu (3p14.2, FHIT gen; 3p21, RASFF1A a FUS-1 geny; 3p22-24, BAP-1 gen) a chromozomech 8q21-23, 18q a 22p (Minna J. D. et al., 2002). Kromě těchto změn má význam též genetická nestabilita kritických oblastí chromozomů, jako je např. změna v počtu mikrosatelitů neboli krátkých repetitivních sekvencí (STR - short tandem repeats) (Zöchbauer-Müller S. a Minna J. D., 2000).

Všem histologickým typům karcinomu plic jsou společné tři časté aberace. První z nich zahrnuje mutace genu TP53, který kóduje protein p53 s antiproliferační úlohou zejména

v odpovědi na genotoxické stresy. Inaktivující mutace TP53 vznikají ve velmi časných stadiích karcinogeneze až u 50 % NSCLC a přes 70 % SCLC (Pfeifer G. P. et al., 2002). Další častou genetickou změnou je postižení signální dráhy kontrolující tumor supresorový gen RB, kódující Rb protein, který působí jako regulátor přechodu G1 do S fáze buněčného cyklu. Nejčastěji se jedná o ztrátu exprese RB genu či vyřazení („*silencing*“) genu CDKN2A kódujícího p16^{INK4A} hypermetylací promotoru či ztrátou heterozygosity na chromozomu 9p21, event. nadměrnou expresi genu CCND1 kódujícího cyklin D1. Tyto geny působí ve vzájemné návaznosti v kaskádě kontrolující inaktivaci Rb proteinu fosforylací a jejich změny mají v zásadě podobné funkční dopady. Mechanismus poruchy regulace této dráhy je však odlišný u SCLC a NSCLC (Brambilla E. et al., 1999). U neuroendokrinních karcinomů je přítomna ztráta exprese Rb proteinu v důsledku inaktivující mutace genu RB v 80 % až 100 % případů, zatímco exprese p16^{INK4A} a cyklinu D1 je normální. Naopak u NSCLC se tento mechanismus uplatňuje pouze v 15 % případů a hlavní roli hraje inaktivace p16^{INK4A} (až u 70 % SCC) (Yokota J. a Kohno T., 2004). Konečně velmi častou genetickou změnou přítomnou až v 80 % SCLC i NSCLC je ztráta heterozygosity (LOH, loss of heterozygosity) na krátkém raménku 3. chromozomu (Lu Y. J. et al, 1999). Zde se nachází několik potenciálních TSG, např. gen FHIT (kódující protein s ADP hydrolázovou aktivitou s možnými intracelulárními funkcemi v regulaci replikace DNA a buněčné odpovědi na stres), RASSF1 (kódující protein s úlohou v kontrole aktivity členů rodiny RAS onkogenů) či SEMA3B (kódující semaphorin 3B účastní se vývoje neuronálních a epiteliálních tkání) (Yokota J. a Kohno T., 2004). Význam těchto genů v karcinogenezi je zatím nejasný, nicméně jejich exprese v nádorech často chybí. Výše zmíněné geny na chromozomu 3p jsou zřejmě častým cílem epigenetických změn vlivem dosud ne zcela objasněných mechanismů, neboť v nádorových buňkách často zůstávají reziduální, očividně intaktní alely.

Další genetické změny pozorované u SCLC a NSCLC jsou do jisté míry odlišné, stejně tak jsou změny přítomné v SCC odlišné od změn v adenokarcinomech. Přes 80 % SCC exprimuje např. EGFR protein (Franklin W. A. et al., 2002), oproti tomu exprese HER2/neu a aktivační mutace KRAS, které jsou časté u adenokarcinomů, jsou u SCC relativně vzácné (Hirsch F. R. et al., 2002). Většina SCC vykazuje LOH velkých úseků 3p, zaujímajících téměř celé krátké raménko chromozomu, zatímco v adenokarcinomech a preinvazivních lézích SCC jsou úseky LOH malé, multifokální a začínají v centrální oblasti 3p21 (Wistuba I. I. et al., 2000).

2.1.4 Molekulární podstata prekancerózních lézí SCC

Přestože je známa celá řada molekulárně genetických změn vyskytujících se u invazivních plicních karcinomů, o změnách předcházejících jejich vzniku a mechanismech karcinogeneze víme stále relativně málo. V posledních letech byly zveřejněny studie zabývající se molekulární charakterizací preinvazivních lézí vedoucích především k SCC a adenokarcinomu a mnoho

z těchto genetických změn bylo prokázáno již v normálním bronchiálním epitelu kuřáků (Wistuba I. I. et al., 2002).

U SCC jsou LOH nejčastější a mnohotné na chromozomu 3p (3p21, 3p14, 3p22-24 a 3p12), kde je lokalizována celá řada TSG (RASSF1A, FUS1, LIMD1, SEMA3B, SEMA3F, FHIT a RAR β). LOH zde vzniká ještě v normálním epitelu v iniciálním stadiu prekancerózních změn. Dále následuje LOH na 9p21 (p16^{INK4a}) a později jsou popsány změny v oblastech 8p21-23, 13q14 (RB) a 17p13 (TP53). Všechny popsané děje probíhají ještě před histologicky patrným stadiem dysplázie (Wistuba I. I. et al., 1999 a 2000). LOH proto mohou být zjištěny i v histologicky normálním epitelu kuřáků a nemusí nutně znamenat zvýšené riziko vzniku invazivního karcinomu. Spíše indikují genetické poškození spojené s kouřením (Wistuba I. I. et al., 1997). V dysplastických lézích jsou časté aneuploidie DNA, a to zejména v případech těžké dysplázie (Jonsson S. et al., 2008). Tyto změny jsou progresivní a pokročilé nádory již často mají kompletní či parciální ztráty chromozomálních ramének, zatímco prekursorové léze vykazují spíše fokální LOH. Oproti tomu ztráta alely na 5q21 (APC-MCC) je zjištěná až ve stadiu CIS, mutace TP53 vznikají v různých stadiích rozvoje prekancerózy (Wistuba I. I. a Gazdar A. F., 2006). Drobné okrsky se ztrátou alel (LOH) jsou často mnohotné a přetrvávají dlouhodobě po zanechání kouření.

Důležitým mechanismem inaktivace TSG je rovněž epigenetická hypermetylace jejich promotorů, jako např. metylace p16^{INK4a} (CDKN2A/ARF lokus na 9p21), která se též vyskytuje v časných lézích s frekvencí stoupající během histologické progresse od hyperplázie rezervních buněk (17 %) přes dlaždicobuněčnou metaplázii (24 %) po CIS a invazivní karcinom (50 - 75 %) (Belinsky S. A. et al., 2007). Detekce takových změn ve vzorcích sputa by mohla mít prediktivní hodnotu v identifikaci kuřáků se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu plic (Baryshnikova E. et al., 2008). Dalšími molekulárně genetickými změnami vyskytujícími se v SCC a detekovanými již v prekancerózním stadiu jsou mutace, amplifikace, chromozomální přestavby a epigenetické modifikace (např. hyperexprese) onkogenů PIK3CA a C-MYC (Brambilla E. a Gazdar A., 2009).

2.1.4.1 Ztráta heterozygoty - LOH

Ztráta heterozygoty (Loss of Heterozygosity = LOH) v buňce obecně znamená ztrátu normální funkce jedné alely na specifickém lokusu genu, jehož druhá alela již byla v minulosti inaktivována. V onkogeneze může dojít k LOH v případě, pokud somatická buňka obsahuje pouze jednu kopii alely zatím funkčního TSG. Ke ztrátě alely dochází následkem nondisjunkce v průběhu mitózy, segregace během rekombinace či delece chromozomálního úseku. LOH se stane kritickou v momentě, kdy ve zbylé alele dojde k bodové mutaci, která TSG inaktivuje, což může vést k iniciaci patologických pochodů v buňce a v důsledku toho k nádorové transformaci. LOH (resp. ztráta mikrosatelitní alely) je častou genetickou lézí v mnoha solidních nádorech (Lasko D. et al., 1991) a mapování specifických chromozomálních oblastí výskytu LOH a identifikace

mikrosatelitních expanzí a delecí pomáhá rozpoznat cílové geny, jejichž ztráta či amplifikace je nutná k buněčné transformaci (Sidransky D., 1997).

Ztráty delších chromozomálních úseků jsou detekovatelné cytogenetickými metodami, zatímco k detekci ztráty menšího množství genetického materiálu je třeba použít různé sondy, které jsou specificky komplementární k úseku chromozomu se suspektním TSG. Díky vysokému stupni polymorfismu a výskytu v rozsahu celého genomu jsou vhodnými markery LOH mikrosatelitní DNA lokusy či krátké repetitivní sekvence (STR, short tandem repeat) (Mao L. et al. 1996). Po amplifikaci DNA jsou v normálních somatických buňkách v daném lokusu patrné dvě alely (tj. heterozygota), značící polymorfismus na paternálním a maternálním chromozomu, zatímco v buňkách nádorových je alela pouze jedna (neboť druhá byla „ztracena“) (Cacev T. et al., 2006).

Nejčastější a nejčasnější změny u karcinomu plic jsou LOH oblastí na chromozomu 3p, 9p a 17p (viz výše). U karcinomu plic a bronchiálních preneoplastických lézí byly rovněž hledány defekty v oblastech genů zodpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, tzv. „*mismatch repair genů*“ (3p21 pro hMLH1, 2p15-p22 pro hMSH2 a 2q31-33 pro hPMS1). Změny typu LOH v těchto lokalizacích byly zjištěny v hereditárních i sporadických karcinomech tlustého střeva, endometria, ovaria a jiných primárních lokalizací (Gafa R. et al., 2000; Geisler J. P. et al., 2003; Stefansson I. et al., 2002). Data týkající se karcinomu plic a bronchiálních preneoplastických lézí jsou stále limitována (Woenckhaus M. et al., 2003; Hirao T. et al., 2001; Xinarianos G. et al. 2000). Přítomnost TSG v telomerické oblasti chromozomu 11 (11p15.5) je též v popředí zájmu, neboť LOH v této oblasti byly detekovány v celé řadě malignit včetně karcinomu mammy a NSCLC (Rasio D. et al., 1995; Tran Y. K. a Newsham H., 1996).

2.1.4.2 Telomery a hTERT

Telomery byly poprvé popsány v roce 1930 Hermannem Müllerem, který si povšimnul jejich zvláštních vlastností a pojmenoval je podle jejich pozice na koncích chromozomu „telomery“ (z řeckého *telos* = konec a *meros* = část). Telomery jsou nukleoproteinové komplexy na koncích chromozomů eukaryotických buněk, které slouží k jejich stabilizaci a brání jejich vzájemné fúzi a natrávení exonukleázami (McKnight T. D. a Shippen D. E., 2004). V případě lidských chromozomů sestávají ze 300 násobného až 8000 násobného opakování sekvence TTAGGG (Vega L. R. et al., 2003). Během každého buněčného dělení dochází v důsledku nekompletní replikace DNA polymerázou ke zkracování telomer přibližně o 50 až 200 párů bazí na jedno buněčné dělení (Henderson E. H., 1995). Kritické zkrácení telomer omezuje proliferaci buněk a vyvolá apoptózu či senescenci buňky, neboť působí obdobně jako poškozená DNA na aktivaci tumor supresorového genu TP53 (Hastie N. D. et al., 1990). Během časných fází karcinogeneze vedou onkogenní stimuly ke zvýšené replikaci DNA, tudíž dochází ke zkracování/opotřebování telomer a dalšímu poškození DNA (Lantuejoul S. et al., 2007).

Za syntézu repetitivních telomerických úseků je zodpovědný ribonukleoproteinový komplex zvaný telomeráza (Greider C. W. a Blackburn E. H., 1985). Lidská telomeráza se skládá z RNA komponenty (RNA component human telomerase reverse transcriptase – hTERC), která slouží jako templát k elongaci telomer pomocí proteinové katalytické komponenty s funkcí reverzní transkriptázy (human telomerase reverse transcriptase - hTERT), a dalších stabilizačních proteinů jako např. dyskerinu (Artandi S. E. a DePinho R. A., 2010). Právě katalytická podjednotka představuje limitující faktor telomerázové aktivity. Její exprese je v dospělosti omezena na proliferující buňky, tj. buňky zárodečné a kmenové, fibroblasty a aktivované lymfocyty (Kim N. W. et al., 1994; review Bayne S. a Liu J. P., 2005). Většina somatických tkání vykazuje nedetekovatelné či minimální hladiny telomerázové aktivity. Obnovení její exprese je nutné pro neomezenou proliferaci buněk nádorových (Holt S. E. a Shay J. W., 1999), kterým navíc často chybí kontrolní body regulované p53 a Rb proteiny. Tato genetická nestabilita vede ke vzniku nových genetických abnormalit a dále tak podporuje progresi nádorového růstu. Mechanismy reexprese telomerázy v průběhu karcinogeneze nejsou dosud zcela známy. Dochází k nim na úrovni transkripce přes promotor hTERT aktivovaný prostřednictvím proteinů c-Myc, Mad/Max a SP1. Přes 80 % všech maligních nádorů, včetně SCLC a NSCLC, vykazuje zvýšenou telomerázovou aktivitu (Hiyama K. et al., 1995), zatímco u nenádorových buněk je telomeráza aktivní u méně než 0.5 % buněk (Shay J. W. a Bacchetti S., 1997). Přestože některé in vitro či in vivo studie neprokázaly souvislost mezi telomerázovou aktivitou a nádorovým bujením a navíc ukázaly přítomnost její aktivity v normálních regenerujících buňkách (Belair C. D. et al., 1997), většina z nich přímý vztah mezi aktivitou telomerázy a maligním bujením potvrzuje (Herbert B. et al., 1999; Shay J. W. a Bacchetti S., 1997). Měřitelné hodnoty byly pozorovány též v krevním séru a v moči pacientů s malignitou (Hess J. L. a Highsmith W. E. jr., 2002; Meid F. H. et al., 2001). To by mohlo mít poměrně velký význam v klinickém testování jako neinvazivní a cenově výhodná metoda pro časnou detekci a monitoraci nádorového onemocnění.

2.1.5 Možnosti časně detekce SCC a jeho prekancerózních lézí

Karcinom plic je teoreticky vhodným cílem skrínigových opatření, neboť se jedná o onemocnění relativně časté, má dlouhou preklinickou fázi a v případě jeho časně diagnostiky existuje potenciálně kurativní léčba. Navíc je známá naprostá většina cílové rizikové populace, kterou tvoří kuřáci a bývalí kuřáci (Warner E. et al., 2010).

Jednou z možných skrínigových metod je opakované cytologické vyšetření sputa, které je sice vysoce specifické pro detekci centrálních lézí, nicméně je málo senzitivní. Alternativním přístupem může být vyšetření počítačovou tomografií s nízkou intenzitou záření (*low dose CT*), které je schopné odhalit malé, zejména periferní léze (Warner E. et al., 2010). Zda uvedený postup povede ke snížení mortality, je mimo jiné předmětem právě probíhajících klinických studií. Jedním z omezení CT vyšetření je limitovaná detekce centrálních lézí (McWilliams A. et al., 2003), které

jsou charakteristické pro SCC a SCLC. Nejlepší metodou k detekci časných lézí trachey a velkých bronchů proto zůstává klasické bronchoskopické vyšetření bílým světlem (WLB), které dokáže poměrně úspěšně odhalit superficiální či ploché léze velikosti nad 5 mm. Ještě výhodnější je však autofluorescenční bronchoskopie (AFB), využívající fialového či modrého světla a speciálních senzorů ke snímání autofluorescence (viz Materiál a metody), která je schopná zobrazit léze velikosti až kolem 0.5 mm (Lam S. et al., 2000).

Díky zavedení těchto skrínigových přístupů v diagnostice karcinomu plic mohou být detekovány již léze odpovídající dlaždicobuněčné dysplázii a CIS (Kennedy T. C. et al., 2001; Loewen et al., 2007). Konečnou snahou je tyto premaligní léze odhalit a eradikovat dříve, než se transformují v invazivní karcinom. Právě ve fázi karcinomu *in situ* případně mikroinvazivního karcinomu je patrný největší potenciálně kurabilní přínos časné detekce, neboť 5-tileté přežití takto postižených léčených pacientů přesahuje 90 %. Otázkou však i nadále zůstává, jak by tyto léze měly být ošetřeny – zda chirurgickou resekci, radikální externí radioterapií či endobronchiálně nebo naopak jen konzervativně sledovány. Proto je nutné rozvinout vhodné molekulárně genetické metody ke stratifikaci pacientů podle závažnosti léze a ke zvolení vhodné terapie. Klinické studie na tomto poli mohou vést k identifikaci nových diagnostických i prognostických genetických markerů, které by pomohly v indikaci určité formy chemopreventivní terapie s následným sledováním pacientů pomocí AFB.

Cílem skrínigového programu by mělo být snížení počtu úmrtí na karcinom ve sledované populaci. Současné *lege artis* postupy však nedoporučují žádnou z dosud zkoumaných strategií, neboť se přes opakovaná radiografická vyšetření hrudníku či cytologii sputa nepodařilo prokázat jejich přínos ke snížení mortality karcinomu plic (Humphrey L. L. et al., 2004; Guessous I, 2007; Gomez M., Silvestri G. A., 2008). Taktéž podle aktuálního doporučení *US Preventive Services Taskforce* (USPST) neexistují důkazy pro či proti skrínigu karcinomu plic (Summaries for patients. Screening for lung cancer: recommendations from the U.S. Preventive Services Task Force. 2004).

2.2 MEZOTELIÁLNÍ NÁDORY PLEURY

2.2.1 Mezoteliální nádory pleury – klasifikace

Naprostou většinu nádorových mezoteliálních proliferací pleury představuje difúzní maligní mezoteliom (MM) různých histologických typů (panel č. 3), který bývá často nazýván „maligní mezoteliom“ či „mezoteliom“. Ostatní nádory, jejichž biologické chování je příznivější, jsou raritní.

Panel 3

WHO histologická klasifikace mezoteliálních nádorů pleury (Travis W. D. et al., 2004) – zjednodušeno.

Difúzní maligní mezoteliom

- Epiteloidní
- Sarkomatoidní
- Desmoplastický
- Bifázický

Lokalizovaný maligní mezoteliom

Jiné nádory mezoteliálního původu

- Dobře diferencovaný papilární mezoteliom
- Adenomatoidní nádor

Epiteloidní mezoteliom obvykle vykazuje morfologicky epiteloidní rysy s eozinofilní cytoplazmou a relativně světlým jaderným chromatinem, bez nápadnější mitotické aktivity. V nízké diferencovaných tumorech je pleomorfie výraznější a mitózy jsou časté. Nádorové buňky mohou růst tubulopapilárně, mikroglandulárně či solidně. Vzácněji nacházíme varianty malobuněčné, světlobuněčné či deciduoidní. Nádory s anaplastickými či obrovskými nádorovými buňkami jsou nazývány pleomorfní. Fibrózní nádorové stroma může být relativně chudé či naopak hojné, s kolísající buněčností, někdy myxoidně změněné. V takových případech jsou nádorové buňky uloženy v extracelulární matrix, která je tvořena hyaluronátem a vykazuje pozitivitu v barvení alcianovou modří. Jednotlivé výše popsané varianty epiteloidního MM však nemají z klinického hlediska žádný prognostický význam, a proto není jejich bližší subklasifikace nutná.

Sarkomatoidní mezoteliom je varianta MM tvořená vřetenitými buňkami uspořádanými nahodile či ve svazcích připomínajících fibrosarkom, event. v případech s výraznou pleomorfií maligní fibrózní histiocytom. Méně často se mohou v sarkomatoidním MM vyskytovat oblasti podobné osteosarkomu či chondrosarkomu. Jedním z obzvláště agresivních podtypů sarkomatoidního mezoteliomu je mezoteliom desmoplastický, který je tvořený denzním kolagenním vazivem a vmezeřenými nádorovými buňkami.

Bifázický mezoteliom je termín používaný v případech, kdy je v nádoru tvořeném epiteloidní i sarkomatoidní komponentou jedna z těchto složek přítomna v minimálně 10 % objemu nádorové tkáně.

2.2.2 Difúzní maligní mezoteliom

2.2.2.1 Epidemiologie, etiologie a patogeneze

MM je vzácné onemocnění s vysokou letalitou, které je etiologicky ve více než 90 % případů spojeno s expozicí azbestu (McDonald J. C. a McDonald A. D., 1996). Nejčastěji se vyskytuje jako nemoc z povolání u horníků, zaměstnanců loděnic s překladištěm materiálu obsahujícího azbest nebo továren přímo azbest zpracovávajících. U neprofesionální expozice se jedná o obyvatele bydlící v blízkosti dolů na azbest či továren azbest zpracovávajících. První případ MM byl popsán v roce 1947 a od šedesátých do osmdesátých let 20. století, kdy došlo k rozvoji průmyslu používajícího azbest, se výskyt maligního mezoteliomu zvýšil u mužů 3,5krát a u žen 1,4krát (Boutin C. et al., 1998). I nadále dochází zejména v Evropě a Austrálii k vzestupu jeho incidence. Maximum výskytu se z důvodu latence mezi expozicí azbestu a vznikem MM (20 až 40 let) předpokládá kolem roku 2020 (Robinson B. W. a Lake R. A., 2005). Teprve po této době se začne projevovat příznivý vliv opatření zavedených v sedmdesátých letech 20. století regulujících spotřebu a využití azbestu (Peto J. et al., 1999).

Střední doba přežití nemocných s MM činí 9 až 12 měsíců (Robinson B. W. et al., 2005), bez léčby pak přibližně 6 měsíců (Ismail-Khan R. et al., 2006). Jeho letalita dosahuje 100 %, i když nelze vyloučit, že některé časně zachycené nádory je možné vyléčit multimodální terapií, sestávající z extrapleurální pneumonektomie s následnou chemo- a radioterapií. Pleurální MM se vyskytují převážně u pacientů nad 60 let věku, nicméně věková distribuce je široká a jsou známy i případy výskytu tohoto nádoru u dětských pacientů. Dle WHO bulletinu (Delgermaa V. et al., 2011) činí celosvětová věkově specifická mortalita MM 4,9/1 000 000 obyvatel s převahou výskytu v mužské populaci (muži vs. ženy 3,6:1), přičemž nejvyšší incidence byla zaznamenána v Austrálii (16/1 000 000) a v Evropě (7,2/1 000 000). Co se týče anatomické lokalizace, výrazně převažuje postižení pleury nad lokalizací peritoneální, perikardiální a jinou (86,0 %, 11,8 %, 0,6 %, resp. 1,5 %) (Pass H. I. et al., 2005).

Ve většině rozvinutých zemí je vznik pleurálního MM spojen s expozicí azbestu. Azbest je minerál ze skupiny silikátů, které se v přírodě vyskytují ve dvou hlavních formách jako serpentiny (chrysotil) a amfiboly (krocidolit a amosit). Společnou vlastností všech azbestových minerálů je jejich vláknitá struktura, při níž délka mnohonásobně převyšuje průměr. Základní fibrily mají průměr od 0,02 μm (chrysotil) do 0,1 μm (krocidolit), ale délka vláken může dosahovat až desítky milimetrů. Karcinogenní účinek azbestu je důsledkem jeho fyzikálních vlastností. Nejvíce karcinogenní jsou formy amfibolické, zejména krocidolit (Hodgson J. T. a Darnton A., 2000). Dlouhá a odolná azbestová vlákna se dostávají s vdechovaným vzduchem do distálních dýchacích cest a do alveolů. Organismus není schopen eliminovat azbestová vlákna delší než 15 μm mukociliárním transportem či fagocytózou alveolárními makrofágy. Dochází k aktivaci makrofágů, lyzomálních enzymů a cytokinů, jejichž prostřednictvím se rozvíjí chronická zánětlivá reakce až fibróza. Azbestová vlákna deponovaná v plicních alveolech vykazují pleurotropii, tj. migrují

k pleuře, akumulují se subpleurálně a při změně normálního transpleurálního tlaku i přímo v pleurální dutině (Miserocchi G., 1997). Mezotelové buňky jsou až 10krát citlivější k poškození azbestem než epiteliální bronchiální buňky. Azbestová vlákna v nich indukují uvolnění volných kyslíkových radikálů poškozujících DNA, způsobujících mutagenezi a zvýšenou expresi některých onkogenů (c-fos, c-jun) či supresi tumor supresorových genů (FUS1/TUSC2) (Ivanova A. V. et al., 2009). Tyto transformované buňky dále produkují cytokiny snižující protinádorovou obranyschopnost organismu.

Z populace exponované azbestu nicméně v průběhu let vyvine MM pouze malá část jedinců (zhruba 5 %). Pouhá expozice tomuto minerálu tedy není dostatečným podnětem ke vzniku nádorového bujení (Carbone M., 2005). Proto jsou zkoumány další faktory, které ve spojení s expozicí azbestu vedou ke vzniku MM. Uvažuje se především o genetické predispozici, což dokládá pozorování rodin pacientů s MM indukovaným v přírodě se vyskytujícím minerálem erionitem v Turecku. Dalším zkoumaným rizikovým faktorem je infekce virem SV40 (Simian monkey virus), kterým byly kontaminovány vakcíny proti poliovirům v letech 1955 až 1962, což vedlo k rozšíření tohoto viru mezi miliony lidí v různých oblastech světa. Některé studie prokázaly častější výskyt DNA sekvence viru SV40 v určitých typech nádorů, včetně mezoteliomu (Vilchez R. A. et al., 2003; Gazdar A. F. a Carbone M., 2003). Dle původních zjištění SV40 indukuje tvorbu zlomů DNA v mezoteliích a virový antigen Tag inaktivuje funkci tumor supresorových genů TP53 a RB a vede ke vzniku chromozomálních aberací (Barbanti-Brodano G. et al., 2004). Tato pozorování však nebyla v několika novějších studiích potvrzena a rovněž epidemiologické studie nezaznamenaly u populace očkované kontaminovaou vakcínou významně vyšší riziko vzniku maligního nádorového onemocnění (Manfredi J. J. et al., 2005; Engels E. A. et al., 2003). Role latentní infekce SV40 v rozvoji mezoteliomu tedy zůstává nejasná.

Buňka původu („*cell of origin*“) MM dosud není známa. Podle tradiční teorie tento nádor vzniká z povrchových mezotelií, nicméně některé studie poukazují na možný původ v submezoteliální vrstvě buněk, které se diferencují různými směry. MM se pravděpodobně vyvíjí přes *in situ* stadium. Neexistují však zatím žádná spolehlivá histologická kritéria, která by odlišila léze potenciálně představující *in situ* mezoteliom od atypických benigních reakcí, a proto jsou čisté povrchové proliferace mezotelu bez přítomnosti infiltrativního růstu nazývány atypickou mezoteliální hyperplázií.

2.2.2.2 Genetické a molekulární změny

V buňkách MM se vyskytují změny v celé řadě mitogenních signalizačních drah, jakož i poruchy kontroly buněčného cyklu a nadměrná exprese většiny známých genů zodpovědných za radio- a chemorezistenci (Røe O. D. et al., 2009; Mossman B. T. et al., 2013). Karyotypické analýzy a komparativní genomová hybridizace ukázaly, že většina mezoteliomů vykazuje mnohotné chromozomální odchylky. Byly identifikovány určité oblasti se ztrátou genetického

materiálu, a to zejména delece 1p21-22, 3p21, 4q, 6q, 9p21, 13q13-14 a 14q, nicméně žádná ze zkoumaných změn není diagnostická. Méně časté je zmožení genetického materiálu, např. v oblastech 1q, 5p, 7p, 8q22-24 a 15q22-25 (Testa J. R. et al., 2001). Nejčastěji pozorovanými nálezy je inaktivace TSG negativně regulujících cyklin D1, např. homozygotní delece či mutace genu neurofibromatózy (NF2) na chromozomu 22q12, které jsou pozorovány až u 50 % MM (Bianchi A. B. et al., 1995), či homozygotní delece a metylace promotoru CDKN2A/ARF lokusu v oblasti 9p21 s TSG p16^{INK4a} a p14^{ARF}, přítomné až u 70 % MM (Lee A. Y. et al., 2007; Altomare D. A. et al., 2011). Mezoteliomové buněčné linie mají většinou navíc fosforylované četné receptorové tyrozinkinázy, nejvýrazněji EGFR a MET. Aktivace onkogenů bodovými mutacemi či amplifikací však u MM, na rozdíl od karcinomu plic, prokázána nebyla (Sekido Y., 2010).

