

Onkologie

Suppl. B
2011

www.solen.cz

ISSN 1802-4475

ROČNÍK 5.

SBORNÍK ABSTRAKT

**VII. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ
A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE**

XIX. SJEZD ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH PATOLOGŮ

XCVII. DIAGNOSTICKÝ SEMINÁŘ ČESKÉ DIVIZE IAP

XIX. SJEZD ČESKÉ SPOLEČNOSTI HISTOLOGICKÝCH LABORANTŮ

9.– 11. listopadu 2011, Olomouc / Regionální centrum Olomouc



Ni-E

Advanced research microscope

Expandability



- Upright microscope based on world-renowned Eclipse Ti concept
- Full motorisation of stage, condenser, focus, magnification and illumination
- Multi-mode offers extendable infinity space for upgrade to confocal and multi-photon
- Total programmable control via NIS-Elements
- Choice of three "stackable" turrets for fluorescence-manual, intelligent and motorised
- Fixed platform option for in-vivo imaging
- World-class CFI60 nano crystal coat, lambda and 25x water immersion objectives

See the evolution

www.nikoninstruments.com

POŘADATELÉ

Sekce diagnostické a prediktivní onkologie České onkologické společnosti ČLS JEP
Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc,
Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc,
Česká společnost patologů ČLS JEP,
Slovenská společnost patológov SLS,
Oddělení patologie Slezské nemocnice Opava,
Nadace pro výzkum rakoviny – Rakovina věc veřejná,
společnost Solen

KOORDINÁTOŘI AKCE

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D. – Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc
prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D. – Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FNOL
prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc. – Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FNOL
Danuše Kvapilová – Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FNOL
MUDr. Josef Palas – Oddělení patologie, Slezská nemocnice v Opavě

ZÁŠTITA

rektor UP prof. RNDr. Miroslav Mašláň, CSc.
děkan LF UP prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.
ředitel FN Olomouc MUDr. Radomír Maráček

ORGANIZÁTOR

SOLEN, s.r.o.

Lazecká 297/51, 779 00 Olomouc

kontaktní osoba:

Ing. Veronika Ješátková

tel.: 582 396 038

mob.: 777 557 415

e-mail: jesatkova@solen.cz

Olomouc 9.–11. 11. 2011
REGIONÁLNÍ CENTRUM OLOMOUC

Účast je v rámci celoživotního postgraduálního vzdělávání dle Stavovského předpisu č. 16 ČLK ohodnocena 16 kredity pro lékaře a 12 kredity pro sestry, zdravotní laboranty a vysokoškolsky vzdělaný nelékařský personál.

Supplementum B časopisu Onkologie
Evidence MK ČR pod číslem 17305

Citační zkratka: Onkologie; 5(Suppl. B). ISSN 1802-4475

Grafické zpracování a sazba: Jan Sedláček, www.sedlacech.cz, tel.: +420 724 984 451

Časopis je indexován v Bibliographia Medica Českoslovac, EMBASE, Scopus
a v Seznamu recenzovaných neimpaktovaných periodik vydávaných v ČR.

STŘEDA 9. LISTOPADU

od 14.00

Registrace

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS

15.00–17.45 BIOMARKERY V DIAGNOSTICE I / Předsedající: Z. Kolář, J. Ehrmann (**Přednášková sekce v rámci grantu OPVK MOLONKOL**) / strana B10–B13

- **Sphingosine 1-phosphate: a potential biomarker and therapeutic target in prostate cancer** – O. Cuvillier (Toulouse)
- **Molekulární diagnostika změn ALK genu u různých typů onemocnění dětí i dospělých** – M. Mrhalová, M. Kalinová, R. Kodet (Praha)
- **Immunohistochemical co-expression of CD124, TGF- β , PAR-2, TSLP and YY1 in routine endobronchial symplex: Differences between COPD and bronchial asthma patients** – R. Matěj, M. Vašáková, M. Šterclová, J. Kukul, T. Olejář (Praha)
- **Úloha SDF-1, CXCR4 a HGF v maligní transformaci epitelu střeva** – S. Brychtová, M. Bezděková, E. Sedláková, M. Geierová, S. Brychtová, jr., V. Dvořáková (Olomouc)
- **Novel combination of urine biomarkers for early detection of prostate cancer** – T. Jamsaspishvili, M. Král, I. Khomeriki, V. Vyháňková, G. Mgebrishvili, V. Študent, Z. Kolář, J. Bouchal (Olomouc)
- **Korelácia DNA analýzy a expresie vybraných proteínov pri hydatidóznnej mole** – Z. Čierna, M. Palkovič, L. Danihel, L. Donárová, V. Repiská (Bratislava)
- **Apoptosis associated genes and their role in predicting clinical outcome of neoadjuvant breast cancer treatment** – D. Tvrdlík, H. Skálová, P. Dundr, C. Povýšil, Z. Velenská, A. Berková, L. Staněk, L. Petrželka (Praha)
- **Barrett's oesophagus and telomerase activity** – I. Ůberall, J. Vaníčková, J. Srovnal, J. Gregar, J. Ehrmann (Olomouc)
- **Sledování exprese miR-21, miR-126 a miR-205 u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic** – V. Žižková (Olomouc)



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie
reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL CENTAURUS (1. POSCHODÍ)

15.30–17.30 NOVÁ A POTENCIÁLNÍ NÁDOROVÁ LÉČIVA I / Předsedající: M. Hajdúch, P. Džubák / strana B14–B17

- **Chyby a úskalí v hodnocení léčby glioblastomů** – O. Kalita, M. Vaverka, L. Hrabálek, M. Zlevorová, R. Trojanec, M. Hajdúch, J. Drábek, J. Ehrmann, jr., M. Houdek (Olomouc)
- **Proteomika v odhadu rizika recidivy a metastazování karcinomu prsu – možné využití v prognostice onemocnění** – M. Sochor, P. Tesařová, L. Petruželka, I. Janatková (Praha)
- **Proteomické profilování platinových léčiv** – T. Oždian, D. Holub, P. Džubák, G. Rylová, M. Kollaredy, J. Řehulka, R. Čábelka, D. Cahová, V. Havlíček, M. Hajdúch (Olomouc)
- **Molecular targets and biological activity of quinolinone derivatives with anticancer effect** – G. Rylová, P. Džubák, M. Špenerová, A. Janošťáková, I. Frydrych, P. Konečný, D. Holub, T. Oždian, D. Doležal, M. Sural, J. Hlaváč, M. Hajdúch
- **Prodrug formy triterpenů s protinádorovou aktivitou** – P. Džubák, H. Vágnerová, I. Frydrych, P. Konečný, J. Řehulka, A. Janošťáková, A. Gandaláková, M. Hajdúch (Olomouc)
- **Profilování 2-fenylsubstituovaných-3-hydroxychinolin-4(1H)-one-karboxamidů a jejich protinádorových účinků metodou průtokové cytometrie** – P. Konečný, P. Džubák, M. Sural, J. Hlaváč, I. Frydrych, G. Rylová, P. Kocis, M. Hajdúch (Olomouc)
- **Selekce účinných 4-chinolonů s protinádorovou aktivitou a studium mechanismu jejich účinku** – J. Řehulka, P. Džubák, I. Frydrych, P. Krejčí, M. Sural, M. Hajdúch (Olomouc)

18.30–20.00 Zahajovací koncert a welcome banquet (Kaple Božího těla, Konvikt UP)

20.00–21.00 Schůze výborů odborných společností (Café Restaurant Konvikt)

ČTVRTEK 10. LISTOPADU

od 8.30

Registrace

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS

9.00–10.00 SLAVNOSTNÍ ZAHÁJENÍ S PŘEDÁNÍM OCENĚNÍ
/ Předsedající: V. Mandys, L. Plank, M. Ondráková, M. Hajdúch, Z. Kolář, J. Ehrmann, čestní hosté

10.00–11.30 DIAGNOSTIKA NÁDORŮ, KLINICKO-PATOLOGICKÉ KORELACE I / Předsedající: R. Kodet, M. Hermanová / strana B18–B19

- **High grade serous carcinoma of the ovary** – R. Soslow (New York)

- **Multiplicitní sarkomy u nemocného se syndromem Li-Fraumeni** – R. Kodet, M. Frantlová, L. Hornofová, M. Kalinová, M. Mrhalová, P. Škapa, R. Paděra, J. Kozák, A. Puchmajerová, A. Křepelová (Praha)
- **Expresní analýza genů zapojených v patogenezi rabdomyosarkomů (RMS) a jejich využití pro sledování minimální diseminované nemoci** – L. Krsková, M. Kalinová, M. Mrhalová, I. Hilská, P. Šrahůlková, E. Langerová, R. Kodet (Praha)
- **Klinicko-patologické aspekty exprese nestinu v high-grade osteosarkomech** – I. Zambo, M. Hermanová, D. Adámková, P. Múdry, K. Zitterbart, M. Kýr, K. Veselý, J. Štěřba, R. Veselská (Brno)
- **Statistika vrozených vývojových vad** – F. Fakhouri, J. Dvořáčková, R. Tomanová, P. Buzrla (Ostrava)

11.30–11.45 Přestávka s občerstvením

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL CENTAURUS (1. POSCHODÍ)

10.30–12.00 RNA JAKO BIOMARKER / Předsedající: J. Drábek, O. Slabý / strana B20–B22

- **Nekódující RNA u nádorových onemocnění** – O. Slabý, J. Šána, M. Svoboda, R. Vyzula (Brno)
- **Možnosti detekce cirkulujících nádorových buněk** – A. Benedíková, J. Srovnal, M. Hajdúch (Olomouc)
- **Studium mikroRNA u pacientů s kolorektálním karcinomem: identifikace biomarkerů a nových terapeutických cílů** – P. Faltejsková, K. Šrůtová, J. Mlčochová, M. Svoboda, L. Radová, R. Němeček, A. Bešše, R. Vyzula, O. Slabý (Brno)
- **Využití DNA microarrays v predikci odpovědi na glukokortikoidní terapii u pacientů s ALL** – J. Srovnal, M. Špenerová, D. Pospíšilová, Z. Novák, V. Koudeláková, M. Sedláčková, L. Radová, M. Hajdúch, J. Starý, B. Blažek, J. Hak, Z. Černá, P. Timr, E. Kaiserová, E. Bubanská, V. Mihál (Olomouc)

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL PERSEUS (1. POSCHODÍ)

10.30–12.00 HISTOLOGICKÁ TECHNIKA A METODOLOGIE I / ČSHL / Předsedající: D. Kvapilová, M. Ondráková, D. Indrová / strana B33

- **Faktory ovlivňující výsledek imunohistochemické reakce** – Z. Manhartová, M. Plašilová (Praha)
- **Sentinelová uzlina** – D. Kvapilová, M. Petrová, I. Šmídová (Olomouc)
- **Vyšetření kůže transmisí elektronovou mikroskopií** – A. Esterková (Brno)
- **Postup při zhotovení velkoplošného histotopogramu** – M. Hakenová, J. Křížová, B. Veselá (Praha)
- **Laboratorní zpracování GIT z endoskopického vyšetření** – P. Krystková, V. Zvonařová (Brno)

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS

11.45–13.00 GIST – OD MOLEKUL K PACIENTOVI / Předsedající: B. Melichar, J. Škarda / strana B22–B23

- **Contemporary GIST Pathology** – B. Liegl-Atzwanger (Graz)
- **Medical therapy of gastrointestinal stromal tumors** – B. Melichar (Olomouc)
- **Mutační analýza pacientů s GIST** – M. Janíková (Olomouc)

13.00–14.00 Oběd

14.00–14.30 PŘEDNÁŠKA VĚNOVANÁ R. KOĐOUSKOVI / Předsedající: L. Plank, Z. Kolář / strana B23

- **The future of pathology in personalized health care** – M. Padilla (Barcelona)

14.30–16.10 DIAGNOSTIKA NÁDORŮ, KLINICKO-PATOLOGICKÉ KORELACE II / Předsedající: L. Plank, M. Tichý / strana B24–B26

- **Deciphering tumor suppressive and tumor promoting function of NFκB** – E. Pikarsky (Jerusalem)
- **Význam a limity vyšetření nádorové infiltrace v stagingových biopsiích kostnej drene pri difúznom veľkobunkovom B-lymfóme** – T. Balhárek, B. Beblavá, P. Szépe, J. Marcinek, Z. Kviatkovská, L. Plank (Martin)
- **Současná léčba mění obraz nehodgkinových B lymfomů v biopsiích kostní dřeni** – J. Strítěský, Z. Velenská, J. Špačková (Praha)
- **Molekulární diagnostika pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem ALK pozitivním** – M. Kalinová, I. Hilská, M. Mrhalová, R. Kodet (Praha)
- **Prognostic factors in multiple myeloma** – J. Marečková, J. Ehrmann, V. Ščudla, P. Abrahamová (Olomouc)
- **Firemní symposium ROCHE: cobas® Onkologické prediktivní testy** – I. Blanárik

16.10–16.25 Přestávka s občerstvením

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL CENTAURUS (1. POSCHODÍ)

15.00–17.00 BIOMARKERY V DIAGNOSTICE II. / Předsedající: J. Srovnal, K. Bouchalová / B27–B32

- **Identifikace molekulárně genetických změn spojených s relapsem u glioblastoma multiforme** – M. Knebllová, V. Koudeláková, R. Trojanec, O. Kalita, D. Cahová, L. Radová, B. Braunerová, S. Mlčochová, M. Hajdúch (Olomouc)
- **Expres miR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 a metylační status MGMT promotoru koreluje s klinickou odpovědí u pacientů s multifórním glioblastomem** – J. Šána, S. Hankeová, R. Lakomý, E. Lžičarová, I. Křen, P. Fadrus, M. Smrčka, R. Vyzula, O. Slabý (Brno)
- **Detekce metylace v promotoru genů MLH1 a MLH3 metodou high resolution melting (HRM)** – P. Procházka, N. Stojceva, J. Slyšková, V. Poláková, P. Vodička (Praha)
- **ALK rearrangement u nemalobuněčného karcinomu plic – první zkušenosti** – V. Koudeláková, M. Knebllová, R. Trojanec, Z. Kolář, V. Kolek, S. Mlčochová, M. Hajdúch (Olomouc)

- **Vliv mutací PIK3CA na přežití pacientek s karcinomem prsu** – M. Čížková, A. Susini, S. Vacher, G. Cizeron-Clairac, C. Andrieu, K. Driouch, E. Fourme, R. Lidereau, I. Bièche (Olomouc)
- **The influence of factors associated with primary ovarian cancer and its treatment on disease-free and overall survival** – V. M. Matějka, J. Fínek, T. Svoboda, L. Holubec, S. Kormunda, O. Topolčan (Plzeň)
- **Triple negative breast carcinoma (TNBC) – challenge for translational oncology: our results of chromosome 17 and BCL2 protein assessment** – K. Bouchalová, M. Čížková, R. Trojanec, V. Koudeláková, S. Mlčochová, L. Radová, B. Melichar, K. Cwiertka, G. Kharashvili, Z. Kolář, M. Hajdúch

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL PERSEUS (1. POSCHODÍ)

15.00–16.30 HISTOLOGICKÁ TECHNIKA A METODOLOGIE II / ČSHL / Předsedající: D. Kvapilová, M. Ondráková, D. Indrová / strana B33

- **Trepanobiopsie** – K. Sedláčková, M. Bártová (Olomouc)
- **Rutinní zpracování tvrdých tkání – jak na kost** – V. Musilová (Brno)
- **Informace z ČSHL a ČAZL** – M. Ondráková (Brno)
- **Hospodaření ČSHL** – V. Musilová (Brno)
- **Představení nové řady kryostatů Thermo NX a nových kazet SecureSette** – L. Kordík

PARALELNÍ PROGRAM: SALONEK ANDROMEDA (1. POSCHODÍ)

15.00–16.00 POSTERY – DISKUZE S AUTORY U POSTERŮ / Předsedající: J. Dvořáčková, J. Drábek / strana B40

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS

16.25–18.10 KLINICKÁ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE / Předsedající: C. Povýšil, Š. Galbavý, A. Böör / strana B34–B36

- **The application of next generation microdissection to the molecular analysis of cells isolated from complex tissues** – P. Murray (Birmingham)
- **Histopatologické porovnání dvou různých nosičů autologních chondrocytů a výsledků jejich transplantace do kloubních defektů u lidí** – C. Povýšil, A. Podškubka, M. Handl (Praha)
- **Rizikové faktory operační léčby úrazů z pohledu morfológa** – Š. Galbavý, J. Paukovic, J. Šidlo (Bratislava)
- **K otázkám kancerogenezy formaldehydu** – A. Böör, J. Kuchár (Košice)
- **Vplyv cievneho zásobenia, hypoxie a ich vzájomného vzťahu na biologické správanie sa medulárneho karcinómu štítnej žľazy** – L. Feketeová, M. Ondříková, P. Janega, F. Gabalec, A. Ryška, S. Pastoreková, M. Babál (Hradec Králové, Bratislava)
- **Vplyv frakcionovaných dávkov ionizujúceho žiarenia na zmeny neurogenézy v mozgu za experimentálnych podmienok** – S. Báľentová, E. Hajtmanová, I. Kinclová, J. Lehotský, D. Dobrota, M. Adamkov (Martin)

18.30–18.45 Odjezd do místa konání společenského večera

19.00–24.00 Společenský večer (pevnost Fort Křelov)

PÁTEK 11. LISTOPADU

od 8.00 Registrace

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS

9.00–11.00 VARIA / Předsedající: V. Mandys, I. Šteiner / strana B36–B38

- **Přínosy nové (2010) WHO klasifikace gastroenteropankreatických neuroendokrinních nádorů** – V. Mandys (Praha)
- **Kalcifikovaná aortální stenóza – zánětlivé onemocnění** – I. Šteiner, L. Krbal, L. Laco, T. Rozkoš (Hradec Králové)
- **Nonparazitárne a nenádorové ochorenia GITu s výrazným zastúpením eozinofilných leukocytov** – A. Böör, K. Dudriková, L. Babjaková, I. Jurkovič, P. Kočan (Košice)
- **Cystitis papillaris imitující uroteliální tumor nízkého maligního potenciálu** – J. Dušková, R. J. Bennett (Praha)
- **Maligní PECom mediastina** – T. Tichý, P. Buzrla, J. Dvořáčková, M. Mitták (Olomouc, Ostrava)

11.00–11.30 Přestávka s občerstvením

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL ANDROMEDA (1. POSCHODÍ)

11.30–13.30 DIAGNOSTICKÝ SEMINÁŘ IAP / Předsedající: J. Ehrmann, P. Szépe

- **Případ č. 1** – A. Böör, K. Dudriková, L. Babjaková, E. Štammová, A. Mikuláková, J. Belák (Košice)
- **Případ č. 2** – P. Szépe, A. Skálová (Martin, Plzeň)
- **Případ č. 3** – P. Dundr, C. Povýšil, R. Jakša (Praha)
- **Případ č. 4** – P. Mačoková, R. Kodet (Praha)
- **Případ č. 5** – K. Kamarádová (Praha)
- **Případ č. 6** – J. Laco, A. Ryška, P. Vítková (Hradec Králové)
- **Případ č. 7** – I. Zambo (Brno)
- **Případ č. 8** – P. Buzrla, P. Delongová, J. Dvořáčková (Ostrava)
- **Případ č. 9** – G. Černá, V. Kinčková (Opava)
- **Případ č. 10** – P. Látalová, P. Flodr (Olomouc)
- **Případ č. 11** – Z. Prouzová, M. Dušková (Olomouc)

Abstrakta k diagnostickému semináři obdrží účastníci v samostatném tiskovém materiálu.

