

V Brně 3. května 2014

OPONENTSKÝ POSUDEK DOKTORANDSKÉ DISERTAČNÍ PRÁCE
Histopatologická a molekulární diagnostika nádorů plic a pleury**Autor disertace:** MUDr. Linda Čapková
Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK**Oponentka:** Prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc.
Klinika nemocí plicních a tuberkulózy LF MU a FN Brno

Oponovaná práce je závěrem doktorského studia MUDr. Lindy Čapkové. Byla vypracovaná v rámci postgraduálního studia na 2. lékařské fakultě, Univerzita Karlovy v Praze, pod vedením Prof. MUDr. Romana Kodeta, CSc.

V první části práce se autorka zabývala studiem vybraných molekulárně genetických změn v bronchiálním epitelu kuřáků, které by mohly předcházet fenotypickým změnám detekovatelným na úrovni mikroskopického vyšetření. Dále se zabývala analýzou prekancerózních lézí dlaždicobuněčného karcinomu plic na úrovni genotypu a fenotypu. Také zkoumala přínos odběrů při autofluorescenční bronchoskopii v diagnostice prekancerózy a časných stadií karcinomu plic. K histologickému vyšetření bylo odebráno 474 vzorků tkáně. Vzorky byly odebrány v rámci kombinovaného vyšetření pomocí konvenční bronchoskopie v bílém světle a pomocí autofluorescenční bronchoskopie. Autorka se zaměřila na skupinu těžkých kuřáků. Bioptické vzorky byly odebrány z míst, kde byl jedním nebo oběma vyšetřeními zjištěn nálezní suspektní z patologie. Dále byla provedena kontrolní biopsie z jedné či dvou oblastí bronchoskopicky normální sliznice při obou bronchoskopických metodách. Z každého místa byly odebrány dva vzorky – jeden na histologické a jeden na molekulárně genetické vyšetření. Z bioptických vzorků bylo hodnotitelných 398 (84 %). 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. Autorka stanovila senzitivitu a specifitu bronchoskopie v bílém světle a autofluorescenci na základě korelace s histologickými nálezy. Statisticky významný rozdíl byl nalezen ve specifitě bronchoskopie v bílém světle a autofluorescenci ($p < 0,05$).

Součástí této části práce byla molekulárně genetická studie, ve které bylo zhodnoceno 122 bronchiálních biopsií. 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 %) byl diagnostikován invazivní dlaždicobuněčný karcinom. Autorka studovala vztah mezi přítomností histologických změn a detekcí ztráty heterozygotiky (LOH loss of heterozygosity). Celkově byla detekována LOH v jednom či více lokusech ve 41,8 % (51 ze 122) vzorků tkáně. 24,6 % (30 ze 122) vykazovalo LOH v jednom z analyzovaných lokusů, 8,2 % (10 ze 122) ve dvou a 9 % (11 ze 122) ve

třech nebo více lokusech. Nejčastěji byly tyto genetické změny detekovány v jednom či více lokusech z oblasti 9. chromozomu, s maximem změn v oblasti 9p21 značené D9S156.

Dále autorka studovala vztah mezi přítomností histologických změn a expresí hTERT (reverzní transkriptáza telomer - human telomerase reverse transcriptase) mRNA. Celkově byla exprese hTERT mRNA stanovena u 87 bronchiálních biopsií, u nichž byla k dispozici jak DNA, tak RNA. Za pozitivní histologický nález autorka považovala biopsii s nálezem střední či těžké dysplázie a karcinomu, 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). Výsledky byly hodnoceny jako statisticky významné. Dále autorka porovnávala ve všech vzorcích, u nichž byla k molekulární analýze k dispozici jak DNA tak i RNA počet LOH s relativní expresí hTERT mRNA. Z této části práce vyplývá, 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, ale celkový rozdíl hladiny exprese mezi jednotlivými kategoriemi podle výskytu LOH byl statisticky signifikantní na nízké hladině významu ($p=0,013$). Pro zjištění závislosti vzniku studovaných genetických změn na době trvání kouření autorka porovnávala počet lokusů s LOH v odebrané tkáni s kumulativní dávkou vykouřených cigaret, výsledky nebyly statisticky signifikantní ($p=0,1847$). Dále zjišťovala závislost hTERT_N na expozici cigaretovému kouři, ale ani zde nebyl prokázán statisticky významný výsledek ($p=0,8597$). Autorka dále zjišťovala vztah mezi přítomností molekulárních změn a autofluorescenčním obrazem. Molekulárně geneticky bylo vyšetřeno 97 vzorků z míst s negativní histologií, 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). Ve skupině AFB pozitivních byla zjištěna 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 ($p=0,023$). Dále byla zjištěna statisticky významně vyšší četnost exprese hTERT mRNA ($p=0,0003$).