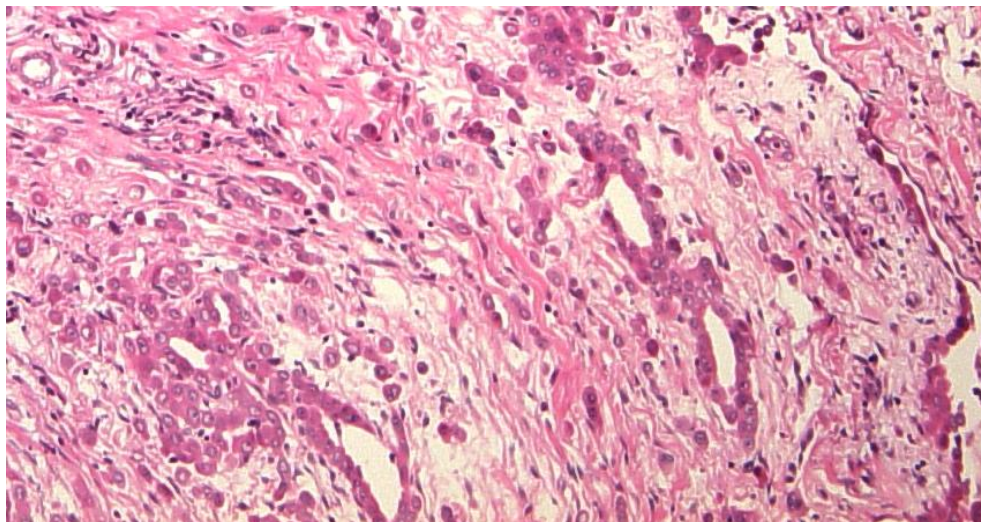
2.2.2.3 Histologická a imunohistochemická diagnostika

MM patří mezi nádory, jejichž histologická diagnostika je na základě morfologie samotné v některých případech velmi obtížná. Diagnóza MM musí být vždy založena na výsledcích adekvátního biotického vyšetření v kontextu s odpovídajícím klinickým, radiologickým a chirurgickým nálezem. V případě pleurálního MM je většinou k dispozici biopsie pleury získaná pomocí videotorakoskopie. V některých případech je postačující cytologie pleurálního výpotku, i když riziko diagnostického omylu je zde poměrně vysoké (Henderson D. W. et al., 2013). Schopnost mezotelových buněk vystylajících serózní povrchy měnit svou morfologii je často zachovaná i v mezotelových nádorech. Existence různých morfologických variant MM tak přispívá k obtížnosti diagnostiky. V první řadě může být problematické odlišit epiteloidní elementy MM od buněk adenokarcinomu různého primárního zdroje. Ve druhé řadě je cytologicky velmi náročné až nemožné odlišit MM od benigní mezoteliální hyperplázie s reaktivními atypii. Buňky MM totiž vykazují cytologické nepravidelnosti různého stupně od pleomorfních až po elementy blandního vzhledu, naopak benigní mezotelie mohou nabývat rysů jinak spojených s malignitou (pleomorfie, mitotická aktivita, zvýšená buněčnost).

Z důvodu morfologické podobnosti mezi zmíněnými jednotkami je třeba použít pomocné diagnostické metody, mezi něž patří barvení histochemickými a imunohistochemickými metodami, elektronová mikroskopie, případně molekulární vyšetření. V diagnostické oblasti hraje v dnešní době primární roli vyšetření imunohistochemické, zejména pak v odlišení epiteloidního MM od adenokarcinomu metastázujícího na pleuru. Rovněž se objevují snahy imunohistochemicky odlišit reaktivní mezoteliální proliferace od nádorových (reaktivní mezoteliální hyperplázii od epiteloidního MM a fibrózní pleuritidu od dezmozplastické varianty sarkomatoidního mezoteliomu), nicméně výsledky těchto studií prozatím nevedly k jednoznačným závěrům (Henderson D. W. et al., 2013).

Diferenciální diagnóza obecně závisí na základním histologickém typu MM. Diferenciální diagnóza epiteloidního MM zahrnuje karcinomy (zejména primární plicní adenokarcinomy či metastatické adenokarcinomy extrapulmonálního zdroje) (obr. 2) a další epiteloidně rostoucí

nádory. Diferenciální diagnostika sarkomatoidního MM zahrnuje sarkomy, sarkomatoidní karcinom a jiné vřetenobuněné nádory. Diferenciální diagnostika bifázického MM zaujímá ostatní smíšené a bifázické nádory jako např. synoviální sarkom nebo pneumoblastom. V době před zavedením imunohistochemického vyšetření do rutinní praxe začátkem 90. let 20. století a před érou relativně vysoce specifických protilátek pro diagnostiku MM bylo velmi obtížné či dokonce nemožné jej odlišit od uvedených maligních nádorů jiného původu.



Obr. 2 Epiteloidní maligní mezoteliom s tvorbou tubulárních/acinárních formací, morfoloicky obtížně odlišitelný od adenokarcinomu (HE; 400x).

Nejčastějším histologickým typem je MM epiteloidní, jehož varianty (zejména tubulární a papilární) musí být odlišeny od adenokarcinomů metastázujících na pleuru a to zejména primárně plicních adenokarcinomů. Nejprve byly k odlišení adenokarcinomů a MM k dispozici protilátka reagující s antigeny exprimovanými adenokarcinomy, jako např. karcinoembryonální antigen (CEA), Ber-EP4 či B72.3 (TAG-72) a nověji pak MOC-31. Koncem 90. let byly vyvinuty protilátky proti cytokeratinu 5/6 (CK 5/6), WT1 (Wilms tumor protein 1) a calretininu (Ordóñez N. G., 1998), v roce 2005 pak proti podoplaninu/D2-40 (Chu A. Y. et al., 2005). Tyto pro MM specifitější mezoteliální, tzv. pozitivní markery, spolu s markery karcinomů, tzv. markery negativními, které s MM imunohistochemicky nereagují, významně přispěly ke zpřesnění diagnózy MM (Ordóñez N. G., 2013). Žádný z těchto markerů však sám o sobě není dostatečně spolehlivý, a v současné době je proto k odlišení epiteloidního MM pleury a plicního adenokarcinomu doporučováno využití kombinace minimálně dvou mezoteliálních a dvou či více epiteliálních (karcinomových) markerů (Husain A. N. et al., 2009). Navíc pro určení primárně plicního původu adenokarcinomu lze využít protilátku proti thyreoidálnímu transkripčnímu faktoru-1 (TTF-1), který je exprimován výlučně v alveolárních pneumocytech a thyreocytech a v nádorech z nich odvozených. Samozřejmě je přizpůsobení těchto diagnostických panelů v případech, kdy diferenciativně diagnosticky připadá

v úvahu jiný nádor než primárně plicní adenokarcinom. Přehled protilátek využívaných v rámci této diferenciální diagnostiky je uveden v tabulce č. 2.

Tabulka 2

Přehled protilátek/antigenů nejčastěji využívaných v imunohistochemické diagnostice maligního mezoteliomu a jejich stručná charakteristika.

D2-40	monoklonální protilátka reagující s onkofetálním antigenem M2A, povrchovým sialoglykoproteinem endotelu lymfatických, fetálních zárodečných buněk a nádorů od nich odvozených a rovněž buněk mezoteliálního původu
CK 5/6	polypeptid cytoskeletu buněk dlaždicového a přechodního epitelu a též mezotelií, jeho exprese je zachována v MM
calretinin	kalcium-vážíci protein s úlohou v regulaci buněčného cyklu (s antiapoptotickými vlastnostmi) a vlivem na homeostázu kalcia, hojný v centrálním i periferním nervovém systému a v neuronech senzoryckých vláken, též exprimován v normálních a nádorových mezoteliích
WT1	tumor supresorový gen na chromozomu 11p13, kódující represor transkripce genů pro růstové faktory, jeho exprese je omezena na deriváty embryonálního mezodermu (fetální ledvina, gonády, slezina, mezotel vystýlající coelomové dutiny)
HBME-1	monoklonální protilátka reagující s neznámým antigenem na vilózním povrchu mezotelií i jiných buněk
CEA	rodina příbuzných onkofetálních glykoproteinů v glykokalyxu povrchových membrán fetálních buněk, v dospělosti přítomny v epitelálních nádorech, zejména adenokarcinomech gastrointestinálního traktu
MOC-31	monoklonální protilátka reagující s epitelálními antigeny neznámé funkce, přítomnými na povrchu normálních či nádorových epitelových buněk, včetně adenokarcinomů různého primárního zdroje
Ber-EP4	monoklonální protilátka reagující s epitelálními antigeny neznámé funkce, přítomnými na povrchu normálních či nádorových epitelových buněk, včetně adenokarcinomů různého primárního zdroje
B72.3 (TAG-72)	monoklonální protilátka reagující s cytoplazmatickým epitopem onkofetálního glykoproteinu (tumor-associated protein 72) exprimovaného u většiny adenokarcinomů
TTF-1	tkáňově specifický jaderný transkripční faktor nutný pro normální vývoj thyrocytů a alveolárních pneumocyty, exprimovaný v nádorech odvozených z těchto buněk

Sarkomatoidní MM jsou typicky pozitivní v průkazu širokospektrých cytokeratinů, zároveň však mohou být pozitivní v průkazu vimentinu, aktinu, desminu či S100 proteinu. Pouze část případů reaguje s protilátkou proti calretininu, event. s dalšími mezoteliálními markery. Odlišení od sarkomatoidního karcinomu plic prorůstajícího na pleuru či metastázujícího sarkomatoidního karcinomu ledviny tak může být velice obtížné a imunohistochemické vyšetření je v těchto případech nepřínosné.

V poslední době si získala pozornost protilátka proti externí N-terminální doměně karboanhydrázy IX (CAIX). CAIX je jednou z 15-ti izoform karboanhydráz, skupiny metaloenzymů, které se účastní regulace pH pomocí katalýzy přeměny oxidu uhličitého na bikarbonát a proton a které jsou zvýšeně exprimovány za hypoxických podmínek přes hypoxií indukovaný faktor 1 α (HIF-1 α). Hypoxie je důležitým faktorem spojeným s růstem různých solidních nádorů, včetně maligního mezoteliomu (Klabatsa A. et al., 2006). Na molekulární úrovni jsou vlivem hypoxie regulovány rozličné buněčné pochody včetně proliferace, apoptózy, angiogeneze, glykolýzy, kontroly pH, adheze a migrace, a konečně i nesmrtelnosti nádorových buněk, schopnosti invaze a metastázování (Harris A. L., 2002). CAIX byla poprvé popsána v linii maligních nádorových buněk HeLa a původně pojmenována MN protein (Pastorekova S. et al., 1992). Funkčně tento enzym podporuje nádorovou progresi a umožňuje přežití nádorových buněk, neboť je udržováním stálého pH chrání před hypoxií a acidózou. Promotor CAIX obsahuje tzv. „*hypoxia response element*“ (HRE), který je řízen transkripčním faktorem HIF-1 α (Wykoff C. C. et al., 2000). Většinou tak distribuce exprese CAIX ve tkáních koreluje s oblastmi hypoxie, měřené prostřednictvím exprese proteinu HIF-1 α či pomocí kyslíkové elektrody. Imunohistochemická exprese CAIX je proto považována za potenciální marker hypoxie (Pastorekova S. et al., 2006).

Fyziologická exprese CAIX je v dospělém organismu omezena pouze na několik typů tkání s distribucí omezenou na specializované buňky, které nemusí být nutně hypoxické či existovat v kyselém prostředí. Tkáněmi exprimujícími CAIX během lidského fetálního vývoje je coelomový epitel (mezotel) a jeho deriváty, některé epitelie v gastrointestinálním traktu a buňky nacházející se v místech výskytu některých buněk kmenových (např. v kůži a v tlustém střevě) (Liao S. Y. et al., 2009). Ektopická exprese CAIX byla popsána v celé řadě nádorových buněčných linií a prokazatelně hypoxických nádorů, vycházejících z děložního hrdla, ovaria, ledviny, plíce, jícnu, mammy, tlustého střeva a dalších, kde byla použita jako endogenní marker hypoxie (Robertson N. et al., 2004). S několika málo výjimkami vykazovala CAIX expresi v okolí nekrotických úseků, tedy v hypoxických oblastech. Přesná distribuce a výskyt CAIX v mezoteliálních tkáních a nádorech od mezotelu odvozených a jejich možné využití (např. jako marker mezotelu/MM či jako cílová molekula pro terapeutický zásah) nejsou zatím dostatečně prozkoumány. Lepší porozumění expresnímu profilu CAIX v těchto tkáních by mohlo vést k využití inovativních léčebných postupů u pacientů s MM.

3 OTÁZKY A CÍLE PRÁCE

Cílem této práce je hlubší poznání patogeneze a zpřesnění diagnostiky maligních onemocnění plic a pleury, konkrétně dlaždicobuněčného karcinomu plic a jeho prekanceróz a difúzního maligního mezoteliomu pleury (MM).

První část práce se zabývá studiem vybraných molekulárně genetických změn v bronchiálním epitelu kuřáků, které by mohly předcházet fenotypickým změnám detekovatelným na úrovni mikroskopického vyšetření, a analýzou prekancerózních lézí dlaždicobuněčného karcinomu plic, a to na úrovni genotypu a fenotypu. Rovněž je zkoumán přínos jedné z moderních bronchoskopických metod v diagnostice prekanceróz a časných stadií karcinomu plic. Konkrétní cíle byly definovány takto:

- porovnat výskyt genetických změn (ztráty heterozygoty - LOH, exprese mRNA katalytické podjednotky telomerázy - hTERT) v závislosti na histologickém obraze, klinických datech a výsledku AFB/WLB vyšetření
- zhodnotit přínos AFB kombinované se standardní WLB oproti samotné WLB pro detekci preneoplastických změn bronchiální sliznice (tj. dysplázie středního a těžkého stupně a karcinomu in situ)
- na základě výše uvedených výsledků potvrdit či vyvrátit následující pracovní hypotézy:
 - Rozšíření standardního bronchoskopického vyšetření o AFB zlepší záchyt premaligních a maligních změn bronchiální sliznice.
 - Pozitivní nález při AFB předchází v procesu karcinogeneze mikromorfologickým změnám bronchiální sliznice, což je možné prokázat molekulárním vyšetřením „biomarkerů malignity“.

Ve druhé části práce je naším cílem zpřesnění diagnostiky maligního mezoteliomu (MM) zejména v diferenciálně diagnosticky obtížných případech. Dále se pokoušíme posoudit význam protilátky proti karboanhydráze IX (CAIX) v diagnostice tohoto typu nádoru. Cílem práce tedy bylo:

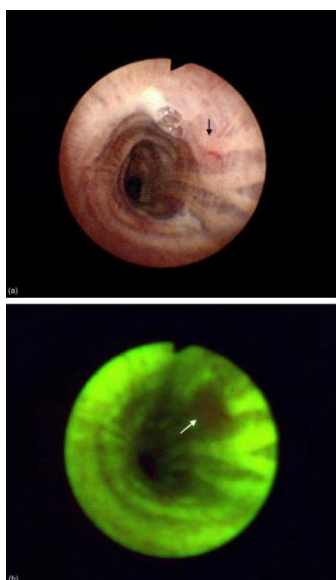
- zpřesnit diagnostiku MM (získat spolehlivě diagnostikovaný archivní materiál pro další studium MM, zejména s ohledem na diferenciální diagnostiku oproti adenokarcinomu metastázujícím na pleuru)
- zhodnotit jednotlivé pozitivní a negativní imunohistochemické markery MM používané na našem pracovišti

- na úrovni proteinu pomocí imunohistochemie zhodnotit (v histologickém i v cytologickém materiálu) v maligních i benigních buňkách mezoteliálního původu rozsah exprese CAIX, jejíž porozumění by mohlo vést k využití inovativních léčebných postupů u pacientů s MM.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST - METODIKA

4.1 Odběr a zpracování materiálu

Materiál pro molekulární část práce byl odebrán na Pneumologické klinice 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (2. LF UK) v Praze a Fakultní nemocnice v Motole (FNM) v rámci kombinovaného vyšetření pomocí konvenční WLB a AFB Onco-LIFE systémem (Xillix Technologies Corporation, Richmond, Kanada). Odběry byly prováděny v místní či celkové anestézii (obr. 3). Zaměřili jsme se na skupinu těžkých kuřáků s FEV1 (usilovně vydechnutým objemem vzduchu během 1. sekundy výdechu) pod 70 % normy. V některých případech bylo k bližšímu posouzení slizničních změn během výkonu přepínáno mezi standardním a autofluorescenčním zobrazením. Bioptické vzorky byly odebrány z míst, kde jedno nebo obě vyšetření byla suspektní z patologického nálezu. Dále byla provedena kontrolní biopsie z jedné či dvou oblastí bronchoskopicky normální sliznice při WLB i AFB. Z každého místa byly odebrány dva vzorky – jeden na histologické a jeden na molekulárně genetické vyšetření. Z vyšetření jsme vyloučili pacienty s akutním zánětem bronchiální sliznice či s krvácením, které dává při AFB falešně pozitivní výsledky. Dále byl od každého pacienta odebrán vzorek periferní krve jako zdroj pro analýzu konstituční DNA. Všechny vzorky jsme zpracovali v Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FNM.



Obr. 3 Obraz z bronchoskopie bílým světlem (WLB) (nahore) a digitalizovaný obraz z autofluorescenčního bronchoskopu (AFB) (dole). AFB sbírá in-vivo fluorescenční signály po osvětlení sliznice modrým laserem či xenonem při vlnové délce 460 nm a zobrazuje rozdíly mezi suspektní (střední a těžkou dysplázií a CIS) a normální bronchiální sliznicí (suspektní léze jsou červenohnědé - šipka, zatímco normální sliznice je zelená). Bronchiální sliznice postižená dysplázií nebo karcinomem vykazuje při fluorescenci defekt převážně v zelené části spektra, zatímco červená část spektra je postižena méně. Předpokládá se, že odlišnou fluorescenci nádorové tkáně způsobuje hlavně větší tloušťka epitelu, která nepropustí fluorescenci vznikající převážně v subepiteliálních vrstvách, dále pak snížený obsah flavinů a větší průtok krve nádorovou tkání při novotvorbě cév.

Převzato z *Optical spectroscopy and imaging for early lung cancer detection: a review.* (Zheng H. et al., 2004).

Materiál na histologické vyšetření byl fixován ve 4 % vodném roztoku formaldehydu, zalit do parafínu, nakrájen na 3 μm silné řezy a na podložních sklech nabarven hematoxylinem-eozinem (HE) pro další histologické posouzení. Druhý vzorek byl po transportu ve fyziologickém roztoku do patnácti minut zamražen při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následně použit pro molekulárně genetické vyšetření.

Histologické preparáty nabarvené HE byly hodnoceny dvěma nezávislými patology a histologický nález byl klasifikován podle platné WHO klasifikace (Travis W. D. et al., 2004).

Materiál k imunohistochemickému vyšetření pochází z archivu Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FNM z let 1999 až 2012. Za účelem získání materiálu se spolehlivou diagnózou MM jsme retrospektivně revidovali bioptický materiál od pacientů s dříve provedenou histologickou diagnózou MM pomocí níže uvedených protilátek a zároveň určili jejich senzitivitu a specifitu. Jako reference bylo vyšetřeno 21 vzorků od pacientů s diagnózou plicního adenokarcinomu. Případy s imunohistochemicky potvrzenou diagnózou MM jsme pak následně vyšetřili protilátkou proti CAIX (viz níže).

4.2 Extrakce nukleových kyselin ze zmražené tkáně a periferní krve

Celkovou DNA a RNA jsme extrahovali pomocí Trizolu (Life Technologies, Merelbeke, Belgie) podle doporučení výrobce z osmi až deseti 5 µm silných řezů zmražených vzorků tkáně, ověřených histologicky na dostatečný počet epitelových buněk (nad 70 %). Vzorky periferní krve byly odebrány do sterilních zkumavek s obsahem antikoagulantia (EDTA) a ihned transportovány při pokojové teplotě do laboratoře. Jaderné buňky jsme izolovali osmotickou lýzou erytrocytů a následnou centrifugací, celkovou DNA a RNA Trizolem dle doporučení výrobce. Přepis RNA do cDNA probíhal pomocí MMLV reverzní transkriptázy (Invitrogen, Carlsbad, USA) a náhodných hexamerů (Roche, Basel, Švýcarsko) v reakčních podmínkách: 1 x RT pufr (50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂); 0,01 M dithiotreitol; 12,5 µM hexamery; 0,5 mM každého dNTP, 200 U MMLV reverzní transkriptázy – inkubace 1 h při 37 °C.

4.3 Markery polymorfismu mikrosatelitů a genotypizace pomocí fluorescenčně značených primerů

Ztráta heterozygoty (LOH) je u nádorů identifikována tak, že se nejprve pomocí markerů polymorfismu (mikrosatelitů neboli krátkých tandemových repetič) posoudí přítomnost heterozygoty daného lokusu ve vzorku krve pacienta (tj. v jeho zárodečné DNA), a poté se porovná s přítomností či nepřítomností heterozygoty ve vzorku zkoumané tkáně. Seznam sledovaných mikrosatelitních markerů a jejich cytogenetická lokalizace jsou uvedeny v tabulce 3. Primery pro polymerázovou řetězcovou reakci (PCR) jsme navrhli podle sekvencí z databáze *Genome Data Base* (www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) a označili fluorescenčním barvivem (6-FAM, HEX, TAMRA). K amplifikaci DNA byl použit automatický cycler, reakční podmínky PCR jsou uvedeny v příložené publikaci (příloha A).

Tabulka 3

Seznam použitých mikrosatelitních markerů, jejich cytogenetická lokalizace a příslušné sekvence primerů.

STR lokus	lokalizace	repeat	index heterozygoty*	sekvence primerů
D2S117 (hPMS1)	2q31-q33	(CA) _n	0.89	5'GAC ATC AGG TAT ATT CAA TCC AC 5'CAG AAA ATG ACA AAC TTT AGA GAG
D2S123 (hMSH2)	2p15-p22	(CA) _n	0.76	5'AAA GAG GAT GCC TGC CTT TA 5'GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC
D3S1611 (hMLH1)	3p21.3	(CA) _n	0.65	5'CCC CAA GGC TGC ACT T 5'AGC TGA GAC TAC AGG CAT TGG
D9S156	9p21	(CA) _n	0.74	5'ATC ACT TTT AAC TGA GGC GG 5'AGA TGG TGG TGA ATA GAG GG
D9S171	9p21	(CA) _n	0.83	5'AGC TAA GTG AAC CTC ATC TCT GTC T 5'ACC CTA GCA CTG ATG GTA TAG TCT
D9S259	9p21	(CA) _n	0.75	5'GGC ATC ATT GCN CCA T 5'GGA TGG ATC TTA TGG GTG GAA
D11S1363	11p15.5	(CA) _n	0.57	5'GAA AAT GGT ATT TAG AAA CCA A 5'CCC AAG GGC TTA CAA C

STR – krátká tandemová repetice; repeat – repetitivní sekvence; * - procentuální zastoupení heterozygotů v jednotlivých lokusech u vyšetřovaných pacientů

Produkty PCR byly kvantitativně detekovány pomocí fragmentační analýzy automatickým genetickým analyzátozem ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Každý fluorescenční „peak“ byl kvantifikován co do velikosti (počtu párů bazí) a výšky (množství amplifikované DNA) (obr. 7 – část Výsledky). Za signifikantní LOH byl arbitrárně považován pokles peaku jedné z alel v daném STR lokusu o 25 či více procent v porovnání s přítomností „peaku“ v normálních buňkách, tj. konstituční DNA z leukocytů periferní krve. Tento arbitrární limit byl zvolen v souladu s předchozími studiemi (Medintz I. L. et al., 2000; Powell C. A. et al., 1999). Pro vyhodnocení ztráty alel jsme vypočetli normalizované poměry (R) dle vzorce

$$R = (A1/A2)/(N2/N1),$$

kde A1 a N1 jsou výšky nižších „peaků“ fluorescence a A2 a N2 výšky vyšších „peaků“ (dle Wanga Y. et al., 1997) ve vzorcích z bronchiální sliznice (A) a periferní krve (N).

4.4 Reverzní kvantitativní PCR v reálném čase (RQ-RT-PCR)

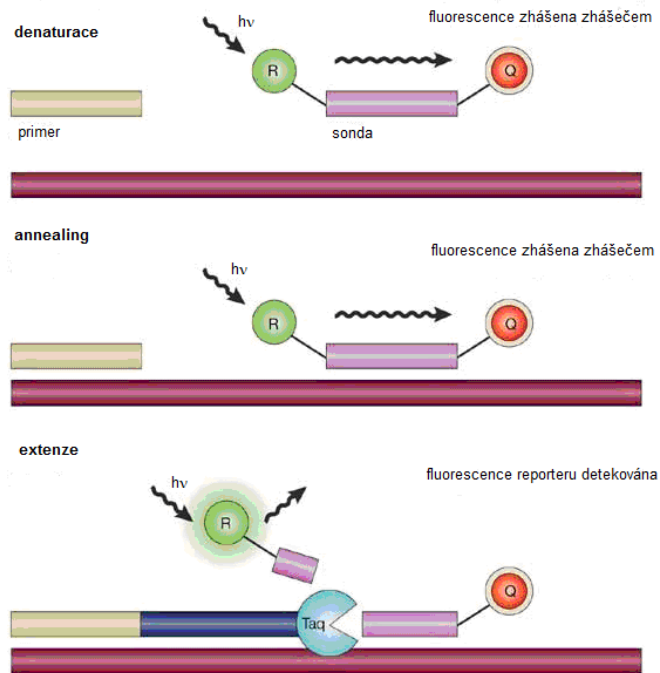
Ke kvantifikaci genové exprese byla použita metoda reverzní kvantitativní polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RQ-RT-PCR), kde sběr dat probíhá kontinuálně během procesu PCR a tudíž je zde amplifikace DNA spojena do jednoho kroku s její detekcí. Základní podmínkou je přítomnost fluorescenčního substrátu, který se váže na syntetizovanou DNA a úroveň detekované fluorescence pak odráží množství nasyntetizované nukleové kyseliny. V systému RQ-RT-PCR se hodnotí tzv. „crossing point“ (CP) či „cycle threshold“ (C_t), což je PCR cyklus, ve kterém přechází kinetika reakce do exponenciální fáze amplifikace. Hodnota C_t stoupá s klesající

koncentrací templátu ve vzorku. Čím větší je množství amplifikované DNA vstupující do reakce, tím dříve dojde k signifikantnímu nárůstu fluorescenčního signálu.

Pro kvantifikaci dané exprese se používá buď relativní a/nebo absolutní kvantifikace. U relativní kvantifikace se analyzují změny v genové expresi v porovnání s referenčním vzorkem. Nejprve se vztahuje (normalizuje) exprese kvantifikovaného genu k expresi tzv. „*housekeeping genu*“, což je gen, který by měl být stabilně exprimován ve všech tkáních. Nejčastěji se používají gen ABL (Abelson murine leukemia virus oncogene homolog), gen pro β -2 mikroglobulin (β 2-M) a gen pro β -glukuronidázu. Tato normalizovaná exprese se označuje jako Δ Ct (Ct vyšetřovaného genu – Ct „*housekeeping genu*“ ve vzorku). Dále se stanovuje RFI (relative fold increase/decrease), což je hodnota Δ Ct stanovovaného genu ve vzorku vztažená k hodnotě Δ Ct daného genu v referenčním vzorku, např. u zdravých dárců, v neléčeném terénu, případně v kalibrátoru, což je cDNA např. z buněčné linie nebo plazmidová DNA. Tato hodnota je označována jako $\Delta\Delta$ Ct a hodnota RFI je následně vypočtena jako $2^{-\Delta\Delta$ Ct.