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL ANDROMEDA (1. POSCHODÍ)

13.00–13.15 Ukončení sjezdu

POSTEROVÁ SEKCE /STRANA B40

SALONEK ANDROMEDA (1. POSCHODÍ)

1. **Ultrastrukturální obraz nádoru pankreatu** – R. Novotný, J. Ehrmann, I. Tozzi, R. Havlík, J. Kysučan, M. Loveček (Olomouc)
2. **Význam a možnosti detekce zlomu genu ALK u nemocných s karcinomem plic** – L. Staněk, A. Berková, D. Tvrdík, S. Lísová, J. Dušková, M. Ludvíková, C. Povýšil (Praha)
3. **Význam molekulární a cytogenetické diagnostiky transformace folikulárního lymfomu do DLBCL** – L. Staněk, R. Jakša, Z. Velenská, A. Berková, D. Tvrdík, S. Lísová, C. Povýšil (Praha)
4. **Možnosti ve sledování mutací genů signálních drah u pacientů s NSCLC pro indikaci inhibitorů tyrozinkinázy** – L. Staněk, D. Tvrdík, S. Lísová, I. Vítková, M. Ludvíková, C. Povýšil (Praha)
5. **Problematické diagnózy při endoskopické ultrasonograficky navigované tenkojehlové aspirační biopsii pankreatu (EUS-FNA)** – J. Šustíková, J. Dvořáčková, M. Uvírová, V. Židlík, P. Dopitová, D. Žiak (Ostrava)
6. **Benigní smíšený duktuloinzulární tumor pankreatu** – D. Kurfürstová, J. Janková, M. Tichý (Olomouc)
7. **Výsledky retestování HER2 u karcinomu prsu různými metodami na Ústavu patologie 1. LF UK a VFN v Praze** – Z. Velenská, J. Galko, C. Povýšil, D. Tvrdík (Praha)
8. **Nestin and collagen triple helix repeat containing 1 in triple negative breast cancer** – G. Kharashvili, D. Šimková, M. Čížková, K. Bouchalová, G. Mgebrishvili, Z. Kolář, J. Bouchal (Olomouc)
9. **The role of NFκB signaling pathway – potential prognostic and predictive factor in diffuse large B-cell lymphoma** – P. Flodr, Z. Kubová, T. Papajík, M. Tichý, E. Sedláková, M. Šváchová (Olomouc)
10. **Naše první zkušenosti se zavedením needle core biopsie tumoru ledvin ve FNO** – J. Dvořáčková, P. Buzrla, R. Tomanová, I. Zavacká, M. Uvírová, M. Fabišovský (Ostrava)
11. **Přítomnost klonálních buněk v nenádorové lymfadenopatii s folikulární hyperplazií** – J. Soukup, V. Campr, R. Kodet, M. Mrhalová, M. Kalinová, E. Mejstříková (Praha)
12. **Molekulárně genetická vyšetření u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC)** – J. Šimová, D. Konvalinka, B. Kubová, I. Urbanovská, M. Jalůvková, M. Uvírová, J. Žmolíková, I. Žebráková, J. Dvořáčková (Ostrava)
13. **Progesteronový receptor v normálním endometriu a v I. a II. type karcinomu endometria** – V. Šišovský, M. Palkovič, J. Porubský, L. Danihel (Bratislava)
14. **Cytometrická analýza obsahu DNA, status hormonálních receptorů a exprese HER2 v karcinomu prsníka** – M. Vallová, P. Kuliffay, Š. Galbavý (Bratislava)
15. **The relationship of IL-4 cytokine gene polymorphisms, HRCT score and histopathological score in patients with idiopathic pulmonary fibrosis** – M. Vašáková, M. Šterclová, T. Olejář, J. Kolesář, J. Skibová, R. Matěj (Praha)
16. **Analysis of HGG-02 cell line with loss of EGFR gene copy derived from childhood glioblastoma multiforme** – J. Škoda, J. Neradil, T. Loja, K. Zitterbart, Z. Pavelka, E. Brichtová, J. Šmardová, I. Valášková, M. Hermanová, J. Štěrba, R. Veselská (Brno)
17. **Analýza pacientů s pokročilým NSCLC s dlouhotrvajícím přežitím bez progresu při léčbě EGFR tyrozinkinázovými inhibitory** – O. Fiala, M. Pešek, F. Brůha, M. Minárik (Plzeň)
18. **Changes in gene expression in neuroblastoma and medulloblastoma cell lines during induced differentiation by combined treatment with all-trans retinoic acid and LOX/COX inhibitors** – P. Chlápek, M. Rádová, J. Neradil, K. Zitterbart, M. Hermanová, J. Štěrba, R. Veselská (Brno)
19. **Barevné značení resekčních linií** – M. Fabiánová, K. Kropáčková, L. Píšová, R. Stonišová (Ostrava)
20. **Klinicko-patologické korelace exprese nestinu ve tkáni duktálního adenokarcinomu pankreatu včetně analýzy perineurálního šíření** – J. Lenz, P. Karásek, J. Jarkovský, K. Mučková, P. Dítě, Z. Kala, R. Veselská, M. Hermanová (Brno)

21. **Interactions of platinum (II) complexes containing substituted 6-benzylaminopurines as ligands with microsomal cytochromes P450** – V. Mašek, M. Harvanová, M. Michalová, Z. Matušková, E. Anzenbacherová, P. Anzenbacher
22. **Studium účinku derivátů odvozených od cholestanu na prsní nádorové buněčné linie** – J. Steigerová, K. Křížová, L. Rárová, J. Oklešťková, M. Šváchová, Z. Kolář, M. Strnad (Olomouc)
23. **Méně časté lokalizace dobře diferencovaných neuroendokrinních karcinomů** – H. Bielníková, J. Mačák, R. Tomanová, P. Buzrla, F. Fakhouri, J. Horáček, J. Dvořáčková, J. Plášek, J. Dokulil (Ostrava)
24. **Patomorfologie žilních štěpů** – J. Horáček, R. Brát (Ostrava)
25. **Zjišťování mutačního statusu genu BRAF u zhoubného novotvaru štítné žlázy** – J. Lukáš, J. Drábek, M. Dziechciarková, M. Syrůček, M. Rabčanová, V. Holinková, J. Stránská, S. Jančík, M. Hajdúch (Olomouc)
26. **Hladina metalothioneinu u pacientů s Hodgkinovým lymfomem** – J. Sochor, D. Hynek, M. Masařík, M. Stiborová, T. Eckschlager, J. Kruseová, V. Adam, R. Kizek (Brno)
27. **Vliv platinových cytostatik na oxidační stres a životnost buněk** – J. Sochor, J. Gumulec, M. Masařík, V. Adam, R. Kizek (Brno)
28. **Vztah mezi hladinou PSA a obsahem thiolových sloučenin u pacientů s karcinomem prostaty** – J. Sochor, O. Zítka, D. Hynek, N. Cernei, M. Masařík, V. Adam, R. Kizek (Praha)
29. **Stanovení oxidačního stresu u nádorových buněk vystavených působení cytostatických léčiv** – J. Sochor, B. Ruttkay-Nedecký, M. Masařík, M. Stiborová, T. Eckschlager, V. Adam, R. Kizek (Praha)
30. **Stanovení polymorfizmů v genech pro glutathion-S-transferázy v souvislosti s chemoprotektivním účinkem fytochemikálií zeleniny rodu Brassica a jejich vliv na riziko kolorektálního karcinomu** – R. Héžová, J. Bienertová-Vašků, M. Sachlová, A. Vašků, M. Svoboda, L. Radová, I. Kiss, R. Vyzula, O. Slabý (Brno)
31. **Stanovení jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) v miR-196-a2, miR-27a a miR 146a a jejich vliv na riziko kolorektálního karcinomu** – R. Héžová, A. Kovaříková, M. Sachlová, J. Bienertová-Vašků, A. Vašků, M. Svoboda, L. Radová, R. Vyzula, O. Slabý (Brno)
32. **Význam mikroRNA-21 u kolorektálního karcinomu** – A. Bešše, S. Ševčíková, M. Svoboda, I. Kiss, R. Vyzula, O. Slabý (Brno)
33. **Identifikace a funkční analýza mikroRNA u pacientů s renálním karcinomem** – M. Rádová, R. Lakomý, A. Poprach, M. Svoboda, L. Radová, P. Fabian, R. Iliev, R. Vyzula, O. Slabý (Brno)
34. **Použití polymerázové řetězové reakce v reakčním objemu 1 µl pro detekci mutací genu EGFR** – J. Stránská, J. Drábek, V. Holinková, M. Rabčanová, P. Vojta, M. Hajdúch (Olomouc)
35. **Studium vybraných transkribovaných ultrakonzervovaných regionů (T-UCR) u pacientů s kolorektálním karcinomem** – J. Šána, S. Hankeová, M. Svoboda, R. Němeček, R. Vyzula, O. Slabý

Za původnost a obsahovou správnost příspěvků odpovídají autoři.

VII. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE, XIX. SJEZD ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH PATOLOGŮ,
XCVII. DIAGNOSTICKÝ SEMINÁŘ ČESKÉ DIVIZE IAP, XIX. SJEZD ČESKÉ SPOLEČNOSTI HISTOLOGICKÝCH LABORANTŮ

HARMONOGRAM	9.00	10.00	11.00	12.00	13.00	14.00	15.00	16.00	17.00	18.00	19.00	20.00	21.00	
Středa 9.11.														
PEGASUS							Biomarkery v diagnostice I							
CENTAURUS								Nová a potenciální nádorová léčiva I						
Jezuitský Konvikt UP											Uvítací koncert s welcome banketem			Schůze výborů odborných společností
Čtvrtek 10.11.														
PEGASUS		Slavnostní zahájení	Diagnostika nádorů, klinicko-patologické korelace I	GIST – od molekul k pacientovi	OBĚD		Přednáška R. K.	Diagnostika nádorů, klinicko-patologické korelace II	Klinická a experimentální patologie					
CENTAURUS			RNA jako biomarker					Biomarkery v diagnostice II						
PERSEUS			Histologická technika a metodologie I					Histologická technika a metodologie II						
ANDROMEDA								Posterová sekce – diskuze s autory						
Pevnost FORT KŘELOV												Společenský večer (19.00–24.00)		
Pátek 11.11.														
PEGASUS		Varia												
ANDROMEDA					Diagnostický seminář IAP									

POZNÁMKY: Sály Pegasus, Centaurus, Perseus, Andromeda se nachází v budově RCO. (Pegasus – přízemí; Centaurus, Perseus, Andromeda – I. poschodí)
Jezuitský Konvikt UP se nachází poblíž centra města Olomouce na ulici Univerzitní 3
Odjezd na místo konání společenského večera v 18.30 od RCO
Odvoz ze společenského večera bude zajištěn minimálně ve dvou časových intervalech.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Podpora vzdělávání vědeckých pracovníků z oblasti molekulární onkologie
reg. č.: CZ.1.07/2.3.00/09.0089

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS BIOMARKERY V DIAGNOSTICE I

Předsedající: Z. Kolář, J. Ehrmann – středa / 9. 11. 2011 / 15.00–17.45

Sphingosine 1-phosphate: a potential biomarker and therapeutic target in prostate cancer

Dr. Olivier Cuvillier

Institute of Pharmacology and Structural
Biology, Toulouse

Sphingosine 1-phosphate (S1P) has emerged as a critical lipid mediator promoting tumor cell proliferation, survival, migration and neoangiogenesis. S1P level is low and kept under control through a delicately regulated balance between its synthesis and its degradation. It has been suggested that the balance between the levels of S1P and its metabolic precursors ceramide and sphingosine provides a rheostat mechanism that decides whether a cell dies (via ceramide and sphingosine) or proliferates and survives (via S1P). Two decisive regulators of this sphingolipid switch are the sphingosine kinase-1 (SphK1), the enzyme converting the death-promoting sphingosine into the growth-promoting S1P; and the S1P lyase that degrades S1P irreversibly. SphK1 activity can be stimulated by a wide array of stimuli (e.g. growth factors, hormones) and anticancer treatments cause its down-regulation, and small molecule inhibitors of SphK1 can reduce tumor volume and sensitize to irradiation and chemotherapies in animal models. Much less is known about S1P lyase in cancer. Our recent studies have demonstrated the relationship between SphK1-increased activity and concomitant S1P lyase-decreased activity in human prostate cancer tissues and relevant clinical features (including aggressiveness and treatment failure) confirming a central role for S1P in prostate cancer that herald promising avenues in risk assessment and treatment. Finally, current studies conducted *in vitro* and animals targeting directly S1P by a therapeutic monoclonal anti-S1P antibody are established its efficacy as a strong sensitizer to standard treatments including chemotherapy.

Phase Ib/II clinical trial in hormone-refractory prostate cancer patients will be conducted in 2012.

Molekulární diagnostika změn ALK genu u různých typů onemocnění děti i dospělých

RNDr. Marcela Mrhalová, Ph.D.,

RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D.,

prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.

Ústav patologie a molekulární medicíny,
2. LF UK a FN v Motole, Praha

Gen ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase, CD246 antigen) je lokalizován na 2. chromozomu v oblasti p23. Gen ALK kóduje transmembránový receptor s tyrosinkinázovou aktivitou. ALK hraje důležitou roli ve vývoji nervového systému. Za patologických stavů bývá gen ALK přestaven (zlomy, translokace, inverze), mutován nebo amplifikován. Nejčastější změnou genu ALK jsou přestavby vedoucí ke vzniku fúzních genů, které bývají následně přepisovány do fúzních proteinů. Prvně byla exprese ALK proteinu popsána u nemocných s velkobuněčným anaplastickým T lymfomem, CD30 pozitivním. Následně bylo prokázáno, že zvýšená exprese ALK v lymfoidní populaci je způsobena translokacemi genu ALK s různými translokačními partnery a následným vznikem fúzních genů. Postupem času však byly translokace a jiné molekulární změny s účastí genu ALK prokázány i u dalších nosologických jednotek. V našem sdělení prezentujeme molekulární změny na úrovni genu ALK, které jsme detekovali u pěti nemocných s různými patologickými procesy. Biopický materiál byl vyšetřen standardními histologickými a imunohistochemickými metodami, se spektrem vyšetření používaným v daných diagnostických jednotkách. Zlom v oblasti genu ALK jsme detekovali metodou FISH na interfázických jádrech v histologickém řezu, přítomnost různých fúzních genů metodou RT-PCR a expresi translokované části ALK genu metodami kvan-

titativní RT-RQ-PCR. U vyšetřených nemocných jsme zjistili následující změny ALK genu/proteinu:

a) 15letý chlapec s velkobuněčným anaplastickým T lymfomem (cytoplazmatická a jaderná pozitivita ALK proteinu, zlom 2p23, fúzní gen ALK/NPM), b) 59letý muž s velkobuněčným B lymfomem s plazmablastickou morfologií (cytoplazmatická pozitivita ALK proteinu, zlom 2p23, fúzní gen ALK/CLTC), c) 44letá žena se zánětlivým myofibroblastickým nádorem (cytoplazmatická pozitivita ALK proteinu, zlom 2p23, fúzní gen ALK/TPM3), d) 63letý muž s adenokarcinomem plic (cytoplazmatická pozitivita ALK proteinu, zlom 2p23), e) 4letá holčička s níže diferencovaným neuroblastomem (cytoplazmatická pozitivita ALK proteinu, zvýšený počet intaktních signálů 2p23, zvýšená exprese ALK genu). Naším příspěvkem jsme chtěli poukázat na biologickou rozmanitost molekulárních změn na příkladu jedné konkrétní molekuly u různých patologických procesů u dětských i dospělých nemocných a jejich potenciální diagnostické i terapeutické využití. Práce byla podpořena projektem MZ0FNM2005 (dílní projekt 6704).

Immunohistochemical co-expression of CD124, TGF- β , PAR-2, TSLP and YY1 in routine endobronchial samples: Differences between COPD and bronchial asthma patients

MUDr. Radoslav Matěj, Ph.D.,

doc. MUDr. Martina Vašáková, Ph.D.,

MUDr. Martina Šterclová, Ph.D.,

doc. Ing. Jaromír Kukal, CSc.,

MUDr. Tomáš Olejář, Ph.D.

Department of Pathology and Molecular
Medicine, Thomayer University Hospital,
Prague

Introduction: In Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), Th1 immune reaction predominates, while in bronchial asthma (BA), Th2

immunity is mainly involved. There are a few "novel molecules" from different families proposed to take part in etiopathogenesis and development of COPD and BA modulating different inflammatory properties and subsequently clinical and morphological appearance of both units. In previous studies, proteinase-activated receptor 2 (PAR-2), thymic stromal lymphoprotein (TSLP), IL-4 and its receptor (CD124), TGF- β and Yin Yang 1 (YY1) were shown to have been involved in the pathophysiology of COPD and BA. In the present study we investigated PAR-2, TSLP, CD124 (IL-4 R), TGF- β and YY1 immunohistochemical expression in parallel groups of BA and COPD endobronchial samples to carry out a possible differences of these molecules in etiopathogenesis of both diseases.

Methods: 20 patients with diagnosis of COPD and 22 patients definitely diagnosed to suffer from asthma were enrolled into the study. 5 μ m thick formaline-fixed and paraffin-embedded slices from endoscopic samples were routinely stained with hematoxylin and eosin for confirmation of histopathological diagnosis. Primary antibodies against PAR-2, CD124, TGF β , YY-1, TSLP were used and detection of immunostaining was performed using the Envision® kit. Immunostaining quantification was performed by modified semiquantitative scoring system according to Remmele and Schickentanz. Two statistical samples for every stochastic variable were investigated via three tests: normality test of belonging to Gaussian normal distribution, F-test of variance equity and two-sample two-sided t-test of mean value equity. Critical level was set to $p = 0.05$. All the calculations were performed in MATLAB 7.8.0 Statistical Toolbox (Mathworks Inc., 2009).

Results: Immunohistochemical positivity was investigated for CD124, TGF- β , TSLP, YY1 and PAR-2 in all samples from both cohorts. TGF- β in epithelial cells (TGF- β epi) and in submucosa (TGF- β sub) and PAR-2 in epithelial (PAR-2 epi) and submucosa (PAR-2 sub) were evaluated separately. All statistical samples passed the normality test with non significant $p > 0.05$. The F-test also exhibited non significant variance ratios with $p > 0.05$ for every variable. Thus, the standard t-test was used to indicate the mean value differences between COPD and BA. The statistically significant differences were in TGF- β epi ($p = 0.0007$), C124 ($p = 0.0015$), TGF- β sub ($p = 0.0075$) and TSLP ($p = 0.0106$).

Discussion: In presented immunohistochemical study, we demonstrated statistically significant higher production of TGF- β in bronchial epithelial cells and bronchial submucosa as well as in BA patients. Statistically significant higher was CD124 (IL-4R) and TSLP expression in COPD patients. No significant difference was observed

between both groups in expression of PAR-2. Also no difference was observed in expression of Yin-Yang 1 transcription factor. In a summary, airway inflammatory reaction differences in both diseases looks to be in a complex of specific and shared processes that could be partially simplified as a way of perpetual *circulus vitiosus* of subsequent activation of TGF- $\beta \rightarrow$ PAR-2 $\rightarrow$ TSLP $\rightarrow$ IL-4, where excess of IL-4 in sensitive BA patients switches the Th2 inhibitory effect of TGF- β to pro-inflammatory reaction via shared PAR-2 pathway.

*The study was supported by grant
IGA MZCR NR- 9131 and NS10423-3/2009*

Úloha SDF-1, CXCR4 a HGF v maligní transformaci epitelu střeva

doc. MUDr. Svetlana Brychtová, Ph.D.,

Mgr. Michala Bezděková, Ph.D.,

Mgr. Eva Sedláková,

MUDr. Marie Geierová,

Svetlana Brychtová, jr.,

Veronika Dvořáková

Ústav klinické a molekulární patologie,

Lékařská fakulta Univerzity Palackého

Olomouc

Karcinom tlustého střeva patří k nejčastějším maligním nádorům, v jejichž progresi se významně uplatňuje působení sítě chemokinů. Jedná se o proteiny, které svým působením regulují proliferaci buněk, angiogenezi, migraci a metastazování. Dále dokáží významným způsobem modulovat imunitní systém a ovlivňují chemotaxi buněk imunitního systému. Bylo prokázáno, že chemokin SDF-1 (stromal cell-derived factor) známý také jako CXCL12 podstatným způsobem přispívá k progresi a metastazování kolorektálního adenokarcinomu, avšak přesný mechanismus účinku není doposud znám. Protein působí prostřednictvím svého receptoru CXCR4, přičemž tato interakce je kritická pro chemotaxi lymfocytů a hematopoetických kmenových buněk. V poslední době přibývá důkazů potvrzujících, že SDF-1 může rovněž regulovat chemotaxi tkáňových kmenových buněk. Dále bylo prokázáno, že protein inhibuje apoptózu a významně stimuluje proliferaci, migraci a invazi nádorových buněk. Zablokování SDF1-CXCR4 efektorové osy se ukazuje jako slibný cíl léčby nádorových onemocnění.

Růstový faktor hepatocytů (HGF) je známým mitogenem, který přes svůj receptor c-Met stimuluje proliferaci a migraci buněk a významně ovlivňuje interakce mezi epitelovými a mezenchymovými buňkami. Některé studie poukazují na význam aktivace HGF/cMet v progresi karcinomu střeva, přičemž inhibice těchto proteinů bývá

spojována s lepší prognózou pacientů. Ukazuje se rovněž, že HGF indukovaná aktivace Met se podílí na rezistenci nádorových buněk u terapie EGFR inhibitory. K poněkud překvapivým poznatkům patří zjištění, že HGF podporuje obnovu epitelu poškozené sliznice a dokonce reparace zprostředkovaná tímto faktorem snižuje riziko vzniku karcinomu.

Materiál a metodika: V naší studii jsme pomocí metody nepřímé imunohistochemie v barvicím automatu Ventana Benchmark na formálním fixovaných parafrinových vzorcích vyšetřili celkem 98 bioptických vzorků zahrnujících karcinomy a adenomy tlustého střeva a okolní nenádorovou sliznici. Expres proteinů byla hodnocena jak v buňkách nádorového a nenádorového epitelu, tak v buňkách stromatu.

Výsledky: Nebyly zjištěny významné kvantitativní rozdíly exprese SDF-1 mezi buňkami normálního a nádorového epitelu. Prokázali jsme redukci exprese tohoto proteinu ve stromatu adenokarcinomů, ve srovnání se skupinou adenomů a normálním epitelem. U adenokarcinomů i adenomů došlo k redistribuci proteinu z membrány do cytoplazmy. CXCR4 vykazoval silnou jadernou expresi bez rozdílu u všech sledovaných skupin. HGF byl zvýšen exprimován nádorovým epitelem i stromatem ve srovnání s nenádorovým epitelem bez signifikantních rozdílů mezi maligními a benigními lézemi. U skupiny adenokarcinomů byla zjištěna změna subcelulární lokalizace proteinu s převahou cytoplazmatické exprese oproti jaderné. Neprokázali jsme rozdíly exprese ve stromálním kompartmentu.