Tuto část práce lze hodnotit tak, že autorka prokázala vztah mezi molekulárními změnami v oblastech tzv. „*mismatch repair genu*“ a regulátorů buněčného cyklu a expresí mRNA katalytické podjednotky telomerázy. Také poukázala na vztah mezi těmito molekulárními změnami a histologickým obrazem v bronchiální sliznici. Autorka dospěla k závěru, že u dlaždicobuněčného karcinomu korespondují morfologické změny se změnami na genetické úrovni a již morfologicky normální či minimálně alterovaná bronchiální sliznice silných kuřáků může skrývat popsané genetické odchylky. Dále prokázala, že změny exprese hTERT mRNA v korelaci s výskytem LOH v bronchiální sliznici těžkých kuřáků a naznačují, že její zvýšení může být jedním z prvních kroků v procesu karcinogeneze dlaždicobuněčného karcinomu plic a že tento děj nabývá v pozdních fázích vývoje na intenzitě.

K této části práce mám následující připomínku a dotazy. Je si autorka jistá, že vzorky vyšetřené histologicky a molekulárně geneticky byly opravdu identické, když na každé vyšetření byl odeslán jiný vzorek, i když ze „stejného“ místa? Kolikrát byl nález v bílém světle makroskopicky negativní a v autofluorescenci pozitivní a naopak?

Ve druhé části práce si dala autorka za cíl zpřesnění diagnostiky maligního mezoteliomu (zejména v diferenciatně diagnosticky obtížných případech). Dále se rozhodla posoudit význam protilátky proti karboanhydráze IX (CAIX) v diagnostice tohoto typu nádoru. Za účelem zpřesnění diagnostiky a definování imunohistochemického diagnostického panelu byl vyšetřen soubor 59 pacientů (33 mužů, 26 žen) s diagnózou maligního mezoteliomu 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.

Autorka stanovila ze širokého spektra imunohistochemických markerů pro odlišení maligního mezoteliomu a plicního adenokarcinomu na základě senzitivity a specificity panel kombinující tzv. pozitivní markery (calretinin a D2-40) s tzv. markery negativními (MOC-31, TTF-1). Dále popsala imunohistochemickou expresi proteinu karboanhydrázy IX (CAIX), kterou zaznamenala ve všech vyšetřovaných případech maligního mezoteliomu a i v normálních a aktivovaných mezoteliích i v řadě metastatických karcinomů. Výsledky interpretuje tak, že nelze použít CAIX jako spolehlivý diagnostický marker pro maligní mezoteliom a ani jako marker malignity v pleurálních výpotcích.

Vzhledem k tomu že maligní mezoteliom představuje nejčastější primární malignitou pleury a jeho diagnostika je obtížná a velmi často je obtížné odlišení od metastazujícího či na pleuru prorůstajícího adenokarcinomu plic, domnívám se, že každé poznání, které upřesňuje diagnostiku, má velký význam. K této části práce otázku nemám.

Všechny v dizertační práci použité vyšetřovací metody a zvolené statistické metody považuji za správné vzhledem k řešené problematice. Práci velmi obohatilo dostatečné množství tabulek, obrázků a velmi názorných grafů. Práce splnila cíl. Autorka prokázala, že je zdatná ve spolupráci s kliniky a také při výzkumné práci. Způsob zpracování tématu svědčí o tom, že autorka má velmi hluboké teoretické i praktické znalosti v diagnostice a diferenciální diagnostice plicních onemocnění. Výzkum byl velmi dobře zorganizován. Pozitivně hodnotím intenzivní mezioborovou spolupráci. Autorka dokázala výsledky výzkumu objektivně vyhodnotit. Jazyková úroveň je velmi dobrá. Práce je napsána srozumitelně i pro klinického lékaře. Přílohou práce je i seznam publikovaných prací autorky souvisejících s tématem, který dokumentuje dlouhodobou práci a odpovídá požadavkům na publikace v průběhu postgraduálního studia.

Práce i předložený seznam publikací jednoznačně vyhovují předpisům pro disertační práce a postgraduální studium. Navrhuji tuto práci přijmout k obhajobě a v případě úspěšné obhajoby udělit MUDr. Lindě Čapkové akademický titul doktor ve zkratce Ph.D. dle paragrafu 47 Zákona o vysokých školách č. 111/98 Sb.

Prof. MUDr. Jana Skříčková, CSc.