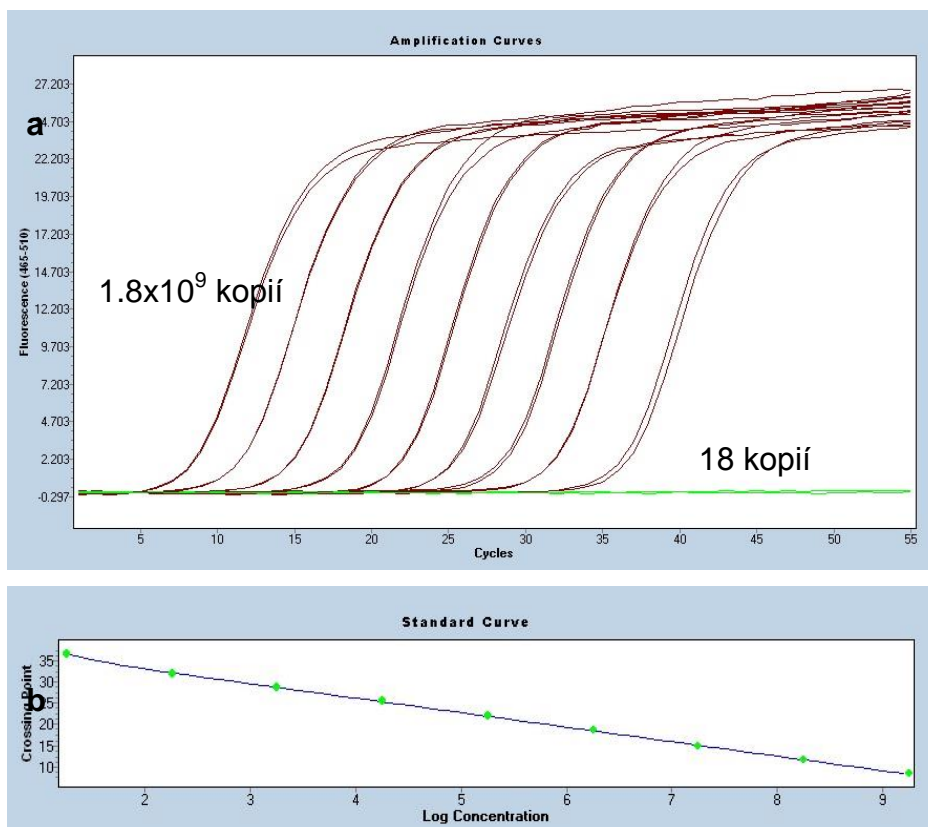
V případě absolutní kvantifikace vztahujeme vyšetřovaný vzorek ke známému množství – standardní kalibrační křivce, kterou sestojíme buď z buněčné linie nesoucí danou genetickou změnu nebo z plazmidové ředící řady. V případě plazmidové ředící řady je nutné genetickou změnu vložit do plazmidu, pomnožit v bakteriích, následně izolovat a určit počet kopií. Daná exprese se vztahuje opět k expresi „*housekeeping genu*“, kdy i v tomto případě je nutno sestavit kalibrační křivku k přesnému určení množství molekul „*housekeeping genu*“. Tato normalizace slouží k určení koncentrace vstupní cDNA ve vzorku. Normalizovaná hodnota (např. počet kopií) je určena jako poměr hodnot vyšetřovaného genu a „*housekeeping genu*“. I zde musí standardní kalibrační křivky splňovat kritéria a parametry pro reprodukovatelnost a efektivitu amplifikace (ideální sklon - „*slope*“ 3,33, korelační koeficient 1). Citlivost metodiky RT-RQ-PCR se pohybuje podle daného systému od 10^{-5} do 10^{-6} v případě vztahování k počtu buněk a 10 až 5 kopií genu v případě využití plazmidové ředící řady.

Detekce exprese mRNA genu hTERT a „*housekeeping*“ genu pro β 2-M pomocí RQ-RT-PCR probíhala na přístroji IQcycler (Bio-Rad, Philadelphia, USA). Pro zhodnocení množství a amplifikovatelnosti cDNA byla použita metoda RT-PCR kvantifikující expresi β 2-M pomocí hydrolyzační sondy TaqMan (obr. 4). Sekvence primerů pro expresi genu β 2-M (β 2-M-F: 5'-TGA CTT TGT CAC AGC CCA AGA TA-3' a β 2-M-R: 5'-AAT CCA AAT GCG GCA TCT TC-3') byly odvozeny z práce K. Bijwaard et al. (2001). K měření hladin mRNA genu hTERT jsme použili RT-PCR s LNA sondou sestavenou podle univerzální knihovny *Universal Probe Library for Human* (www.universalprobelibrary.com; Roche, Mannheim, Německo). Oblast hTERT byla naamplifikována pomocí primerů hTERT-F (5'-GCC TTC AAG AGC CAC GTC-3') a hTERT-R (5'-CCA CGA ACT GTC GCA TGT-3') a LNA sondy č. 19. Reakční podmínky kvantitativních PCR jsou uvedeny v příložené publikaci (viz příloha A).



Obr. 4 Schéma vzniku fluorescenčního signálu pomocí hydrolyzační sondy. Specifická sonda je značena fluoroforem (reporter = R) na 5' konci a zhášedčem (quencher = Q) na 3' konci. Pokud jsou R a Q v blízkosti, tj. sonda je intaktní, Q redukuje fluorescenci R na principu FRET (fluorescence resonance energy transfer); během annealingu k cílové sekvenci dojde k degradaci sondy polymerázou a tím ke zvětšení vzdálenosti mezi molekulou R a Q, což vede ke zvýšené emisi fluorescenčního signálu (upraveno podle Kocha W., 2004).

Standardní křivky (obr. 5) byly vytvořeny pomocí plazmidové DNA genu pro β 2-M a kalibrátoru hTERT od firmy Roche (LightCycler TeloTAGGGhTERT Quantification Kit, Roche, Basel, Švýcarsko). Sekvence cDNA celého naamplifikovaného genu pro β 2-M jsme zaklonovali do plazmidu PCR 2.1.-TOPO a transformovali do buněk bakterie kmene *E. coli* za použití TOPO T/A Cloning Kit (Gibco BRL, San Francisco, USA). Po namnožení transformovaných bakterií jsme izolovali plazmid s námi vloženým inzertem metodou Miniprep, poté spektrofotometricky změřili koncentraci plazmidu a vypočetli počet kopií genu β 2-M. Za účelem sestrojení standardní kalibrační křivky pro absolutní kvantifikaci jsme logaritmicky naředili plazmid do xeno-DNA (DNA z lososích spermií, Sigma, Saint Louis, USA). Standardní kalibrační křivky, které sloužily k určení počtu kopií testovaných genů ve vyšetřovaném vzorku, jsme připravili v následujících konečných sestupných koncentracích: 1) pro β 2-M 1×10^7 , 3×10^6 , 1×10^6 , 3×10^5 , 1×10^5 , 1×10^4 kopií/ μ l a 2) pro transkript genu hTERT 2×10^6 , $2,41 \times 10^5$, $1,80 \times 10^4$, $2,42 \times 10^3$, $2,7 \times 10^2$ kopií/ μ l (dle návodu výrobce). Počet kopií genu β 2-M a počet kopií genu hTERT jsme odečetli ze standardní křivky. Normalizovanou expresi genu hTERT ve vzorcích (hTERT_N) jsme vypočítali jako poměr exprese mRNA genu hTERT a exprese mRNA genu β 2-M $\times 10^4$.



Obr. 5 Příklad stanovení exprese hTERT mRNA metodou kvantitativní PCR s reverzní transkripcí v reálném čase. (a) Amplifikační křivky z přístroje LightCycler 480: na ose x je znázorněn počet cyklů PCR reakce, na ose y intenzita fluorescenčního signálu. (b) Standardní křivka použitá pro výpočet exprese hTERT mRNA. Osa x udává log koncentrace plazmidu a osa y počet cyklů PCR.

4.5 Imunohistochemie

Imunohistochemie je metoda využívaná k detekci antigenů ve tkáňových řezech pomocí vazby mezi specifickou protilátkou aplikovanou na tkáň a antigenním epitopem ve tkáni. V závislosti na typu fixace a uchování tkáně je nutné nejprve zpřístupnit epitopy pro navázání protilátky, a to deparafinací a odkrytím epitopů (např. tepelnou indukci, natrávením tkáně enzymem, působením mikrovlnného záření či roztoků s různým pH). Dále musí dojít k blokadě endogenní aktivity biotinu či enzymu, který je využíván k detekci reakce, např. peroxidázy. Po aplikaci je primární protilátka vizualizována pomocí různých detekčních systémů vznikem barevného precipitátu ve tkáni v místě hledaného epitopu. Nejčastějším systémem detekce je aplikace sekundárních polyklonálních protilátek značených biotinem a vážících se na primární protilátku na základě druhové specifity. Poté se aplikuje komplex avidin-enzym (např. křenová peroxidáza), který po navázání na biotin přemění svou enzymatickou aktivitou bezbarvý roztok substrátu na barevný precipitát. Po dobarvení jader hematoxylinem je preparát odvodněn, zamontován pod krycí sklíčko a výsledek je pak odečítán ve světelném mikroskopu. Postup imunohistochemických reakcí a charakteristika jednotlivých použitých protilátek jsou uvedeny v tabulce č. 4. Současně jsme provedli příslušné pozitivní a negativní kontrolní reakce.

Tabulka 4

Charakteristika použitých protilátek a postupu imunohistochemických reakcí.

protilátka	klon	natrávení	ředění	pozitivita	zdroj
Anti-D2-40	D2-40	citrátový pufr	1:200	cytopl./membrána	DakoCytomation
Anti-CK5/6	D5/16B4	pH 9.9 *	1:100	cytoplazma	DakoCytomation
Anti-calretinin	DAK Calret 1	citrátový pufr *	1:100	jádro/cytoplazma	DakoCytomation
Anti-WT1	6F-H2	pH 9.9 *	1:75	jádro	DakoCytomation
Anti-mesothelial cell	HMBE-1	---	1:50	membrána	DakoCytomation
Anti-CEA	II-7	citrátový pufr	1:40	cytoplazma	DakoCytomation
Anti-epithelial Ag	MOC-31	citrátový pufr *	1:60	membrána	DakoCytomation
Anti-epithelial Ag	Ber-EP4	citrátový pufr *	1:300	membrána	DakoCytomation
Anti-TAG-72	B72.3	---	1:300	membrána	BioGenex
Anti-TTF-1	8G7G3/1	citrátový pufr *	1:100	jádro	NeoMarkers
Anti-CAIX	M75	---	1:100	membrána	Nekomerční zdroj

*HIER: tepelná indukce - heat induced epitope retrieval (40 min při 96 °C); nekomerční zdroj: Jan Závada, Institut molekulární genetiky AV ČR; Ag: antigen

Výsledky imunohistochemických reakcí mezotelových a karcinomových markerů jsme hodnotili semikvantitativně podle procentuálního zastoupení pozitivních nádorových buněk (negativní, méně než 10 %, 10 až 50 %, nad 50 %) a intenzity reakce (slabě, středně a silně pozitivní). Případy se slabou či střední intenzitou reakce cytoplazmatických a membránových markerů v méně než 10 % buněk byly považovány za negativní.

V případě protilátky proti CAIX jsme za pozitivní považovali pouze pozitivitu membránovou. Zhodnotili jsme jak distribuci CAIX pozitivních buněk (negativita - 0 %; ložisková pozitivita - < 50 %; difúzní pozitivita - ≥ 50 %), tak i intenzitu reakce, kterou jsme klasifikovali jako slabou (tj. slabší než pozitivní kontrola) a silnou (stejně nebo vyšší intenzity než pozitivní kontrola). Stanovili jsme 5 skupin exprese CAIX: negativní, slabá fokální, slabá difúzní, silná fokální a silná difúzní pozitivita.

4.6 Statistické metody

Všechny statistické výpočty byly provedeny pomocí statistického programu StatView (Abacus Concept, Berkeley, USA). Základní porovnání metod AFB a WLB bylo provedeno McNemarovým testem a dále byly vypočteny intervaly spolehlivosti pro specifitu, resp. senzitivitu jednotlivých metod. Ke srovnání morfologických nálezů v bronchiální sliznici, stavu kouření a přítomnosti molekulárních změn jsme použili Kruskal-Wallisův H-test a Mann-Whitneyho U-test. K porovnání morfologických nálezů mezoteliomů a exprese CAIX jsme rovněž použili Kruskal-Wallisův H-test. Ve všech případech jsme za statisticky signifikantní považovali hodnoty $p < 0,05$.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST – VÝSLEDKY

5.1 Molekulární diagnostika prekancerózních lézí NSCLC (Práce I a II)

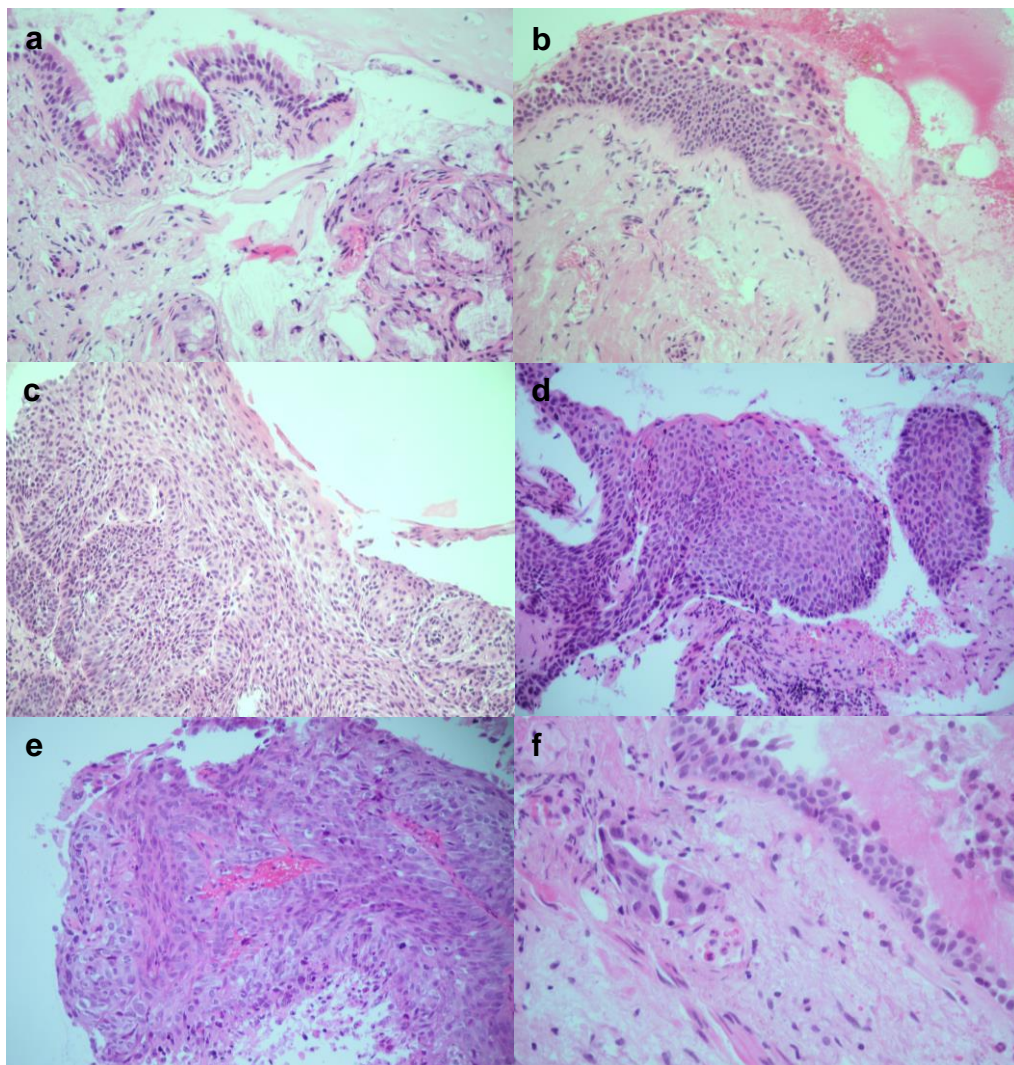
5.1.1 Vztah mezi endoskopickým AFB/WLB nálezem a přítomností histologických změn

Makroskopické nálezy při WLB i AFB byly zařazeny do následujících kategorií: 1. normální nález, nespecifické či zánětlivé změny, 2. podezření z malignity, 3. jednoznačný nádor. Kategorie 1 byla považována za negativní, kategorie 2 a 3 za pozitivní.

Mikroskopické nálezy: všechny vyšetřované vzorky pocházely z povrchových částí bronchiální sliznice a obsahovaly přes 70 % epitelových buněk. Nálezy byly hodnoceny podle WHO klasifikace (Travis W. D. et al., 2004) a rozděleny do následujících kategorií:

1. normální
2. zánětlivé změny
3. hyperplázie/dlaždicová metaplázie
4. lehká dysplázie
5. střední/těžká dysplázie
6. karcinom in situ
7. invazivní karcinom
8. nehodnotitelný materiál.

Nálezy ve skupinách 1 až 4 jsme považovali za negativní, ve skupinách 5 až 7 za pozitivní. Celkem bylo k histologickému vyšetření odebráno 474 vzorků tkáně, z nichž 398 (84 %) bylo hodnotitelných. Histologicky negativních pak bylo 309 vzorků (77,6 % hodnotitelných biopsií), pozitivních 89 (22,4 %), z toho ve 24 případech byla zachycena střední či těžká dysplázie, v 7 případech karcinom in situ a v 58 případech invazivní dlaždicobuněčný karcinom (SCC) (obr. 6). Tabulka 5 zobrazuje korelaci histologických a endoskopických nálezů, tabulka 6 pak zachycuje stejné parametry po vyloučení invazivně rostoucích nádorů diagnostikovaných histologicky a zároveň jednoznačných nádorů podle endoskopického nálezu. V tabulce 7 jsou vypočítány senzitivita a specifita WLB a AFB na základě korelace s histologickými nálezy. Statisticky významný je pouze rozdíl ve specifitě WLB a AFB ($p < 0,05$).



Obr. 6 Příklady histologických nálezů pozorovaných v odebraných vzorcích bronchiální sliznice. (a) Normální bronchiální sliznice. (b) Dlaždicobuněčná metaplázie a střední dysplázie. (c) Střední dysplázie. (d) Těžká dysplázie. (e) Intraepiteliální dlaždicobuněčný karcinom/CiS. (f) Invazivní dlaždicobuněčný karcinom – lymfangioinvaze (HE, 400x).

Tabulka 5

Korelace histologických a endoskopických nálezů (včetně jednoznačných nádorů).

<i>Histologie</i>	<i>Pozitivní</i>	<i>Negativní</i>
WLB pozitivní	TP = 67	FP = 26
WLB negativní	FN = 22	TN = 283
Celkem	89	309
AFB pozitivní	TP = 68	FP = 61
AFB negativní	FN = 21	TN = 248
Celkem	89	309

TP - správně pozitivní; TN - správně negativní; FP - falešně pozitivní; FN - falešně negativní

Tabulka 6

Korelace histologických a endoskopických nálezů s vyloučením histologicky a endoskopicky jednoznačných nádorů.

<i>Histologické vyšetření</i>	<i>Pozitivní</i>	<i>Negativní</i>
WLB pozitivní	TP = 10	FP = 26
WLB negativní	FN = 22	TN = 283
Celkem	32	309
AFB pozitivní	TP = 11	FP = 61
AFB negativní	FN = 21	TN = 248
Celkem	32	309

TP - správně pozitivní; TN - správně negativní; FP - falešně pozitivní;
FN - falešně negativní

Tabulka 7

Senzitivita a specificita WLB a AFB založená na histologických nálezech.

	<i>Všechny biopsie</i>		<i>Biopsie s vyloučením nádorů</i>	
	<i>WLB</i>	<i>AFB</i>	<i>WLB</i>	<i>AFB</i>
Senzitivita (%)*	75,3 (66,3-84,2)	76,4 (67,6-85,2)	31,3 (15,2-47,3)	34,4 (17,9-50,8)
Specificita (%)*	91,6 (88,5-94,7)	80,3 (75,8-84,7)	91,6 (88,5-94,7)	80,3 (75,8-84,7)

*95% interval spolehlivosti (CI); nepřekrývající se CI prokazují signifikantní rozdíl specificit, resp. senzitivit srovnávaných metod na hladině významnosti 5 %

V rámci molekulárně genetické studie jsme dále hodnotili 122 bronchiálních biopsií (tabulka 8). Z těchto biopsií bylo 67 (54,9 %) histologicky beze změn či vykazovalo pouze mírné zánětlivé změny. Ložiska dlaždicové metaplázie byla zastižena ve 12 (9,8 %) vzorcích a dysplastické změny (lehké, střední či těžké) byly přítomny ve 28 (23 %) biopsiích. V 15 případech (12,3 %) jsme diagnostikovali invazivní dlaždicobuněčný karcinom.

Tabulka 8

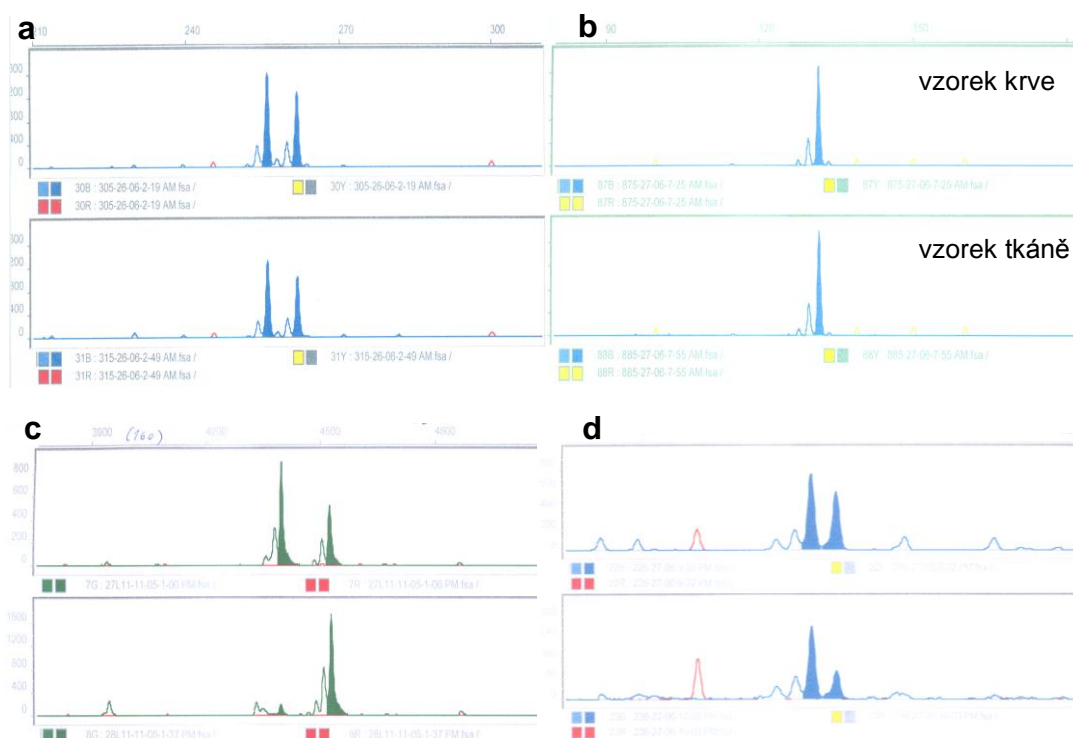
Zastoupení jednotlivých histologických kategorií a celková frekvence LOH (%) v bronchiální sliznici kuřáků v korelaci s histologickými nálezy.

Histologický náleží	Počet případů n (%)	Počet LOH n (%)
Normální sliznice/chronický zánět	67 (54,9)	24 (35,8)
Dlaždicová metaplázie	12 (9,8)	4 (33,3)
Lehká dysplázie	18 (14,8)	7 (38,9)
Střední dysplázie	5 (4,1)	1 (20)
Těžká dysplázie	5 (4,1)	2 (40)
Invazivní karcinom	15 (12,3)	13 (86,7)

n – počet případů; LOH – ztráta heterozyzity

5.1.2 Vztah mezi přítomností histologických změn a detekcí LOH

Za signifikantní LOH byl považován pokles „peaku“ jedné z alel v jednotlivých STR lokusech o více než 25 % v porovnání s normální tkání, tj. konstituční DNA z leukocytů periferní krve (obr. 7).



Obr. 7 Ztráta heterozyzity (LOH) pozorovaná v STR lokusech. Výstup z automatického genetického analyzátoru provádějícího fragmentační analýzu a následně kvantitativní detekci PCR produktů. (a) Vzorek pacienta heterozygota pro danou analyzovanou alelu, bez nálezu LOH. (b) Neinformativní homozygot. (c) Pacient heterozygot s nálezem LOH v kratší z alel. (d) Pacient heterozygotní pro danou STR oblast s prokázanou LOH v delší alele.

Všechny markery byly vysoce informativní (viz tabulka č. 6 – kapitola Metody), marker D11S1363 vykazoval informativitu nejnižší. Všechny vyšetřované vzorky tkání byly informativní minimálně pro dva z vyšetřovaných markerů.

Celkově jsme detekovali LOH v jednom či více lokusech ve 41,8 % (51 ze 122) vzorků tkáně. 24,6 % (30 ze 122) vzorků vykazovalo LOH v jednom z analyzovaných lokusů, 8,2 % (10 ze 122) ve dvou a 9 % (11 ze 122) ve třech nebo více lokusech. Četnost výskytu LOH pro jednotlivé markery se pohybovala v rozmezí od 4,4 % do 28,9 % (tabulka č. 9).

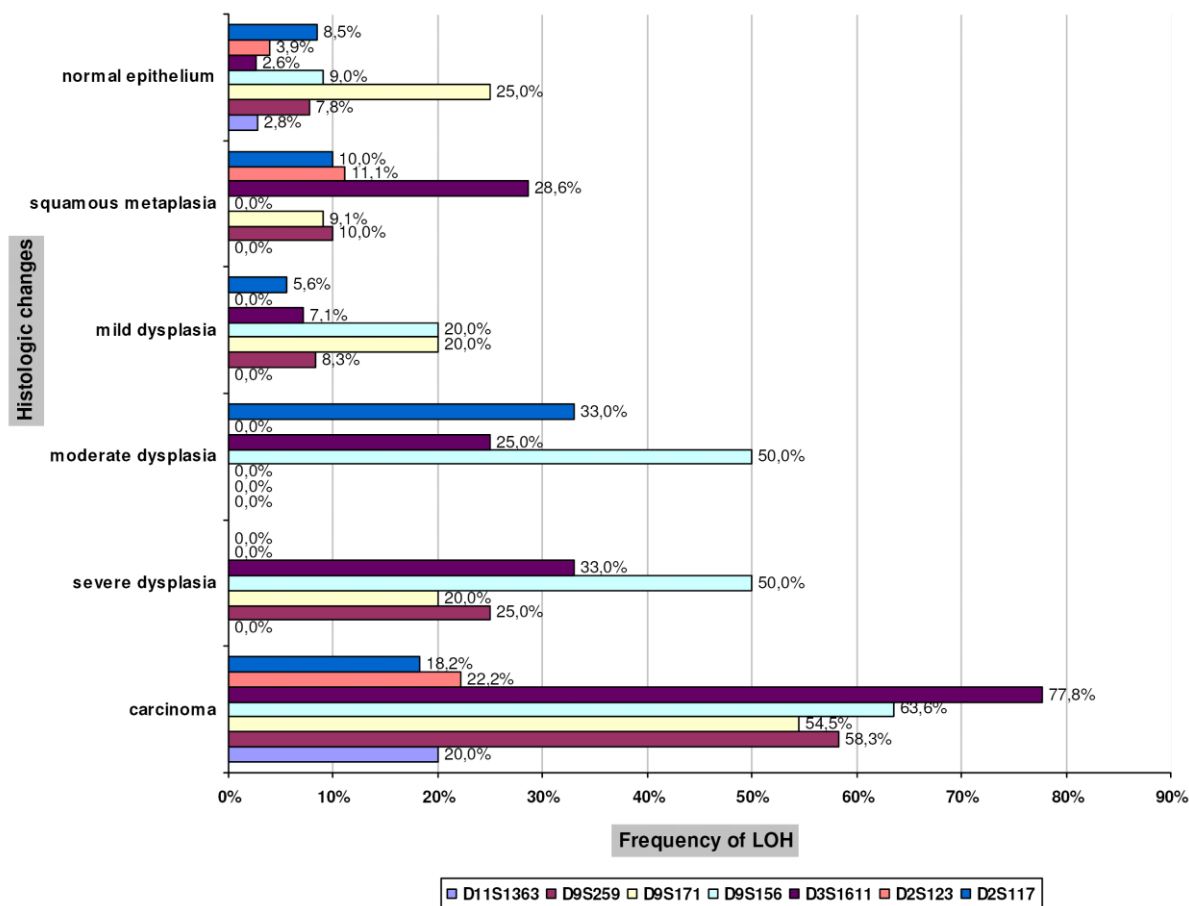
Tabulka 9

Frekvence LOH v jednotlivých chromozomálních lokusech.