Závěry: Ukazuje se, že sledované proteiny se uplatňují v buněčných regulacích nenádorového i nádorového epitelu. Spíše než kvantitativní změna exprese se na jejich efektorové funkci podílí změny subcelulární lokalizace. Kromě toho pokles SDF-1 v stromatu u adenokarcinomů může vést k dysfunkci lymfocytů a alteraci imunitní odpovědi proti nádorovým antigenům.

*Práce na tomto projektu je podporována
granty GAČR P304/10/1070 a MSM 6198959216.*

Novel combination of urine biomarkers for early detection of prostate cancer

MUDr. Tamar Jamaspishvili¹,

MUDr. Milan Král, Ph.D.²,

MUDr. Irakli Khomeriki²,

MUDr. Vlasta Vyhnánková²,

Giorgi Mgebrishvili¹,

doc. MUDr. Vladimír Študent, Ph.D.²,

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.¹,

Mgr. Jan Bouchal, Ph.D.¹

¹ **Laboratory of Molecular Pathology and Department of Clinical and Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc**

² **Department of Urology, University Hospital, Olomouc**

Background: The major advantages of multiplex urine-based assays are their noninvasive character, ability to monitor prostate cancer (CaP) with heterogeneous foci and detect cancer more accurately than do single marker tests. They might supplement serum PSA test which has low specificity resulting in a number of unnecessary biopsies especially in "grey zone" and thereby reducing complications associated with biopsy. While the test for the prostate cancer gene 3 (PCA3) is commercially available, the aim of our research was to test other putative urine markers in multiplex settings (AMACR, EZH2, GOLM1, MSMB, SPINK1 and TRPM8).

Materials and methods: Expression of the candidate biomarkers was studied in sedimented urine using quantitative RT-PCR on two sets of patients with PSA levels of 3–15 ng/ml (N=104) and 0.1–587 ng/ml (N=176). Total RNA isolation was performed by the Urine Exfoliated Cell RNA Purification Kit (Fisher Scientific, USA), quantified by Nanodrop, pretreated with Dnase I (Invitrogen) and reverse transcribed with SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen), preamplified and tested on real-time PCR with Light Cycler® 480 (Roche). Clinicopathological characteristics were defined according to the WHO classification. Statistical analysis was done in SPSS using Spearman, Mann-Whitney and ROC analysis. Univariate and multivariate regression analysis were used to determine predicted probability of the individual markers and their combinations.

Results and discussion: We confirmed that PCA3 is an independent predictor of cancer in the patients without restriction of serum PSA values (0.1–587 ng/ml). However, AMACR was the only parameter that differentiated CaP from nonCaP patients in patients with serum PSA between 3 and 15 ng/ml. The area under curve (AUC) for this gene was 0.645 with both sensitivity and specificity at 65 %. Further improvement was achieved by multivariate logistic regression analysis which identified novel duplex (TRPM8 and MSMB), triplex (plus AMACR) and quadruplex (plus PCA3) models for the detection of early prostate cancers (AUC 0.665, 0.726 and 0.741, respectively).

Conclusions: In the current study we demonstrated that novel quadruplex test could be implemented as an adjunct to serum PSA or urine PCA3 and this could improve decision making for diagnostics in the case of "PSA dilemma" patients.

This work was supported by grants NS 9940-4 from the Czech Ministry of Health and MSM 6198959216 from the Czech Ministry of Education and EU infrastructure support CZ.1.05/2.1.00/01.0030. Tamar Jamaspishvili was also supported by GACR 303/09/H048 from the Grant Agency of the Czech Republic and LF_2010_006.

Korelácia DNA analýzy a expresie vybraných proteínov pri hydatidózne moly

MUDr. Zuzana Čierna^{1,2}

MUDr. Michal Palkovič, PhD.^{1,2}

prof. MUDr. Ľudovít Danihel, PhD.^{1,2}

Mgr. Lucia Donarová^{1,2}

prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.^{1,2}

¹ **Ústav patologickej anatómie, LFUK a UN, Bratislava**

² **Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UN Bratislava**

Úvod: V súčasnosti je platná klasifikácia gestačnej trofoblastovej choroby podľa WHO z roku 2003, ktorá ju rozdeľuje na tri skupiny – nádory trofoblastu, molárne tehotnosti a nenádorové nonmolárne zmeny trofoblastu. Medzi molárne tehotnosti zaraďujeme kompletnú, parciálnu, invazívnu a metastatickú hydatidóznou moly. Vzhľadom na vyššie riziko možnej malígnej transformácie buniek trofoblastu pochádzajúcich z kompletnej hydatidóznej moly je potrebné v diferenciálnej diagnostike odlíšiť túto formu gestačnej trofoblastovej choroby od iných foriem respektíve hydropického potratu. Odlíšenie kompletnej od parciálnej moly môže byť problematické len na základe mikroskopického vyšetrenia v základnom farbení hematoxylínom a eozínom, najmä v skorých štádiách tehotnosti do 12. týždňa tehotnosti, tzv "early" forma kompletnej hydatidóznej moly. Správna diagnostika typu molárnej tehotnosti je dôležitá pre pacientku z hľadiska prognózy, pretože parciálne moly zriedka prechádzajú do choriokarcinómu a invazívnej alebo metastatickej moly. Proteín p57 je marker, ktorý odliší kompletnú hydatidóznou moly od parciálnej moly a nonmolárneho hydropického potratu. Ide o inhibitor cyklín-dependentnej kinázy, prvý regulátor bunkového cyklu, ktorý podlieha

paternálnemu genómovému imprintingu, je exprimovaný len maternálnymi alelami. p57 je exprimovaný v materskej decidue, stromálnych bunkách klkov, vilóznom cytotrofoblaste a extravilóznom trofoblaste v placentе po fyziologicky prebiehajúcom tehotenstve a pôrode, v prípade spontánneho alebo umelo vyvolaného potratu, po hydropickom potrate alebo po parciálnej molárnej tehotnosti. V prípade kompletnej hydatidóznej moly chýba expresia p57 vo vilóznom cytotrofoblaste a stromálnych bunkách klkov, pretože kompletná mola je paternálna, neobsahuje materské alely. Pozitívita p57 v deciduálnych bunkách pri kompletnej moly slúži ako interná pozitívna kontrola kvality imunohistochemického vyšetrenia. Negatívita expresie p57 potvrdzuje kompletnú moly, no pozitívita p57 ju nemusí jednoznačne vylúčiť.

Materiál a metódy: Do našej pilotnej štúdie sme zaradili 9 prípadov geneticky potvrdenej kompletnej moly a 10 prípadov geneticky potvrdenej parciálnej moly. Prípady boli náhodne vybrané z biotických vzoriek zaslaných na Ústav patologickej anatómie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave z gynekologicko-pôrodných oddelení na Slovensku. Vo všetkých prípadoch sme mikroskopicky vyšetrili preparáty farbené základným farbením hematoxylínom a eozínom a imunohistochemicky s použitím protilátky proti ľudskému choriogonadotropnému hormónu (hCG) a placentárnej alkalické fosfatáze (PLAP). Vyšetrenie sme doplnili sledovaním expresie proteínu p57 vo vilóznom a extravilóznom trofoblaste, stromálnych a deciduálnych bunkách. Intenzita jadrovej pozitivity p57 bola hodnotená semikvantitatívne svetelným mikroskopom.

Výsledky: Vo všetkých prípadoch parciálnej hydatidóznej moly boli bunky vilózneho cytotrofoblastu, extravilózneho trofoblastu, stromálne bunky a deciduálne bunky p57 výrazne pozitívne. Pri vyšetrení kompletnej hydatidóznej moly bol vo všetkých 9 prípadoch vilózny cytotrofoblast a stromálne bunky p57 negatívne, kým extravilózný trofoblast a deciduálne bunky vykazovali p57 pozitívitu.

Záver: p57 je marker, ktorý v prípade diagnostických pochybností môže výrazne prispieť k spresneniu diagnózy. Pozitívita p57 svedčí pre parciálnu moly, no nie je možné jednoznačne vylúčiť kompletnú molárnu tehotnosť. Výsledky je potrebné vždy korelovať s makroskopickým vzhľadom tkaniva, morfológiou v mikroskopickom obraze v základnom farbení hematoxylínom a eozínom, ďalšími imunohistochemickými vyšetreniami s použitím protilátok proti PLAP a HCG a s analýzou DNA.

Apoptosis Associated Genes and their Role in Predicting Clinical Outcome of Neoadjuvant Breast Cancer Treatment

Ing. Daniel Tvrdík, Ph.D.¹,
MUDr. Helena Skálová¹,
doc. MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.¹,
prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.¹,
MUDr. Zuzana Velenská¹,
MUDr. Adéla Berková¹,
Mgr. Ing. Libor Staněk¹,
prof. MUDr. Luboš Petruželka, CSc.²

¹ Institute of Pathology

² Department of Oncology, 1st Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague

Neoadjuvant chemotherapy is used in the treatment of breast carcinoma because it substantially reduces the size of the primary tumor and lymph node metastases. This present study is aimed at the investigation of biomarkers that can predict a pathologic response to the therapy.

The role of apoptosis in regression of the tumors after neoadjuvant chemotherapy was determined by TUNEL and anti-active caspase 3 assay. The transcriptional profile of 84 key apoptosis genes was evaluated in both pre-therapeutically obtained tumor tissue by core needle biopsy and in specimens removed by final surgery, using a pathway-specific Real-Time PCR assay. Obtained data were analysed by statistical methods as hierarchical cluster analysis and correlation analysis. The immunohistochemical profile of each tumor was determined using standard ABC method.

On the basis of a hierarchical cluster analysis of 13 significantly changed genes, we divided patients into good and bad prognosis groups, which correlate well with progression-free survival. In the good prognosis group, we found a statistically significant downregulation of the expression of MCL1 and IGF1R genes after neoadjuvant treatment. We also found a statistically significant overexpression of BCL2L10, BCL2AF1, CASP8, CASP10, CASP14, CIDEA, FADD, HRK, TNFRSF25, TNFSF8 and CD70 genes. In contrast, we found upregulation of IGF1R after the treatment in the group with poor prognosis.

We have concluded that in order to devise effective rational treatments, we need a reliable tool for predicting response to the treatment. As we have shown, gene expression profiling using a Real-Time PCR assay is a valuable re-

search tool for the investigation of molecular markers, which may better reflect tumor biology and treatment response than standard prognostic and predictive factors.

*This work was supported by Grant
IGA MZ ČR NS/10575-3.*

Barrett's oesophagus and telomerase activity

Ing. Ivo Überall, Ph.D.¹,
Mgr. Jana Vaníčková¹,
MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.²,
MUDr. Jan Gregar³,
prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.¹

¹ Institute of Clinical and Molecular Pathology and Laboratory of Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

² Laboratory of Experimental Medicine, Departments of Pediatrics and Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital in Olomouc

³ II. Department of Internal Medicine, University Hospital in Olomouc

Diagnosis on time of cancer disease is a predictor of successful and effective therapy. One of the possibilities how to detect it is a detection of specific markers for certain type and development level of cancer disease. Barrett oesophagus occurs as a consequence of gastroesophageal reflux disease, it is a precancerous condition and it can lead to the development of adenocarcinoma. The development of Barrett oesophagus is conditioned by multifactorial chain of changes in genome or proteome of oesophageal cells. However, detection on time of these changes predates a successful therapy. We expect that there are more types of tumor markers of Barrett oesophagus and we focused on the change of telomerase activity and expression of hTERT. The aim of this work was to find association between Barrett oesophagus and telomerase activity indicators obtained by TRAP, Western blot, and immunohistochemistry methods. Telomerase enzymatically prolongs the chromosome ends, thus counteracting replication loss in the lagging DNA strand. When overexpressed, it participates in immortalization of cells. TRAP tracked the telomerase activity in samples of Barrett oesophagus, adenocarcinoma, carcinoid, immortalized fibroblast cells, MCF-7 cell line, intestinal tissue but also in the normal oesophageal tissue. Western blot found

hTERT protein expression in all oesophagus samples, cell line MCF-7, fibroblast cells but not in intestinal samples. On the basis of results from the experimental part it was found that higher telomerase activity does not correlate with higher level of malignancy. Barrett oesophagus telomerase activity is not suitable biomarker for diagnosis.

Supported by grant MSM 619 895 9216, NS 10279-3/2009, Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C1.05/2.1.00/01.0030, and LF_2011_009.

Sledování exprese miR-21, miR-126 a miR-205 u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic

Mgr. Veronika Žižková
Ústav klinické a molekulární patologie
LF UP a FN Olomouc

Karcinom plic je maligní nádorové onemocnění, k jehož léčbě se v posledních letech začala aktivně využívat RNA interference (RNAi). RNA interference představuje vysoce konzervovaný molekulární mechanismus, který je v buňkách využíván k posttranskripční, sekvenčně specifické inhibici genové exprese. Funkčními jednotkami, zodpovídajícími za mechanismus RNAi, jsou krátké, jednovláknové molekuly RNA (miRNA, siRNA atd.). Ty se vážou na cílové molekuly mRNA a dle míry komplementarity je mRNA buď degradována, či je pouze zamezeno translaci, aniž by došlo k její degradaci.

U 65 pacientů s karcinomem plic byla detekována exprese miR-21, miR-126 a miR-205 s využitím TaqMan® MicroRNA Assays od firmy Ambion. Tato exprese byla následně korelována s jednotlivými subtypy nemalobuněčného karcinomu plic (adenokarcinom, spinocelulární karcinom a velkobuněčný karcinom), se stadiem onemocnění, s délkou bezpříznakového období (DFS) a celkovým přežíváním (OS).

miR-21 a miR-126 nevykazovaly žádný signifikantní vztah mezi expresí a výše zmíněnými charakteristikami, avšak u miR-205 byla potvrzena signifikantně vyšší amplifikace ve spinocelulárních karcinomech ($p < 2,10^{-3}$) oproti jiným subtypům NSCLC. miR-205 vykazovala také signifikantní korelaci s expresí a délkou bezpříznakového období a celkovým přežitím pacientů s NSCLC (OS: $p = 0,01$; DFS: $p < 0,015$). Z těchto výsledků je možno usuzovat, že miR-205 by mohla být u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic využívána jako diagnostický i prognostický marker.

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL CENTAURUS NOVÁ A POTENCIÁLNÍ NÁDOROVÁ LÉČIVA I

Předsedající: M. Hajdúch, P. Džubák – středa / 9. 11. 2011 / 15.30–17.30

Chyby a úskalí

v hodnocení léčby glioblastomů

MUDr. Ondřej Kalita, Ph.D.¹,

MUDr. Miroslav Vaverka, CSc.¹,

doc. MUDr. Lumír Hrabálek, Ph.D.¹,

MUDr. Miloslava Zlevorová²,

RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.³,

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.³,

doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.³,

prof. MUDr. Jiří Ehrmann, jr., Ph.D.⁴,

prof. MUDr. Michael Houdek, CSc.¹

¹ Neurochirurgická klinika LF UP

a FN Olomouc

² Onkologická klinika LF UP a FN Olomouc

³ Laboratoř experimentální medicíny,
Institut molekulární a translační medicíny
LF UP a FN Olomouc

⁴ Laboratoř molekulární patologie,
Oddělení patologie LF UP a FN Olomouc

Úvod: Zavedení radikálních operačních metod a účinné chemoterapie do léčebného protokolu prodloužily u glioblastomu bezpříznakové období i délku přežití. Při dlouhodobém sledování takto léčených pacientů byl odhalen zvýšený výskyt nekrotických změn (až ve 20–30 % případů). Jejich obraz na standardním MRI sekvencích odpovídá recidivě, či progresi high grade gliomu mozku. Tato tzv. „pseudoprogrese“ se nejčastěji vyskytuje v období mezi 3 a 9 měsícem po ukončení konkomitantní chemo-radioterapie; tedy v období pokračovací chemoterapie. Mylné vyhodnocení nálezu jako progrese nádoru vede k přerušení nejúčinnější léčby a v některých případech i k nadbytečné operaci. Cílem naší práce bylo zhodnotit klinické projevy pseudoprogrese, její diagnostické možnosti umožňující indikace k operaci, ale i určení obecné léčebné strategie.

Metoda: Na našem souboru pacientů s pseudoprogresí bychom chtěli ukázat možnosti, které využíváme k odlišení recidivy high grade gliálního nádoru od jiných expanzivních, na MRI mozku postkontrastně se zvýrazňujících procesů. U několika našich případů operací pseudoprogresí jsme hodnotili jejich vliv na klinický stav, taktéž jejich histologický obraz a cytogenetické změny.

Výsledky a závěr: Pseudoprogrese jsou většinou klinicky němé. Indikace k případné operaci je velmi sporná. Pseudoprogrese je pozitivní prediktivní faktor ukazující dobrý efekt onkologické léčby. Na základě histologického a imunohistochemického vyšetření je obtížně odlišit pseudoprogresi a progresi. Protože jde o v čase vyvíjející se proces, často nacházíme kombinaci nekrotických změn a viabilní nádorové tkáně. Podstatné pro interpretaci je však informovat patologa o provedené onkoterapii. Základem pro další postup je rozšířené MRI vyšetření, popř. doplněné o PET/CT, v našem případě s thymidinem (FLT). Zvýšené riziko pseudoprogrese lze detekovat např. detekcí methylace promotoru MGMT nebo oligodendrogliální komponenty nádoru.

Pozn.: V současné době je postupně implementována antivaskulární terapie (bevacizumab – Avastin) do léčebného protokolu Glioblastomů. Léčba by měla zajistit vymizení intracerebrálních, na MRI postkontrastně sytících se lézí, což vedlo k nahrazení zavedených MacDonaldových kritérií RANO škálou.

Proteomika v odhadu rizika recidivy a metastazování karcinomu prsu – možné využití v prognostice onemocnění

MUDr. Marek Sochor¹,

doc. MUDr. Petra Tesařová, Ph.D.²,

prof. MUDr. Luboš Petruželka, Ph.D.²,

RNDr. Ivana Janatková³

¹ Komplexní onkologické centrum
KN Liberec a.s.

² Onkologická klinika VFN a 1. LF UK Praha

³ Ústav klinické biochemie a laboratorní
diagnostiky VFN a 1. LF UK Praha

Proteomika je vědní obor zabývající se proteiny z hlediska změn kvalitativních a kvantitativních, jejich strukturou, funkcí, lokalizací v buňce a protein-proteinovými interakcemi. Metody hodnocení jsou založené na hmotnostní spektrometrii. V poslední době se začínají rozvíjet technologie založené na čipové analýze, které jsou přesné, rychlé a vysokokapacitní. Proteomika je logický krok v bádání směrem od genomiky, protože proteiny jsou hybnou

silou buněčných dějů. DNA je nositelka informace a slouží k její archivaci, neurčuje však strukturu, funkci, lokalizaci a společné interakce mezi proteiny. Proteinová komplexita je dána posttranslačními procesy, jako je fosforylace, sulfatace, glykosylace a metylace. Tudíž aktivace proteinových signálních cest určujících migraci, dělení, invazivitu, apoptózu a další může nastat před změnami v genové expresi. Analýzou kvalitativních a kvantitativních změn proteinů v souvislosti s fyziologickými a patologickými stavy organismu lze získat nové informace v diagnostických a terapeutických postupech. Proteomika umožňuje mapovat aktivní buněčné signální proteinové kooperace v konkrétním vzorku, lze využít všechny tělesné tkáně a tekutiny. Proteomiku lze v onkologii využít v diagnostice, prognostice a přípravě cílené léčby.

Karcinom prsu je v ČR s přibližnou incidencí 120/100 000 žen suverénně nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním u žen. Přežití časných stadií je kolem 95 % a klesá na přibližně 26 % pro pozdní stadia. V průběhu choroby dojde u 30–50 % pacientek k recidivě nebo vzdálenému metastatickému postižení i přes adekvátní lokoregionální a systémovou léčbu. Základem úspěchu terapie je časná diagnostika, správný odhad rizika recidivy a indikace odpovídající léčby. Současné prognostické systémy rozdělují pacientky na základě hodnocení klinických a histopatologických znaků, jejich kombinace potom určují, která skupina podstoupí adjuvantní terapii, případně v jakém rozsahu (chemoterapie, hormonální léčba a radioterapie). Jsou známé genomické prognostické parametry, ale jejich využití není standardně využíváno. Nejproblematictější situace je u pacientek s časným nádorem prsu. Jedná se o pacientky vesměs s výbornou prognózou, s výhledem dlouhodobého přežití. Mezi těmito pacientkami je však skupina těch, které mají prognózu velice špatnou a dochází u nich v průběhu let k lokální nebo systémové recidivě onemocnění. Je proto nutné hledání dalších preciznějších prognostických nástrojů k určení optimálního postupu a skutečné individualizaci léčebných postupů.

Studie zkoumající využití proteomiky v prognostickém hodnocení u karcinomu prsu jsou, po genomice, dalším slibným krokem. Jejich data jsou zatím velice omezená, ve srovnání se studiemi diagnostickými. Gonçalves a kol. hodnocením pooperačních sér pacientek s karcinomem prsu stanovili 40 proteinový profil predikující klinický vývoj u 83 % pacientek. Hlavní složky byly haptoglobin alfa 1, C3 a složka komplementu, transferin a apolipoprotein A-1 a C-1 (1). Další skupina stanovila vysoké hodnoty ubikvitinu a nízké hodnoty lehkého řetězce feritinu v nádorové tkáni jako prediktory dobré prognózy (2). Další nezávislé skupiny potvrdily význam ubikvitinu v nádorové tkáni v prognóze onemocnění (3). Jiné skupiny nezávisle na sobě určily další možné prognostické markery jak v nádorové tkáni, tak séru nebo plazmě, případně potvrdily již známé prognostické markery (4, 5, 6). Přesto tyto studie mají své limity ve velikosti souborů, čítajících maximálně desítky pacientek a dále nepřítomnost nezávislého porovnání. Některé autorské kolektivy porovnávaly známé genomické prognostické faktory s proteomickými a jejich výsledky se zdají slibné, včetně korelace s rizikovými skupinami (BRCA mutace) (7, 8).

Význam proteomiky v klinické praxi budoucnosti může mít zásadní vliv na celý diagnosticko-léčebný proces (9). Primárně bude možné aplikovat proteomiku v časně detekci nádorových onemocnění analýzou proteinů ze vzorků tkání organismu. Dále bude proteomika sloužit v době diagnózy jako doplněk ke klasickým histopatologickým metodám, stanou se tak „proteinový podpis“ (10). Umožní individuální stanovení molekulárních dějů pro daný konkrétní nádor, identifikaci specifických regulačních cest buněčného cyklu, diferenciace, apoptózy, invaze a metastazování (11). Bude tak možné stanovení individualizované terapeutické kombinace molekulárně cílených léků k zablokování těchto proteinových cest. Dalším určením prognostických skupin, spolu s genomickými parametry, bude možné určit jednotlivé rizikové podskupiny a určit tak nutnost a rozsah pooperační terapie. Proteomika a genomika dále mohou hrát roli v analýze recidiv a metastatických lézí k úpravě terapie dle změn v signálních cestách v souvislosti s lékovou rezistencí a ve snaze o její překonání. Budoucnost proteomiky, spolu s analýzou DNA a RNA, tak bude v komplexní změně nahlížení na základní body pacientovy péče a managementu (11, 12).

Literatura:

1. Gonçalves A, Esterni B, Bertucci F, Sauvan F, et al. Postoperative serum proteomic profiles may predict metastatic relapse in high-risk primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. *Oncogene* 2006; 25: 981–989.
2. Ricolleau G, Charbonnel C, Lodé L, Loussouarn D, et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors. *Proteomics* 2006; 6: 1963–1975.
3. Gonçalves A, Charafe-Jauffret W, Bertucci F, et al. Protein profile of human breast tumor cells identifies novel biomarkers associated with molecular subtypes. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1420–1433.
4. Laronga C, Becker S, Watson P, Gregory B, et al. SELDI-TOF serum profiling for prognostic and diagnostic classification of breast cancers. *Disease Markers* 2003, 2004; 19: 229–238.
5. Chakravarthy B, Pietenpol JA. Combined Modality Management of Breast Cancer: Development of Predictive Markers Through Proteomics. *Semin Oncol* 2003; 30 (Suppl 9): 23–36.
6. Nakagawa T, Huang S K, Martinez S R, Tran A N, et al. Proteomic profiling of primary breast cancer predicts axillary lymph node metastasis. *Cancer Res* 2006; 66(24): 11825–11830.
7. Brozkova K, Budinska E, Buchal P, et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight proteomic profiling of breast carcinomas identifies clinicopathologically relevant groups of patients similar to previously defined clusters from cDNA expression. *Breast Cancer Res* 2008; 10: R48.
8. Becker S, Cazares L H, Watson P, Lynch H, et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF) differentiation of serum protein profiles of BRCA-1 and sporadic breast cancer. *Annals of Surgical Oncology* 2004; 11(10): 907–914.
9. Petricoin EF, III, Calvert V, Wulfkuhle J, et al. Mapping molecular networks using proteomics: a vision for patient-tailored combination therapy. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3614–21.
10. Diamandis EP. Peptidomics for cancer diagnosis: present and future. *J Proteome Res* 2006; 5(9): 2079–82.
11. Carr KM, Rosenblatt K, Petricoin EF, et al. Genomic and proteomic approaches to study human cancer: prospects for true patient-tailored therapy. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2003; 1: 32.
12. Baak JP, Path FR, Hermsen MA, et al. Genomics and proteomics in cancer. *Eur J Cancer* 2003; 39: 1199–1215.

Evaluation of complex proteomic samples in case of platinum drugs treated CEM cell line (Proteomické profilování platinových léčiv)

Mgr. Tomáš Oždian^{1,2},

Mgr. Dušan Holub¹,

MUDr. Petr Džubák, Ph.D.¹,

Mgr. Gabriela Rylová¹,

Mgr. Madhu Kollaredy¹,

Mgr. Jiří Řehulka¹,

Ing. Rolf Čábelka¹,

Bc. Dana Cahová¹,

doc. Ing. Vladimír Havlíček, Dr.²,

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.¹

¹ Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital in Olomouc, Olomouc

² Institute of Microbiology, Czech Academy of Sciences, v. v. i., Prague

In proteomics, large datasets are usually produced but statistical evaluation of such datasets is still in progress and there is not one established protocol. In this work, we will present our ways how to evaluate results of proteomic study. In our study, we aim to compare an effect of different anticancer drugs. For that purpose, we have chosen a CEM cell line, originated from acute lymphoblastic leukemia, because it's good responsibility to a broad scale of drugs. CEM cell culture was grown in RPMI media with isotope labeled arginine and lysine (SILAC experiment) in the three biological replicates. Then the culture was treated with platinum drugs in concentration 5xIC50 and incubated for 4 hours in case of oxaliplatin, 2.5 hours for cisplatin and 3 hours for carboplatin, mixed with the same amount of unlabeled cell culture, lysed and separated by preparative SDS-PAGE electrophoresis. SDS-PAGE gel was chopped in 45 fractions and digested by trypsin. Digests were analyzed in parallel by HPLC-ESI and HPLC-MALDI. Results were processed by Proteinscape software. In average there were identified 808 ± 166 proteins by ESI for all three drugs (totally 9 biological replicates) with average coverage 442 ± 98 proteins in all three replicates of each drug. By MALDI mass spectrometry, there were identified 500 ± 93 proteins in average of all nine replicates. Average coverage was 145 ± 19 proteins for all three replicates per drug. Total average coverage between MALDI and ESI was 267 ± 61 . Only coverage in the same replicate was taken into account. For evaluation of our measured datasets, we used three different statistical methods. First, we have tried fixed protein fold change limit 0,75 and 1,25 to proteins which were present at least in two from all six measurements to gain reproducibility. This relaxed limits revealed 96 differentially expressed proteins for carboplatin, 208 for cisplatin and 51 for oxaliplatin. Advantages of this approach are its simplicity and the biggest number of proteins characterized as differentially regulated. Disadvantage of this approach is absolutely missing peptide information and small resistance to quantification errors. The second statistical approach consisted from selection of proteins present at least in two of six measurements and from getting the peptide information from Proteinscape to each protein. Peptide fold change was manually controlled for quantification errors and then the same limit criteria (0,75 and 1,25) were applied. For carboplatin, 59 proteins were differentially regulated. For cisplatin, there were 176 proteins differentially regulated and for oxaliplatin, there

were 41 proteins differentially regulated. This statistical approach eliminated quantification errors, but it is somehow irreproducible because quantification errors are controlled manually and there is room for variations, e. g. some error could be forgotten, etc. In the last approach, which we tested, we left the hypothesis "at least in two from six" and worked with every single measurement. At peptide level, we have excluded peptides outlying 1.5 times from first and third quartile, then counted protein fold change and proteins meeting two conditions – first was fold change bigger than 1.5 or less than 0.66 and second was the significance test for up-regulation: $\log(\text{mean protein ratio} - 2 \times \text{SD of peptide ratios}) > 0$ and for down-regulation: $\log(\text{mean protein ratio} + 2 \times \text{SD of peptide ratios}) < 0$. For carboplatin, there were totally 37 proteins found differentially regulated, each of them was only in one from all six measurements. For cisplatin, there were 30 differentially regulated proteins, with three proteins present in two measurements. For oxaliplatin there were 31 proteins differentially regulated with one present in two measurements. These proteins didn't much correlate with proteins selected by the second method (average 6 proteins per drug common between method nr. 2 and nr. 3). This approach is most complicated, impossible to perform without in-house scripts and provides very fewer interesting proteins, but is fully reproducible and fully automated. Further investigation is still needed to find an approach with enough reliable results. The work was supported by grants LC07017, MSM6198959216, Czech Science Foundation (H-084) and Infrastructural part was supported by project Biomedicine for regional development and human resources (BIOMEDREG) C.1.05 /2.1.00/01.0030.

Molecular targets and biological activity of quinolinone derivatives with anticancer effect

**Mgr. Gabriela Rylová¹,
MUDr. Petr Džubák, Ph.D.¹,
MUDr. Michaela Špenerová¹,
Bc. Anna Janošťáková¹,
Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.¹,
Mgr. Petr Konečný¹,
Mgr. Dušan Holub¹,
Mgr. Tomáš Oždian¹,
MUDr. Dalibor Doležal¹,
RNDr. Miroslav Soural, Ph.D.²,
doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.²,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.¹**

¹ Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and University Hospital in Olomouc, Olomouc

² Department of Organic Chemistry, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

Quinolinone derivatives are well known for their antibacterial, antiprotozoal, cytotoxic and immunosuppressive effect. We are currently testing chemical libraries of these interesting compounds with IC₅₀ values in sub-micromolar concentrations.

Derivatives were further tested by flow cytometry for cell cycle analysis and inhibition of DNA/RNA synthesis. Compounds stopped cells predominantly in G1 phase together with significant DNA and RNA synthesis inhibition.

The most active derivative was tested in in vivo cancer model with using hollow fibres. Hollow fibres were filled by leukemic CEM (human T-lymphoblastic leukemia) cell line and were implanted to mice. Afterwards mice were treated by tested compound. Hollow fibres were after 14 days taken from mice and viable cells were tested by cytotoxic MTT assay. Activity of tested compound was comparable to doxorubicine.

For protein targets identification of these derivatives we have synthesized biotinylated molecules of these original compounds. Biotinylated compounds were immobilized on the surface of streptavidin coated magnetic beads and whole complex (magnetic bead-streptavidin-biotin-derivative) was incubated with total protein cell lysate of the CEM or U2OS (human osteosarcoma) cell line. Thereafter non-bonded proteins were washed-out and specifically bonded proteins were separated on 1D-SDS gel. Following silver-staining of the gel we compared sample lines with specifically bonded proteins to biotinylated compound and negative control. Specific proteins were cut off from the gel and trypsinized to get peptides for protein identification. For mass spectrometry analyses we used liquid chromatography (HPLC) coupled with ion trap and MALDI TOF/TOF. Identified targets are proteins associated with translational regulation, glucose metabolism and cytoskeleton. Identified proteins were validated by western blot and by other tests (cell models, kinase and enzymatic assays, evaluation in vitro transcription and translation).

The work was supported by grants: LC07017 and MSM6198959216. Infrastructural part of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational Programme Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030)

Prodrug formy triterpenů s protinádorovou aktivitou

**MUDr. Petr Džubák, Ph.D.¹,
Hana Vágnerová¹,
Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.¹,
Mgr. Petr Konečný¹,
Mgr. Jiří Řehulka¹,
Bc. Anna Janošťáková¹,
Adéla Gandaláková²,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.¹**

¹ Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

² Ústav lékařské chemie a biochemie, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci

Počet pacientů s nádorovým onemocněním se neustále zvyšuje. Léčba rakoviny je nesmírně náročná mimo jiné i proto, že cytostatika působí na organismus mnoha nežádoucími účinky. Proto je zájem vyvíjet a testovat nová účinnější a méně zatěžující protinádorová léčiva. Nežádoucím účinkům je možné předejít aplikací léčiv v jejich prodrug formě, kdy toxicitu limitujeme na cílové orgány a místa aktivace léčiv. V naší práci jsme se zaměřili na *in vitro* metabolizaci „prodrug formy“ derivátů kyseliny betulinové a následné stanovení jejich cytotoxicity na buněčné nádorové linii CEM (lidské lymfoblastické leukemie). Kyselina betulinová se řadí mezi triterpeny, u kterých byla nalezena vysoká cytotoxická aktivita vůči nádorovým buňkám. Proto probíhá aktivní snaha vyvíjet deriváty této sloučeniny s lepšími farmakologickými vlastnostmi – biologickou dostupností a vyšším terapeutickým účinkem. Jednou z možností je právě převedení derivátů kyseliny betulinové do prodrug formy. V našich experimentech jsme se snažili o optimalizaci testů na hepatocytech a nádorových liniích, které by nám umožnily studovat metabolizaci a následně i účinnost prodrugs. Po optimalizaci testů vykazovaly metabolizované deriváty v porovnání s nemetabolizovanými látkami vyšší cytotoxickou účinnost.

Projekt byl financován granty Ministerstva školství a tělovýchovy (MSM 6198959216, LC07017) a Grantové agentury České republiky (GACR 301/09/P433, 305/09/1216).

Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena z Operačního Programu Věda a Výzkum pro Inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Profilování

2-fenylsubstituované-3-hydroxychinolin-4(1H)-one-karboxamidů a jejich protinádorových účinků metodou průtokové cytometrie

Mgr. Petr Konečný¹,
MUDr. Petr Džubák, Ph.D.¹,
RNDr. Miroslav Soral, Ph.D.²,
doc. RNDr. Jan Hlaváč, Ph.D.²,
Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.¹,
Mgr. Gabriela Rylová¹,
MUDr. Petr Kocis, Ph.D.¹,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.¹

¹ Laboratoř experimentální medicíny,
Ústav molekulární a translační medicíny,
LF UP v Olomouci

² Katedra organické chemie,
Institut molekulární a translační medicíny,
LF UP v Olomouci

2-fenylsubstituované-3-hydroxychinolony jsou skupina látek vykazující antiprotozoální, imunosupresivní, protinádorové a další biologické účinky. V naší práci jsme se zaměřili na zájima-

vou skupinu těchto derivátů, 2-fenylsubstituované-3-hydroxychinolin-4(1H)-one-karboxamidy se submikromolární cytotoxicitou u různých chemosenzitivních/rezistentních nádorových buněčných linií s příznivým terapeutickým indexem. Látky mající hodnotu IC₅₀ < 10 mM vůči senzitivní buněčné linii CEM-T byly analyzovány metodami průtokové cytometrie, za účelem monitorování buněčného cyklu a syntézy DNA a RNA u testovaných nádorových linií. Tímto způsobem byly získány informace o zajímavých změnách monitorovaných účinků v návaznosti na strukturu těchto látek (SAR). Některé ze zkoumaných látek výrazně ovlivnily buněčný cyklus nádorových buněk nebo měly diferencovanou aktivitu vůči p53+/- nádorovým liniím a zdají se být slibné pro další vývoj.

Práce v tomto projektu byla podporována granty Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (MSM 6198959216, LC07017); a grantovou agenturou České republiky (GACR 301/09/P433, 305/09/1216). Infrastrukturální část projektu (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podporována z Operačního programu – Výzkum a vývoj pro inovace (CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

Selekce účinných 4-chinolonů s protinádorovou aktivitou a studium mechanismu jejich účinku

Mgr. Jiří Řehulka¹,
MUDr. Petr Džubák, Ph.D.¹,
Mgr. Ivo Frydrych, Ph.D.¹,
MUDr. Petr Krejčí³,

RNDr. Miroslav Soral, Ph.D.²,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.¹

¹ Laboratoř experimentální medicíny,
Ústav molekulární a translační medicíny,
Lékařská fakulta, Univerzita Palackého,
Olomouc

² Katedra organické chemie, Přírodovědecká
fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc

³ Farmak, a.s., Olomouc

4-chinolony jsou zajímavou skupinou biologicky aktivních látek s imunosupresivním a protinádorovým účinkem. S využitím kombinatoriální chemie byly připraveny substituované deriváty 4-chinolony a otestována jejich cytotoxicita vůči panelu nádorových i primárních buněčných linií *in vitro*. Analýza buněčného cyklu zjistila G2/M blok indukovaný látkou 06-0896. Pomocí fluorescenční mikroskopie byla prokázána akumulace nádorových buněk v M fázi buněčného cyklu. Jako cíl této látky byl identifikován proces polymerizace tubulinu. Sloučenina může být díky svému výhodnému terapeutickému indexu využita jako lead compound další knihovny látek a může být studován vztah mezi její chemickou strukturou a biologickou aktivitou.

Práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství ČR (MSM 6198959216, LC07017), operačního programu Výzkum a vývoj pro inovace (CZ.1.05/2.1.00/01.0030), evropského sociálního fondu (CZ.1.07/2.3.00/20.0009) a grantové agentury ČR (GA ČR 303/09/H048).

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS DIAGNOSTIKA NÁDORŮ, KLINICKO-PATOLOGICKÉ KORELACE I

Předsedající: R. Kodet, M. Hermanová – čtvrtek / 10. 11. 2011 / 10.00–11.30

High grade serous carcinoma of the ovary

Robert Soslow, M.D.

Memorial Sloan-Kettering Cancer Center,
New York, USA

High grade serous carcinoma of the ovary is now understood to be biologically, phenotypically and clinically heterogeneous. This lecture will review what is currently known about this topic and introduce those in attendance to new advances, with particular emphasis on the clinical features of BRCA-associated ovarian cancer and genotypic/phenotypic correlations.

Multiplicitní sarkomy u nemocného se syndromem Li-Fraumeni

prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.¹,

MUDr. Miroslava Frantlová¹,

MUDr. Ludmila Hornofová¹,

RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D.¹,

RNDr. Marcela Mrhalová, Ph.D.¹,

MUDr. Petr Škapa¹,

MUDr. Richard Paděra²,

doc. MUDr. Jiří Kozák, CSc.³,

MUDr. Alena Puchmajerová⁴,

MUDr. Anna Křepelová, CSc.⁴

¹ Ústav patologie a molekulární medicíny,
2. LF a FN Motol, Praha

² Dětská a dospělá ortopedie a traumatologie,
UK 2. LF a FN Motol, Praha

³ Dětská stomatologická klinika
UK 2. LF a FN Motol, Praha

⁴ Ústav biologie a lékařské genetiky,
2. lékařská fakulta UK v Praze
a Fakultní nemocnice v Motole Praha

Vrozené syndromy se zvýšeným rizikem vzniku nádorových onemocnění nejsou snadno diagnostikovatelné, zejména při rozpoznání prvního postižení v rodině. Jde o závažná onemocnění postihující většinou podstatně mladší věkové kategorie, než stejná onemocnění se sporadickým výskytem. Vrozené predispozice ke vzniku nádorů přispívají k rozvoji nádorů multiplicitních. Mnohotné nádory mohou být relativně stereotypní nebo různorodé nozolo-

gické kategorie. Patolog může včas upozornit na možný familiální nádorový syndrom a tím napomoci ke genetickému zařazení jednotky. Tím přispěje k dalšímu sledování nebo léčbě nemocného a jeho rodiny. Jednou z nejznámějších predispozic k rozvoji nádorů je syndrom Li-Fraumeni. Je charakterizovaný zárodečnými mutacemi genu TP53 s následným rodinným výskytem nádorů. Nádorová onemocnění jsou u tohoto syndromu různorodá. Častými jsou karcinomy mléčné žlázy, leukemie, karcinomy nadledviny, mozkové nádory a sarkomy.

Prezentujeme případ sedmnáctiletého muže se syndromem Li-Fraumeni s metachronním i synchronním výskytem čtyř různých sarkomů. První nádor jsme diagnostikovali v roce 1996 – osteogenní sarkom čelisti. Po devíti letech měl pacient druhostranné postižení čelisti chondrosarkomem. V roce 2010 jsme u nemocného diagnostikovali leiomyosarkom v měkkých tkáních stehna a zároveň alveolární rabdomyosarkom paranazálních dutin. Progresi posledního sarkomu z oblasti paranazálních dutin a nazofaryngu pacient v roce 2011 ve věku 32 let podlehl. Při diagnostice jednoho ze sarkomů jsme referovali nemocného a jeho rodinu ke genetickému vyšetření genu TP53. Na základě zjištěné mutace v zárodečné linii byl prokázán syndrom Li-Fraumeni. U alveolárního rabdomyosarkomu jsme nezjistili přestavby genů FKHR a PAX, což ukazuje na jiný patomechanismus vzniku rabdomyosarkomu v rámci syndromu Li-Fraumeni u tohoto nemocného. V přednášce dokumentujeme význam rozpoznání možného familiálního nádoru a nálezy u popsaného nemocného.

Podpořeno výzkumným záměrem
FN v Motole MZOFNM2005/6704 a výzkumným
záměrem 2. LF UK v Praze MSM0021620813.

Expresní analýza genů zapojených v patogenezi rabdomyosarkomů (RMS) a jejich využití pro sledování minimální diseminované nemoci

RNDr. Lenka Krsková, Ph.D.,

RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D.,

RNDr. Marcela Mrhalová, Ph.D.,

Bc. Irena Hilská,

Bc. Petra Šrahůlková,

Eva Langerová,

prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.