<i>STR lokus</i>	<i>Počet případů n*</i>	<i>Počet LOH n (%)</i>
D2S117 (hPMS1)	108	10 (9,26)
D2S123 (hMSH2)	88	5 (5,7)
D3S1611 (hMLH1)	77	13 (16,9)
D9S156	90	26 (28,9)
D9S171	101	17 (16,8)
D9S259	91	14 (15,4)
D11S1363	68	3 (4,4)

*počet analyzovaných informativních heterozygotů pro jednotlivé použité markery; LOH – ztráta heterozygoty

Nejčastěji byly tyto genetické změny detekovány v jednom či více lokusech z oblasti 9. chromozomu, s maximem změn v oblasti 9p21 značené D9S156. Dalšími v pořadí byly změny v oblasti s lokusy tzv. „*mismatch repair genu*“ 3p (hMLH1) a 2q (hPMS1). LOH v oblasti 11p15.5 jsme zjistili pouze ve třech případech, ale pouze 68 ze 110 vzorků bylo pro použitý marker informativních. Vztah mezi celkovým výskytem LOH a morfologickým obrazem je shrnut v tabulce č. 8. Ve skupině vzorků normální či zánětlivě změněné bronchiální sliznice byla LOH v minimálně jednom lokusu detekována ve 24 ze 67 (35,8 %), mezi vzorky s dlaždicobuněčnou metaplázií ve 4 z 12 (33,3 %), ve skupině dysplastických změn v 10 z 28 (35,7 %) vzorků a mezi karcinomy ve 13 z 15 (86,7 %) odběrů. Z těchto výsledků je zřejmé, že frekvence výskytu LOH v normální, jakož i v preneoplasticky změněné bronchiální sliznici je obdobná, signifikantní nárůst jsme pozorovali až v kategorii karcinomů. Rovněž jsme porovnali konkrétní histologické změny v bronchiální sliznici s přítomností LOH v jednotlivých lokusech ve všech informativních vzorcích (detailní výsledky viz obr. 8).



Obr. 8 Vztah mezi ztrátou heterozygoty v jednotlivých chromozomálních lokusech a histologickým nálezem v bronchiálním epitelu těžkých kuřáků (převzato z Capkova et al., 2007).

5.1.3 Vztah mezi přítomností histologických změn a expresí hTERT mRNA

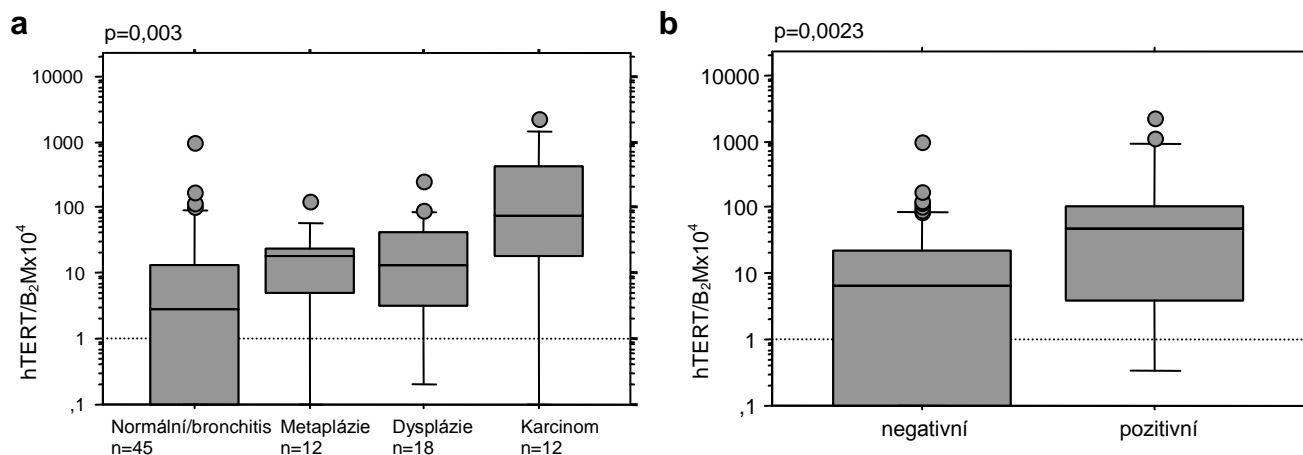
Celkově byla exprese hTERT mRNA stanovena u 87 bronchiálních biopsií, u nichž byla k dispozici jak DNA, tak RNA. Za pozitivní histologický nález jsme považovali biopsie s nálezem střední či těžké dysplázie a karcinomu, přičemž v této kategorii vykazovalo expresi hTERT mRNA 90 % (18 z 20) vzorků. Ve skupině negativních histologických nálezů (normální sliznice/chronické zánětlivé změny, dlaždicová metaplázie a lehká dysplázie) pak byla exprese hTERT mRNA přítomna v 65,7 % (43 z 67). Podrobné výsledky ukazuje tabulka č. 10. Normalizovaná exprese hTERT mRNA ($hTERT_N$) v normální či zánětlivě změněné bronchiální sliznici činila 0 – 125,4 (medián 18,38), v dysplastickém epitelu 0 – 257,65 (medián 13,31) a v karcinomech 0 – 2270,25 (medián 75,46). Hodnoty $hTERT_N$ byly v těchto jednotlivých kategoriích signifikantně odlišné (Kruskal-Wallisův H-test, $p=0,0036$). Při porovnání skupiny podle histologického kritéria pozitivní a negativní byl rozdíl rovněž statisticky významný (Mann-Whitneyho U-test, $p=0,0023$). V případě porovnání jednotlivých histologických kategorií s odlišením různých stupňů dysplázie byl rozdíl menší, nicméně stále zůstal statisticky signifikantní ($p=0,066$).

Tabulka 10

Procento případů exprimujících hTERT mRNA a hodnoty hTERT_N v závislosti na histologických změnách v bronchiální sliznici těžkých kuřáků.

Histologický obraz	n	Pozitivní n (%)	Medián hTERT _N (kopie/μl)
Normální/zánětlivě změněná sliznice	45	26 (57,8)	6,67
Dlaždicová metaplázie	12	9 (75)	18,38
Dysplázie	18	16 (88,9)	13,31
- lehká	10	8 (80)	13,31
- střední	4	4 (100)	63,83
- těžká	4	4 (100)	2,68
Dlaždicobuněčný karcinom	12	10 (83,3)	75,46

n – počet případů, hTERT_N - normalizovaná exprese hTERT mRNA

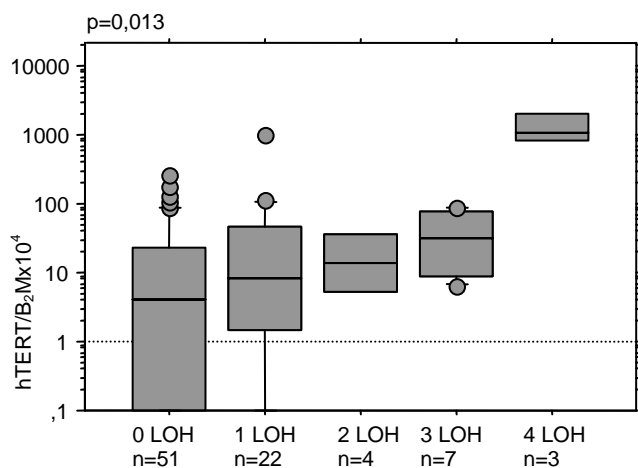


Obr. 9 Box-plotový graf normalizované exprese hTERT mRNA (hTERT_N) (počet kopií/μl). (a, b) Závislost histologického nálezu a hTERT_N v bronchiální sliznici těžkých kuřáků; statisticky významný vztah [(a) Kruskal-Wallisův H-test, p=0,003, (b) Mann-Whitneyho U-test, p=0,0023].

5.1.4 Vztah mezi přítomností LOH a expresí hTERT mRNA

Ve všech vzorcích, u nichž byla k molekulární analýze k dispozici jak DNA tak i RNA, byl porovnán počet LOH s relativní expresí hTERT mRNA. V biopsiích bez detekované LOH, bez ohledu na jejich morfologii, činila hodnota hTERT_N 0 – 257,65 (medián 3,96). Ve vzorcích s jedním lokusem vykazujícím LOH činila hodnota hTERT_N 0 – 972,34 (medián 8,39), se dvěma detekovanými LOH 0 – 54,94 (medián 14,17), se třemi 6,53 – 88,76 (medián 31,65) a se čtyřmi 727,38 – 2270,25 (medián 1094,05). Tato data naznačují, že hTERT mRNA je exprimována ve větším počtu vzorků bronchiální sliznice bez přítomnosti genetických změn charakteru LOH. Se

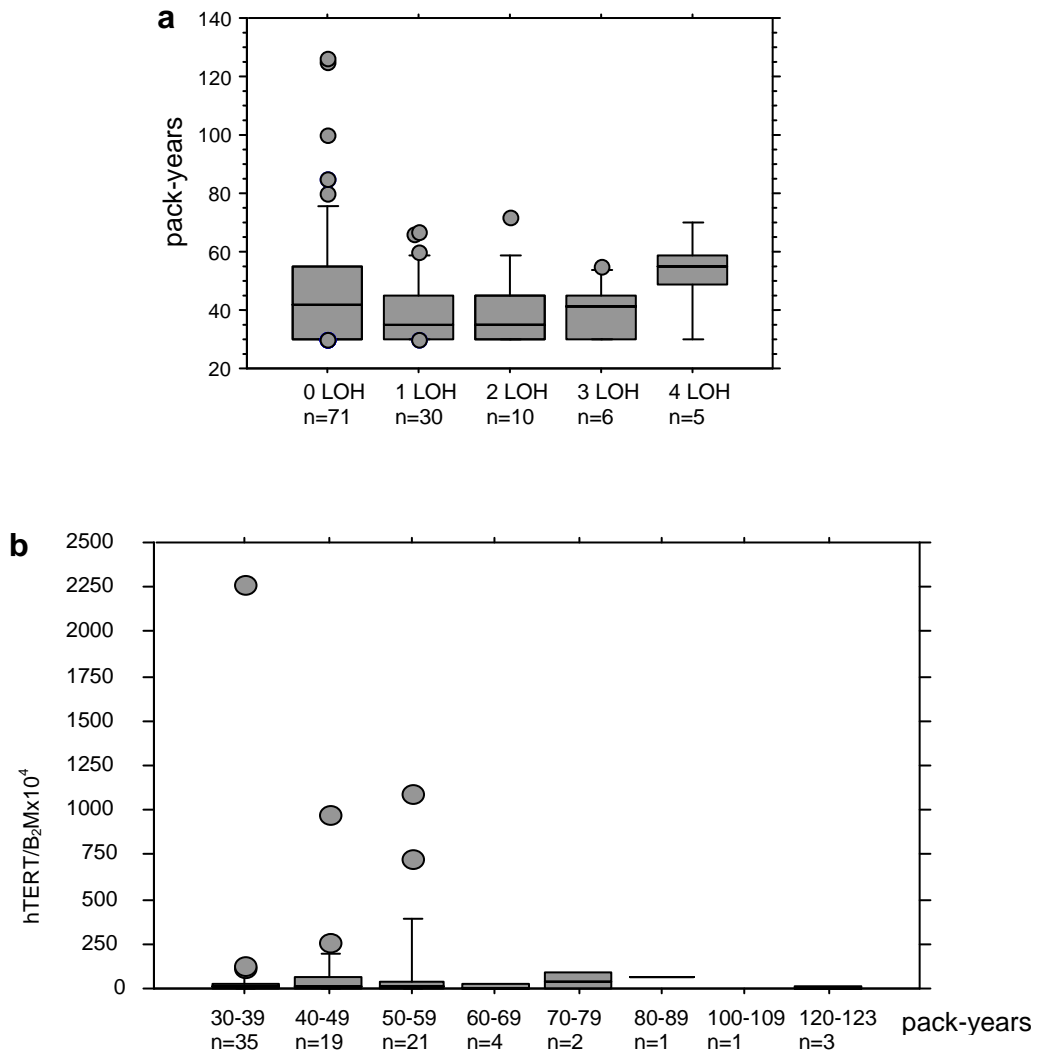
stoupajícím počtem detekovaných LOH stoupá též hodnota mediánu $hTERT_N$, nicméně celkový rozdíl hladiny exprese mezi jednotlivými kategoriemi podle výskytu LOH byl statisticky signifikantní na nízké hladině významu ($p=0,013$) (obr. 10).



Obr. 10 Box-plotový graf znázorňující závislost počtu lokusů s LOH na hladině normalizované exprese $hTERT$ mRNA ($hTERT_N$); statisticky významný vztah, Kruskal-Wallisův H-test, $p<0,013$.

5.1.5 Vztah mezi přítomností molekulárních změn a počtem let kouření

Pro zjištění závislosti vzniku studovaných genetických změn na době trvání kouření jsme porovnávali počet lokusů s LOH v odebrané tkáni s kumulativní dávkou vykouřených cigaret (1 „*pack-year*“ odpovídá abusu jednoho balení cigaret denně po dobu jednoho roku). Ve vzorcích bez LOH byli pacienti exponováni 30 až 126 „*pack-years*“ (medián 65,8), v kategorii 1 LOH to bylo 30 až 67 „*pack-years*“ (medián 51,0), se 2 LOH 30 až 72 (medián 53,7), se 3 LOH 30 až 55 (medián 57,4) a v kategorii 4 LOH 30 až 70 „*pack-years*“ (medián 83,5). Tyto výsledky nebyly statisticky signifikantní ($p=0,1847$) (obr. 11a). Podobně jsme zjišťovali závislost $hTERT_N$ na expozici cigaretovému kouři, nicméně ani zde nebyl prokázán statisticky významný výsledek ($p=0,8597$) (obr. 11b).



Obr. 11 Box-plotový graf zachycující (a) vztah „pack-years“ a počtu lokusů s LOH (n – počet pacientů s daným počtem lokusů s LOH) ($p=0,1847$) a (b) vztah normalizované exprese hTERT mRNA ($hTERT_N$) a „pack-years“ (n – počet pacientů s udaným rozmezím počtu „pack-years“) ($p=0,8579$).

5.1.6 Vztah mezi přítomností molekulárních změn a autofluorescenčním obrazem

Molekulárně geneticky jsme vyšetřili 97 vzorků z míst s negativní histologií (tj. histologické skupiny 1 – 4), z nichž 33 bylo AFB pozitivních (tedy falešně pozitivních vzhledem k histologii) a 64 negativních (tedy správně negativních, jednalo se o kontrolní biopsie z míst normálního vzhledu). Četnost výskytu jednotlivých LOH v informativních vzorcích a expresi hTERT mRNA s rozdělením dle výsledku AFB ukazuje tabulka č. 11. Ve skupině AFB pozitivních je statisticky významně vyšší četnost LOH pro 2 lokusy (D3S1611, $p=0,005$ a D9S259, $p=0,019$) i pro přítomnost LOH v alespoň jednom lokusu ze 7 vyšetřovaných ($p=0,023$). Obdobně je v této skupině významně vyšší četnost exprese hTERT mRNA ($p=0,0003$).

Tabulka 11

Vyšetřované molekulárně genetické změny v histologicky negativních bioptických vzorcích v závislosti na výsledku autofluorescenční bronchoskopie.

Lokus	D2S117	D2S123	D3S1611	D9S156	D9S171	D9S259	D11S1363	LOH pozitivní	hTERT ^x
AFB pozitivní									
N	29	28	18	28	25	28	21	33	31
LOH/hTERT	3	1	4	6	4	4	0	17	27
% LOH/hTERT	10,3	3,6	22,2	21,4	16,0	14,3	0	51,5	87,1
AFB negativní									
N	60	47	44	45	57	45	46	64	36
LOH/hTERT	4	2	0	10	6	0	1	18	16
% LOH/hTERT	6,7	4,3	0	22,2	10,5	0	2,2	28,1	44,4
AFB stat.	N.S.	N.S.	p=0,005	N.S.	N.S.	p=0,019	N.S.	p=0,023	p=0,0003

AFB – autofluorescenční bronchoskopie; LOH – ztráta heterozygoty; LOH pozitivní – přítomnost LOH alespoň v jednom z vyšetřovaných lokusů; n – počet informativních biopsií heterozygotních v konstituční DNA pro daný lokus; hTERT^x - přítomnost exprese hTERT mRNA; LOH/hTERT - počet biopsií, kde je přítomna LOH nebo exprese hTERT mRNA; % LOH/hTERT - totéž vyjádřené v procentech informativních vzorků; AFB stat. – statistická významnost rozdílu četnosti LOH event. exprese hTERT mRNA ve vzorcích AFB pozitivních oproti vzorkům AFB negativním; N.S. statisticky nesignifikantní výsledek

5.1.7 Diskuze

Mnohastupňový model karcinogeneze plicních nádorů vychází z velkého počtu histologických, imunohistochemických a molekulárně genetických studií posledních deseti až dvaceti let. Molekulárně genetické změny přítomné u invazivních karcinomů, jak resekovaných, tak bronchoskopicky bioptovaných, jsou poměrně dobře prostudované. Data týkající se prekancerózních lézí v bronchiálních biopsiích jsou však limitovaná, a to zejména vzhledem k jejich obtížné detekci tradičními metodami, mezi kterými je nejběžnější konvenční bronchoskopie v bílém světle (WLB). Prekancerózní léze jsou však pod hranicí citivosti WLB. V poslední době začaly být využívány fluorescenční bronchoskopické systémy, které jsou schopné tyto preinvazivní a časně invazivní léze lokalizovat a zvýšit tak jejich záchyt (Lam S. et al., 1998; Shibuya K. et al., 2001). Vzhledem k tomu, že vznik většiny plicních karcinomů úzce souvisí s kouřením cigaret, zaměřili jsme se v naší studii na skupinu pacientů, kteří byli těžkými dlouholetými kuřáky (s anamnézou více než 30 „*pack-years*“) a jejichž FEV1 činila pod 70 % normy. Tito pacienti byli vyšetřeni bronchoskopicky a odebraný materiál jsme následně vyšetřili histologicky a na přítomnost molekulárně genetických změn. K detekci makroskopicky suspektních časných lézí a odběru materiálu pro další vyšetření byla použita kombinace autofluorescenční bronchoskopie (AFB) s klasickou WLB. U endoskopicky jednoznačných nádorů byla AFB vždy pozitivní. To však

nepředstavuje jedinečný přínos této metody, neboť jí nebyl zachycen žádný nádor, který by nebyl detekovatelný pomocí WLB. Při bližší analýze falešných pozitivit obou metod (viz tabulka č. 5 a č. 6) bylo v případě makroskopicky jednoznačných nádorů zjištěno, že se ve všech případech o nádor skutečně jednalo, pouze biopsie zařazená do studie nebyla diagnostická a nádor byl potvrzen z biopsií následných. Po vyloučení jednoznačných nádorů, tedy při detekci premaligních změn, kterých bylo 31 (histologická klasifikace 5 a 6), byla AFB úspěšnější než WLB pouze v jednom případě. Výsledná senzitivita AFB po vyloučení jednoznačných nádorů se tedy statisticky významně neliší od senzitivity WLB. Specificita AFB činí 80,3 % a je oproti WLB (91,6 %) statisticky signifikantně nižší ($p < 0,05$).

Přehled 18 prací srovnávajících senzitivitu a specificitu AFB a WLB uveřejnil v roce 2005 Haussinger K. a kolektiv. Výsledky se pohybovaly v širokém rozmezí od 6,3krát vyšší senzitivity AFB oproti WLB, kterou uvádí zakladatel metody S. Lam (Lam S. et al., 1998), až po studii, která přínos AFB neprokázala (Kurie J. M. et al., 1998). V dosud největší multicentrické prospektivní randomizované studii s použitím AFB systému D-Light (Karl Storz, Německo), zahrnující 1173 pacientů, byla pro detekci premaligních změn senzitivita AFB kombinované s WLB 1,42krát vyšší než senzitivita WLB samotné (Haussinger K. et al., 2005). V klinickém využití na našem spolupracujícím pneumologickém pracovišti se AFB oproti standardní WLB neosvědčila, neboť v detekci premaligních změn neprokázala vyšší senzitivitu. Lepší výsledky je možné očekávat od nové generace autofluorescenčních přístrojů na bázi videobronchoskopů, které spojují dokonalý obraz s možností autofluorescence (Chhajed P. N. et al., 2005; Ikeda N. et al., 2006). Další progresivní technologií je pak tzv. „*narrow band imaging*“ detekující dysplastické změny na základě změny tvaru a struktury slizničních cév, kterou mají nejnovější videobronchoskopy již zabudovanou a která pravděpodobně autofluorescenci nahradí (Shibuya K. et al., 2003; Herth F. J. et al., 2006).

V molekulárně genetické části studie jsme DNA extrahovanou ze vzorků tkáně analyzovali na přítomnost LOH pomocí PCR s fluorescenčně značenými primery a následnou kvantitativní detekcí fragmentační analýzou. Analyzovali jsme 7 polymorfních STR markerů značících 5 chromozomálních oblastí, kde jsou lokalizovány tzv. „*mismatch repair geny*“, zodpovědné za opravy náhodných chyb vzniklých při replikaci DNA, a geny, jejichž produkty ovlivňují buněčný cyklus. Nevyšší frekvence LOH byla přítomna v oblasti 9p21, kde jsou lokalizovány potenciální TSG včetně genů CDKN2A a CDKN2B, kódujících proteiny p15 a p16. Tyto oblasti, u karcinomů plic poměrně často studované (Brambilla C. et al., 2003; Wistuba I. I. et al., 1999; Mao L. et al., 1997), jsme porovnali s výskytem LOH v oblastech „*mismatch repair genů*“ na chromozomu 2p, 2q a 3p a s oblastí na chromozomu 11 (11p15.5). Minimálně jeden STR lokus na 9. chromozomu vykazoval LOH ve více než 20 % biopsií nezávisle na histologickém nálezu (s výjimkou dlaždicobuněčné metaplázie). Ve skupině karcinomů pak byla LOH detekována ve více než 50 % případů. Oproti tomu ve zkoumaných oblastech „*mismatch repair genů*“ (2q a 3p) byla LOH přítomna až ve stadiu střední a těžké dysplázie či karcinomu. V oblasti 11p15.5 byl počet neinformativních homozygotů příliš vysoký, a tudíž bližší hodnocení výskytu LOH nebylo přínosné.

Naše výsledky jsou v souladu s několika předchozími studii, které ukázaly výskyt LOH v resekovaném materiálu s histologicky normálním či metaplastickým epitelem kuřáků či bývalých kuřáků (Wistuba I. I. et al., 1999) a stoupající počet LOH ve specifických lokusech se zvyšující se závažností morfologického nálezu (Brambilla C. et al., 2003). Frekvence celkového výskytu LOH nekorelovala přímo úměrně se závažností histologických změn, což může být způsobeno poměrně malým zastoupením dysplastických lézí v celkovém počtu vyšetřovaných vzorků tkáně. V případě histologicky prokázaných karcinomů však byla podle očekávání nejvyšší. Otázkou zůstává diagnostický význam detekce LOH v bronchiálních biopsiích kuřáků, neboť LOH jsou přítomny i u jedinců bez zjevné malignity. Stejně tak je nutné v dalších prospektivních studiích prokázat, zda má přítomnost LOH jednotlivých specifických lokusů v preinvazivních lézích prediktivní hodnotu pokud jde o progresi léze do invazivního karcinomu či nikoliv.

Následně byla ve vzorcích bronchiální sliznice stanovována hladina hTERT mRNA, kopírující aktivitu telomerázy, jejíž aktivace souvisí s imortalizací různých normálních somatických buněk a tudíž s karcinogenezí (Lundberg A. S. et al., 2002). Literární data týkající se konkrétního složení studované populace, způsobu odběru materiálu i spektru vyšetřovaných lézí byla poměrně chudá. Analyzovali a kvantifikovali jsme expresi mRNA hTERT podjednotky telomerázy v bronchiálním epitelu těžkých kuřáků v závislosti na histologických nálezech popsanych výše (viz tabulka č. 11). Aktivita telomerázy je v karcinomech plic nejčastěji stanovována pomocí měření její enzymové aktivity metodou „*telomeric repeat amplification protocol*“ (TRAP) či právě pomocí určení hladin hTERT mRNA. Tato metoda je sice pouze indikátorem hladiny exprese, nikoliv přímou detekcí aktivního enzymu, současné studie však prokázaly vysokou korelaci mezi expresí hTERT mRNA a aktivitou telomerázy (Shibuya K. et al., 2001; Kumaki F. et al., 2001). Zároveň bylo demonstrováno, že právě hTERT podjednotka je pro aktivitu enzymu rozhodující (Counter C. M. et al., 1998; Hara H. et al., 2001). Použitá metoda RQ-RT-PCR je navíc jednou z nejpresnějších kvantitativních metod s vysokou senzitivitou a adaptabilitou (Bijwaard K. E. et al., 2001). Rovněž zde jsme prokázali statisticky významnou korelaci mezi zvýšením hladiny hTERT mRNA a závažností histologických změn v řadě normální bronchiální sliznice/zánět - dlaždicová metaplázie - dysplázie - SCC ($p=0,0023$). Většina invazivních karcinomů ukazovala nejvyšší hladiny její exprese, což je v souladu se studii prováděnými na chirurgicky resekovaném materiálu či u pacientů s malignitou v anamnéze bez znalosti abusu cigaret (Snijders P. J. et al., 2004; Shibuya K. et al., 2001).