Ústav patologie a molekulární medicíny,
2. LF a FN Motol, Praha

Rabdomyosarkomy jsou nejčastějšími nádory měkkých tkání dětského věku. U dětí se vyskytují ve dvou základních variantách: alveolární (aRMS) a embryonální (eRMS).

Provedli jsme absolutní kvantifikaci fúzních genů (PAX3-FKHR a PAX7-FKHR) a genů zapojených do patogeneze RMS (MyoD1, Myogenin, Igf2, Egfr). Vyšetřili jsme 136 vzorků od 92 pacientů s diagnózou RMS a kontrolní skupinu vzorků. Detekce fúzních genů vyvolaných translokací představují vhodný marker pro sledování minimální diseminované nemoci, popř. okrajů excize u pacientů s fúzně pozitivním aRMS.

Mezi oběma skupinami RMS jsme nepozorovali signifikantní rozdíl v hladině exprese MyoD1a Myogeninu. Podobnou hladinu mRNA MyoD1 i Myogeninu jako u RMS jsme detekovali i ve zdravé svalové tkáni. Z tohoto důvodu jsme dospěli k závěru, že oba molekulární markery jsou nevhodné např. pro posouzení okrajů excize. Pozorovali jsme statisticky významnou závislost mezi hladinou MyoD1 mRNA a ztrátou heterozygoty v oblasti 11p15.

Naše výsledky detekce fúzních transkriptů, MyoD1 a Myogeninu v kostní dřeni pacientů s RMS ukazují, že pacienti s pozitivními nálezy mají vysoké riziko progresu onemocnění ($p=0,04$).

Sledovali jsme roli imprintovaného genu Igf2 v patogenezi RMS. Zjistili jsme, že exprese genu Igf2 hraje roli v patogenezi RMS. Hladina mRNA Igf2 byla u RMS signifikantně vyšší než u kontrolní skupiny ($p=0,0001$). Nepozorovali jsme rozdíl v hladině exprese Igf2 mezi eRMS a aRMS.

Zjistili jsme stonásobně vyšší hladinu Igf2 mRNA u RMS oproti zdravé svalové tkáni. Zjistili jsme vysokou hladinu Igf2 mRNA u RMS v korelaci s hladinou mRNA pro MyoD1 ($p=0,0008$) a pro Myogenin ($p=0,0009$). Tento nálezy je prav-

děpodobně způsoben tím, že MyoD1 a následně i Myogenin jsou cílovými geny IGF2 dráhy, a to jak u aRMS, tak i eRMS.

Hladina mRNA *EGFR* byla u RMS vyšší než u kontrolní skupiny ($p=0,0001$). Dále jsme pozorovali rozdíl v hladině exprese *EGFR* mezi oběma skupinami RMS ($p=0,03$) – vyšší hladina byla detekována u eRMS. Podobný obraz jsme pozorovali při imunohistochemickém barvení receptoru *EGFR*, kdy u eRMS dominovala silná difúzní pozitivita, na rozdíl od aRMS, kde přes pozitivitu mRNA *Egfr* jsme zvláště u fúzně pozitivních pacientů pozorovali negativní výsledky imunohistochemického barvení. U fúzně negativních pacientů s aRMS imunopozitivita kolísala, nicméně byl nález slabší než u embryonální varianty. Z dosažených výsledků sledování exprese genu *EGFR* je patrné, že u případů, u kterých je detekována silná exprese *EGFR* v imunohistochemickém vyšetření, lze této vlastnosti nádorových buněk využít k terapii pomocí inhibitorů *EGFR*, zvláště pak u pacientů, u kterých došlo k selhání léčby.

Výzkum byl podporován granty:

GAČR 304/07/0532, MŠMT 0021620813

a výzkumným projektem MZ FNMMZO2005.

Klinicko-patologické aspekty exprese nestinu v high-grade osteosarkomech

MUDr. Iva Zambo¹,

prof. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D.¹,

MUDr. Dagmar Adámková Krákorová²,

MUDr. Peter Múdry, Ph.D.³,

MUDr. Katerl Zitterbart, Ph.D.³,

MUDr. Michal Kyr³,

MUDr. Karel Veselý, Ph.D.¹,

prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D.³,

doc. RNDr. Renáta Veselská, Ph.D., M.Sc.^{3,4}

¹ I. patologicko-anatomický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně

² Klinika komplexní onkologické péče

Masarykova onkologického ústavu, Brno

³ Klinika dětské onkologie LF MU a FN Brno

⁴ Laboratoř nádorové biologie,

Ústav experimentální biologie PŘF MU, Brno

Úvod: Nestin patří mezi intermediální filamenta typu VI a je exprimován během embry-

geneze v proliferujících buňkách různých tkání, nejvíce v CNS, PNS a svalové tkáni. V průběhu diferenciace je nestin nahrazován jinými, tkáňově specifickými intermediálními filamenti, takže postnatálně je jeho exprese omezena pouze na některé lokalizace, např. plexus chorioideus, prekursorové buňky subventrikulární zóny CNS či progenitorové buňky vlasového folikulu. V adultních tkáních se s re-expresí nestinu setkáváme za různých patologických stavů, mimo jiné byla exprese nestinu prokázána v celé řadě tumorů převážně neuroektodermového původu, ale i v karcinomu prostaty, GISTu, karcinomu pankreatu, osteosarkomu, rhabdomyosarkomu, dermatofibrosarcoma protuberans, karcinomech štítné žlázy a uroteliálním karcinomu. V některých z výše jmenovaných malignit je nestin považován za marker nádorových kmenových buněk.

Cílem této práce bylo imunodekčními metodami vyšetřit expresi nestinu v high-grade osteosarkomech, zjistit případný vztah exprese nestinu s klinickými parametry (overall survival (OS) a event-free survival (EFS)) a tedy stanovit prognostický význam exprese nestinu pro pacienty s high-grade osteosarkomy.

Materiál a metody: V souboru 45 pacientů (24 mužů a 21 žen, věkové rozpětí 6–85 let) s histologicky prokázaným high-grade osteosarkomem jsme ve formol-parafinovém materiálu imunohistochemicky (IHC) a imunofluorescenčně (IF) vyšetřovali expresi nestinu v nádorových buňkách. Dle četnosti nestin+ buněk jsme stanovili 3 úrovně exprese nestinu (1–3 pro IHC a 1F–3F pro IF). Jako externí pozitivní kontrolu jsme použili tkáň multiformního glioblastomu, za interní pozitivní kontrolu sloužil endotel cév v osteosarkomu. Na základě získaných výsledků jsme statisticky hodnotili význam exprese nestinu s OS a EFS.

Výsledky: Pomocí obou imunodekčních metod (IHC a IF) byly nestin+ nádorové buňky identifikovány ve všech vzorcích high-grade osteosarkomů, i když se frekvence nesporně pozitivních neoplastických buněk v jednotlivých případech lišila. Vysoká úroveň exprese nestinu detekována imunofluorescenčně (2F + 3F) byla spojena se signifikantně horší prognózou, tedy kratším OS ($p=0,031$) i EFS ($p<0,001$). Při použití

imunohistochemie se však tato korelace nepodařila prokázat, pouze byly zaznamenány trendy ke kratšímu přežití.

Závěr: Pro pacienty s high-grade osteosarkomy nepovažujeme expresi nestinu za silný a v praxi využitelný prognostický faktor. Senzitivnější imunodekční metoda aplikovaná na formol-parafinový materiál (tedy IHC) neprokázala statisticky signifikantní vztah mezi expresí nestinu a přežitím.

Práce byla podpořena VZ MSM0021622415.

Statistika vrozených vývojových vad

MUDr. Fádí Fakhouri¹

MUDr. Jana Dvořáčková Ph.D., MIAC²

MUDr. Radoslava Tomanová¹

MUDr. Petr Buzrla¹

¹ Fakultní nemocnice Ostrava

² Lékařská fakulta Ostravské univerzity

Problematika vrozených vývojových vad patří k těm složitým v oboru patologicko-autopstické diagnostiky. V mé studii jsem se zaměřil na statistiku jejich výskytu u potracených plodů v období od roku 2000 do roku 2011. Celkem bylo klinem udáváno 109 potracených plodů pro vrozenou vývojovou vadu, z toho bylo skutečně prokázáno 100 malformovaných plodů celkem se 164 vrozenými vadami.

Tyto objekty jsem si vybral z počítačového nemocničního systému Ústavu patologie Fakultní nemocnice Ostrava. Některé tyto vrozené vady tvořily syndromologickou jednotku, další se vyskytovaly solitárně. Na základě provedené statistiky byly nejčastější vývojové vrozené vady v následujícím pořadí:

- VVV kardiiovaskulárního systému 19,5 %
- VVV centrální nervové soustavy 15,2 %
- VVV pohybového aparátu 12,1 %
- VVV močopohlavního systému 12,1 %
- Rozštěpové vývojové vady 8 %
- VVV dýchací soustavy 6 %
- VVV trávicí soustavy 5,5 %
- VVV spojené s geneticky podmíněnými syndromy 5 %

Závěrem bych Vás seznámil s několika neobvyklými kazuistikami.

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL CENTAURUS

RNA JAKO BIOMARKER

Předsedající: J. Drábek, O. Slabý – čtvrtek / 10. 11. 2011 / 10.30–12.00

Nekódující RNA u nádorových onemocnění

RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.^{1,2},

Mgr. Jiří Šána²,

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.¹,

prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.¹

¹ Masarykův onkologický ústav,

Klinika komplexní onkologické péče, Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický
institut, Masarykova univerzita, Brno

Existence netranslatovaných funkčních RNA je učebnicovou skutečností již desítky let, přičemž většina těchto RNA plní v buňce především generické funkce, jako rRNA a tRNA v translaci mRNA, malé jaderné RNA (snRNAs) v sestřihu, nebo malé jadérové RNA (snoRNAs) v modifikaci rRNA. Centrální dogma molekulární biologie vytvořené především na základě pozorování u jednoduchých organismů jako *Escherichia coli*, bylo takové, že RNA funguje především jako informační mezistupeň mezi sekvencí DNA („genem“) a proteinem, který kóduje. Předpokladem bylo, že naprostá většina genetické informace určující biologickou formu a fenotyp je vyjádřena proteiny. Jedním z největších překvapení moderní biologie bylo rozhodně zjištění, že lidský genom kóduje jenom přibližně 20,000 proteinů, což představuje méně než 2 % jeho celkového obsahu. Následně s příchodem celogenomových analytických přístupů a sekvenování nové generace (ENCODE project) bylo zjištěno, že 90 % genomu je aktivně transkribováno. Lidský transkriptom se tak ukázal daleko komplexnějším systémem než pouze souborem mRNA kódujících genů a jejich sestřihových variant, ale také množstvím transkriptů antisense, překrývajících se a jiných nekódujících RNA. Ačkoliv se nejdříve předpokládalo, že se jedná o transkripční šum nebo akumulovaný evoluční pozůstatek vytvořený počátečním skládáním genů a/nebo inzercí mobilních elementů, současné poznatky ukazují, že tato tak zvaná „dark matter“ genomu může hrát zásadní roli v buněčném vývoji, její fyziologii i patologiích. Obecně platí, čím komplexnější organizmus je, tím větší množství nekódující RNA obsahuje.

Nekódující RNA (ncRNA) se dělí na dvě základní skupiny na základě své délky: krát-

ké ncRNA (small ncRNAs) a dlouhé ncRNA (lncRNAs). Krátké nekódující RNA představují široké spektrum známých, ale rovněž nově popisovaných druhů RNA, přičemž většina těchto RNA je spojena s 5' a 3' koncovými oblastmi kódujících genů. Tato skupina zahrnuje dnes již velice dobře popsané miRNA, siRNA, piRNA a další. Většina těchto RNA významně rozšířila koncepci molekulární kancerogeneze, a v současné době je předmětem intenzivního výzkumu v této oblasti. Oproti tomu, lncRNA, jsou transkripty dosahující délky 200nt až 100 kb a neobsahující otevřené čtecí rámce. Hladiny exprese těchto RNA se ukazují být nižší než kódujících genů, a některé z nich jsou tkáňově specifické. Doposud malý počet charakterizovaných lncRNA u člověka byl asociován s biologickými procesy, jako jsou epigenetické regulace, alternativní sestřih, jaderný transport, strukturní funkce nebo jako prekursorů krátkých ncRNA nebo dokonce regulátory jejich degradace. Stále přibývající práce ukazují, že deregulace hladin lncRNA (HOTAIR, MALAT1, H19, T-UCR, a další) se vyskytuje u řady nádorových onemocnění a významně přispívá k jejich patogenezi. Toto sdělení bude shrnovat současný pohled na klasifikaci a funkční charakterizaci jednotlivých skupin ncRNA, jejich funkční zapojení do procesu kancerogeneze a možné využití v diagnostice, případně v terapii nádorových onemocnění.

Výzkum byl podpořen granty IGA MZ ČR NS 10361-3/2009, NS/9814-4/2008, NS 10352-3/2009, NS/11214-4/2010 a projektem MZ0MOU2005.

Možnosti detekce cirkulujících nádorových buněk

Mgr. Andrea Benedíková,

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.,

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.

Laboratoř experimentální medicíny,

Ústav molekulární a translační medicíny

LF UP a FN Olomouc

Jedním z klíčových faktorů pro stanovení prognózy a nejvhodnější léčby pro pacienta s nádorovým onemocněním je určení rozsahu neboli stupně pokročilosti nádorového onemocnění, tzv. staging. Současné

zobrazovací techniky (např. počítačová tomografie, magnetická rezonance, ultrazvuk, pozitronová emisní tomografie aj.), biochemické a mikroskopické metody však nemají dostatečnou citlivost pro zachycení časných stadií metastazování, tzv. ultrastagingu. Z toho plyne riziko nedostatečného stanovení rozsahu nemoci a neadekvátní léčby. V posledních letech se proto s rozvojem nových molekulárně-biologických metod soustřeďuje pozornost na možnosti detekce minimální reziduální choroby (minimal residual disease, MRD). Jedná se o detekci přítomnosti izolovaných nádorových buněk (tzv. cirkulujících nádorových buněk, circulating tumour cells, CTCs) v krvi, v kostní dřeni či ve tkáních, které lze na základě současných znalostí považovat za prekursorů mikrometastáz.

K detekci CTCs lze použít několika metodických postupů lišících se svojí senzitivitou, specifitou, nákladností i pracností. Vedle nyní již běžně využívaných metod, jako jsou imunohistochemie, průtoková cytometrie, PCR, real-time RT-PCR aj., jsou vyvíjeny metody nové, založené především na přímé detekci CTCs. Cílem těchto nových metod je zvýšení senzitivity zachytu CTCs, možnost rutinního využití a také možnost nádorové buňky izolovat a dále s nimi pracovat. Bylo by tak možné CTCs lépe charakterizovat, např. určit status genů HER2/neu, EGFR nebo KRAS. V současné době velmi diskutovaným je systém CellSearch firmy Veridex umožňující automatizovanou detekci a kvantifikaci CTCs. Vědci z Všeobecné nemocnice v Massachusetts vyvinuli tzv. CTC-chip. Jedná se o mikrofluidní platformu připevněnou na standardní mikroskopické sklíčko, ze které lze CTCs jednoduše získat a analyzovat či kultivovat. Další možností je využití metod založených na elektrických vlastnostech CTCs odlišných od ostatních buněk krve.

Ve sdělení bude prezentován přehled metod vhodných k detekci CTCs se zaměřením na perspektivy detekce minimální reziduální choroby.

Práce na tomto projektu je podporována granty MŠMT CZ1.07/2.3.00/09.0089, IGA MZ ČR NS 10285-3, CZ1.05/2.1.00/01.0030.

Studium mikroRNA u pacientů s kolorektálním karcinomem: identifikace biomarkerů a nových terapeutických cílů

Mgr. Petra Faltejsková¹,
Bc. Klára Šrůtová²,
Bc. Jitka Mlčochová²,
MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.¹,
Mgr. Lenka Radová, Ph.D.³,
MUDr. Radim Němeček¹,
Bc. Andrej Bešše¹,
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.¹,
RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.^{1,2}

¹ Masarykův onkologický ústav,
Klinika komplexní onkologické péče, Brno
² CEITEC, Masarykova univerzita, Brno
³ Laboratoř experimentální medicíny DK
FN a LF UP, Ústav molekulární a translační
medicíny LF UP, Olomouc
⁴ ACIU, Lékařská fakulta, MU Brno
⁵ Oddělení patologické fyziologie,
LF MU Brno

Kolorektální karcinom (CRC) patří mezi nejčastější nádorová onemocnění ve světě a je třetí nejčastější příčinou nádorových úmrtí v západních zemích. Přestože v současné době existuje řada preventivních programů usilujících o snížení incidence a následně i mortality, nemá výskyt CRC dosud klesající tendenci a vyléčit se daří pouze 35–40% nemocných. Hlavním důvodem těchto neuspokojivých výsledků je neschopnost současných diagnostických kritérií, jakými jsou histopatologická klasifikace, klinický rozsah onemocnění či míra diferenciací, zařadit pacienty do příslušných skupin na základě rizika relapsu onemocnění, a umožnit tak vytvoření individuálního léčebného plánu. Hlavním problémem současné TNM klasifikace je tzv. „understaging“ regionálních lymfatických uzlin (podhodnocení N stadia), ke kterému dochází v důsledku nedostatečného množství vyšetřených a/nebo odebraných uzlin. Dalším jejím nedostatkem je pak skutečnost, že nezahrnuje molekulární prediktory biologického chování nádoru.

Jedním z nejmodernějších přístupů současné molekulární charakterizace solidních nádorů je analýza mikroRNA (miRNA). MiRNA jsou krátké nekódující jednořetězcové RNA o délce 18–25 nukleotidů, které posttranskripčně regulují genovou expresi. Hrají důležitou roli v mnoha biologických procesech, jakými jsou apoptóza, proliferace, diferenciací, buněčný cyklus či léková rezistence. Současné studie prokázaly rozdílnou expresi některých miRNA

mezi nádorovou tkání a zdravou stěvnou sliznicí a zároveň poukazují na vysoký potenciál těchto molekul rozlišit nádorovou tkáň podle histopatologických, prediktivních a prognostických charakteristik.

Hlavním cílem studie bylo analyzovat expresní profily 667 miRNA metodou kvantitativní Real-Time PCR arrays u 63 důkladně klinicky charakterizovaných pacientů s kolorektálním karcinomem. S použitím moderních biostatistických metod bylo identifikováno 25 miRNA s rozdílnou expresí mezi nádorovou tkání a nenádorovým stěvným epitelem ($P < 0,0001$) a dále bylo nalezeno 5 miRNA schopných odlišit nádory II a III klinického stadia ($P < 0,01$). Takto identifikované miRNA byla následně validována na nezávislém souboru 125 pacientů s CRC pomocí qRT-PCR, přičemž byly analyzována jejich nádorová a paralelní nenádorová tkáň. Validace potvrdila významně snížené hladiny miR-378 ($P < 0,0001$), miR422a ($P < 0,0001$), miR-375 ($P < 0,0001$), miR-451 ($P < 0,0001$), miR-378* ($P < 0,0001$), miR-215 ($P < 0,0001$), miR-145 ($P = 0,037$), miR-195 ($P = 0,0032$) a miR1395p ($P = 0,0002$) a významně zvýšenou hladinu miR-135b ($P < 0,0001$) a miR31 ($P < 0,0001$) v nádorové tkáni. Zároveň byla pozorována rozdílná exprese miR-422a ($P = 0,0117$), miR-135b ($P = 0,0303$) a miR-215 ($P = 0,0188$) u pacientů bez postižení a s postižením regionálních lymfatických uzlin. Vliv těchto miRNA na viabilitu buněk, apoptózu, buněčný cyklus a migraci byl testován in vitro s využitím transienční transfekce syntetického prekurzoru či inhibitoru příslušné miRNA do buněčné linie HCT-116. Výsledky studie budou součástí našeho sdělení.

*Práce byla podpořena grantem
IGA MZ NS/9814-4/2008
a výzkumným záměrem MZMOU2005.*

Využití DNA microarrays v predikci odpovědi na glukokortikoidní terapii u pacientů s ALL

MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.^{1,2},
MUDr. Michaela Špenerová^{1,2},
doc. MUDr. Dagmar Pospíšilová, Ph.D.²,
MUDr. Zbyněk Novák²,
Mgr. Vladimíra Koudeláková¹,
Bc. Michaela Sedláčková¹,
Mgr. Lenka Radová, Ph.D.¹,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.¹,
prof. MUDr. Jan Starý, DrSc.³,
MUDr. Bohumír Blažek⁴,

MUDr. Jiří Hak⁵,
MUDr. Zdeňka Černá⁶,
MUDr. Pavel Timr⁷,
prof. MUDr. Emília Kaiserová, CSc.⁸,
doc. MUDr. Eva Bubanská, CSc.⁹,
prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.^{1,2}
¹ Laboratoř experimentální medicíny DK
FN a LF UP, Ústav molekulární a translační
medicíny LF UP, Olomouc
² Dětská klinika LF UP a FN Olomouc
³ Klinika dětské hematologie a onkologie
2. LF UK a FN Motol
⁴ Oddělení dětské hematologie a hemato-
onkologie Kliniky dětského lékařství
FN Ostrava
⁵ Dětská klinika FN Hradec Králové
⁶ Dětská klinika FN Plzeň
⁷ Dětská klinika
Nemocnice České Budějovice a.s.
⁸ Onkologická klinika DFNSP Bratislava
⁹ Dětské onkocentrum
NsP F. D. Roosevelta Banská Bystrica

Úvod: Cílem předkládané studie je predikce odpovědi na terapii glukokortikoidy u dětí s akutní lymfoblastickou leukémií. Metoda DNA microarrays umožňuje stanovit míru genové exprese všech genů lidského organismu, v dnešní době tedy kolem 23 tisíc genů. Metoda dále umožňuje stanovit, které varianty genu jsou exprimovány, dále dokáže analyzovat genové polymorfismy či chromozomální mikropřestavby.