Naprostá většina studií ukázala přímý vztah mezi aktivitou telomerázy a maligní transformací buněk v resekovaných karcinomech plic (Arinaga M. et al., 2000; Kim N. W. et al., 1994), přičemž histologicky normální buňky byly pozitivní pouze vyjimečně (pod 0,5 %) (Shay J. W. a Bacchetti S., 1997). V naší studii materiálu odebraného pomocí WLB v kombinaci s AFB vykazovalo expresi hTERT mRNA přes 50 % biopsií histologicky normální či zánětlivě změněné bronchiální sliznice těžkých kuřáků, i když průměrné hodnoty byly o něco nižší než u vzorků se změnami dysplastickými. Možným vysvětlením exprese hTERT mRNA v histologicky normálním či

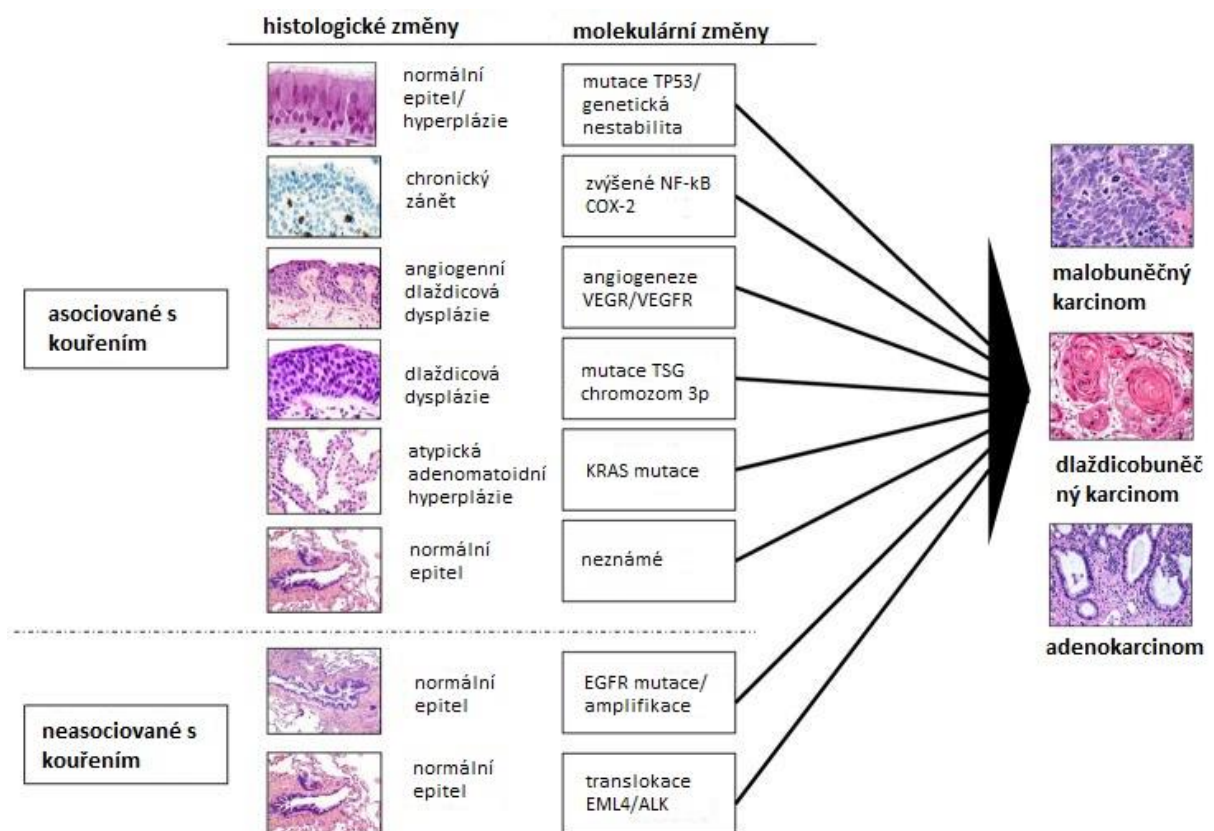
zánětlivě změněném bronchiálním epitelu by mohla být přítomnost aktivního enzymu v lymfocytární příměsi v odebraných vzorcích, nicméně počet lymfocytů pozorovaných v normální sliznici byl malý a rovněž některé vzorky s nálezem bronchitidy nevykazovaly žádnou expresi hTERT mRNA. Tuto skutečnost lze tedy nejspíše vysvětlit zvýšenou regenerační aktivitou buněk exponovaných karcinogenním látkám obsaženým v cigaretovém kouři a mohla by znamenat časnou změnu na molekulární úrovni indukovanou těmito karcinogeny. Zda telomerázová aktivita stanovená jako exprese hTERT mRNA představuje normální fyziologickou expresi v regenerujících kmenových buňkách nebo abnormalitu v kouření poškozeném epitelu je nutné ještě vyřešit, neboť do této studie byli zařazeni pouze kuřáci. Rovněž Yim H. W. et al. (2006) poukazují na souvislost mezi expozicí cigaretovému kouři a aktivitou telomerázy v pasážovaných buněčných kulturách normálního bronchiálního epitelu. Proto zastáváme názor, že detekce hTERT mRNA ve vzorcích tkání těžkých kuřáků neznamena jednoznačnou přítomnost karcinomu či těžké dysplázie, jak se domnívají jiní autoři (Arinaga et al., 2000). Zvýšená telomerázová aktivita by však mohla znamenat prodloužení životnosti buněk v riziku maligní transformace, a tak přispívat k progresi karcinogeneze.

Vzhledem ke skutečnosti, že zatím není zcela objasněna časová souvislost aktivace telomerázy a korespondujícího zvýšení hladin exprese hTERT mRNA v preneoplastických lézích bronchiální sliznice, porovnali jsme expresi hTERT mRNA s výskytem LOH v různých histologických kategoriích. LOH je spolu s nestabilitou mikrosatelitů považována za jeden z prvních kroků v karcinogenezi a vyskytuje se již v normálním bronchiálním epitelu těžkých kuřáků (Mao L. et al., 1997; Wistuba I. I. et al., 1997). Podle našich výsledků je telomerázová aktivita měřená pomocí exprese hTERT mRNA přítomna rovněž v celé řadě vzorků normální bronchiální sliznice, v bronchiálních biopsiích s metaplastickými či dysplastickými změnami a též v biopsiích bez detekované LOH. Navíc její hladina s přibývajícím počtem lokusů s nálezem LOH stoupá ($p=0,013$). Z těchto výsledků vyplývá, že aktivace telomerázy by mohla mít roli již v časných stádiích procesů vedoucích ke vzniku zhoubného onemocnění.

Konečně porovnání přítomnosti zkoumaných molekulárně genetických změn a celkového počtu vykouřených cigaret („*pack-years*“) žádnou statisticky významnou souvislost neprokázalo ($p=0,1847$, resp. $p=0,8579$). Podobné závěry uvádějí i další autoři (Powell C. A. et al., 1999; Malhotra P. et al., 2004).

Z hlediska odběru bronchiální sliznice zasluhuje pozornost statisticky významně vyšší výskyt molekulárně genetických změn v histologicky normálních biopsiích z míst, která byla při AFB pozitivní, než v biopsiích odebraných náhodně jako kontroly. Obdobná závislost již byla popsána (Sutedja G., 2003, Helfritzsch H. et al., 2002) a umožňuje vyslovit hypotézu, že AFB je schopna odhalit časnější změny v procesu karcinogeneze, kdy jsou sice již přítomny závažné molekulární změny, avšak morfologický vzhled epitelu je ještě nezměněn. Otevírá se tak možnost využití AFB pro odběr biopsií pro molekulárně genetické vyšetření ke studiu vývoje tohoto nádorového onemocnění.

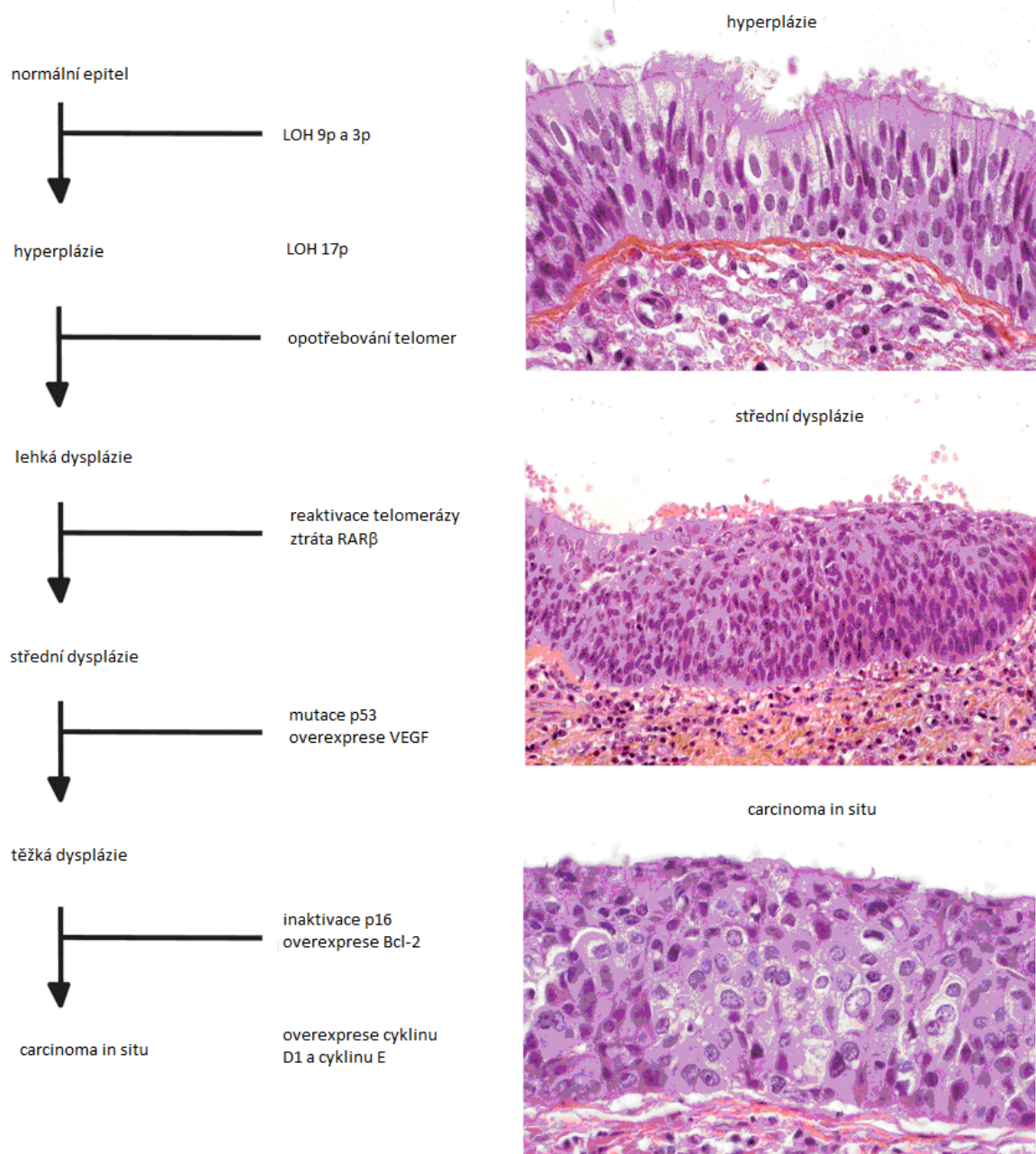
V posledních dvaceti letech prodělal vývoj znalostí týkajících se vzniku karcinomu plic významný pokrok. Plicní karcinogeneze je vnímána jako komplexní a multicentrický proces vyžadující postupnou akumulaci molekulárně genetických změn, které mají paralelu v histologických změnách normálního epitelu přes změny preneoplastické až po nádorové. Pomocí analýzy LOH různých chromozomálních oblastí a metylačního stavu mnoha genů se ukázalo, že TSG inaktivované v průběhu karcinogeneze SCLC a NSCLC se zásadně liší. Genové expresní profily navíc vedly k objevení nových molekulárních markerů histologicky odlišných typů NSCLC, včetně poskupin adenokarcinomů (Bhattacharjee A. et al. 2001; Beer D. G. et al., 2002). Skupina kolem Wistuby (Wistuba I. I. et al., 1999 a 2000) zaznamenala u dlaždicobuněčných karcinomů významně častější výskyt delecí v oblasti 17p13 (TP53), 13q14 (RB), 9p21 (p16^{INK4a}), 8p21-23 a v několika oblastech chromozomu 3p. Rovněž metylace genů je odlišná u dlaždicobuněčných karcinomů a adenokarcinomů. Nové poznatky pak zahrnují zejména mutace ve třech genech: KRAS, EGFR a Her2/neu, které se vyskytují téměř výhradně u adenokarcinomů (Shigematsu H. et al., 2005). Stav aktuálních znalostí týkajících se procesu vývoje hlavních typů karcinomu plic stručně znázorňuje obr. 12.



Obr. 12 Současný obecný model plicní karcinogeneze. Převzato a upraveno dle Gold K. A. et al., 2011.

Zkoumání patogeneze dlaždicobuněčného karcinomu vedlo k vytvoření pracovního modelu „centrální“ bronchiální karcinogeneze – od ztáty alel (LOH) a následných inaktivujících mutací různých TSG v histologicky normálním epitelu kuřáků přes zkrácení telomer v dlaždicobuněčné

metaplázii, reaktivaci telomerázy, inaktivaci TP53 a CDKN2A ($p16^{INK4a}$) a nadměrnou expresi cyklinu D1 a cyklinu E v lézích dysplastických (Lantuéjoul S. et al., 2009) (obr. 13).



Obr. 13 Pracovní model „centrální“ bronchiální karcinogeneze, vedoucí ke vzniku dlaždicobuněčného karcinomu: mnohokrokový proces akumulace molekulárně genetických změn. Převzato a upraveno podle Lantuéjoul S. et al., 2009.

Vznik adenokarcinomu z periferního bronchioloalveolárního epitelu oproti tomu zahrnuje minimálně dvě patogeneticky odlišné cesty v závislosti na abusu kouření cigaret. Jedna z nich se týká zejména žen, nekuřáček, spíše asijského etnika, kde zřejmě pro maligní transformaci buňky postačuje jako jediná genetická změna mutace genu pro EGFR (transmembránový tyrozinkinázo-
 receptor, HER1/ERBB1) (Gazdar A. F., 2004). Druhá cesta, pozorovaná častěji u kuřáků, zahrnuje mutace v genu KRAS (kódujícím rodinu GTP vázících proteinů přenášejících proliferací signály)

současně s inaktivací TSG (např. metylací p16^{INK4a} či mutací TP53) (Yoshida Y. et al., 2005; Sekido Y. et al., 2003). Vznik mucinózních adenokarcinomů a adenokarcinomů lokalizovaných centrálně dosud objasněn není.

Přestože byl v posledních dvou desetiletích učiněn výrazný pokrok v otázkách plicní karcinogeneze, zůstává i nadále celá řada kroků v tomto mnohastupňovém procesu neobjasněna, a proto je pro možnost terapeutického zásahu do tohoto procesu nutné získávat stále nové informace. Různé studie ukázaly, že dochází k akumulaci celé řady genetických změn, o jejichž významu a případné reversibilitě není nic bližšího známo. Stejně tak chybí podrobnější data i o riziku progresu prekancerózních lézí. Po přerušení expozice karcinogenům je předpokádána jistá míra reversibility histologických změn, genetické změny však přetrvávají dlouhou dobu. Mortalitu na karcinom plic je tedy možno cíleně ovlivnit zejména prostředky vedoucími k prevenci maligní transformace a přesnou identifikací genetických procesů, které s ní bezprostředně souvisejí.

5.2 Diferenciální diagnostika maligního mezoteliomu (Práce III)

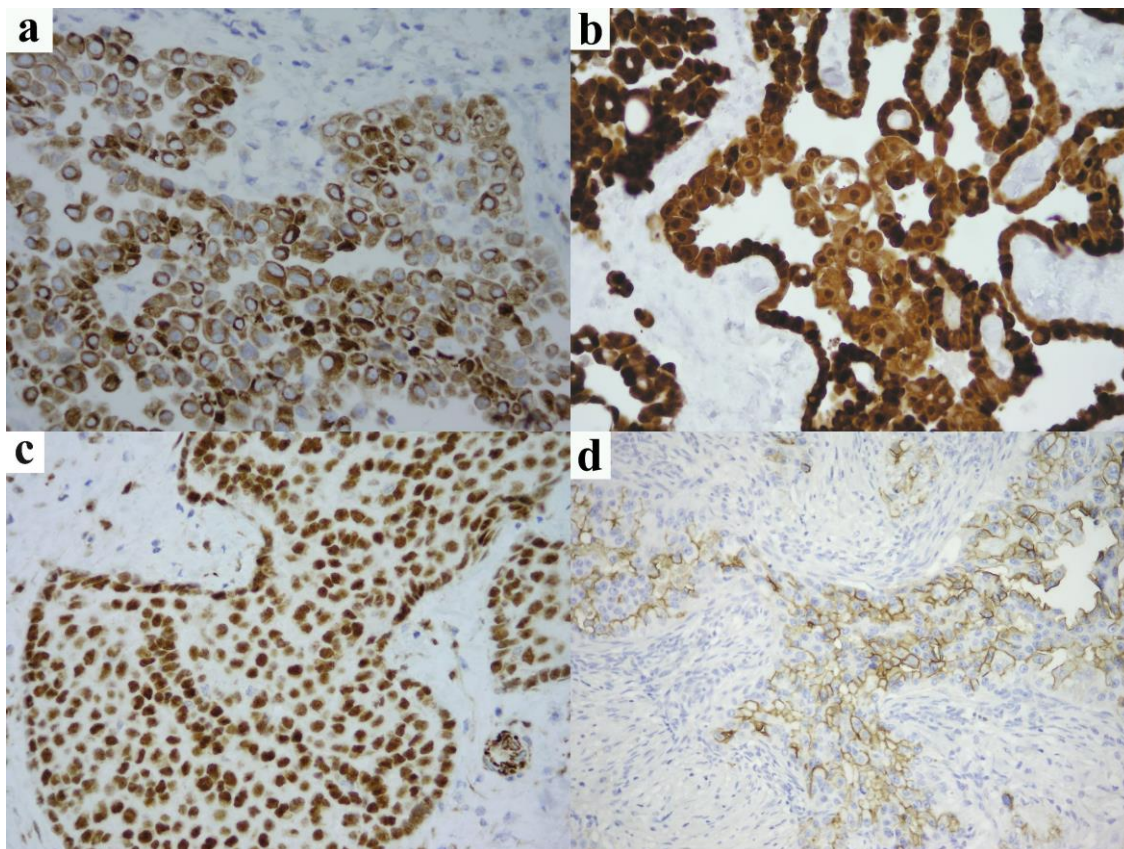
5.2.1 Zhodnocení histologických diagnóz maligního mezoteliomu pomocí imunohistochemického vyšetření

Použití moderních molekulárních technik vhodných k analýze vzorků tkáně zalitých do parafínu zvýšilo využívání archivovaného materiálu k vědeckým účelům. V době určení diagnózy (zejména v případě relativně vzácných nálezů, kdy je nutné využít materiál staršího data) však často nebylo k dispozici dostatečné spektrum vhodných imunohistochemických vyšetření, a proto existuje určité riziko nesprávné diagnózy. Za účelem zpřesnění diagnostiky a definování imunohistochemického diagnostického panelu na našem pracovišti byl vyšetřen soubor 59 pacientů (33 mužů, 26 žen) s diagnózou MM (55 MM pleury: 49 epiteloidních, 4 sarkomatoidní, 2 bifázické; 4 MM peritonea – všechny epiteloidní) a 21 pacientů (15 mužů, 6 žen) s diagnózou adenokarcinomu plic metastázujícího na pleuru. Imunohistochemické vyšetření zahrnovalo 5 tzv. pozitivních mezotelových markerů (CK5/6, calretinin, WT1, D2-40, HBME-1), 4 tzv. negativní markery karcinomu (CEA, MOC-31, Ber-EP4, B72.3) a marker plicního původu adenokarcinomu TTF-1. Příklady imunoreaktivity jednotlivých protilátek jsou znázorněny na obr. 14, 15 a 16. U bioptických vzorků pocházejících z období před rokem 2006 byla většina imunohistochemických vyšetření prováděna retrospektivně - jednalo se celkem o 36 pacientů s diagnózou epiteloidního MM a 21 pacientů s diagnózou adenokarcinomu plic. V tomto souboru pacientů jsme na základě doplněných imunohistochemických reakcí reklasifikovali 4 MM (4/36, 11 %) a jeden adenokarcinom (1/21, 5 %). Ve třech případech diagnostikovaných původně jako MM se jednalo o adenokarcinomy a k diagnóze byly použity pouze nespecifické markery, v jednom případě šlo spíše o adenokarcinom, jehož imunoprofil nebyl jednoznačný. Jeden adenokarcinom byl na základě reakcí s uvedenými protilátkami přehodnocen jako epiteloidní MM. Před zavedením specifických imunohistochemických markerů bylo tedy nesprávně diagnostikováno 9 % (5/57) případů zahrnujících tuto diferenciální diagnózu.

Membránová reaktivita protilátky proti D2-40 byla přítomna v 51 (91 %) z 56 mezoteliomů. V lépe diferencovaných epiteloidních MM a zejména nádorech s papilárním růstem byla reaktivita silná, kontinuální, v solidních a méně diferencovaných spíše fokální a slabá. V bifázických MM byla pozorována pozitivita v epiteloidní složce. Většina (3/4; 75 %) sarkomatoidních MM byla negativní, v jednom pozitivním případě byla imunoreaktivita pouze fokální, slabé intenzity. Žádný z plicních adenokarcinomů s touto protilátkou nereagoval.

Pozitivitu v reakci s protilátkou proti CK5/6 vykazovalo 52 z 56 (93 %) MM. Ve většině případů byla pozitivita difúzní, cytoplazmatická, silné či střední intenzity (obr. 14a). Reaktivita chyběla ve dvou sarkomatoidních, v jednom bifázickém a v jednom epiteloidním MM. Naopak pozitivní ve většině buněk byly též 4 plicní adenokarcinomy, přičemž intenzita reakce kolísala od slabé po silnou.

S protilátkou proti calretininu reagovalo 54 (96 %) z 56 MM. Za pozitivní byla striktně považována pouze pozitivita zároveň cytoplazmatická i jaderná (obr. 14b). Prakticky všechny epiteloidní MM vykazovaly pozitivitu difúzní, silné intenzity. V sarkomatoidních MM a sarkomatoidních oblastech bifázických MM bylo pozitivní malé procento buněk (pod 10 %), avšak silně. Žádný z plicních adenokarcinomů s protilátkou proti calretininu nereagoval.



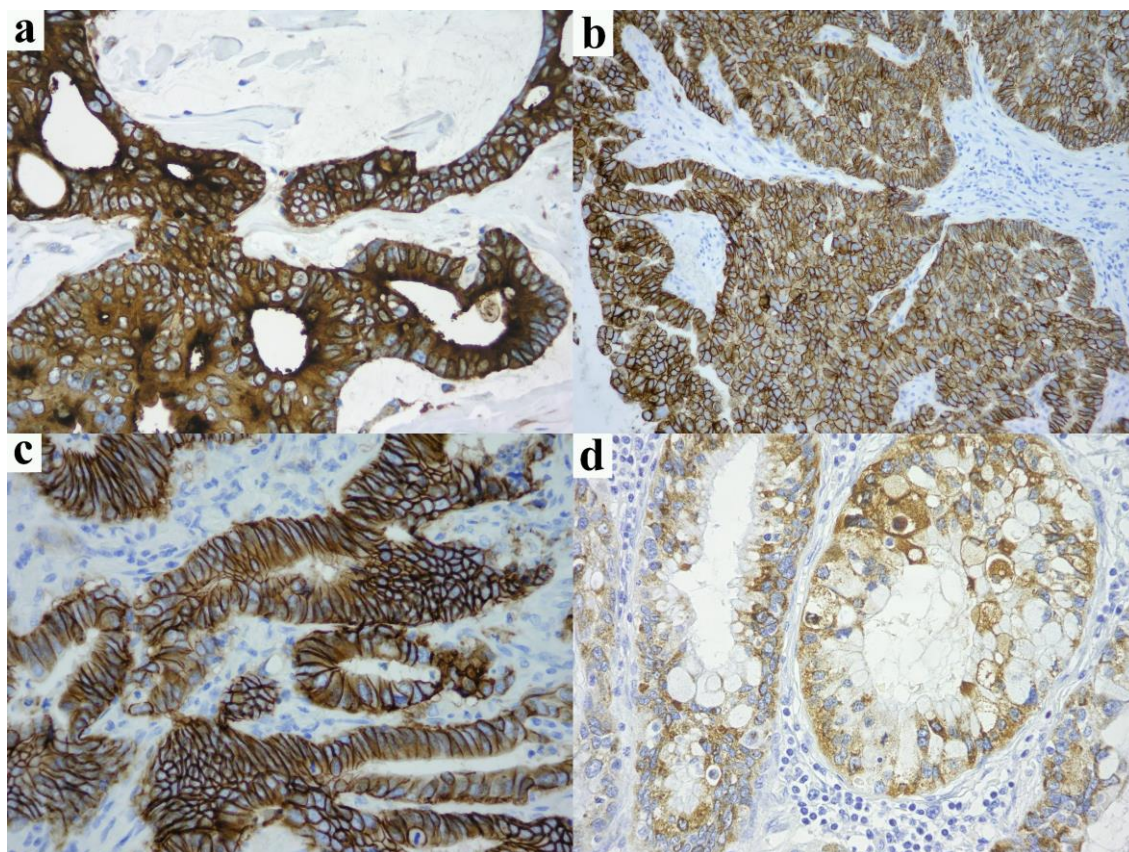
Obr. 14 Imunoreaktivita tzv. pozitivních mezoteliálních markerů. (a) Difúzní cytoplazmatická pozitivita cytokeratinu 5/6 v epiteloidním mezoteliomu (x400). (b) Difúzní silná cytoplazmatická i jaderná pozitivita calretininu v epiteloidním mezoteliomu (x400). (c) Epiteloidní mezoteliom pozitivně reagující s protilátkou proti WT-1 s difúzní jadernou pozitivitou (x400). (d) Plicní adenokarcinom infiltrující pleuru, vykazující membránovou pozitivitu v reakci s protilátkou HBME-1 (x200).

50 z 56 (89 %) MM reagovalo s protilátkou proti WT1 (obr. 14c). Ve většině případů byla jaderná pozitivita difúzní, silné intenzity. Negativní byly 3 sarkomatoidní a 3 epiteloidní MM. Pozitivita v bifázických MM a v případě sarkomatoidního MM byla silné či středně silné intenzity, avšak omezená na malé procento buněk (5 – 10 %). Všechny plicní adenokarcinomy byly v reakci s touto protilátkou negativní.

47 z 56 (84 %) MM reagovalo s protilátkou HBME-1. Všechny pozitivní případy vykazovaly silnou membránovou pozitivitu ve většině nádorových buněk. 7 z 20 (35 %) plicních adenokarcinomů bylo rovněž pozitivních (obr. 14d), přičemž pozitivita byla patrná jak na membráně, tak v některých případech v cytoplazmě.

Pozitivita s protilátkou proti CEA byla cytoplazmatická, akcentovaná podél povrchové membrány (obr. 15a). Pozitivních bylo 13 z 20 (65 %) adenokarcinomů, a to silně, ve většině nádorových buněk. Žádný z MM tento antigen neexprimoval.

Všechny plicní adenokarcinomy (20/20; 100 %) byly silně, převážně difúzně membránově pozitivní v reakci s protilátkou MOC-31 (obr. 15b), zatímco MM reagoval ve 2 případech, v nichž byla pozitivita ložisková, slabší intenzity.



Obr. 15 Imunoreaktivita tzv. negativních mezoteliálních markerů. (a) Difúzní cytoplazmatická pozitivita protilátky proti CEA v plicním adenokarcinomu metastázujícím na pleuru (x400). (b) Plicní adenokarcinom se silnou membránovou pozitivitou reakce s monoklonální protilátkou proti MOC-31 (x200). (c) Reakce s anti-Ber-EP4 vykazuje silnou membránovou pozitivitu adenokarcinomu metastázujícího na pleuru (x400). (d) Hrubě granulární cytoplazmatická pozitivita adenokarcinomu plic v reakci s protilátkou proti TAG72 (x400).

Protilátka Ber-EP4 vykazovala membránovou pozitivitu kolísající intenzity ve většině nádorových buněk v 16 z 20 (80 %) adenokarcinomů (obr. 15c). Dva MM reagovaly též pozitivně, intenzita reakce však byla spíše slabá a procento pozitivních buněk nízké (10 až 20 %).

V reakci s protilátkou proti TAG-72 (B72.3) jsme pozorovali hrubě granulární cytoplazmatickou pozitivitu slabší či střední intenzity (obr. 15d) ve 13 z 20 (65 %) vyšetřovaných adenokarcinomů. Všechny MM byly negativní.

Za pozitivní imunoreakci s protilátkou proti TTF-1 byla považována pouze pozitivita jaderná. Většina adenokarcinomů plic (18/20; 90 %) byla pozitivní difúzně, s pozitivitou středně silné až

silné intenzity. Dva adenokarcinomy (2/20; 10 %) a rovněž všechny MM (56/56; 100 %) byly negativní.

Na základě imunohistochemických výsledků byla stanovena senzitivita a specifita jednotlivých použitých protilátek, jejichž hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 12.

Tabulka 12

Přehled výsledků imunohistochemických reakcí s výpočtem senzitivity a specifity jednotlivých protilátek.

	<i>Senzitivita mezoteliom (n=56)</i>	<i>Specifita vůči adenokarcinomu plic (n=20)</i>
Pozitivní markery	pozitivní (%)	negativní (%)
D2-40	51/56 (91)	20/20 (100)
CK5/6	52/56 (93)	16/20 (80)
Calretinin	54/56 (96)	20/20 (100)
WT1	50/56 (89)	20/20 (100)
HBME-1	47/56 (84)	13/20 (65)
	<i>adenokarcinom (n=20)</i>	<i>vůči mezoteliomu (n=56)</i>
Negativní markery	pozitivní (%)	negativní (%)
CEA	13/20 (65)	56/56 (100)
MOC-31	20/20 (100)	54/56 (96)
Ber-EP4	16/20 (80)	54/56 (96)
B72.3	12/20 (60)	56/56 (100)
TTF-1	18/20 (90)	56/56 (100)

n – počet vyšetřovaných případů

5.2.2 Expres CAIX v maligním mezoteliomu

Protilátkou proti CAIX bylo vyšetřeno 51 pacientů s diagnózou MM pleury a peritonea (47 MM pleury, 4 MM peritonea) a 14 benigních pleurálních lézí, které představovaly normální mezotelie u pacientů se spontánním pneumotoraxem či hyperplastický mezotel u pacientů s fibrinózní pleuritidou. K imunocytochemickému vyšetření jsme vybrali 19 cytobloků z výpotků od pacientů s histologicky ověřenou diagnózou MM pleury, karcinomů různé primární lokalizace (3 adenokarcinomy plic, 2 karcinomy ovaria a 1 kolorektální karcinom) a reaktivní pleuritidy. Podrobný přehled vyšetřovaných případů je uveden v tabulce č. 13.

Tabulka 13

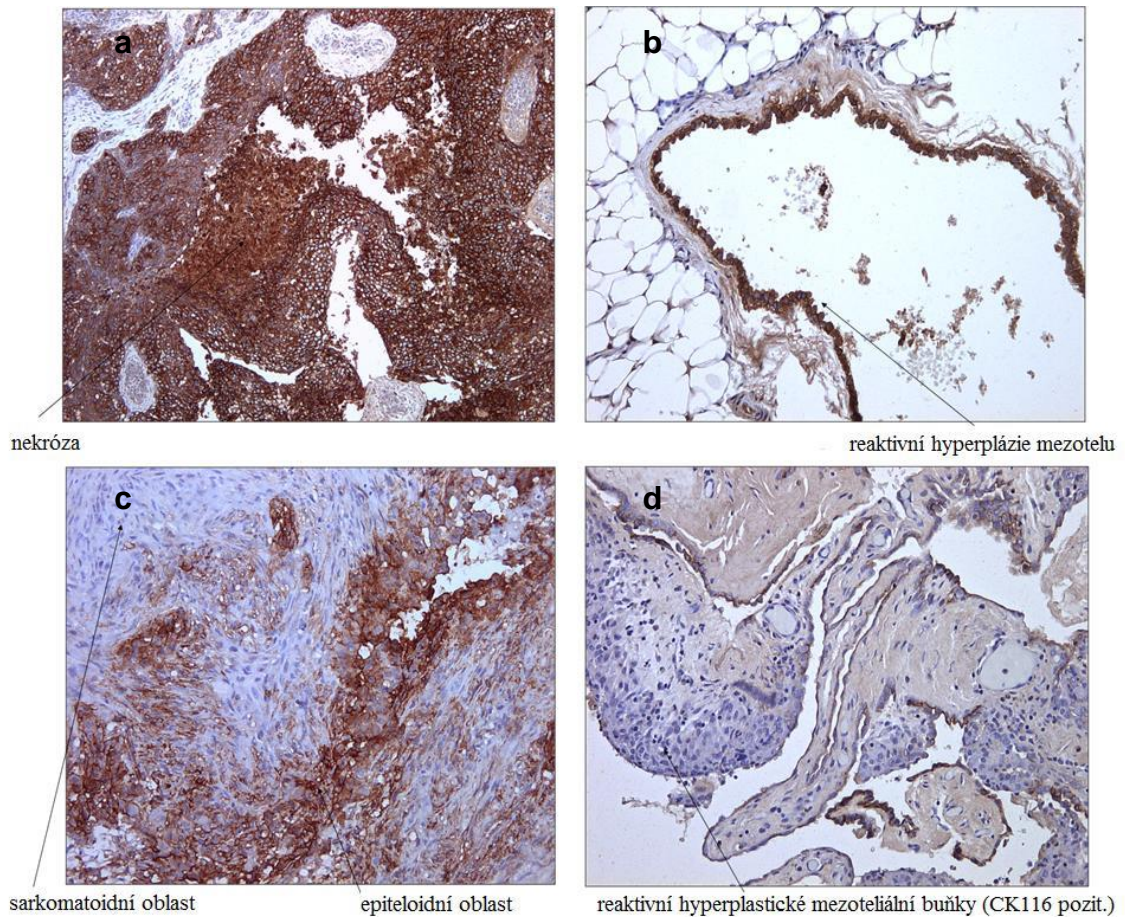
Přehled případů vyšetřovaných imunohistochemicky na expresi karboanhydrázy IX.

Bioptický materiál	n (%)
epiteloidní	41 (63,1)
MM pleury sarkomatoidní	4 (6,2)
bifázický	2 (3,1)
MM peritonea (epiteloidní)	4 (6,2)
normální mezotel	7 (10,7)
reaktivní mezotel/pleuritis	7 (10,7)
celkem	65 (100,0)
Cytobloky	n (%)
maligní výpotek u pacientů s MM pleury	6 (31,6)
maligní výpotek u pacientů s karcinomem	6 (31,6)
benigní reaktivní pleurální výpotek	7 (36,8)
Celkem	19 (100,0)

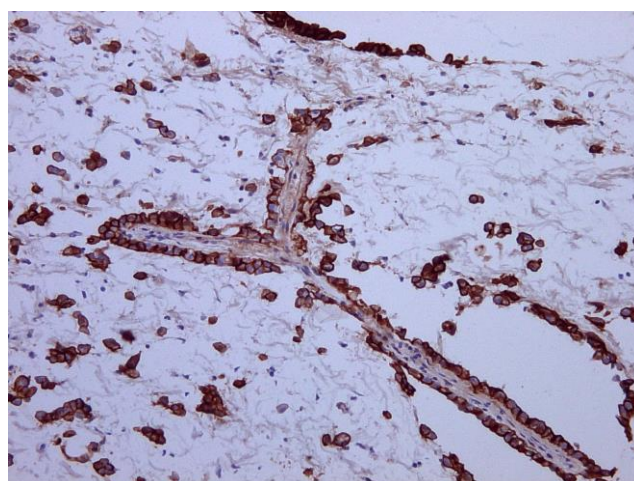
MM – maligní mezoteliom; n – počet vyšetřovaných případů

Všechny vyšetřované bioptické vzorky tkáně (51 MM, 14 nenádorových) byly informativní pro zhodnocení exprese CAIX na úrovni proteinu. Epiteloidní MM pleury i peritonea vykazovaly minimálně slabou fokální (8,9 %, 4/45), většinou však silnou difúzní pozitivitu (73,3 %, 33/45) (obr. 16). Případy bifázického MM byly pozitivní v epiteloidních oblastech. 4 negativní případy představovaly MM sarkomatoidní (7,8 %, 4/51). Výsledek imunohistochemických reakcí je v přehledu uveden v tabulce 14. Pozitivita v MM byla difúzní či disperzní, bez jakékoliv závislosti na přítomnosti nekrózy či vzdálenosti nádorových buněk od cévního zásobení (obr. 17). V případě negativních oblastí se jednalo o sarkomatoidní okrsky MM bifázických nebo o oblasti dediferencované, s obrovskými bizarními nádorovými buňkami, či s přechodem do sarkomatoidního růstu (obr. 16). Buňky stromální a zánětlivé a stejně tak elementy okolního plicního parenchymu byly v reakci s protilátkou proti CAIX negativní.

Ve všech vzorcích normální (100 %, 7/7) a ve většině vzorků reaktivní (71,4 %, 5/7) pleury vykazovaly ploché či kubické mezoteliální buňky pozitivitu difúzní, silné intenzity. Pouze benigní reaktivní hyperplastické mezotelie, které byly zavzaty do granulační tkáně v rámci organizující fibrinózní pleuritidy, vykazovaly pouze ložiskovou, slabou či žádnou expresi CAIX (obr. 17). Mezi pozitivitou CAIX v MM a nenádorových mezoteliích nebyl statisticky signifikantní rozdíl ($p=0,8991$).



Obr. 16 Příklady imunohistochemických reakcí s protilátkou proti karboanhydráze IX (CAIX). (a) Difúzní silná membránová pozitivita imunoreakce v epiteloidním mezoteliomu pleury s centrální nekrózou (x200). (b) Silná difúzní membránová pozitivita benigních reaktivních mezotelií (x400). (c) Silná pozitivita epiteloidních oblastí v bifázickém mezoteliomu, sarkomatoidní oblasti jsou negativní (x200). (d) Negativita reaktivních hyperplastických mezotelií v případě organizující pleuritidy (x400).



Obr. 17 Expres karboanhydrázy IX v buňkách maligního mezoteliomu v bezprostřední blízkosti cévy.

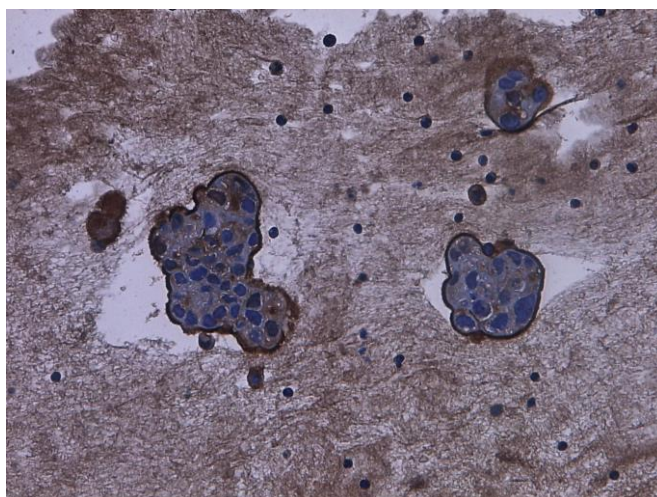
Tabulka 14

Přehled imunohistochemické exprese karboanhydrázy IX v biotických vzorcích.

Histologická diagnóza	Imunohistochemická exprese CAIX – n (%)					
	pozitivní celkem	silná difúzní	silná fokální	slabá difúzní	slabá fokální	negativní
MM celkem	47/51 (92,2)	33 (64,7)	7 (13,7)	3 (5,9)	4 (7,8)	4 (7,8)
epiteloidní	45/45 (100,0)	33 (73,3)	5 (11,1)	3 (6,7)	4 (8,9)	0
bifázický	2/2 (100,0)	0	2 (100,0)	0	0	0
sarkomatoidní	0/4 (0)	0	0	0	0	4 (100,0)
reaktivní mezotel/pleuritis	6/7 (85,7)	3 (42,8)	2 (28,6)	0	1 (14,3)	1 (14,3)
normální mezotel	7/7 (100)	7 (100)	0	0	0	0

CAIX – karboanhydráza IX; n – počet vyšetřovaných případů; MM – maligní mezoteliom

Imunohistochemická exprese CAIX v pleurálních výpotcích je znázorněna v tabulce 15. Silná difúzní membránová pozitivita byla přítomna ve všech případech MM (100 %, 6/6) (obr. 18). Stejně tak byly pozitivní 4/6 karcinomů a 6/7 případů reaktivních výpotků. Rovněž mezi těmito cytologickými skupinami nebyl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl v expresi CAIX ($p=0,6197$).



Obr. 18 Membránová pozitivita reakce s protilátkou proti karboanhydráze IX v buňkách maligního mezoteliomu (pleurální výpotek; x400).

Tabulka 15

Přehled imunohistochemické exprese karboanhydrázy IX v pleurálních výpotcích.

Cytologická diagnóza (cytoblok)	Imunohistochemická exprese CAIX – n (%)					
	pozitivní celkem	silná difúzní	silná fokální	slabá difúzní	slabá fokální	negativní
maligní výpotek pacientů s MM pleury	6/6 (100,0)	5 (83,3)	0	0	1 (16,7)	0
maligní výpotek pacientů s karcinomem	4/6 (66,7)	0	2 (33,3)	0	2 (33,3)	2 (33,3)
benigní reaktivní pleurální výpotek	6/7 (85,6)	3 (42,8)	2 (28,6)	0	1 (14,3)	1 (14,3)

CAIX - karboanhydráza IX; MM - maligní mezoteliom

5.2.3 Diskuze

Maligní mezoteliom je nejčastějším primárním nádorem postihujícím pleuru. Adenokarcinom plic je však spolu s adenokarcinomy dalších primárních lokalizací potenciálně metastázujícími do plic a na pleuru mnohem častější, a vzhledem k možné morfologické podobnosti a odlišné léčbě představuje diferenciální diagnostika těchto jednotek poměrně závažný problém. Imunohistochemické vyšetření s použitím široké palety protilátek hraje v této oblasti významnou úlohu. V dřívější době se imunohistochemická diagnóza opírala zejména o použití protilátek obvykle reagujících s adenokarcinomy (tzv. negativních markerů), protilátky vhodné k identifikaci buněk MM nebyly známy. Od poloviny 90. let 20. století začaly být postupně k dispozici tzv. pozitivní markery, tj. protilátky reagující výlučně s mezoteliemi, resp. zejména s epiteloidními mezoteliomy (Ordóñez N. G., 1998). V biotických případech z období před zavedením nových relativně specifických imunohistochemických markerů na našem pracovišti jsme při použití těchto protilátek detekovali diskrepanci s předchozí histologickou diagnózou v 9 % případů. Tyto výsledky potvrzují nutnost histopatologického přehodnocení biotických případů MM pro jejich zařazení do dalších studií.

Kvalita imunohistochemického markeru je podmíněna jeho dostatečně vysokou senzitivitou a zároveň specificitou. Mezinárodní skupina expertů zabývajících se MM (IMIG – *International Mesothelioma Interest Group*) doporučuje do vyšetřovacího panelu zařadit markery se specificitou a senzitivitou nad 80 %, přičemž při interpretaci výsledků je nutné zohlednit lokalizaci positivity daného markeru (např. cytoplazmatická vs. jaderná) a procento pozitivních buněk (pro cytoplazmatické a membránově pozitivní markery byla navržena hranice nad 10 % pozitivních buněk jako pozitivní nález) (Husain A. L. et al., 2012).

V současné době je pro diferenciální diagnostiku epiteloidního MM k dispozici několik vysoce specifických a senzitivních markerů, avšak žádný z nich není absolutně specifický a

zároveň senzitivní. Na základě našich výsledků vykazuje z pozitivních markerů nejvyšší senzitivitu spolu se 100% specificitou calretinin (senzitivita 96 %) a D2-40 (senzitivita 91 %). Reakce s anti-D2-40 vyžaduje pozornou interpretaci, neboť její pozitivita je v některých případech pouze fokální či slabé intenzity, což může komplikovat hodnocení zejména malých vzorků tkáně, event. cytobloku. Oproti tomu reakce s anti-calretininem bývá většinou silná a rovněž procento pozitivních buněk je vyšší. Vysoce specifický (100%) v odlišení adenokarcinomu plicního původu je též WT1 antigen, jehož senzitivita je jen o málo nižší než v případě předchozích dvou protilátek (89 %). Protilátka HBME-1 má sice senzitivitu přes 80 %, nicméně její specificita je příliš nízká (65 %). Zatímco z markerů negativních jsou všechny schopné diagnostikovat adenokarcinom s vysokou senzitivitou (96 až 100 %), současná vysoká specificita (100 %) favorizuje k pozitivní identifikaci adenokarcinomu použití MOC-31, v případě primárně plicního adenokarcinomu společně s TTF-1 (specificita 90 %).

Epiteloidní MM jsou ve srovnání se sarkomatoidními MM diferencovanější nádory, pravidelně exprimující alespoň jeden z pozitivních mezotelových markerů jakým je calretinin, WT1 či D2-40. Naopak k diagnóze sarkomatoidního mezoteliomu není nutná pozitivita těchto markerů, pokud je zachována reaktivita se širokospektrými cytokeratiny (Sandeck H. P. et al., 2010). Mezi pozitivními markery MM jsme v sarkomatoidních MM nejčastěji zaznamenali pozitivitu calretininu (ve 3/4 případů) a CK5/6 (ve 2/4 případů). Protilátky proti D2-40 a WT1 reagovaly v 1 ze 4 sarkomatoidních MM. Pozitivita byla patrná ovšem pouze v malém procentu buněk a její intenzita byla slabší než v MM epiteloidních. Obdobné výsledky pozoroval Chirieac L. et al. (2006) na větším souboru pacientů. Oproti epiteloidním nádorům pleury má tedy imunohistochemické vyšetření v dif. dg. sarkomatoidních nádorů menší roli a je nutná pečlivá korelace s klinickopatologickými a radiologickými údaji. Z praktického hlediska je postačující panel 4 protilátek (dvou pozitivních mezotelových a dvou karcinomových), přičemž nám se osvědčila kombinace calretininu a D2-40 (event. WT1) společně s MOC-31 a TTF-1. Pokud nejsou výsledky imunohistochemických reakcí jednoznačné, je samozřejmě nutné použít další markery, a to jak mezoteliální tak epiteliální, případně vaskulární či melanomové. Stejně tak je nutné přizpůsobit výběr protilátek v případech potenciálně jiného primárního původu karcinomu. Pokud není přínosný ani rozšířený imunohistochemický panel, může být v některých případech užitečné vyšetření elektronmikroskopické (Galateau-Salle F. B. et al., 2006).

V hlavní části imunohistochemické studie jsme se zabývali expresí CAIX v MM a benigních mezoteliálních buňkách v histologickém a cytologickém materiálu. Data v literatuře týkající se reaktivity CAIX u těchto morfologických jednotek jsou relativně chudá. Imunohistochemickou expresi CAIX v 8 případech mezoteliomů stručně zmínil ve své práci Ivanov S. et al. (2001), pomocí RT-PCR v pleurálních výpotcích 8 pacientů s mezoteliomem Li G. et al. (2007) a nejnověji pak Ramsey M. L. et al. (2011) v 19 případech MM pleury. Všechny tyto práce však postrádají bližší popis intenzity a lokalizace imunoreaktivity, která se u jiných maligních nádorů popisuje v oblastech přiléhajících k nekrotickým okrskům (Kim S. J. et al., 2004; Loncaster J. A. et al.,

2001). Vyjimku tvoří světlobuněčný karcinom z renálních buněk, pro který je typická difúzní pozitivita v důsledku zvýšené aktivity HIF-1 α a ztráty regulace CAIX přes hypoxii v důsledku inaktivovaného von-Hippel-Lindau (VHL) genu (Potter C. a Harris A. L., 2004).

V naší studii jsme pozorovali difúzní silnou membránovou imunoreaktivitu u většiny MM (64.7 %), a to bez závislosti na přítomnosti nekrózy či vzdálenosti od cévního zásobení. Naše pozorování jsou podobná nálezům jiných autorů u světlobuněčných karcinomů z renálních buněk, přestože mutace VHL genu nehrají v karcinogenezi MM významnější roli (Sekido Y. et al., 1994; Jean D. et al., 2012). Zajímavým nálezem je imunohistochemická exprese CAIX v sarkomatoidních oblastech bifázických MM a v epiteloidních MM s dediferencovanými okrsky (anaplastickými obrovskými bizarními buňkami či přechodem do sarkomatoidních partií), které nevykazovaly pozitivitu CAIX jinak typickou pro úseky epiteloidní. Rovněž všechny vyšetřované sarkomatoidní MM byly negativní. Obdobnou ztrátu exprese epiteliálních a mezoteliálních epitopů v mezoteliomech se sarkomatoidní diferenciací lze pozorovat v imunohistochemických reakcích s dalšími tzv. mezoteliálními markery, jak uvádíme výše (Lucas D. R. et al., 2003).

Pozornost zasluhuje rovněž imunohistochemická exprese CAIX v nenádorových mezoteliálních buňkách. Téměř ve všech případech normálních či reaktivně hyperplastických mezoteliích jsme pozorovali silnou difúzní membránovou pozitivitu, avšak za předpokladu, že tyto buňky měly epiteloidní vzhled a nacházely se na pleurálním povrchu. Jakmile ovšem došlo v průběhu procesu organizující pleuritidy k zavzetí těchto buněk do vrstvy fibrinu a proliferaující granulační tkáně v původně submezoteliální oblasti, byl průkaz CAIX v těchto buňkách negativní. Tento fakt by se mohl krýt se změnami pozorovanými v regenerující seróze, kdy mezoteliální buňky získávají odlišný fenotyp podobný myofibroblastům (Mutsaers S. E., 2004).

Hlavním regulátorem exprese CAIX ve většině solidních nádorů je hypoxie (Potter C. a Harris A. L., 2004; Wykoff C. C. et al., 2000), a proto lze očekávat pozitivitu imunohistochemické reakce v hypoxických a perinekrotických oblastech rovněž v případě MM. Naše výsledky však ukazují většinou silnou a difúzní expresi CAIX v mezoteliomech nezávisle na výše popsaných faktorech a rovněž i v benigních mezoteliích. Exprese CAIX je v mezoteliálních elementech tedy zřejmě regulována pomocí jiných mechanismů a transkripčních faktorů než jak je tomu u hypoxie. Rovněž Liao S. Y. et al. (2009) nedávno poukázal na fakt, že exprese CAIX nemusí být v normálních tkáních indukována pouze hypoxií, ale je závislá na funkčním stavu a typu buňky původu („*cell of origin*“) dané tkáně.

V nedávné době byly provedeny dvě studie, které hodnotily úlohu CAIX jako nového markeru pro detekci maligních buněk v pleurálních výpotcích. Liao N. D. et al. (2011) použil k imunohistochemické detekci exprese CAIX v benigních a maligních výpotcích (u pacientů s různými typy karcinomů) polyklonální protilátku proti CAIX (Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA). CAIX byla exprimována ve většině (63,8 %) maligních výpotků, zatímco benigní cytologické vzorky pozitivitu nevykazovaly. Autoři dospěli k závěru, že pozitivita reakce s protilátkou proti CAIX je známkou malignity a CAIX by mohla být vhodným doplňkovým markrem maligních buněk

v pleurálních výpotcích. K podobným závěrům dospěl Li G. et al. (2007) pomocí RT-PCR s kvalitativní detekcí exprese MN/CA9 mRNA. V naší studii s použitím cytobloků k imunohistochemické detekci exprese CAIX však byla CAIX prokázána v 83,3 % (10/12) případech maligních výpotků (MM a karcinomů) a rovněž v 85,7 % (6/7) benigních efúzí ($p=0,6197$). Na základě našich výsledků s použitím monoklonální protilátky proti CAIX (klon M75) jsme přesvědčeni, že by její imunoreaktivita v pleurálních výpotcích neměla být považována za známku malignity, a to z důvodu její positivity jak v maligních tak v benigních reaktivních mezoteliích ve výpotcích i v odpovídajících bioptických vzorcích. Domníváme se, že exprese CAIX představuje spíše fenomén společný buňkám odvozeným z coelomového epitelu. Ramsey M. L. et al. (2011) vyslovili rovněž domněnku, že by CAIX mohla sloužit jako nový mezoteliální marker. Vzhledem k poměrně uniformní pozitivitě CAIX jak v maligních tak v benigních mezoteliích a reaktivitě v celé řadě dalších maligních nádorů postihujících plíce a pleuru (Kim S. J. et al., 2004; Ivanov S. et al., 2001) však zůstává její význam v diferenciální diagnostice pleurálních afekcí pochybný.

V posledních desetiletích se pro oblast karboanhydráz a jejich inhibitorů otevírají možnosti vývoje nových specificky působících léků (Supuran C. T., 2007), jakož i diagnostických a prognostických prostředků (Parkkila S., 2008). Syntéza nových anti-CAIX-specifických protilátek proti katalytické doméně CAIX (Zatovicova M. et al., 2010) by mohla být podnětem pro provedení preklinických studií zabývajících se imunoterapeutickými postupy pro léčbu solidních nádorů. Nicméně běžná exprese CAIX v některých normálních lidských tkáních (včetně mezotelií) vede k nutnosti vývoje izoenzymově specifických a orgánově selektivních inhibitorů pro udržení minimální toxicity takové léčby.

6 ZÁVĚRY

Časná detekce prekancerózních lézí má zásadní význam ve snaze o snížení mortality karcinomu plic. Především dlouhodobí kuřáci a pacienti s karcinomem aerodigestivního traktu patří mezi vysoce rizikové skupiny pacientů, na které je nutné cílit časnou detekci nádorových a premaligních lézí. Konvenční metody užívané k identifikaci dysplastických lézí v dýchacích cestách mají však výrazné limity. Proto jsme se v souladu s moderními trendy snažili identifikovat biologické vlastnosti respiračního epitelu a korespondujících premaligních lézí, včetně molekulárně genetických změn, které by umožnily posoudit riziko vzniku invazivního nádorového onemocnění u této rizikové skupiny pacientů a tím měly pozitivní vliv na časnou detekci a monitoraci odpovědi na chemopreventivní léčbu. Naším cílem je pomocí kombinace histologického a molekulárně genetického vyšetření dospět k časnější detekci prekanceróz a tudíž i ke snížení mortality v důsledku tohoto zhoubného onemocnění.

V této práci jsme systematicky analyzovali přítomnost LOH v různých chromozomálních oblastech a expresi hTERT mRNA u bioptických vzorků celého spektra morfologických stadií procesu karcinogeneze SCC a též v normálním bronchiálním epitelu těžkých kuřáků. Prokázali jsme vztah mezi molekulárními změnami v oblastech tzv. „*mismatch repair genu*“ a regulátorů buněčného cyklu a expresí mRNA katalytické podjednotky telomerázy. Také jsme poukázali na vztah mezi těmito molekulárními změnami a histologickým obrazem v bronchiální sliznici analyzované skupiny pacientů. U SCC korespondují morfologické změny se změnami na genetické úrovni a již morfologicky normální či minimálně alterovaná bronchiální sliznice silných kuřáků může skrývat popsané genetické odchylky. Naše výsledky pomáhají nahlédnout do procesu změn exprese hTERT mRNA v korelaci s výskytem LOH v bronchiální sliznici těžkých kuřáků a naznačují, že její zvýšení představuje jeden z prvních kroků v mnohastupňovém procesu karcinogeneze SCC v plicích a že tento děj nabývá v pozdních fázích vývoje na intenzitě.

Naše studie v souladu s dalšími (Baryshnikova E. et al., 2008) ukazuje, že expozice cigaretovému kouři vede nejen k histologickým, ale i k disperzním molekulárním změnám ve sliznici bronchiálního stromu. Identifikace bioptických vzorků s LOH určitého typu či velkého rozsahu může představovat nový způsob definice rizika invazivního karcinomu u kuřáků a možnost monitorace odpovědi na chemopreventivní opatření. Zároveň je důležité odlišit molekulární markery vedoucí buňku směrem k invazivnímu fenotypu od změn spojených s poškozením chemickými látkami cigaretového kouře, aby bylo možné spolehlivě identifikovat skupinu preinvazivních lézí, které mají potenciál progredovat do invazivních nádorů. Dysregulace telomerázy v dospělých tkáních může představovat způsob, jak buňky překonají mechanismy senescence vedoucí k definitivní smrti a tím se zvýší riziko jejich přechodu do autonomní nádorové transformace. K dysregulaci telomerázy v bronchiálním epitelu kuřáků dochází ve velmi časně fázi patogeneze SCC a i když zvýšení její aktivity předchází invazi, je vzhledem k přítomnosti exprese

hTERT mRNA též v normálním epitelu těžkých kuřáků využití tohoto markeru k vyhledání pacientů kuřáků se zvýšeným rizikem rozvoje SCC či markeru pro monitoraci chemopreventivních studií sporné.