Metodika: Fenol-chloroformovou metodou byla izolována RNA ze vzorků kostní dřeně v 0. den léčby pacientů s ALL po inkubaci lymfoblastů s prednisonem a/nebo dexamethasonem v rámci testu chemorezistence (MTT). Po izolaci byla provedena DNA microarrays analýza pomocí GeneChip Human Exon 1.0 ST Array (Affymetrix). Následně bylo provedeno statistické vyhodnocení dat za použití freeware „R“ a Bioconductor.

Výsledky: Byla provedena mikročipová analýza u 11 pacientů s ALL (5 poor prednisolone responders, 6 good prednisolone responders). Bylo identifikováno celkem 557 rozdílně exprimovaných genů ($p < 0,00001$, $\log_{2}FC < -2$ nebo $\log_{2}FC > 2$), které predikují odpověď na indukci glukokortikoidy. Za využití exonových analýz bylo identifikováno 113 rozdílně exprimovaných exonů ($p < 0,00000000001$ or $\log_{2}FC < -2$ or $\log_{2}FC > 2$) na základě clearance blastů. Dále byla identifikována exprese různých variant genu PBX1 (pre-B-cell leukemia homeobox 1; NM_002585) u prednisolon rezistentních pacientů. Budou

prezentovány přínosy a perspektivy metody DNA microarrays v možnostech individualizace terapie dětí s ALL.

Závěr: Metoda DNA microarrays umožňuje identifikovat profily genové exprese vztahující se k chemorezistenci pacienta nejenom na glukokortikoidy. Projekt umožňuje díky korelacím

s *in vitro* odpovědí buněk v rámci MTT testu eliminovat interindividuální variabilitu v metabolismu, farmakokinetice, farmakogenetice a vylučování cytostatik v podmínkách *in vivo*. Budeme-li schopni predikovat chemorezistenci na glukokortikoidy, můžeme návazně individualizovat kortikosteroidní terapii u dětí s ALL s cílem

zlepšit léčebné výsledky anebo minimalizovat nežádoucí účinky léčby.

Práce na tomto projektu je podporována granty

CZ.1.07/2.3.00/09.0089, CZ.1.05/2.1.00/01.0030, EHP CZ 0099 a IGA MZ ČR NS 9939.

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS GIST – OD MOLEKUL K PACIENTOVÍ

Předsedající: B. Melichar, J. Škarda – čtvrtek / 10. 11. 2011 / 11.45–13.00

Contemporary GIST Pathology

Bernadette Liegl-Atzwanger,

Institute of Pathology,

Medical University of Graz, Graz, Austria

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are the most common mesenchymal tumors of the GI tract. Within only one decade GISTs have emerged from being poorly defined, treatment-resistant tumors to a well recognized, well understood, and treatable tumor entity. The understanding of GIST biology has made this tumor a paradigm for molecularly targeted therapy in solid tumors and provides informative insights into the advantages and limitations of so-called targeted therapeutics.

The vast majority of GISTs harbour a KIT or PDGFRA mutation. These mutations are an early event in GIST development, and the oncoproteins serve as a target for the small-molecule tyrosine kinase inhibitors imatinib and sunitinib. The ability to inhibit the active KIT or PDGFRA kinase with tyrosine kinase inhibitors (TKI) and alternative drugs demands more than ever accurate tumor classification and risk assessment. Although, KIT immunohistochemistry is a reliable diagnostic tool in the diagnosis of GIST, KIT-negative GISTs, GISTs showing unusual morphology as well as GISTs which progress during or after treatment with imatinib/sunitinib can be a challenge for pathologists and clinicians. The talk will focus on GIST pathogenesis, morphologic evaluation, immunohistochemical markers, risk assessment, the role of molecular analysis, and the increasing problem of secondary imatinib resistance and its mechanisms.

Medical therapy

of gastrointestinal stromal tumors

prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.

Klinika onkologie a radioterapie

LF UP a FN Olomouc

Historically, gastrointestinal stromal tumors (GIST) were resistant to cytotoxic agents, recurrence rate after surgery for primary tumor was high, and patients with metastatic GIST had dismal prognosis. Today, the therapy of gastrointestinal stromal tumors may serve as an example of success of multidisciplinary approach in the therapy of malignant disorders. A significant progress in the therapy of metastatic GIST was obtained with the use of molecular targeted therapy (imatinib and sunitinib). The median survival of patients with metastatic GIST was prolonged by several years. The advent of targeted therapy also resulted in improved possibilities of surgical intervention, and imatinib is currently registered in the adjuvant setting and is used also in neoadjuvant indication. While first- and second-line therapy of metastatic GIST is well defined, the search of an effective third-line option for patients failing imatinib and sunitinib is ongoing. The research in the adjuvant setting concentrates on optimal duration of adjuvant imatinib therapy. Close collaboration between surgical and medical oncologist as well as the concentration of patients with this rare tumor to specialized centers are of fundamental importance for optimal therapy and outcome.

Mutační analýza pacientů s GIST

Mgr. Mária Janíková

Ústav klinické a molekulární patologie

LF UP a FN Olomouc

Gastrointestinální stromální tumory (GIST) jsou jedny z nejčastějších mezenchymových nádorů gastrointestinálního traktu. Většinou jsou lokalizovány v žaludku, pak v tenkém střevě, v tlustém střevě a v konečníku. Malé procento se vyskytuje i v jícnu, mezenteriu, omentu, retroperitoneu a v malé pánvi. Jejich přítomnost je pozorována jak u mužů, tak i u žen různých věkových kategorií. Jsou vysoce rezistentní ke konvenční chemoterapii a radioterapii. GIST vznikají z intersticiálních Cajalových buněk (ICC) nebo se vyvíjejí z mezenchymových prekurzorů společných pro ICCs a buňky hladké svaloviny. Rozdělují se do tří morfologických kategorií: epiteloidní nádory, nádory z vřetenitých buněk a nádory smíšené. U GIST často dochází k aktivním mutacím genů tyrozin-kinázových receptorů v 75–80% c-KIT (CD117) a u 5–10% případů PDGFRA (platelet-derived growth factor receptor alpha). Podle přítomnosti a lokalizace mutací v daných genech je možné predikovat odpověď pacientů na léčbu nízkomolekulárním tyrozin-kinázovým inhibitorem imatinibem. Pacienti s mutací v exonu 11 genu c-KIT by měli dobře odpovídat na léčbu imatinibem, pacientům s mutací v exonu 9 je potřeba zvýšit dávku na dvojnásobek (800 mg). Pacienti s GIST mající mutaci D842V v exonu 18 genu PDGFRA jsou přirozeně rezistentní na imatinib. Tyto poznatky mají velký význam pro rozhodování o vhodné léčbě, a proto se u pacientů s GIST v současnosti zjišťují molekulárně-genetické profily genů c-KIT a PDGFRA.

Materiál a metody: V naší laboratoři jsme doposud vyšetřili 6 pacientů s GIST lokalizovanými v žaludku a 3 vzorků z GIST jícnu. Z parafinových bloků jsme izolovali genomickou DNA. Specifické fragmenty vybraných exonů jsme amplifikovali pomocí PCR (polymerase chain

reaction) a přesnou mutaci jsme určili sekvenováním.

Výsledky: U dvou pacientů jsme identifikovali mutaci v exonu 9 genu c-KIT (p.Y503_

F504insAY), u dvou v exonu 11 téhož genu (p.W557_K558del, p.V559D) a u jednoho tzv. tichou mutaci v exonu 12 genu PDGFRA (p.V824V).

Diskuze a závěr: Identifikace mutací genů c-KIT a PDGFRA je užitečným nástrojem pro rozhodování o vhodné léčbě pacientů s GIST.

PŘEDNÁŠKA VĚNOVANÁ R. KOŽOUSKOVÍ

Předsedající: L. Plank, Z. Kolář – čtvrtek / 10. 11. 2011 / 14.00–14.30

The Future of Pathology in Personalized Health Care

Mary Padilla, M.D.

Roche Tissue Diagnostics

Barcelona, Spain

Pathologists have critical roles to play as personalized health care evolves. Personalized health care will require interpretation of companion diagnostic and prognostic assays, integration of molecular data with more traditional pathology and clinical data, and efficient communication of the results to patients and clinicians. Sophisticated molecular tests and new technologies will require assay standardization, quality assurance (QA) and quality control

(QC) initiatives, as well as sample quality and pre-analytical standardization. Biomarker and translational diagnostics research among and between academia and industry will elaborate novel markers, better assays for existing targets, and novel technologies. These new tools will determine if the patient needs treatment or not, whether the therapeutic approach should be aggressive or conservative, and the likely course of the disease – aggressive or indolent – in the absence of therapy. Companion diagnostic biomarkers will elaborate which specific therapies will be effective or ineffective, and whether a tumor is likely to exhibit primary or acquired resistance to a particular therapy in an individual patient. Ultimately, this information will deter-

mine the right drug or drug combination for the right patient. The effective application of personalized healthcare most certainly will become more complex as we learn more about tumor molecular biology. Detection of tumor-based mutations will be particularly important in the identification of molecular subsets of cancer patients responsive to specific targeted therapies, including combination therapies. Pathologists have significant opportunities to play a central and critical role as drivers of personalized healthcare via the delivery of tumor profiling information critical for therapy decisions, and to actively pursue new roles, responsibilities and technologies for the benefit of patients in the era of personalized healthcare.

DIAGNOSTIKA NÁDORŮ, KLINICKO-PATOLOGICKÉ KORELACE II

Předsedající: L. Plank, M. Tichý – čtvrtek / 10. 11. 2011 / 14.30–16.10

Deciphering tumor suppressive and tumor promoting functions of NF-κB

Dr. Eli Pikarsky

Immunology and Cancer Research

Hebrew University Faculty of Medicine's

Department of Pathology, Jerusalem, Israel

Hepatocellular carcinoma (HCC) is a major cause of cancer mortality, commonly developing in the background of chronic inflammation. Nuclear factor-kappa B (NF-κB) is a transcription factor which has a major role as an anti-apoptotic regulator. Upregulation of NF-κB was shown to be important for tumor development in various stages. However, the role of NF-κB in tumorigenesis is more complex than anticipated, as in some models NF-κB inhibition blocks tumor development, whereas in others it facilitates tumorigenesis. These opposing actions of NF-κB, even in a particular organ system, hinder the implementation of NF-κB inhibition in human studies. It is therefore important to decipher the pathogenetic mechanisms that underlie these opposing outcomes.

We found that constitutively activating NF-κB in mouse hepatocytes induced spontaneous tumors in aged mice and accelerated chemical carcinogenesis. Examination of the livers of these mice revealed tertiary lymphoid aggregates harboring atypical hepatocytes already at 3 months of age. These aggregates grew in number and size and the atypical hepatocytes gradually formed tumors. Staining the atypical hepatocytes showed they were highly proliferative and expressed markers typical of transformed hepatocytes. We found a strong activation of the non-canonical NF-κB pathway and of the lymphotoxin pathway. Based on this data we hypothesize that long-term NF-κB activation induces hepatocytes to release chemokines that attract the inflammatory cells into the liver. Release of lymphotoxin by these activated inflammatory cells leads to strong activation of the non-canonical NF-κB pathway and to the formation of lymphoid bodies, forming a favorable environment for transformed hepatocytes to proliferate and progress to HCC. As it is well known that chronic hepatitis C infection induces prolonged NF-κB activation, it

is possible that the same sequence of events underlies the protumorigenic effect of this liver disease in humans.

So how can NF-κB suppress tumorigenesis? Using mice in which we can genetically block NF-κB in an inducible and reversible mode, we timed the window of the NF-κB tumor suppressive effect during DEN-induced tumorigenesis to the period of acute carcinogen response. The liver response to DEN involves a temporary NF-κB-dependent DNA damage response and a subsequent long term cell cycle arrest, a likely barrier against tumor formation. This cascade following DEN injection did not occur upon NF-κB inhibition in transgenic animals. Our results demonstrate a new role for NF-κB in the regulation of DNA repair and suggest that the tumor suppressive role of NF-κB is mediated via this ability. Taken together, these results not only resolve the conundrum regarding the role of NF-κB in carcinogenesis, but also suggest that NF-κB based therapeutics should be efficacious and safe in cancer patients.

Význam a limity vyšetrenia nádorovej infiltrácie v stagingových biopsiách kostnej drene pri difúznom veľkobunkovom B-lymfóme

MUDr. Tomáš Balhárek, PhD.^{1,2},

Barbora Beblavá¹,

MUDr. Peter Szépe, CSc.^{1,2},

MUDr. Juraj Marcinek, PhD.^{1,2},

Ing. Zuzana Kvietková^{1,2},

prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc.^{1,2}

¹ Ústav patologickej anatómie a Konzultačné centrum biptickej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a UNM, Martin

² Martinské biopické centrum, s.r.o., Martin

Difúzny veľkobunkový B-lymfóm (DLBCL) je najčastejším typom malígneho lymfómu u nás. V skutočnosti ide o heterogénnu skupinu agresívnych non-Hodgkinových lymfómov B-pôvodu (B-NHL) zahŕňajúcich rôzne varianty, podskupiny a klinicko-patologické podtypy, z ktorých niektoré sú podľa SZO klasifikácie nádorov hemopoetického a lymfoidného tkaniva (2008) akceptované ako samostatné entity. Heterogenitu DLBCL

ďalej akcentuje fakt, že môžu vzniknúť v tkanive lymfatických uzlín (nodálne) alebo mimo nich (extranodálne), a to buď ako primárne (de novo) alebo sekundárne, tj. vznikajúce transformáciou nízkomalígneho B-NHL. Medzi jednotlivými podskupinami možno očakávať biologické a aj klinické rozdiely. Štandardnou súčasťou klinického manažmentu pacientov s DLBCL je stagingová biopsia kostnej drene (KD) v pred- a postterapeutickéj fáze. Infiltrácia KD sa vyskytuje cca v 20 % prípadov DLBCL, pričom môže mať podobu konkordantnej blastické alebo diskordantnej malobunkovej infiltrácie. Malobunková nádorová infiltrácia supponuje postihnutie KD primárnym malobunkovým B-NHL. Infiltrácia KD je pri DLBCL negatívnym prognostickým faktorom, pričom blastická infiltrácia ovplyvňuje prežívanie pacientov nezávisle na medzinárodnom prognostickom indexe (IPI). Analýzou 100 prípadov nodálnych a 107 prípadov extranodálnych DLBCL, bližšie netylizovateľných (NOS), sme medzi sledovanými podskupinami zaznamenali signifikantné rozdiely v tendencii k postihu KD. Nodálne DLBCL vykazovali infiltráciu KD v 25 % prípadov (25/100), pričom vo väčšine z nich (n=20) išlo o konkordantnú blastickú infiltráciu. Naproti tomu, extranodálne DLBCL vykazovali postih KD len v 11 % prípadov (12/107), pričom takmer vo všetkých prípadoch (n=11) išlo o diskordantnú malobunkovú infiltráciu. S diagnostikou diskordantnej malobunkovej infiltrácie KD pri DLBCL sa však spája niekoľko praktických problémov. V prvom rade ide o určenie nenádorovej (reaktívnej) alebo nádorovej povahy prítomnej malobunkovej lymfoproliferácie, čo býva obzvlášť problematické v prípadoch málo rozsiahlych infiltrátov, častokrát s prímiesou početných T-lymfocytov. Druhým problémom je určenie klonálnej príbuznosti DLBCL a nádorovej malobunkovej B-lymfoproliferácie, ktorá je podľa literárnych údajov dokázateľná len v cca 50 % prípadov. Bez dostupnej molekulovo-genetickej analýzy hrozí relatívne vysoké riziko pod- alebo naopak naddiagnotikovania malobunkovej lymfoproliferácie v stagingovej biopsii KD, čo môže ovplyvniť terapeutický manažment pacienta.

Podporené projektom Centrum excelencie CEPV I (IMTS 26220120016), CEPV II (IMTS 26220120036) a MBRKM (IMTS 26220220113).

Současná léčba mění obraz nehdgkinových B lymfomů v biopsiích kostní dřeně

MUDr. Jan Stříteský,

MUDr. Zuzana Velenská,

Jana Špačková

Ústav patologie, 1. LF UK a VFN, Praha

Trepanobiopsie kostní dřeně jako základní vyšetření při vstupním stagingu, při restagingu po léčbě i při dlouhodobém sledování nemocných s maligními lymfoproliferacemi, spolurozhoduje o léčbě a prognóze nemocných. Široké terapeutické používání protilátek anti-CD20 u nehdgkinových B lymfomů nezdědka vede k výskytu CD20-negativních B-buněk v kostní dřeně.

Rozhodování mezi kompletní a parciální remisí nádoru závisí na rozlišení reziduální nádorové infiltrace a nenádorových změn vyvolaných léčbou. Nález lymfoidních infiltrátů s vysokou převahou buněk CD20+/CD79a+ nebo CD20-/CD79a+ nad buňkami CD3+ nečiní při stanovení diagnózy reziduálního lymfomu potíže. Problematická není diagnóza nenádorových reziduí po léčbě B-lymfomů v případech infiltrátů, tvořených prakticky jen buňkami CD3 pozitivními. Obtížné je stanovení diagnózy při nálezů malého, ale nezanedbatelného množství buněk CD20+/CD79a+ nebo CD20-/CD79a+.

Alespoň v části diagnosticky obtížných trepanobiopsií kostní dřeně po léčbě lymfomů je přínosné použití vhodného panelu imunohistochemicky vyšetřovaných antigenů, zejména CD5, CD10, CD23, cyklinu D1, bcl-2, CD138, kappa, lambda. Spolehlivost vyšetření se zvyšuje srovnáním s výsledkem průtokové cytometrie. Význam morfologického a podrobnějšího imunohistochemického vyšetření se zvyšuje u nálezů, které z technických důvodů mohou uniknout vyšetření průtokovou cytometrií, např. u paratrabekulárních lymfoidních infiltrátů, u intertrabekulárních infiltrátů na pozadí retikulární fibrózy nebo u infiltrátů plazmocytárních.

*Práce podpořena výzkumným záměrem
MŠMT ČR VZ MSM 0021620808.*

Molekulární diagnostika pacientů s anaplastickým velkobuněčným lymfomem ALK pozitivním

RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D.

Bc. Irena Hilská,

RNDr. Marcela Mrhalová, Ph.D.,

prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.

Ústav patologie a molekulární medicíny
2. LF UK Praha a FN Motol, Praha

Anaplastický velkobuněčný lymfom (ALCL) patří do skupiny T lymfomů s expresí cytokinového receptoru CD30. V případě ALK pozitivního ALCL dochází k patologické aktivaci onkogenu ALK ležícím na 2p23 (gen anaplastic lymphoma kinase). Je způsobena chromozomální translokací, při které vznikají fúzní geny s různými translokačními partnery. Nejčastěji nacházíme translokaci t(2;5), kdy dochází k fúzi s genem NPM (gen pro nukleofosmin).

Cílem práce byla detekce nejčastějšího fúzního genu NPM/ALK. Dále bylo u pacientů bez prokázané fúze NPM/ALK provedeno následné hledání translokačního partnera genu ALK pomocí metody 5' RACE. Poté byla zavedena kvalitativní, resp. kvantitativní PCR k detekci dané variantní translokace pro ověření fúzního produktu. Také jsme zavedli kvantitativní detekci exprese translokované části genu ALK (3'ALK), která slouží nejen k diagnostice ALK pozitivních ALCL, ale také ke sledování minimální reziduální nemoci. Výsledky jsme porovnávali s výsledky imunohistochemického průkazu (IHC) exprese proteinu ALK a jeho lokalizace v buňce a dále s výsledky fluorescenční in situ hybridizace na interfázických jádrech (I-FISH).

Celkem jsme vyšetřili 41 pacientů s ALCL (4-80 let; medián 17 let) s IHC prokázanou expresí proteinu ALK. U 39 pacientů bylo provedeno vyšetření zlomu chromozomu 2, oblasti 2p23, pomocí I-FISH a ve všech případech byl detekován zlom.

V naší skupině pacientů jsme ve 31/41 případech detekovali fúzní gen NPM/ALK (76%), ve 3 případech fúzní gen ATIC/ALK (fúze s genem kódujícím 5-aminoimidazole-4-carboximide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase), ve dvou případech fúzní gen CLTC/ALK (fúze s genem kódujícím clathrin heavy chain), 1x jsme detekovali fúzní gen TPM4/ALK, resp. fúzní gen TPM3/ALK, resp. fúzní gen ALO17/ALK (fúze s geny pro tropomyosin 4, resp. 3, resp. gen ALK lymphoma oligomerization partner on chromosome 17). U 2 pacientů NPM/ALK negativních, ALK pozitivních jsme neměli dostatek materiálu (RNA) pro následné vyšetření metodou 5' RACE. U všech vyšetřených pacientů (40/41) jsme detekovali vysokou hladinu exprese translokované části genu ALK s mediánem 30153 kopií.

Korelace nálezů fúzních genů s imunohistochemickým obrazem ukázala v případě fúze NPM/ALK v 70% jadernou a cytoplazmatickou pozitivitu, u pacientů s fúzí CLTC/ALK byla detekována jasně granulózní cytoplazmatická pozitivita a ostatní variantní translokace nesly difúzní cytoplazmatickou pozitivitu proteinu ALK.

Molekulární diagnostika umožňuje detekovat translokační partnery genu ALK u ALK pozitivního ALCL. Zavedení kvantitativní detekce exprese translokované části genu ALK nám slouží jak k diagnostice ALK pozitivních ALCL, tak převážně ke sledování minimální reziduální nemoci. Posouzení vlivu jednotlivých translokací na klinický průběh onemocnění vyžaduje klinickou studii, která by v rámci mezinárodní spolupráce přispěla k rozšíření souboru pacientů s vzácným onemocněním ALK pozitivního ALCL.

*Podporováno projekty: MSM 0021620813
a MZO FNM 2005/6704.*

Prognostic factors in multiple myeloma

MUDr. Jana Marečková¹,

prof. MUDr. Jiří Ehrmann, CSc.¹,

prof. MUDr. Vladimír Študla, CSc.²,

Pravomila Abrahamová¹

¹ Department of Clinical and Molecular Pathology, Laboratory of Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

² 3rd Internal Clinic, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc, University Hospital Olomouc

Introduction: Multiple myeloma is a malignant neoplasm originating in plasma cells. It is frequently associated with poor prognosis and characterized by the production of a monoclonal immunoglobulin called the M component. Multiple myeloma (MM) is connected to a number of chromosomal abnormalities, in most cases IgH translocation with FGFR3, CCND1, CCND2, CCND3, c-MAF in early stages. Further chromosomal changes appear with the progression of the disease the most frequent of which are monoallelic deletion or monosomy of chromosome 13, trisomies of chromosome 8, 9, 15 and many others. It has also been revealed that some proteins controlling cell the cycle and apoptosis (p53, p16, FGFR3, cyclin D 1, 2, 3, Bcl-2, caspase 3, 8, 9) seem to play an important role during MM pathogenesis and progression. However, there are no reliable data on their prognostic significance in the various stages of disease (monoclonal gammopathy of uncertain significance – MGUS, smouldering MM and advanced MM). Therefore the aim of this pilot study was analysis of expression of these proteins in various stages of MM and potentially extend the panel of prognostic markers which allows differentiation of the above-mentioned disease stages.

Materials and methods: Bone marrow from 35 patients treated by the same chemotherapy protocol (VAD) and autologous transplantation were used. Standard indirect immunohistochemistry on formalin fixed, paraffin-embedded sections was used for the detection of p53, p16, FGFR3, cyclin D 1, 2, 3, Bcl-2, caspase 3, 8, 9 using a high temperature epitope retrieval technique. Immunohistochemical staining was evaluated by a semi-quantitative method using a histoscore which is the multiplication of positivity by intensity of staining. Intensity of staining was scored as weak (1), moderate (2) or strong (3) while positivity of staining was assessed as percentage of tumour cells.

Results: Bone marrow samples of patients in advanced stages of MM showed high expression of Bcl-2 in tumor cells, in contrast to those in remission which showed weak or no positivity for Bcl-2. p53 and p16 were completely negative. Caspase 8 was negative in most cases. However, we detected a few caspase 8 positive cells in patients in remission. Caspase 9 was negative in biopsies taken before treatment but we detected several caspase 9 positive cells in patients after treatment.

Conclusions: Based on decreased Bcl-2 expression in patients in remission, these preliminary data suggest that detection of low Bcl-2 expression in bioptic samples of MM might be used as positive prognostic factor. Negativity of p16 can be explained by hypermethylation which leads to p16 deactivation. Mutation of p53 is probably infrequent in multiple myeloma but the mechanism of its impaired function needs further study.

cobas® Onkologické prediktivní testy

Firemní symposium

Roche Česká republika,

MUDr. Igor Blanárik

Roche, Česká republika

Firma Roche uvedla v srpnu 2011 na trh testy pomáhající cílené personalizované zdravotní péči tím, že poskytují informaci o rozdílech na molekulární úrovni, která napomáhá rozhodnutí o způsobu léčby. Jedná se o testy cobas® BRAF Mutation Test, cobas® KRAS Mutation Test a cobas® EGFR Mutation Test, který bude uveden na trh v prosinci 2011. Testy jsou určeny pro automatický real time PCR analyzátor cobas® 4800 System, v.2.0 a vyšší.

Pro tyto testy byla vyvinuta izolační souprava cobas® DNA Sample Preparation Kit, která je vysoce účinná pro izolaci DNA z tkáňových vzorků fixovaných ve formalínu a archivovaných v parafrinových blocích. Pro získání dostatečného množství DNA postačují parafrinové řezy tloušťky 5 um.

BRAF V600 mutační test byl vyvinut společně s vemurafenibem (Zelboraf Roche), BRAF inhibitorem u metastazujícího melanomu. BRAF protein je součástí RAS-RAF (MAP kináza) signální cesty, která kontroluje buněčný růst. Když BRAF zmutuje, může způsobit rychlý, nekontrolovaný růst buněk, jehož výsledkem je karcinom. V600 BRAF mutace byla indetifikována jako nejčastější BRAF mutace a je asociována se špatnou prognózou u některých karcinomů. Cobas BRAF mutační test stanoví, zda-li pacient má BRAF V600

mutaci. Pacienti s BRAF V600 mutací mohou benefitovat z léčby BRAF inhibitory, jako je vemurafenibem (Zelboraf Roche). Test pracuje na principu TaqMan PCR a má senzitivitu vyšší než 5%.

KRAS mutace jsou asociovány s nepřítomností odpovědi na léčbu anti-EGFR monoklonálními protilátkami u kolorektálního karcinomu. Cobas KRAS mutační test je určen ke stanovení mutačního stavu onkogenu KRAS. Kolorektální karcinomy s KRAS mutací neodpovídají na léčbu monoklonálními anti-EGFR protilátkami. Tato informace může pomoci lékaři identifikovat pacienty s kolorektálním karcinomem, kteří nebudou odpovídat na tuto léčbu. Test pracuje na principu TaqMelt PCR, pokrývá 19 mutací v kodonech 12, 13 a 61 a má senzitivitu vyšší než 5%.

EGFR mutace jsou asociovány s lepší odpovědí na Tyrozinkinázové inhibitory (TKI), Tarceva (Roche) a Iressa (AstraZeneca) u nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC). Cobas EGFR mutační test pomůže identifikovat pacienty s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC), kteří by měli odpovídat na léčbu anti-EGFR TKI. Test pracuje na principu alelické specifické PCR, pokrývá 43 mutací v exonech 18, 19, 20, 21 a má senzitivitu vyšší než 5%.

Společnými vlastnostmi všech onkologických testů cobas je rychlost provedení – výsledky jsou generovány za méně než 8 hodin, přesnost a správnost – mají vysokou senzitivitu a specifitu, spolehlivost – shodný pracovní postup, jednoduchá integrace do laboratoře a automatizace – automatická PCR, automatická interpretace a výdej výsledků.

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL CENTAURUS BIOMARKERY V DIAGNOSTICE II.

Předsedající: J. Srovnal, K. Bouchalová – čtvrtek / 10. 11. 2011 / 15.00–17.00

Identifikace molekulárně genetických změn spojených s relapsem u glioblastoma multiforme

Mgr. Magdalena Kneblová¹,
Mgr. Vladimíra Koudeláková¹,
RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.¹,
MUDr. Ondřej Kalita, Ph.D.²,
Bc. Dana Cahová,
Mgr. Lenka Radová, Ph.D.¹,
RNDr. Božena Braunerová¹,
Soňa Mlčochová¹,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.¹

¹ Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci

² Neurochirurgická klinika, Lékařská fakulta Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci

Glioblastoma multiforme (GBM) je nejčastějším a nejzhoubnějším gliálním nádorem u dospělých. Špatná prognóza tohoto onemocnění se pojí s krátkou dobou přežití pacientů. Ani veškerá dostupná léčba zahrnující resekci nádoru, radioterapii a chemoterapii obvykle neprodlouží dobu přežití pacienta na více než 12 měsíců. U minoritní skupiny pacientů dochází k prodloužení doby přežívání a následně i k relapsu GBM. Přestože je současný výzkum intenzivně orientován na optimalizaci léčebného režimu rekurentních GBM, problematika molekulárně genetických změn souvisejících s relapsem u těchto gliálních nádorů je dosud nejasná.

Cílem naší práce je proto identifikace molekulárně genetických změn u párových vzorků GBM a jejich recidiv. Do pilotní studie bylo vybráno 15 pacientů (11 mužů, 4 ženy, průměrný věk v době diagnózy 54 let, průměrná doba celkového přežití od doby diagnózy 680 dnů), u nichž byly analyzovány párové vzorky tkání jak po první operaci, tak po relapsu, metodou fluorescenční in situ hybridizace na parařinových řezech tkání. Byla vybrána kontrolní skupina 87 pacientů bez relapsu (52 mužů, 35 žen, průměrný věk v době diagnózy 63 let, průměrná doba přežití od doby dia-

gnózy 110 dnů). Zkoumány byly geny EGFR, p53, RB1, C-MYC, N-MYC, CCND1, MDM2, BCR, chromozomální oblasti – 1p36.3, 9p21.3, 19q13 a chromozomy – 7, 8, 10, 11, 13. Status genu EGFR byl hodnocen jako amplifikovaný v případech, že poměr EGFR:CEP7 byl >2.0 (obdobně pro C-MYC/CEP8, CCND1/CEP11, RB1/CEP13). Ostatní cytogenetické markery, chromozomální oblasti a chromozomy byly hodnoceny jako „high copy number – HCN“ („polysomie“)/ „low copy number – LCN“, když byl průměrný počet kopií >2.5 / <1.8.

Předběžná statistická hodnocení ukazují na význam genu C-MYC, a také chromozomu 7, jejichž statut byl u kontrolní skupiny pacientů bez relapsu amplifikovaný resp. zvýšený na rozdíl od pacientů s relapsem, kde se statut obou cytogenetických markerů ukázal při první operaci i relapsu fyziologický. Význam sledovaných cytogenetických markerů při relapsu onemocnění nebyl zatím nalezen. Plánované vyšetření těchto tkání metodou DNA microarray by mohlo ukázat na význam jiných molekulárně genetických markerů. Studium a popis molekulárně genetických změn vznikajících při progresi a relapsu GBM může např. objasnit podstatu biologického chování GBM po předchozí komplexní léčbě, po níž mohou molekulárně genetické změny vyvolené selektivním tlakem terapie vést ke vzniku rezistence vůči léčbě.

Poděkování za podporu výzkumu patří grantům: MPO Tip FR-TI1/525 (561100011), MSM6198959216.

Expresce miR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 a metylační status MGMT promotoru koreluje s klinickou odpovědí u pacientů s multiformním glioblastomem

Mgr. Jiří Šána¹,
Bc. Simona Hankeová²,
MUDr. Radek Lakomý^{1,2},
MUDr. Eva Lžičarová³,
MUDr. Leoš Křen, Ph.D.⁴,
MUDr. Pavel Fadrus, Ph.D.⁵,
prof. MUDr. Martin Smrčka, Ph.D., MBA⁵,
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.¹,
RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.^{1,2}

¹ Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno
² CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno
³ Masarykův onkologický ústav, Oddělení onkologické a experimentální patologie, Brno
⁴ Patologicko-anatomický ústav, FN Brno
⁵ Neurochirurgická klinika, FN Brno

Multiformní glioblastom (GBM) je nejčastěji se vyskytující malignita astrocytárního původu postihující mozkovou tkáň. I přes dostupné terapie je prognóza u pacientů velmi špatná s mediánem přežití 12–15 měsíců od stanovení diagnózy, což GBM řadí mezi nejvíce letální nádory. O6-metylguanin-DNA metyltransferáza (MGMT) je protein s reparační aktivitou specificky odstraňující promutagení alkylové skupiny z pozice O6 na guaninu. Takto tento protein částečně přispívá k rezistenci nádorových buněk k alkylačním činidlům, jakým je například temozolomid (TMZ) rutinně používaný v terapii GBM. V posledních dvou letech bylo s úspěchem provedeno několik studií zaměřených na prediktivní význam metylace promotorové oblasti genu MGMT v léčbě TMZ. V této studii jsme validovali uvedená pozorování, analyzovali metylační status MGMT pomocí metody high resolution melting (HRM) a rozšířili je o kvantitativní analýzu osmi vybraných mikroRNA (miR-21, miR-128a, miR-181c, miR-195, miR-196a, miR-196b, miR-221, and miR-222), které byly již dříve popsány v souvislosti s GBM. MikroRNA jsou nekódující jednořetězcové RNA o délce 18–25 nukleotidů, které se významně podílejí na posttranskripční regulaci genové exprese a jejichž deregulace byla potvrzena jako jedna z kauzálních událostí v kancerogenezi mnoha nádorových onemocnění. Do studie jsme zařadili 38 pacientů s histopatologicky diagnostikovaným GBM podstupujících chirurgický zákrok na Neurochirurgické klinice FN Brno a konkomitantní chemoradioterapii s temozolomidem (RT/TMZ) na Masarykově onkologickém ústavu v Brně. Metylační status MGMT promotoru koreloval s dobou do progresu (PFS) (P=0.0201; log-rank test) i s celkovou dobou přežití (OS) (P=0.0054; log-rank test). MiR-195 (P=0.0124; log-rank test) a miR-196b (P=0.0492; log-rank test) pozitivně korelovali s OS. Hladiny miR-181c v kom-

binaci s miR-21 umožnili identifikovat pacienty s agresivní formou onemocnění, u kterých došlo k relapsu onemocnění do 6 měsíců od zahájení léčby, s 92 % senzitivitou a 81 % specificitou. Předpokládáme proto, že kombinovaná analýza miR-181c a miR-21 by mohla vést k identifikaci pacientů s vysokým rizikem časného relapsu a následně umožnit intenzifikaci jejich léčby.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NS/11214-4/2010, výzkumným záměrem MZMOU2005 a projektem "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropských regionálních rozvojových zdrojů.

Detekce metylace v promotoru genů MLH1 a MLH3 metodou high resolution melting (HRM)

Pavel Procházka¹,

Nina Stojceva¹,

Jana Slyšková^{1,2},

Veronika Poláková^{1,2},

Pavel Vodička^{1,2}

¹ Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.

² Ústav biologie a lékařské genetiky,

1. LF UK Praha

Kolorektální karcinom (CRC) představuje druhý nejčastější nádor ve vyspělých zemích. Celosvětová incidence a mortalita CRC byla k roku 2008 stanovena na 1 230 000 nových případů a 608 000 úmrtí. Incidence CRC v České republice je 91,2 případů na 100 000 mužů a 60,2 případů na 100 000 žen. Incidence CRC rok od roku narůstá. CRC se ve většině případů (90 %) vyskytuje sporadicky a ve vyšším věku (50 let a více). Přibližně 5–10 % případů zahrnuje dědičnou formu CRC s možným časnějším výskytem (pod 45 let).

Velký význam v etiopatogeneze a vzniku CRC mají defekty v mechanismech oprav DNA. Jedním z těchto mechanismů jsou opravy chybného párování bází řízené metylací (mismatch repair, MMR). MMR je důležitá pro opravu chyb, které vznikají při replikaci DNA. Defekty v genech MMR představují vysoké riziko pro vznik tzv. Lynch syndromu a jsou charakteristické nestabilitou mikrosatelitů (MSI). Mikrosatelity jsou krátké repetitivní sekvence vyskytující se po celém lidském genomu. Změny v jejich délce mohou mít za následek aberantní transkripci významných genů (např. nádorové supresory a receptory pro růstové faktory). Je zajímavé, že MSI bývá nalézána v 13–28 % případech sporadického CRC z důvodu inaktivace MMR genů, a to buď prostřednictvím somatických mutací

nebo epigenetické inaktivace. Nejrozšířenější epigenetické mechanismy ovlivňující genovou expresi představují kovalentní modifikaci histonů a změny v metylaci DNA. Tyto epigenetické modifikace jsou vratné, ale mohou se rovněž přenášet během buněčného dělení na dceřiné buňky. Právě epigenetické umlčování genů pomocí aberantní metylace promotorů DNA, vedoucí k utlumení nebo úplnému zablokování transkripce příslušného genu, je důležitým mechanismem kancerogeneze, zcela srovnatelným s mutací v genu. Hypermetylace CpG ostrovů promotoru genu MLH1 (homolog MMR genu mutL u *E. coli*) byla identifikována jako příčina pro vývoj většiny gastrointestinálních nádorů s MSI.

V naší práci jsme se zaměřili na studium metylace promotorů MMR genů MLH1 a MLH3. Od každého pacienta s diagnostikovaným CRC, zahrnutého ve studii, jsme měli k dispozici nádorovou a zdravou tkáň. Metodou MSP (methylation-specific PCR) jsme pak v těchto tkáních vyšetřili metylační status. Pro ověření výsledků jsme zavedli novou velmi citlivou metodu založenou na post-PCR analýze produktů pomocí tání DNA (high resolution melting, HRM). Metoda HRM využitá a optimalizovaná pro detekci metylace (methylation-sensitive HRM, MS-HRM) umožňuje detekci metylace až na 0,1 % hladině. U vzorků určených metodou MSP jako nemetylované jsme našli shodu i při použití metody MS-HRM. U vzorků určených metodou MSP jako částečně nebo silně metylovaných jsme metodou MS-HRM našli shodu u vzorků se silnou metylací. Dle kalibrační křivky takové vzorky odpovídají přibližně 60–90 % metylaci daného promotoru. V naší studii jsme se rovněž pokusili korelovat metylační status v MMR genech s dostupnými klinicko-patologickými údaji.

Hypermetylace promotorů nádorových supresorových genů byly korelovány s metylačním statusem u mnoha různých druhů rakoviny. Epigenetické změny mohou způsobit další genetické změny a tím posílit progresi nádoru. Identifikace konkrétních hypermetylovaných (následkem je snížená transkripce) nebo hypometylovaných (následkem je zvýšená transkripce) genů může vést k objevu nových faktorů, které jsou významné pro zahájení a progresi nádoru. Domníváme se, že po podrobném následném studiu metylačního statutu promotorů MLH1 a MLH3 by tyto geny mohly být zvoleny jako potenciální epigenetické biomarkery CRC. V rámci naší studie bychom rádi rovněž stanovovali mR-NA hladiny MMR genů a expresi MMR proteinů.

*Podpora: CZ:GA CR: GA P304/11/P715
a CZ:GA CR: GA 310/07/1430.*

ALK rearrangement u nemalobuněčného karcinomu plic – první zkušenosti

Mgr. Vladimíra Koudeláková¹,

Mgr. Magdalena Kneblová¹,

RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.¹,

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.²,

prof. MUDr. Vítězslav Kolek, DrSc.³,

Soňa Mičochová¹,

doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.¹

¹ Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a FN Olomouc

² Laboratoř molekulární patologie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a FN Olomouc

³ Klinika plicních nemocí a tuberkulózy, Lékařská fakulta Univerzity Palackého a FN Olomouc

U nemalobuněčného karcinomu plic (NSCLC) je v současné době vyšetřováno několik molekulárně genetických markerů, které určují prognózu a predikují účinnost zvoleného léčebného režimu. Mezi nejvýznamnější markery patří EGFR, K-RAS, ALK a C-MET. Vyšetřování mutací genu EGFR je součástí rutinní diagnostiky a je velkým přínosem pro léčbu pacientů inhibitory tyrosinkináz (TKI; erlotinib, gefitinib). Význam vyššího počtu kopií genu EGFR pro predikci dobré léčebné odpovědi na TKI je v literatuře stále diskutován, jednotlivé studie se navzájem popírají.

Naopak nedávný objev translokace genu ALK vedl jednoznačně k velkému zlepšení prognózy části pacientů s NSCLC. Gen ALK leží v oblasti 2p23 a u 2–7 % pacientů s NSCLC byla nalezena chromozomální přestavba za vzniku fúzního genu EML4 (méně často TFG; KIF5B)-ALK. Díky této fúzi dochází k expresi fúzního proteinu s konstitutivně aktivní ALK kinázovou doménou, což vede k aktivaci PI3K-AKT a MAPK-ERK signální dráhy a rozvoji plicního karcinomu. Pro léčbu pacientů s pokročilým, ALK pozitivním NSCLC byl v září 2011 schválen preparát Crizotinib (Xalcori, Pfizer), jehož efekt byl v klinickém testování jednoznačně potvrzen. Pacienti s ALK přestavbou jsou typicky nekuřáci, bez současné EGFR či K-RAS mutace. Nejčastější podtyp NSCLC s výskytem ALK přestavby je adenokarcinom.