AFB se v naší studii ve skupině těžkých kuřáků s ventilačním omezením neukázala při detekci premaligních změn efektivnější ve srovnání se standardní bronchoskopií a rozšíření standardního bronchoskopického vyšetření o AFB dle našich výsledků nezlepšilo záchyt premaligních a maligních změn bronchiální sliznice. Přesto tato metoda zprostředkuje získání cenných informací týkajících se vývoje preinvazivních bronchiálních lézí a časných karcinomů a v budoucnu může pomoci identifikovat spolehlivé a senzitivní markery invazivního karcinomu. AFB by se tak mohla stát ideální metodou k diagnostice lézí velkých bronchů u jedinců s pozitivním molekulárním skrínigovým testem, jako např. detekcí genetických mutací či metylací DNA ve sputu, krvi, vydechovaném vzduchu či bronchiální laváži (Belinsky S. A. et al., 2007; Spira A. et al., 2007; Brambilla E. et al., 2003; Kennedy T. C. a Hirsch F. R., 2004). Před zavedením AFB do klinické praxe je nutné objasnit velkou část nezodpovězených otázek, mezi které spadá především klinický význam preinvazivních lézí detekovaných AFB a nutnost terapeutického zásahu, který by vedl k prodloužení délky pacientova života (Warner E. et al., 2010). Další otázkou je, zda by tato metoda byla schopna odhalit prekursorové léze jiných častých typů karcinomu plic jako adenokarcinomu či SCLC.

Histologická diferenciatní diagnostika epiteloidního MM a adenokarcinomu plic, založená pouze na morfologii, je zatížena relativně vysokým rizikem diagnostického omylu. Primární úlohu v odlišení těchto jednotek hraje v dnešní době imunohistochemické vyšetření. Na základě imunoreaktivity souboru MM a adenokarcinomu plic jsme posoudili senzitivitu a specifitu řady mezotelových a karcinomových markerů. Žádná z vyšetřovaných protilátek nebyla zároveň 100% senzitivní a specifická, nicméně použití diagnostického panelu dvou pozitivních (v tomto případě calretininu a D2-40) a dvou negativních (MOC-31 a TTF-1) markerů umožnilo definitivní stanovení diagnózy v naprosté většině případů. Naše výsledky upozorňují na nutnost histopatologické reevaluace bioptických vzorků s diagnózou MM, zejména pokud byla stanovena před zavedením specifických mezoteliálních a epiteliálních markerů. Zároveň potvrzují, že je při vyšetření nezbytné kombinovat morfologické vyšetření v základním barvení s vyšetřením minimálně dvou pozitivních a dvou negativních imunohistochemických markerů. Tento postup je zároveň v souladu s doporučením mezinárodní skupiny IMIG (*International Mesothelioma Interest Group*) (Husain A. N. et al., 2009) a IMP (*International Mesothelioma Panel*) (Galateau-Salle F. B. et al., 2006).

V poslední době získala pozornost protilátka proti CAIX, která byla skupinou kolem Ramsey M. L. et al. (2011) navržena jako nový možný mezotelový marker. Imunohistochemickou pozitivitu CAIX jsme v naší práci zaznamenali prakticky ve všech vyšetřovaných případech maligních mezoteliomů a stejně tak i v normálních a reaktivních mezoteliálních buňkách. Tato data podporují koncept orgánově selektivní izoenzymově specifické inhibice CAIX jako potenciálního terapeutického cíle u pacientů s pokročilým MM, avšak poukazují na fakt, že CAIX nelze využít

k odlišení nádorové a reaktivní proliferace mezotelu. Pozitivita imunohistochemické reakce protilátky proti CAIX v různých maligních nádorech a rovněž v benigních mezoteliích navíc neumožňuje její použití jako spolehlivého diagnostického markeru malignity v pleurálních výpotcích. Přesná role CAIX ve vzniku a progresi nádorového onemocnění musí být ještě prozkoumána, a to zejména u MM, kde její exprese spíše úzce souvisí s tzv. buněčnou linií původu („*cell line of origin*“) než s hypoxií, jako je tomu v případě jiných malignit.

7 SOUHRN

Cílem předkládané dizertační práce je představit moderní molekulární vyšetřovací metody, které mohou současně s použitím nejnovějších diagnostických přístrojů významně přispět k poznání patogeneze karcinomu plic, jedné z nejčastějších malignit s vysokou mortalitou. Zároveň chceme poukázat na význam imunohistochemického vyšetření v diferenciální diagnostice nejčastějších primárních malignit plic a pleury.

Karcinom plic všech histologických typů je výsledkem postupné akumulace genetických a epigenetických změn, které zahrnují ztráty alel (LOH), chromozomální nestabilitu, mutace v onkogenech a tumor supresorových genech, epigenetický „silencing“ hypermetylací promotoru či aberantní expresi genů účastnících se buněčné proliferace. V naší práci jsme se zaměřili na detekci některých genetických změn v dlaždicobuněčných karcinomech plic, v jejich prekancerózních lézích a v normální bronchiální sliznici u těžkých kuřáků s ventilační limitací. Prokázali jsme vztah mezi molekulárními změnami typu LOH v oblastech tzv. „mismatch repair genů“ a regulátorů buněčného cyklu a expresí mRNA katalytické podjednotky telomerázy (hTERT) a také korelaci mezi těmito molekulárními změnami a histologickým obrazem v bronchiální sliznici dané skupiny pacientů. Analýza exprese hTERT mRNA v korelaci s výskytem LOH v bronchiální sliznici těžkých kuřáků naznačuje, že její zvýšení představuje jeden z prvních kroků v mnohastupňovém procesu karcinogeneze dlaždicobuněčného karcinomu (SCC) v plicích a že tento děj nabývá v pozdních fázích vývoje na intenzitě. AFB v naší studii neukázala při detekci premaligních změn ve srovnání se standardní bronchoskopií vyšší efektivitu. Přesto tato metoda může zprostředkovat získání cenných informací týkajících se vývoje preinvazivních bronchiálních lézí a časných karcinomů a v budoucnu může napomoci identifikovat spolehlivé a senzitivní markery invazivního karcinomu.

Difúzní maligní mezoteliom (MM) představuje pouze 0,16 % všech maligních nádorů, avšak je nejčastější primární malignitou pleury. Z pohledu patologa spočívá jeho význam zejména v rovině diferenciálně diagnostické, kde stojí na prvním místě v odlišení od metastázujícího či na pleuru prorůstajícího adenokarcinomu, a to zejména primárně plicního původu. Zásadní úlohu v histologické analýze hraje vyšetření imunohistochemické. Dlouhodobě jsou hledány nové protilátky, které by umožnily zpřesnit diagnostiku, event. měly prognostický či terapeutický přínos. Ze širokého spektra imunohistochemických markerů jsme pro odlišení MM a plicního adenokarcinomu na základě senzitivity a specificity stanovili panel kombinující tzv. pozitivní markery (calretinin a D2-40) s tzv. markery negativními (MOC-31, TTF-1). V naší práci jsme dále zmapovali imunohistochemickou expresi proteinu karboanhydrázy IX (CAIX), kterou jsme zaznamenali prakticky ve všech vyšetřovaných případech MM, v normálních a reaktivních mezoteliích i v řadě metastatických karcinomů. Podle našich výsledků nelze použít CAIX jako spolehlivý diagnostický marker MM ani jako znak malignity v pleurálních výpotcích. Tato data však

podporují koncept orgánově selektivní izoenzymově specifické inhibice CAIX jako potenciálního terapeutického cíle u pacientů s pokročilým MM.

Naše práce má za cíl přispět k poznání plicní karcinogeneze a zpřesnění diagnostiky MM, které by v konečném efektu v budoucnu vedly k časnější detekci těchto lézí, resp. k vývoji nových terapeutických prostředků, a tím i ke snížení mortality na tato zhoubná onemocnění.

8 ABSTRACT

The aim of the presented thesis is to introduce modern molecular methods that may contribute to deepening our knowledge of pulmonary carcinogenesis. Furthermore, we would like to point out the significance of immunohistochemistry in differential diagnostics of the most common primary pulmonary and pleural neoplasms.

Lung carcinoma of all histological subtypes is a result of stepwise accumulation of genetic and epigenetic changes, including allelic losses (LOH), chromosomal instability and imbalance, oncogene and tumor suppressor gene mutations, epigenetic silencing by promotor hypermethylation or aberrant gene expression guiding cell proliferation. In our study, certain genetic changes were detected in squamous cell carcinomas (SCC) of the lung, their precancerous lesions as well as in normal bronchial mucosa in a selected group of heavy smokers with limited ventilation. We investigated the relation between molecular changes of LOH type in chromosomal regions harbouring mismatch repair genes and cell cycle regulators and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA expression. We also evaluated the relation between these molecular changes and histologic pattern in bronchial mucosa in this patient group. hTERT mRNA expression analysis in correlation with LOH in bronchial mucosa of heavy smokers suggests that it represents one of the first events in the multistep process of pulmonary SCC carcinogenesis. Autofluorescence bronchoscopy, a novel sensitive imaging method for detection of premalignant bronchial lesions, has not shown higher effectivity in comparison to standard white light bronchoscopy. Nevertheless, this method may assist to obtain valuable information concerning evolution of bronchial preinvasive lesions and early carcinomas. We believe that it may contribute to the identification of reliable and sensitive molecular markers of invasive carcinoma in the future.

Diffuse malignant mesothelioma (MM) represents only 0,16 % of all malignant tumours, but is the most common primary pleural malignancy. From the pathologist's point of view, its significance resides in histological differential diagnosis towards adenocarcinoma metastasizing or infiltrating into the pleura, especially of primary lung origin. Immunohistochemistry plays an essential role in this field. In the long term, new antibodies with increased diagnostic sensitivity and specificity, and eventual prognostic or therapeutic significance, are searched for. From a broad scale of relevant immunohistochemical markers, we validated a panel combining „positive“ (calretinin and D2-40) and „negative“ markers (MOC-31 and TTF-1) with the highest sensitivity and specificity. Our further work comprises the analysis of immunohistochemical expression of carbonhydrase IX (CAIX), a member of metalloproteinases regulating pH homeostasis. Its positivity was observed in virtually all MM as well as in normal and reactive mesothelia and in various metastatic carcinomas. Our results suggest that CAIX may neither be used as a reliable diagnostic marker of malignancy in pleural effusions nor a differentiation tool between neoplastic (mesothelioma) and reactive mesothelial proliferations. Nevertheless, these data support the

concept of organ selective isoenzyme-specific CAIX inhibition as a potential target in patients with advanced MM.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aguayo SM, Mille YE, Waldron JA Jr, Bogin RM, Sunday ME, et al. Brief report: idiopathic diffuse hyperplasia of pulmonary neuroendocrine cells and airways disease. *N Engl J Med*. 1992; 327: 1285-88.
- Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol*. 2005; 23 (14): 3175-3185.
- Altomare DA, Menges CW, Xu J, Pei J, Zhang L, Tadevosyan A, Neumann-Domer E, Liu Z, Carbone M, Chudoba I, Klein-Szanto AJ, Testa JR. Losses of both products of the Cdkn2a/Arf locus contribute to asbestos-induced mesothelioma development and cooperate to accelerate tumorigenesis. *PLoS One*. 2011; 6: e18828.
- Amos Ci, Xu W, Spitz MR. Is there a genetic basis for lung cancer susceptibility? *Recent Results Cancer Res*. 1999; 151: 3-12.
- Arinaga M, Shimizu S, Gotoh K, Haruki N, Takahashi T, Takahashi T, Mitsudomi T. Expression of human telomerase subunit genes in primary lung cancer and its clinical significance. *Ann Thorac Surg*. 2000; 70 (2): 401-5; discussion 405-6.
- Artandi SE, DePinho RA. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31 (1): 9-18.
- Auerbach O, Hammond EC, Garfinkel L. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking, 1955-1960 vs. 1970-1977. *N Engl J Med*. 1979; 300 (8): 381-385.
- Barbanti-Brodano G, Sabbioni S, Martini F, Negrini M, Corallini A, Tognon M. Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses. *Virology*. 2004; 318: 1-9.
- Baryshnikova E, Destro A, Infante MV, Cavuto S, Cariboni U, Alloisio M, Ceresoli GL, Lutman R, Brambilla G, Chiesa G, Ravasi G, Roncalli M. Molecular alteration in spontaneous sputum of cancer-free heavy smokers? Results from a large screening program. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 1913-1919.
- Bayne S, Liu JP. Hormones and growth factors regulate telomerase activity in aging and cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 240 (1-2): 11-22.
- Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, Lin L, Chen G, Gharib TG, Thomas DG, Lizyness ML, Kuick R, Hayasaka S, Taylor JM, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash S. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2002; 8 (8): 816-24.
- Belair CD, Yeager TR, Lopez PM, Reznikoff CA. Telomerase activity: a biomarker of cell proliferation, not malignant transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 13677-13682.
- Belinsky SA, Grimes MJ, Casas E, Stidley CA, Franklin WA, Bocklage TJ, Johnson DH, Schiller JH. Predicting gene promoter methylation in non-small-cell lung cancer by evaluating sputum and serum. *Br J Cancer*. 2007; 96 (8): 1278-1283.
- Berrino F, De Angelis R, Sant M, Rosso S, Lasota MB, Coebergh JW, Santaquilani M, and the EUROCARE Working group. Survival for eight major cancers and all cancers combined for European adults diagnosed in 1995-99: results of the EUROCARE-4 study. *Lancet Oncol*. 2007; 8: 773-783.
- Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark EJ, Lander ES, Wong W, Johnson BE, Golub TR, Sugarbaker DJ, Meyerson M. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98 (21): 13790-5.
- Bianchi AB, Mitsunaga SI, Cheng JQ, Klein WM, Jhanwar SC, Seizinger B, Kley N, Klein-Szanto AJ, Testa JR. High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 10854-10858.
- Bijwaard KE, Aguilera NS, Monczak Y, Trudel M, Taubenberger JK, Lichy JH. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for cyclin D1 expression: utility in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Clin Chem*. 2001; 47 (2): 195-201.
- Boffetta P, Trichopoulos D. Cancer of the lung, larynx, and pleura. In: Adami HO, Hunter D, Trichopoulos D, eds. *Textbook of Cancer Epidemiology*. Oxford, England: Oxford University Press. 2002: 248-280.
- Boutin C, Schlessner M, Frenay C, Astoul P. Malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J*. 1998; 12: 972-981.

- Brambilla E, Moro D, Gazzeri S, Brambilla C. Alterations of expression of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in non-small cell lung carcinoma and their clinical significance. *J Pathol.* 1999; 188: 351-360.
- Brambilla E, Fievet F, Jeanmart M, de FF, Lantuejoul S, Frappat V, Ferretti G, Brichon PY, Moro-Sibilot D. Early detection of lung cancer: role of biomarkers. *Eur Respir J. Suppl.* 2003; 39: 36s-44s.
- Brambilla E, Gazdar A. Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: roadmap for therapies. *Eur Respir J.* 2009; 33 (6): 1485-1497.
- Breuer RH, Pasic A, Smit EF, van Vliet E, Vonk Noordegraaf A, Risse EJ, Postmus PE, Sutedja TG. The natural course of preneoplastic lesions in bronchial epithelium. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 537-543.
- Cacev T, Jokić M, Spaventi R, Pavelić K, Kapitanović S. Loss of heterozygosity testing using real-time PCR analysis of single nucleotide polymorphisms. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006; 132 (3): 200-4.
- Carbone M. Malignant mesothelioma. *Lung Cancer.* 2005; 49: Suppl. 3, S24.
- Ceresoli GL, Zucali PA, Gianoncelli L, Lorenzi E, Santoro A. Second-line treatment for malignant pleural mesothelioma. *Cancer Treat Rev.* 2010; 36 (1): 24-32.
- Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA. Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene.* 1998; 16: 1217-1222.
- Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, Boyle P. *Cancer Incidence in Five Continents.* Lyon: IARC Press; 2007.
- Delgermaa V, Takahashi K, Park EK, Le GV, Hara T, Sorahan T. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. *Bulletin of the World Health Organization.* 2001; 89: 716-724.
- Devesa SS, Bray F, Vizcaino AP, Parkin DM. International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer.* 2005; 117 (2): 294-299.
- Dušek L, Mužík J, Abrahámová J, Pavlík T, Májek O, Koptíková J, Vyzula R, Fínek J, Vorlíček J. Epidemiologie solidních nádorů v ČR podle dat Národního onkologického registru za období 1977-2007. *Postgraduální medicína.* 2010; 3: 268-277.
- Engels EA, Katki HA, Nielsen NM, Winther JF, Hjalgrim H, Gjerris F, Rosenberg PS, Frisch M. Cancer incidence in Denmark following exposure to poliovirus vaccine contaminated with simian virus 40. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95: 532-539.
- Franklin WA, Veve R, Hirsch FR, Helfrich BA, Bunn PA Jr. Epidermal growth factor receptor family in lung cancer and premalignancy. *Semin Oncol.* 2002; 29: 3-14.
- Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, et al.: Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer.* 2000; 89 (10): 2025-37.
- Galateau-Salle FB, Luna RE, Horiba K, Sheppard MN, Hayashi T, Fleming MV, Colby TV, Bennett W, Harris CC, Stetler-Stevenson WG, Liotta L, Ferrans VJ, Travis WD. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in bronchial squamous preinvasive lesions. *Hum Pathol.* 2000; 31: 296-305.
- Galateau-Salle FB, Brambilla E, Cagle PT, et al. Classification and histologic features of epithelioid mesothelioma. In: Galateau-Salle F, ed. *Pathology of Malignant Mesothelioma.* London, England: Springer-Verlag; 2006: 68-131.
- Gazdar AF, Carbone M. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma and its relationship to simian virus 40. *Clin Lung Cancer.* 2003; 5: 177-181.
- Geisler JP, Goodheart MJ, Sood AK, Holmes RJ, Hatterman-Zogg MA, Buller RE: Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma. *Cancer.* 2003; 98 (10): 2199-206.
- Gomez M, Silvestri GA. Lung cancer screening. *Am J Med Sci.* 2008; 335 (1): 46-50.
- Gold KA, Kim ES, Lee JJ, Wistuba II, Farhangfar CJ, Hong WK. The BATTLE to personalize lung cancer prevention through reverse migration. *Cancer Prev Res.* 2011; 4 (7): 962-72.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell.* 1985; 43 (2 Pt 1): 405-13.

- Guessous I, Cornuz J, Paccaud F. Lung cancer screening: current situation and perspective. *Swiss Med Wkly*. 2007; 137 (21-22): 304-311.
- Hara H, Yamashita K, Shinada J, Yoshimura H, Kameya T. Clinicopathologic significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2001; 34 (2): 219-26.
- Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2 (1): 38-47.
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 1990; 346 (6287): 866-8.
- Haussinger K, Becker H, Stanzel F, Kreuzer A, Schmidt B, Strausz J, Cavaliere S, Herth F, Kohlhäufel M, Müller KM, Huber RM, Pichlmeier U, Bolliger ChT. Autofluorescence bronchoscopy with white light bronchoscopy compared with white light bronchoscopy alone for the detection of precancerous lesions: a European randomised controlled multicentre trial. *Thorax*. 2005; 60 (6): 496-503.
- Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 733-744.
- Helfritzsch H, Junker K, Bartel M, Scheele J: Differentiation of positive autofluorescence bronchoscopy findings by comparative genomic hybridization. *Oncol Rep*. 2002; 9 (4): 697-701.
- Henderson EH. Telomere DNA structure. In: Blackburn E, Greider C (eds). *Telomeres*. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1995: 11-34.
- Henderson DW, Reid G, Kao SC, van Zandwijk N, Klebe S. Challenges and controversies in the diagnosis of mesothelioma: Part 1. Cytology-only diagnosis, biopsies, immunohistochemistry, discrimination between mesothelioma and reactive mesothelial hyperplasia, and biomarkers. *J Clin Pathol*. 2013; 66 (10): 847-53.
- Herbert B, Pitts AE, Baker SI, Hamilton SE, Wright WE, Shay JW, Corey DR. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96 (25): 14276-81.
- Herth FJ, Eberhardt R, Ernst A: The future of bronchoscopy in diagnosing, staging and treatment of lung cancer. *Respiration*. 2006; 73 (4): 399-409.
- Hess JL, Highsmith WE Jr. Telomerase detection in body fluids. *Clin Chem*. 2002; 48 (1): 18-24.
- Hirao T, Nelson HH, Ashok TD, et al.: Tobacco smoke-induced DNA damage and an early age of smoking initiation induce chromosome loss at 3p21 in lung cancer. *Cancer Res*. 2001; 61 (2): 612-5.
- Hirsch FR, Franklin WA, Veve R, Varella-Garcia M, Bunn PA Jr. HER2/neu expression in malignant lung tumors. *Semin Oncol*. 2002; 29: 51-58.
- Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar AF, Piatyszek MA, Shay JW. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87 (12): 895-902.
- Hodgson JT, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg*. 2000; 44: 565-601.
- Holt SE, Shay JW. Role of telomerase in cellular proliferation and cancer. *J Cell Physiol*. 1999; 180 (1): 10-18.
- Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M. Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2004; 140 (9): 740-753.
- Husain AN, Colby TV, Ordóñez NG, Krausz T, Borczuk A, Cagle PT, Chirieac LR, Churg A, Galateau-Salle F, Gibbs AR, Gown AM, Hammar SP, Litzky LA, Roggli VL, Travis WD, Wick MR. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: a consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med*. 2009; 133: 1317-1331.
- Husain AN, Colby TV, Ordóñez NG, Krausz T, Borczuk A, Cagle PT, Chirieac LR, Churg A, Galateau-Salle F, Gibbs AR, Gown AM, Hammar SP, Litzky LA, Roggli VL, Travis WD, Wick MR. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: 2012 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med*. 2012; 136: 1-21.
- Chhajed PN, Shibuya K, Hoshino H, Chiyo M, Yasufuku K, Hiroshima K, Fujisawa T. A comparison of video and autofluorescence bronchoscopy in patients at high risk of lung cancer. *Eur Respir J*. 2005; 25 (6): 951-5.

- Chirieac L, Pinkus G, Pinkus J. Sarcomatoid malignant mesothelioma: immunohistochemical characteristics of 24 cases (abstract 1422). *Mod Pathol.* 2005; 19: 305A.
- Chu AY, Litzky LA, Pasha TL, Acs G, Zhang PJ. Utility of D2-40, a novel mesothelial marker in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Mod Pathol.* 2005; 18: 105-110.
- Ikeda N, Honda H, Hayashi A, Usuda J, Kato Y, Tsuboi M, Ohira T, Hirano T, Kato H, Serizawa H, Aoki Y. Early detection of bronchial lesions using newly developed videoendoscopy-based autofluorescence bronchoscopy. *Lung Cancer.* 2006; 52 (1): 21-7.
- Ismail-Khan R, Robinson LA, Williams CC, Jr., Garrett CR, Bepler G, Simon GR. Malignant pleural mesothelioma: a comprehensive review. *Cancer Control.* 2006; 13 (4): 255-63.
- Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of hypoxia-inducible cell-surface transmembrane carbonic anhydrases in human cancer. *Am J Pathol.* 2001; 158 (3): 905-19.
- Ivanova AV, Ivanov SV, Prudkin I, Nonaka D, Liu Z, Tsao A, Wistuba I, Roth J, Pass HI. Mechanisms of FUS1/TUSC2 deficiency in mesothelioma and its tumorigenic transcriptional effects. *Mol Cancer.* 2009; 8: 91.
- Jean D, Daubriac J, Le Pimpec-Barthes F, Galateau-Salle F, Jaurand MC. Molecular changes in mesothelioma with an impact on prognosis and treatment. *Arch Pathol Lab Med.* 2012; 136 (3): 277-93.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61: 69-90.
- Jonsson S, Varella-Garcia M, Miller YE, Wolf HJ, Byers T, Braudrick S, Kiatsimkul P, Lewis M, Kennedy TC, Keith RL, Bjornsson J, McWilliams A, Lam S, Hirsch FR, Franklin WA. Chromosomal aneusomy in bronchial high-grade lesions is associated with invasive lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 342-347.
- Kelly RJ, Sharon E, Hassan R. Chemotherapy and targeted therapies for unresectable malignant mesothelioma. *Lung Cancer.* 2011; 73 (3): 256-63.
- Kennedy TC, Lam S, Hirsch FR. Review of recent advances in fluorescence bronchoscopy in early localization of central airway lung cancer. *Oncologist.* 2001; 6 (3): 257-62.
- Kennedy TC, Hirsch FR. Using molecular markers in sputum for the early detection of lung cancer: a review. *Lung Cancer.* 2004; 45 Suppl 2: S21-S27.
- Kerr KM. Pulmonary preinvasive neoplasia. *J Clin Pathol.* 2001; 54: 257-271.
- Khuder SA. Effect of cigarette smoking on major histological subtypes of lung cancer: meta-analysis. *Lung Cancer.* 2001; 31: 139-148.
- Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Barbar I, Vogel S, Crowley D, Bronson RT, Jacks T. Identification of bronchioalveolar stem cell in normal lung and lung cancer. *Cell.* 2005; 121: 823-835.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994; 266 (5193): 2011-5.
- Kim SJ, Rabbani ZN, Vollmer RT, Schreiber EG, Oosterwijk E, Dewhirst MW, Vujaskovic Z, Kelley MJ. Carbonic anhydrase IX in early-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10 (23): 7925-33.
- Kitamura H, Kameda Y, Ito T, Hayashi H. Atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Am J Clin Pathol.* 1999; 111: 610-22.
- Klabatsa A, Sheaff MT, Steele JP, Evans MT, Rudd RM, Fennel DA. Expression and prognostic significance of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Lung Cancer.* 2006; 51 (1): 53-9.
- Knudson A. Alfred Knudson and his two-hit hypothesis (Interview by Ezzie Hutchinson). *Lancet Oncol.* 2011; 2 (10): 642-5.
- Koch W. Technology platforms for pharmacogenomic diagnostic assays. *Nat Rev Drug Disc.* 2004; 3: 749-761.

- Kumaki F, Kawai T, Hiroi S, Shinomiya N, Ozeki Y, Ferrans VJ, Torikata C. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Hum Pathol.* 2001; 32: 188-195.
- Kurie JM, Lee JS, Morice RC, Walsh GL, Khuri FR, Broxson A, Ro JY, Franklin WA, Yu R, Hong WK. Autofluorescence bronchoscopy in the detection of squamous metaplasia and dysplasia in current and former smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 90 (13): 991-5.
- Lam S, MacAulay C, Hung J, LeRiche J, Profio AE, Palcic B. Detection of dysplasia and carcinoma in situ with a lung imaging fluorescence endoscope device. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993; 105 (6): 1035-40.
- Lam S, Kennedy T, Unger M, Miller YE, Gelmont D, Rusch V, Gipe B, Howard D, LeRiche JC, Coldman A, Gazdar AF. Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy. *Chest.* 1998; 113 (3): 696-702.
- Lam S, MacAulay CE, leRiche JC, Palcic B. Detection and localization of early lung cancer by fluorescence bronchoscopy. *Cancer.* 2000; 89: 2468-73.
- Lantuéjoul S, Salameire D, Salon C, Brambilla E. Pulmonary preneoplasia – sequential molecular carcinogenetic events. *Histopathology.* 2009; 54 (1): 43-54.
- Lasko D, Cavenee W, Nordenskjöld M. Loss of constitutional heterozygosity in human cancer. *Annu Rev Genet.* 1991; 25: 281-314.
- Lee AY, Raz DJ, He B, Jablons DM. Update on the molecular biology of malignant mesothelioma. *Cancer.* 2007; 109 (8): 1454-1461.
- Li G, Passebosch-Faure K, Feng G, Lambert C, Cottier M, Gentil-Perret A, Fournel P, Pérol M, Genin C. MN/CA9: a potential gene marker for detection of malignant cells in effusions. *Biomarkers.* 2007; 12 (2): 214-20.
- Liao ND, Shieh JM, Lee WY. Diagnostic value of metabolic phenotypes in malignant pleural effusions: expression of GLUT1 and CAIX by immunocytochemistry. *Cancer Cytopathol.* 2011; 119 (5): 346-53.
- Liao SY, Lerman MI, Stanbridge EJ. Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development. *BMC Dev Biol.* 2009; 9: 22.
- Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wycoff CC, Pastorek J, Ratcliffe PJ, Stratford IJ, West CM. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. *Cancer Res.* 2001; 61 (17): 6394-9.
- Loewen G, Natarajan N, Tan D, Nava E, Klippenstein D, Mahoney M, Cummings M, Reid M. Autofluorescence bronchoscopy for lung cancer surveillance based on risk assessment. *Thorax.* 2007; 62 (4): 335-40.
- Lu YJ, Dong XY, Shipley J, Zhang RG, Cheng SJ. Chromosome 3 imbalances are the most frequent aberration found in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer.* 1999; 23: 61-66.
- Lucas DR, Pass HI, Madan SK, Adsay NV, Wali A, Tabaczka P, Lonardo F. Sarcomatoid mesothelioma and its histological mimics: a comparative immunohistochemical study. *Histopathology.* 2003; 42 (3): 270-9.
- Lundberg AS, Randell SH, Stewart SA, Elenbaas B, Hartwell KA, Brooks MW, Fleming MD, Olsen JC, Miller SW, Weinberg RA, Hahn WC. Immortalization and transformation of primary human airway epithelial cells by gene transfer. *Oncogene.* 2002; 21 (29): 4577-4586.
- Malhotra P, Behera D, Srinivasan R, Majumdar S, Wali A, Mir S, Kaur R. Detection of microsatellite alterations in bronchial washings in squamous cell lung cancer: the first study from India. *Jpn J Clin Oncol.* 2004; 34: 439-444.
- Manfredi JJ, Dong J, Liu WJ, Resnick-Silverman L, Qiao R, Chanihian P, Saric M, Gibbs AR, Phillips JI, Murray J, Axten CW, Nolan RP, Aaronson SA. Evidence against a role for SV40 in human mesothelioma. *Cancer Res.* 2005; 65 (7): 2602-2609.
- Mao L, Schoenberg MP, Scicchitano M, Erozan YS, Merlo A, Schwab D, Sidransky D. Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. *Science.* 1996; 271 (5249): 659-62.
- Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Broxson A, Yu R, Morice RC, Kemp BL, Khuri FR, Walsh GL, Hittelman WN, Hong WK. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89 (12): 857-62.

- McDonald JC, McDonald AD. The epidemiology of mesothelioma in historical context. *Eur J Respir.* 1996; 9: 1932-42.
- McKnight TD, Shippen DE. Plant telomere biology. *Plant Cell.* 2004; 16 (4): 794-803.
- McWilliams A, Mayo J, McDonald S, leRiche JC, Palcic B, Szabo E, Lam S. Lung cancer screening: a different paradigm. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168 (10): 1167-73.
- Medintz IL, Lee CC, Wong WW, Pirkola K, Sidransky D, Mathies RA. Loss of heterozygosity assay for molecular detection of cancer using energy-transfer primers and capillary array electrophoresis. *Genome Res.* 2000; 10: 1211-1218.
- Meid FH, Gygi CM, Leisinger HJ, Bosman FT, Benhattar J. The use of telomerase activity for the detection of prostatic cancer cells after prostatic massage. *J Urol.* 2001; 165 (5): 1802-5.
- Miller RR. Alveolar atypical hyperplasia in association with primary pulmonary adenocarcinoma: a clinicopathological study of 10 cases. *Thorax.* 1993; 48 (6): 679-80.
- Minna JD, Roth JA, Gazdar AF. Focus on lung cancer. *Cancer Cell.* 2002; 1 (1): 49-52.
- Miserocchi G. Physiology and pathophysiology of pleural fluid turnover. *Eur Respir J.* 1997; 10: 219-225.
- Mori M, Rao SK, Popper HH, Cagle PT, Fraire AE. Atypical Adenomatous Hyperplasia of the Lung: A Probable Forerunner in the Development of Adenocarcinoma of the Lung. *Mod Pathol.* 2001; 14 (2): 72-84.
- Mossman BT, Shukla A, Heintz NH, Verschraegen CF, Thomas A, Hassan R. New insights into understanding the mechanisms, pathogenesis, and management of malignant mesothelioma. *Am J Pathol.* 2013; 182: 1065-1077.
- Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36 (1): 9-16.
- Osanai M, Igarashi T, Yoshida Y. Unique cellular features in atypical adenomatous hyperplasia of the lung: ultrastructural evidence of its cytodifferentiation. *Ultrastruct Pathol.* 2001; 25: 367-73.
- Ordóñez NG. In search of a positive immunohistochemical marker for mesothelioma: an update. *Adv Anat Pathol.* 1998; 5: 53-60.
- Ordóñez NG. Application of immunohistochemistry in the diagnosis of epithelioid mesothelioma: a review and update. *Hum Pathol.* 2013; 44 (1): 1-19.
- Parkkila S. Significance of pH regulation and carbonic anhydrases in tumour progression and implications for diagnostic and therapeutic approaches. *BJU Int.* 2008; 101 Suppl 4: 16-21.
- Pass HI, Vogelzang N, Carbone M. Malignant mesothelioma: pathogenesis, diagnosis, and translational therapies. Springer-Verlag, 2005.
- Pastorekova S, Zavadova Z, Kostal M, Babusikova O, Zavadova J. A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology.* 1992; 187 (2): 620-6.
- Pastorekova S, Parkkila S, Zavadova J. Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance. *Adv Clin Chem.* 2006; 42: 167-216.
- Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer.* 1999; 79: 666-672.
- Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene.* 2002; 21: 7435-7451.
- Powell CA, Klares S, O'Connor G, Brody JS. Loss of heterozygosity in epithelial cells obtained by bronchial brushing: clinical utility in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 2025-2034.
- Potter C, Harris AL. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle.* 2004; 3 (2): 164-7.
- Ramsey ML, Yuh BJ, Johnson MT, Yeldandi AV, Zynger DL. Carbonic anhydrase IX is expressed in mesothelioma and metastatic clear cell renal cell carcinoma of the lung. *Virchows Arch.* 2011; 460 (1): 89-93.
- Rasio D, Negrini M, Manenti G, Dragani TA, Croce CM. Loss of heterozygosity at chromosome 11q in lung adenocarcinoma: identification of three independent regions. *Cancer Res.* 1995; 55 (18): 3988-91.
- Robertson N, Potter C, Harris AL. Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res.* 2004; 64 (17): 6160-5.

- Robinson BW, Lake RA. Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med.* 2005; 353 (15): 1591-603.
- Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet.* 2005; 366: 397-408.
- Røe OD, Anderssen E, Helge E, Pettersen CH, Olsen KS, Sandeck H, Haaverstad R, Lundgren S, Larsson E. Genome-wide profile of pleural mesothelioma versus parietal and visceral pleura: the emerging gene portrait of the mesothelioma phenotype. *PLoS ONE.* 2009; 4: e6554.
- Salaün M, Sesboüé R, Moreno-Siwre S, Metayer J, Bota S, Bourguignon J, Thiberville L. Molecular predictive factors for progression of high-grade preinvasive bronchial lesions. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177: 880-886.
- Sandeck HP, Røe OD, Kjaerhem K, Willén H, Larsson E. Re-evaluation of histological diagnoses of malignant mesothelioma by immunohistochemistry. *Diagn Pathol.* 2010; 5: 47.
- Sekido Y, Bader S, Latif F, Gnarr JR, Gazdar AF, Linehan WM, Zbar B, Lerman MI, Minna JD. Molecular analysis of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene in human lung cancer cell lines. *Oncogene.* 1994; 9 (6): 1599-604.
- Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med.* 2003; 54: 73-87.
- Sekido Y. Genomic abnormalities and signal transduction dysregulation in malignant mesothelioma cells. *Cancer Sci.* 2010; 101: 1-6.
- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997; 33 (5): 787-91.
- Shibuya K, Fujisawa T, Hoshino H, Baba M, Saitoh Y, Iizasa T, Sekine Y, Suzuki M, Hiroshima K, Ohwada H. Increased telomerase activity and elevated hTERT mRNA expression during multistage carcinogenesis of squamous cell carcinoma of the lung. *Cancer.* 2001; 92 (4): 849-55.
- Shibuya K, Hoshino H, Chiyo M, Iyoda A, Yoshida S, Sekine Y, Iizasa T, Saitoh Y, Baba M, Hiroshima K, Ohwada H, Fujisawa T. High magnification bronchovideoscopy combined with narrow band imaging could detect capillary loops of angiogenic squamous dysplasia in heavy smokers at high risk for lung cancer. *Thorax.* 2003; 58 (11): 989-95.
- Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, Roth JA, Herz J, Minna JD, Gazdar AF. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97 (5): 339-46.
- Shimosato Y, Kodama T, Kameya T. Morphogenesis of peripheral type adenocarcinoma of the lung. In: Shimosato Y, Melamed MR, Nettekheim P editors. *Morphogenesis of lung cancer.* CRC press: Boca Raton. 1982: 65-90.
- Sidransky D. Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science.* 1997; 278 (5340): 1054-9.
- Snijders PJ, Breuer RH, Sutetja TG, Egging M, Voorhorst FJ, Steenberg RD, van der Linden HC, Risse EK, Berkhof J, de Vries EG, van der Zee AG, Postmus PE, Meijer CJ, Smit EF. Elevated hTERT mRNA levels: A potential determinant of bronchial squamous cell carcinoma (in situ). *Int J Cancer.* 2004; 109 (3): 412-7.
- Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, Tornielli S, Sard L, Huebner K, Pierotti MA, Croce CM, Pilotti S. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res.* 1998; 58 (22): 5032-7.
- Spira A, Beane JE, Shah V, Steiling K, Liu G, Schembri F et al. Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. *Nat Med.* 2007; 13 (3): 361-366.
- Stefansson I, Akslen LA, MacDonald N, et al.: Loss of hMSH2 and hMSH6 expression is frequent in sporadic endometrial carcinomas with microsatellite instability: a population-based study. *Clin Cancer Res.* 2002; 8 (1): 138-43.
- Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol.* 2007; 25 (5): 561-570.
- Summaries for patients. Screening for lung cancer: recommendations from the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2004; 140 (9): 188.
- Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never-smokers – a different disease. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7 (10): 778-790.
- Supuran CT. Carbonic anhydrases as drug targets--an overview. *Curr Top Med Chem.* 2007; 7 (9): 825-33.
- Sutetja G. New techniques for early detection of lung cancer. *Eur Respir J. Suppl* 2003; 39: 57s-66s.

- Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, Rafnar T, Wiste A, Magnusson KP, Manolescu A, Thorleifsson G, Stefansson H, Ingason A, Stacey SN, Bergthorsson JT, Thorlacius S, Gudmundsson J, Jonsson T, Jakobsdottir M, Saemundsdottir J, Olafsdottir O, Gudmundsson LJ, Bjornsdottir G, Kristjansson K, Skuladottir H, Isaksson HJ, Gudbjartsson T, Jones GT, Mueller T, Gottsäter A, Flex A, Aben KK, de Vegt F, Mulders PF, Isla D, Vidal MJ, Asin L, Saez B, Murillo L, Blondal T, Kolbeinsson H, Stefansson JG, Hansdottir I, Runarsdottir V, Pola R, Lindblad B, van Rij AM, Dieplinger B, Haltmayer M, Mayordomo JI, Kiemeneý LA, Matthiasson SE, Oskarsson H, Tyrfinngsson T, Gudbjartsson DF, Gulcher JR, Jonsson S, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature*. 2008; 452: b638-b642.
- Testa JR, Pass HI, Carbone M. Molecular biology of mesothelioma. In: DeVita VTJr, Hellman S, Rosenberg SA, eds. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2001: 1937-1943.
- Toh CK. The changing epidemiology of lung cancer. *Methods Mol Biol*. 2009; 472:397-411.
- Tran YK, Newsham IF. High-density marker analysis of 11p15.5 in non-small cell lung carcinomas reveals allelic deletion of one shared and one distinct region when compared to breast carcinomas. *Cancer Res*. 1996; 56 (13): 2916-21.
- Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y, Brambilla E. In collaboration with Sobin LH and pathologists from 14 countries. World Health Organization International Histological Classification of Tumours. Histological Typing of Lung and Pleural Tumours. 3rd ed. Springer-Verlag, 1999.
- Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC, editors. Tumors of the lung. In: *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon, France: IARC Press, 2004.
- Vega LR, Mateyak MK, Zakian VA. Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4 (12): 948-59.
- Viallet J, Sausville EA. Involvement of signal transduction pathways in lung cancer biology. *J Cell Biochem Suppl*. 1996; 24: 228-36.
- Vilchez RA, Kozinetz CA, Arrington AS, Madden CR, Butel JS. Simian virus 40 in human cancers. *Am J Med*. 2003; 114: 675-684.
- Wang Y, Hung SC, Linn JF, et al. Microsatellite-based cancer detection using capillary array electrophoresis and energy-transfer fluorescent primers. *Electrophoresis*. 1997; 18: 1742-1749.
- Warner E, Jotkowitz A, Maimon N. Lung cancer screening - are we there yet? *Eur J Intern Med*. 2010; 21 (1): 6-11.
- Westra WH. Early glandular neoplasia of the lung. *Respir Med*. 2000; 1: 163-69
- Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, Samet JM, Srivastava S, Minna JD, Gazdar AF. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89 (18): 1366-73.
- Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Milchgrub S, Syed S, Lam S, Mackay B, Minna JD, Gazdar AF. Allelic losses at chromosome 8p21-23 are early and frequent events in the pathogenesis of lung cancer. *Cancer Res*. 1999; 59 (8): 1973-9.
- Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW 3rd, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Res*. 2000; 60 (7): 1949-60.
- Wistuba II, Mao L, Gazdar AF. Smoking molecular damage in bronchial epithelium. *Oncogene*. 2002; 21 (48): 7298-306.
- Wistuba II, Gazdar AF. Lung cancer preneoplasia. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006; 1: 331-348.
- Woenckhaus M, Stoehr R, Dietmaier W, et al.: Microsatellite instability at chromosome 8p in non-small cell lung cancer is associated with lymph node metastasis and squamous differentiation. *Int J Oncol*. 2003; 23 (5): 1357-63.
- Wykoff CC, Beasley NJ, Watson PH, Turner KJ, Pastorek J, Sibtain A, Wilson GD, Turley H, Talks KL, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Harris AL. Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Res*. 2000; 60 (24): 7075-83.

- Xinarianos G, Liloglou T, Prime W, Maloney P, Callaghan J, Gosney JR, Field JK. hMLH1 and hMSH2 expression correlates with allelic imbalance on chromosome 3p in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res.* 2000; 60 (15): 4216-21.
- Yim HW, Slebos RJ, Randell SH, Umbach DM, Parsons AM, Rivera MP, Detterbeck FC, Taylor JA. Smoking is associated with increased telomerase activity in short-term cultures of human bronchial epithelial cells. *Cancer Lett.* 2007; 246: 24-33.
- Yokota J, Kohno T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.* 2004; 95: 197-2004.
- Yoshida Y, Shibata T, Kokubu A, Tsuta K, Matsuno Y, Kanai Y, Asamura H, Tsuchiya R, Hirohashi S. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2005; 50: 1-8.
- Zatovicova M, Jelenska L, Hulikova A, Csaderova L, Ditte Z, Ditte P, Goliasova T, Pastorek J, Pastorekova S. Carbonic anhydrase IX as an anticancer therapy target: preclinical evaluation of internalizing monoclonal antibody directed to catalytic domain. *Curr Pharm Des.* 2010; 16 (29): 3255-63.
- Zheng H, McWilliams A, Lam S. Optical spectroscopy and imaging for early lung cancer detection: a review. *Photodiagn Photodyn.* 2004; 1 (2): 111-122.
- Zöchbauer-Müller S, Lam S, Toyooka S, Virmani AK, Toyooka KO, Seidl S, Minna JD, Gazdar AF. Aberrant methylation of multiple genes in the upper aerodigestive tract epithelium of heavy smokers. *Int J Cancer.* 2003; 107: 612-616.
- Zöchbauer-Müller S, Minna JD. The biology of lung cancer including potential clinical applications. *Chest Surg Clin N Am.* 2000; 10: 691-708.

10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAH	atypická adenomatózní hyperplázie
ADP	adenosindifosfát (<i>adenosindiphosphate</i>)
AFB	autofluorescenční bronchoskopie
β2-M	beta2-mikroglobulin
BCL-2	gen kódující rodinu Bcl-2 (<i>B-cell lymphoma 2</i>) proteinů
BER	reparace chybného párování bazí (<i>base excision repair</i>)
Ber-EP4	lidský epiteliální antigen, klon Ber-EP4
CAIX	karboanhydráza IX (<i>carboanhydrase IX</i>)
CDX-2	gen kódující transkripční faktor CDX-2 (<i>caudal type homeobox 2</i>)
CEA	karcinoembryonální antigen (<i>carcinoembryonic antigen</i>)
CIS	karcinom in situ (<i>carcinoma in situ</i>)
CK5/6	cytokeratin 5/6
D2-40	anti-podoplanin = D2-40
DIPNECH	difúzní idiopatická hyperplázie plicních neuroendokrinních buněk (<i>diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia</i>)
DNA/cDNA	deoxyribonukleotidová kyselina (<i>deoxyribonucleic acid</i>)/komplementární DNA k messengerové RNA (<i>complementary DNA</i>)
dNTP	dideoxynukleotidtrifosfát (<i>dideoxynukleotidtriphosphate</i>)
EDTA	kyselina ethylendiaminotetraoctová (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru, též ErbB-1 (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ERBB	geny kódující rodinu ErbB receptorových tyrozinkináz
FEV1	usilovně vydechnutý objem vzduchu během 1. sekundy výdechu (<i>forced expiration volume in the first second of expiration</i>)
FHIT	<i>fragile histidine triad</i>
FN	fakultní nemocnice
HE	hematoxylin – eozin
HER2/neu	receptorová tyrozinkináza z rodiny ErbB proteinů, též ErbB-2
HIF-1α	transkripční faktor indukovaný hypoxií (<i>hypoxia inducible factor 1α</i>)
HBME-1	monoklonální protilátka proti neznámému antigenu na povrchu mezotelií
HPF	zorné pole optického zvětšení, 400x; 0,017 mm ² (<i>high power field</i>)
HR-CT	počítačová tomografie s vysokým rozlišením (<i>high-resolution computed tomography</i>)
HRE	promotor genu aktivovaný za podmínek hypoxie (<i>hypoxia response element</i>)
hTERC	RNA komponenta lidské telomerázy
hTERT	reverzní transkriptáza telomer (<i>human telomerase reverse transcriptase</i>)
CHOPN	chronická obstrukční plicní choroba

IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (<i>International Agency for Research on Cancer</i>)
LF UK	lékařská fakulta Univerzity Karlovy
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
LOH	ztráta heterozygoty (<i>loss of heterozygosity</i>)
MOC-31	epiteliální glykoprotein 2 = epiteliální specifický antigen
MM	maligní mezoteliom
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
NER	nukleotidová excizní reparace (<i>nucleotide excision repair</i>)
NOR	Národní onkologický registr
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (<i>non-small cell lung carcinoma</i>)
p	hodnota významnosti
PCR	polymerázová řetězcová reakce (<i>polymerase chain reaction</i>)
RB1	<i>Retinoblastoma</i> gen, kódující pRb protein
RNA	kyselina ribonukleotidová (<i>ribonucleic acid</i>)
RQ-RT-PCR	reverzní kvantitativní PCR v reálném čase (<i>reverse quantitative real-time PCR</i>)
SCC	dlaždicobuněčný karcinom (<i>squamous cell carcinoma</i>)
SCLC	malobuněčný karcinom (<i>small cell lung carcinoma</i>)
STR	krátké tandemové repetice (<i>single tandem repeats</i>)
SV40	<i>Simian Monkey Virus 40</i>
TP53	tumor supresorový gen TP53, kódující protein p53
TSG	tumor supresorový gen
TTF-1	tyreoidální transkripční faktor-1
VHL	<i>von-Hippel-Lindau</i>
WHO	Světová zdravotnická organizace (<i>World Health Organization</i>)
WLB	bronchoskopie bílým světlem (<i>white light bronchoscopy</i>)
WT-1	<i>Wilm's tumor gene 1</i>

11 SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

11.1 Primární publikace

1. **Capkova L.**, Kalinova M., Krskova L., Kodetova D., Petrik F., Trefny M., Musil J., Kodet R. (2007) Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. *Cancer*. 109 (11): 2299-307. (IF₂₀₀₇ 4.582)
2. Petřík F., Trefný M., Kodetová D., **Čapková L.**, Kalinová M., Krsková L., Musil J. (2007) Detekce morfologických a genetických změn bronchiální sliznice autofluorescenční bronchoskopií u těžkých kuřáků. *Studia pneumologica et phthiseologica: Časopis Slovenskej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti a České pneumologické a ftizeologické společnosti*. 67 (5): 204-209.
3. **Capkova L.**, Koubkova L., Kodet R. (2014) Expression of Carboanhydrase IX (CA IX) in Malignant Mesothelioma. An Immunohistochemical and Immunocytochemical study. *Neoplasma*. 61 (2): 161-169. (IF₂₀₁₂ 1.574)

11.2 Publikovaná abstrakta přednesených sdělení

1. **Tarasová (Čapková) L.**, Forejtová V., Kodet R. Imunohistochemická diagnostika maligního mezoteliomu a adenokarcinomů metastázujících na pleuru. Sborník prací 13. sjezdu českých a slovenských patologů, Rožnov pod Radhoštěm, 14.-16.9. 2005, str. 45.
2. Petřík F., Trefný M., Musil J., Kodetová D., **Čapková L.**, Kalinová M., Krsková L. Detekce preneoplastických změn a bronchogenního karcinomu autofluorescenční bronchoskopií u těžkých kuřáků s ventilační limitací. Sborník prací XIII. kongresu České a Slovenské pneumologické a ftizeologické společnosti. Hradec Králové, 15.-18.6.2006.
3. Petrik F., Trefny M., Kodetova D., **Capkova L.**, Kalinova M., Musil J., Krskova L. Autofluorescence bronchoscopy in heavy smokers with ventilatory limitation. 16th ERS Annual Congress, Munich, Germany, 2.-6.9.2006. *European Respiratory Journal*, 2006; 28 (S50): 793.
4. **Capkova L.**, Kalinova M., Krskova L., Kodetova D., Petrik F., Trefny M., Musil J. Detection of Molecular Changes in Bronchial Mucosa of Heavy Smokers in Correlation with Findings of Autofluorescence Bronchoscopy. Abstracts of the XXVI International Congress of the International Academy of Pathology, Montreal, Canada, 16.-21.9.2006. *Modern Pathology*, 2006; 19 (S3): 164.
5. **Čapková L.**, Kalinová M., Krsková L., Kodetová D., Petřík F., Kodet R. Detekce ztráty heterozygosity (LOH) a exprese katalytické podjednotky lidské telomerázy (hTERT) v bronchiální sliznici těžkých kuřáků. 10. seminář mladých patologů s mezinárodní účastí, Litomyšl, 20.-21.4.2007.
6. **Čapková L.**, Kalinová M., Krsková L., Kodetová D., Petřík F., Kodet R. Detekce ztráty heterozygosity (LOH) a exprese katalytické podjednotky lidské telomerázy (hTERT) v bronchiální sliznici těžkých kuřáků. Vědecká konference 2. lékařské fakulty UK, Praha, 25.-26.4.2007. Sborník abstrakt str. 44.
7. Simsa J., Leffler J., Hoch J., Chmelova R., **Capkova L.** Sentinel node biopsy in gastric cancer using vital blue dye technique. 9th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Spain, 28.6.-1.7.2007. *Annals of Oncology*, 2007; 18 (S7): VII98.

8. Mejstříková E., Sumerauer D., Seeman T., Froňková E., Zemanová Z., Lizcová L., Sedláček P., Smíšek P., Mužíková K., Pospíšilová K., Hubáček P., Trka J., Janda A., Kodet R., **Čapkova L.**, Starý J., Kabičková E., Hrušák O. TCR gama/delta pozitivní T lymfoproliferace v předchorobí fatálně probíhajícího hepatosplenického lymfomu u 16leté pacientky po transplantaci ledviny; XXIII. Olomoucké hematologické dny s mezinárodní účastí, XIII. Konference ošetrovatelských profesí v hematologii, XII. Konference zdravotních laborantů v hematologii, 2nd Symposium on Advances in Molecular Hematology, Olomouc, 24.-26.6.2009. *Transfuze a hematologie dnes*, 2009; 15 (S1): 62.
9. Hubacek P., Hrdlickova A., Mejsrikova E., Kabickova E., **Capkova L.**, Keslova P., Formankova R., Markova M., Cetkovsky P., Sedlacek P. Normalised EBV quantity in patients after allogenic haematopoietic stem cell transplantation – Benign reactivation, localised and generalised EBV lymphoproliferative disease. 35th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Göteborg, Sweden, 29.3.-1.4.2009
10. **Capkova L.**, Koubkova L., Kodet R. Expression of Carboanhydrase IX in Malignant Mesothelioma. Abstracts of the European Congress of Pathology, Prague, Czech Republic, 8.-12.9.2012. *Virchows Archiv*, 2012; 461 (Suppl. 1): 62.
11. **Capkova L.**, Koubkova L., Kodet R. Expression of Carboanhydrase IX (CA IX) in Malignant Mesothelioma: An Immunohistochemical and Immunocytochemical study. Vědecká konference 2. lékařské fakulty UK, Praha, 24.-25.4.2013. Sborník abstrakt s. 88.

12 PŘÍLOHY

- Příloha A** Capkova L., Kalinova M., Krskova L., Kodetova D., Petrik F., Trefny M., Musil J., Kodet R. (2007) Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. **Cancer**. 109 (11): 2299-307.
IF₂₀₀₇ 4.582
- Příloha B** Petřík F., Trefný M., Kodetová D., Čapková L., Kalinová M., Krsková L., Musil J. (2007) Detekce morfologických a genetických změn bronchiální sliznice autofluorescenční bronchoskopií u těžkých kuřáků. **Studia pneumologica et phthiseologica: Časopis Slovenskej pneumologickej a ftiseologickej spoločnosti a České pneumologické a ftizeologické společnosti**. 67 (5): 204-209.
- Příloha C** Capkova L., Koubkova L., Kodet R. (2014) Expression of Carboanhydrase IX (CA IX) in Malignant Mesothelioma. An Immunohistochemical and Immunocytochemical study. **Neoplasma**. 61 (2): 161-169.
IF₂₀₁₂ 1.574

Příloha A

Capkova L., Kalinova M., Krskova L., Kodetova D., Petrik F., Trefny M., Musil J., Kodet R. (2007) Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. **Cancer**. 109 (11): 2299-307.

IF₂₀₀₇ 4.582

Příloha B

Petřík F., Trefný M., Kodetová D., Čapková L., Kalinová M., Krsková L., Musil J. (2007) Detekce morfologických a genetických změn bronchiální sliznice autofluorescenční bronchoskopií u těžkých kuřáků. ***Studia pneumologica et phthiseologica***: Časopis Slovenskej pneumologickej a ftizeologickej spoločnosti a České pneumologické a ftizeologické společnosti. 67 (5): 204-209.

Příloha C

Capkova L., Koubkova L., Kodet R. (2014) Expression of Carboanhydrase IX (CA IX) in Malignant Mesothelioma. An Immunohistochemical and Immunocytochemical study. ***Neoplasma***. 61 (2): 161-169.

IF₂₀₁₂ 1.574