Pro diagnostiku mutace ALK je doporučeno FISH stanovení pomocí break apart sondy. Na cytogenetickém pracovišti Laboratoře experimentální medicíny je diagnostika ALK přestaveb zavedena od března 2011. Do dnešního dne bylo vyšetřeno 120 pacientů s NSCLC. Přestavba genu

ALK byla nalezena u 4 (3,3 %) z nich. Ve všech případech šlo o pacienty s adenokarcinomem, bez EGFR mutace a s fyziologickým počtem kopií genu EGFR. U 19 % případů (23/120) nebylo možné pomocí FISH ALK gen vyšetřit. U 18 % případů (22/120) byl nalezen zvýšený počet kopií genu ALK (průměrný počet kopií $\geq 2,5$), který je asociovaný se zvýšeným počtem kopií/amplifikací genu EGFR. Význam této aberace dosud není objasněn.

Tato práce je podporována granty MSM6198959216 a MPO Tip FR-TII/525.

Vliv mutací *PIK3CA* na přežití patientek s karcinomem prsu

MUDr. Magdalena Čížková^{1,2},
Aurélié Susini, M.Sc.¹,
Sophie Vacher, M.Sc.¹,
Géraldine Cizeron-Clairac, Ph.D.¹,
Catherine Andrieu¹,
Keltouma Driouch, Ph.D.¹,
Emmanuelle Fourme, M.D.³,
Rosette Lidereau, Ph.D.¹,
Ivan Bièche, Ph.D.¹

¹ Laboratoire d'Oncogénétique,
Institut Curie, Hôpital René Huguenin,
St-Cloud, France

² Laboratoř experimentální medicíny,
Institut molekulární a translační medicíny,
LF UP a FN Olomouc

³ Département d'Epidémiologie Clinique,
Institut Curie, Hôpital René Huguenin,
St-Cloud, France

Úvod: *PIK3CA* je onkogen, který vykazuje u karcinomu prsu nejvyšší výskyt aktivačních mutací s frekvencí 20–40 % případů. V literatuře byly popsány soubory s dobrou i špatnou prognózou ve vztahu k mutacím genu *PIK3CA*, proto prognostický vliv těchto mutací však zůstává nejistý.

Metodika: Na souboru 452 patientek s unilaterálním primárně invazivním karcinomem prsu, u nichž je známý dlouhodobý vývoj nemoci (medián doby sledování 10 let), byly vyšetřeny mutace *PIK3CA* a zhodnocen jejich vliv na přežití patientek.

Výsledky: Mutace genu *PIK3CA* byly nalezeny u 151 nádorů (33,4 %). Frekvence mutací se výrazně lišila ve vztahu k expresi hormonálních receptorů (HR, tedy ER α a PR) a ERBB2. Nejvyšší výskyt mutací byl v podskupině triple negativního karcinomu prsu (ER-/PR-/ERBB2-) ve 12,5 % a nejvyšší v podskupině HR+/ERBB2- ve 41,1 %. Mutace *PIK3CA* byly asociovány s výrazně delším přežitím bez metastáz (metastasis-free

survival) v celém souboru ($P=0,0056$) a zvláště pak v podskupinách nádorů s pozitivitou PR ($P=0,0064$) a ERBB2 ($P=0,014$). Multivariátní regresní analýza potvrdila nezávislý prognostický vliv mutací *PIK3CA* na přežití patientek v případě ERBB2+ podskupiny nádorů.

Závěr: Tato studie potvrdila častý výskyt mutací genu *PIK3CA* u karcinomu prsu. Mutace *PIK3CA* by se mohly stát užitečným nádorovým markerem, který by mohl pomáhat při výběru vhodné léčby pro pacientky s ohledem na jejich prognostickou předpověď. Nezávislý prognostický vliv těchto mutací by však měl být v případě ERBB2+ nádorů prsu potvrzen na větším prospektivním souboru patientek.

The influence of factors associated with primary ovarian cancer and its treatment on disease-free and overall survival

MUDr. Vít Martin Matějka¹,
doc. MUDr. Jindřich Finek, Ph.D.¹,
MUDr. Tomáš Svoboda, Ph.D.¹,
doc. MUDr. Luboš Holubec, CSc.¹,
Ing. Stanislav Kormunda¹,
prof. MUDr. Ondřej Topolčan, CSc.²

¹ Department of Oncology and Radiotherapy,
University Hospital, Pilsen

² Department of Nuclear Medicine, University Hospital, Pilsen

The aim of the study: To describe the role of the main factors associated with primary ovarian cancer (staging, grading, and histological type) and its treatment (surgery type and the influence of the residual tumour, type and regimen of chemotherapy and inclusion of radiation therapy in the primary treatment together with routine tumour markers) for disease-free and overall survival.

Methods: We included patients treated for primary ovarian cancer between January 1997 and June 2003 with a median of follow up (OS) of more than 4 years. The median age was 56.2 (range 17.3–87.9) years. The total number of women was 263. We also assessed the routine tumour markers CA-125, CA 19-9 and CA 72-4 at regular intervals.

Results: The risk of recurrence was 4-fold higher and risk of death 4.2-fold higher for patients with stage II, III, and IV, disease in comparison with stage I; 2.2-fold higher, resp. 3.1-fold higher risks for grade 2, 3 and 4 tumours in comparison with grade 1; and 1.8-fold higher risks for patients aged more than 60 years in comparison with the population under 60 years

of age. The same situation was seen in patients with non-radical surgery. We did not find any differences between chemotherapeutic regimens. Only the preoperative value of CA-125 has some kind of prognostic significance with a better outcome for patients with cut-off levels above 280 IU/mL (HR 2.13; 95 % CI 1.28–3.53). It has no impact during the next course of the disease; the survival is the same even in the group of those who were treated early (following the raise of CA125) as far as when the next line of chemotherapy was delayed at the time of the clinically confirmed recurrence or symptoms.

Conclusions: Surgery and probably radiation therapy have the greatest impact on DFS and OS in women with ovarian cancer. The uses of tumour markers (CA125) have some role prior to surgery only with no impact on the next course of the disease.

Supported by the research project VZMŠM 0021620819 and by the grant IGA MZCR NS 10258.

Triple negative breast carcinoma (TNBC) – challenge for translational oncology: our results of chromosome 17 and BCL2 protein assessment

MUDr. Kateřina Bouchalová, Ph.D.¹,
Mgr. Magdaléna Čížková^{1,2},
RNDr. Radek Trojanec, Ph.D.¹,
Mgr. Vladimíra Koudeláková¹,
Soňa Mlčochová¹,
Mgr. Lenka Radová, Ph.D.¹,
prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.²,
MUDr. Karel Cwiertka, Ph.D.²,
Kharaishvili Gvantsa, M.D.³,
prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.³,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.¹

¹ Laboratory of Experimental Medicine,
Institute of Molecular and Translational
Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry,
Palacky University and University Hospital, Olomouc

² Oncology Clinic, Faculty of Medicine and Dentistry,
Palacky University and Faculty Hospital, Olomouc

³ Laboratory of Molecular Pathology,
Department of Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry,
Palacky University and Faculty Hospital, Olomouc

Introduction: Triple negative breast carcinoma (TNBC) represents 10–17 % of all breast carcinoma. TNBC, characterized by absence of ER (estrogen receptor), PR (progesterone recep-



EGFR M⁺

1. linie léčby pokročilého NSCLC u pacientů s EGFR M⁺

**IRESSA® v monoterapii prokázala významně vyšší účinnost*
oproti kombinované chemoterapii v 1. linii léčby
pokročilého NSCLC u pacientů s EGFR M⁺1-3**

EGFR M⁺ (pozitivní mutace receptoru pro epidermální růstový faktor)
* v parametru progression free survival (PFS)

IRESSA®
gefitinib

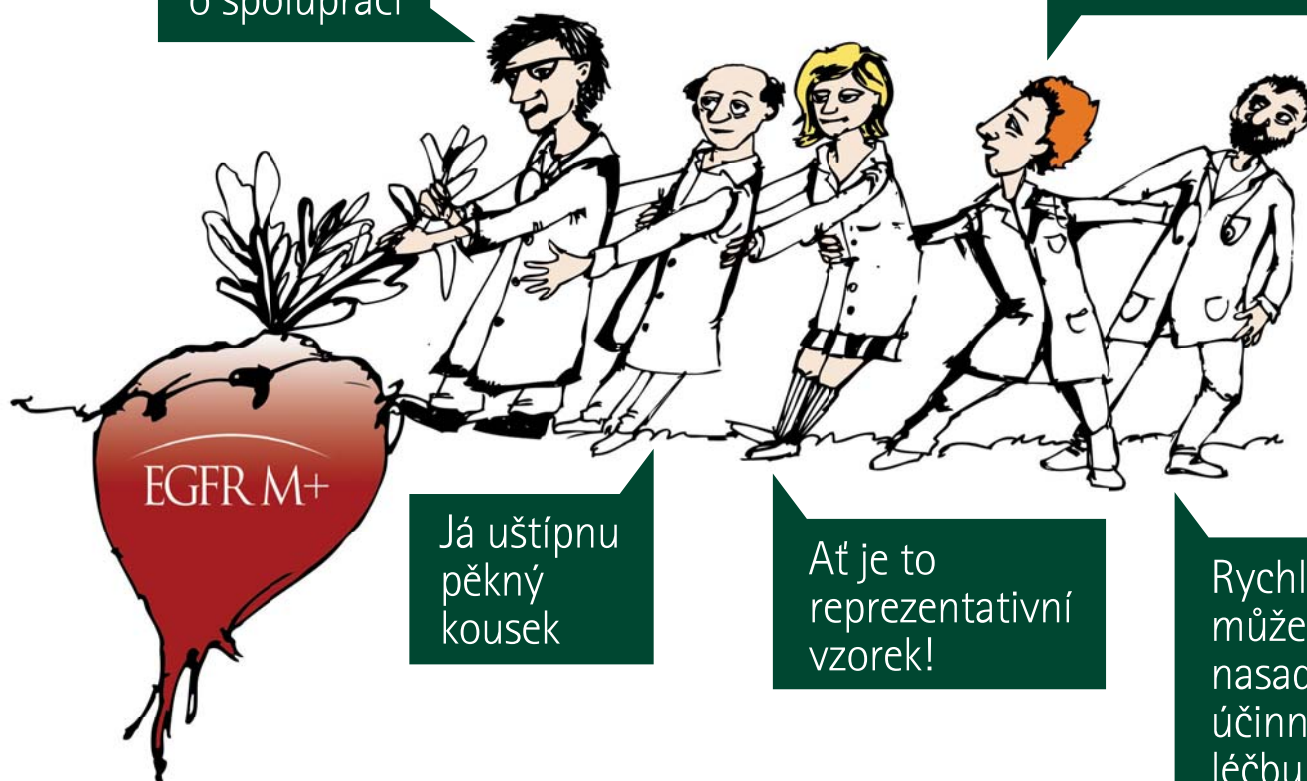
Zkrácená informace o přípravku Iressa®: **Léčivá látka:** gefitinibum. **Indikace:** IRESSA je indikována k léčbě dospělých pacientů s lokálně pokročilým nebo metastazujícím nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) s aktivními mutacemi EGFR-TK. **Dávkování:** Jedna 250 mg tableta jednou denně. Bezpečnost a účinnost přípravku nebyla u dětí a adolescentů hodnocena. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku tohoto přípravku. **Kojení:** **Interakce:** Současné podávání s účinnými inhibitory CYP3A4 může zvýšit plazmatické koncentrace gefitinibu, které může být klinicky relevantní. Zvýšení může být vyšší u jednotlivých pacientů s genotypem pomalých metabolizátorů vázaných na CYP2D6. Látky indukující aktivitu CYP3A4 mohou zvyšovat metabolismus a snižovat plazmatické koncentrace gefitinibu a tím snižovat účinnost přípravku IRESSA, proto by jejich podávání mělo být vyloučeno. U některých pacientů užívajících warfarin současně s gefitinibem bylo zaznamenáno zvýšení INR a/nebo výskyt krvácení. **Zvláštní upozornění:** Pacienti se středně závažným až závažným poškozením jater v důsledku jaterní cirhózy mají zvýšené plazmatické koncentrace gefitinibu. Pokud dojde u pacientů ke zhoršení respiračních symptomů jako je dyspnoe, kašel a horečka, podávání přípravku IRESSA je třeba přerušit a pacient by měl být rychle vyšetřen. Byly hlášeny jednotlivé případy GIT perforace u pacientů s existujícími rizikovými faktory. IRESSA nemá žádný nebo má zanedbatelný vliv na schopnost řídit nebo obsluhovat stroje. **Nežádoucí účinky:** Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky jsou průjem a kožní nežádoucí účinky (zahrnující vyrážku, akné, suchou kůži a svědění). Další hlášené nežádoucí účinky jsou nechutenství, zvracení, slabost, krvácení (např. krvácení z nosu a krev v moči), intersticiální plicní nemoc, změny jaterních parametrů (zvýšení ALT, AST a celkového bilirubinu), proteinurie a alopecie. **Těhotenství a kojení:** Ženy ve fertilním věku musí být poučeny, že v průběhu léčby nesmí otěhotnět. IRESSA by neměla být podávána během těhotenství, pokud to není nezbytné. IRESSA je kontraindikována v průběhu kojení. Kojení je nutné přerušit v průběhu léčby přípravkem IRESSA. **Balení přípravku:** 30 potahovaných tablet v jednom balení. **Uchovávání:** Uchovávejte v původním obalu, aby byl přípravek chráněn před vlhkostí. **Držitel registrace:** AstraZeneca AB, S-151 85, Södertälje, Švédsko. **Registrační čísla:** EU/1/09/526/001, EU/1/09/526/002. **Datum revize textu:** 2. 8. 2011. **Referenční číslo dokumentu:** 02082011API. Registrovaná ochranná známka IRESSA je majetkem AstraZeneca plc. © AstraZeneca 2011. **Výdej přípravku je vázán na lékařský předpis a je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění.** Úplnou informaci pro preskripci naleznete na adrese: AstraZeneca Czech Republic s.r.o., Smíchov Gate – Prague, Plzeňská 3217/16, 150 00 Praha 5, tel. 222 807 111, www.astrazeneca.cz.

Reference:

1. Mok TS et al. New Engl J Med 2009; 361(10): 947–957.
2. Maemondo M et al. N Engl J Med 2010; 362: 2380–2388.
3. Mitsudomi T et al. Lancet Oncol 2010; 11: 121–128.

Prosím Vás
o spolupráci

Prosím o dostatek
kvalitní DNA!



Já uštípnu
pěkný
kousek

Ať je to
reprezentativní
vzorek!

Rychle, ať
můžeme
nasadit
účinnou
léčbu

Rychlost a kvalitní spolupráce dává šanci

IRESSA
gefitinib

Zkrácená informace o přípravku Iressa®: Léčivá látka: gefitinibum. **Indikace:** IRESSA je indikována k léčbě dospělých pacientů s lokálně pokročilým nebo metastazujícím nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC) s aktivačními mutacemi EGFR-TK. **Dávkování:** Jedna 250 mg tableta jednou denně. Bezpečnost a účinnost přípravku nebyla u dětí a adolescentů hodnocena. **Kontraindikace:** Hypersenzitivita na léčivou látku nebo na kteroukoli pomocnou látku tohoto přípravku. **Kojení:** **Interakce:** Současné podávání s účinnými inhibitory CYP3A4 může zvýšit plazmatické koncentrace gefitinibu, které může být klinicky relevantní. Zvýšení může být vyšší u jednotlivých pacientů s genotypem pomalých metabolizátorů vázaných na CYP2D6. Látky indukující aktivitu CYP3A4 mohou zvyšovat metabolismus a snižovat plazmatické koncentrace gefitinibu a tím snižovat účinnost přípravku IRESSA, proto by jejich podávání mělo být vyloučeno. U některých pacientů užívajících warfarin současně s gefitinibem bylo zaznamenáno zvýšení INR a/nebo výskyt krvácení. **Zvláštní upozornění:** Pacienti se středně závažným až závažným poškozením jater v důsledku jaterní cirhózy mají zvýšené plazmatické koncentrace gefitinibu. Pokud dojde u pacientů ke zhoršení respiračních symptomů jako je dyspnoe, kašel a horečka, podávání přípravku IRESSA je třeba přerušit a pacient by měl být rychle vyšetřen. Byly hlášeny jednotlivé případy GIT perforace u pacientů s existujícími rizikovými faktory. IRESSA nemá žádný nebo má zanedbatelný vliv na schopnost řídit nebo obsluhovat stroje. **Nežádoucí účinky:** Nejčastěji hlášené nežádoucí účinky jsou průjem a kožní nežádoucí účinky (zahrnující vyrážku, akné, suchou kůži a svědění). Další hlášené nežádoucí účinky jsou nechutenství, zvracení, slabost, krvácení (např. krvácení z nosu a krev v moči), intersticiální plicní nemoc, změny jaterních parametrů (zvýšení ALT, AST a celkového bilirubinu), proteinurie a alopecie. **Těhotenství a kojení:** Ženy ve fertilním věku musí být poučeny, že v průběhu léčby nesmí otěhotnět. IRESSA by neměla být podávána během těhotenství, pokud to není nezbytné. IRESSA je kontraindikována v průběhu kojení. Kojení je nutné přerušit v průběhu léčby přípravkem IRESSA. **Balení přípravku:** 30 potahovaných tablet v jednom balení. **Uchovávání:** Uchovávejte v původním obalu, aby byl přípravek chráněn před vlhkostí. **Držitel registrace:** AstraZeneca AB, S-151 85, Södertälje, Švédsko. **Registrační čísla:** EU/1/09/526/001, EU/1/09/526/002. **Datum revize textu:** 2. 8. 2011. **Referenční číslo dokumentu:** 02082011API. Registrovaná ochranná známka IRESSA je majetkem AstraZeneca plc. © AstraZeneca 2011. **Výdej přípravku je vázán na lékařský předpis a je hrazen z prostředků veřejného zdravotního pojištění.** Úplnou informaci pro preskripci naleznete na adrese: AstraZeneca Czech Republic s.r.o., Smíchov Gate – Prague, Plzeňská 3217/16, 150 00 Praha 5, tel. 222 807 111, www.astrazeneca.cz.

Reference:

1. Mok TS et al. New Engl J Med 2009; 361(10): 947–957.
2. Maemondo M et al. N Engl J Med 2010; 362: 2380–2388.
3. Mitsudomi T et al. Lancet Oncol 2010; 11: 121–128.

EGFR M+ pozitivní mutace receptoru pro epidermální růstový faktor

AstraZeneca
Oncology

tor) and HER2 expression, are very aggressive tumors with poor prognosis. They more frequently affect younger patients (<50 years), are more prevalent in African-American women, often present as interval cancers, initially are highly chemosensitive, but are significantly more aggressive than tumors pertaining to other molecular subgroups. This aggressiveness is best illustrated by the fact that the peak risk of recurrence is between the first and third years and the majority of deaths occur in the first 5 years following therapy. The majority of TNBC are high-grade invasive ductal carcinomas of no special type, metaplastic and medullary carcinomas. TNBC patients cannot benefit from

treatment based on ER, PR and HER2. Other markers are sought.

Materials and methods: Results from our TNBC study (chromosome 17 by fluorescent in situ hybridization, FISH, BCL2 protein by immunohistochemistry, IHC) will be presented.

Results: Data will be presented at the conference. Current knowledge on possible predictive markers in TNBC will also be shortly reviewed.

Conclusion: Our initial data support the use of classical CMF [cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil (5-FU)] regimen in TNBC patients. However, the biomarker of CMF responsiveness is needed for clinical practice. BCL2 positivity could be a predictor of CMF

sensitivity in TNBC. Thus, validation of this marker in larger study is needed. Higher chromosome 17 copy number was associated with better outcome suggesting the importance of its assessment.

Supported by grants:

Czech Ministry of Healths IGA NS10286-3, Czech Ministry of Education (MSM6198959216, LC07017) a EEA/Norway Financial Mechanisms (CZ0099). Infrastructural part of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported from the Operational Programme Research and Development for Innovations (project CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

PARALELNÍ PROGRAM: SÁL PERSEUS HISTOLOGICKÁ TECHNIKA A METODOLOGIE I

ČSHL / Předsedající: D. Kvapilová, M. Ondráková, D. Indrová

čtvrtek / 10. 11. 2011 / 10.30–12.00

Faktory ovlivňující výsledek imunohistochemické reakce

Mgr. Zuzana Manhartová

Mgr. Martina Plašilová

BIOLAB Praha s.r.o.

Zvyšující se počet imunohistochemických diagnostických markerů v posledních letech zvyšuje také nároky na vybavení laboratorní. Vhodné technické vybavení není jedinou podmínkou k získání validního výsledku imunohistochemické reakce. V mnoha případech je z časových důvodů opomíjena délka fixace a nedostatečné demaskování antigenů. Úprava antigenu závisí i na výběru klonu protilátky, ale správné nastavení všech těchto parametrů není jednoduchým úkolem. Laboratoř provádějící imunohistochemická vyšetření by měla provádět mezilaboratorní porovnávání, aby byly eliminovány chyby, které snižují diagnostickou validitu jejích výsledků.

Sentinelová uzlina

Danuše Kvapilová,

Mgr. Marie Petrová

Ivana Šmídová

Ústav patologie LF UP a FN Olomouc

Co je to sentinelová uzlina? Biopsie sentinelové uzliny se stala jedním z nejvýznamnějších

pokroků onkochirurgie posledních desetiletí. Jaký je princip vyhledávání sentinelových uzlin a přínos v diagnostice nádorových onemocnění?

Vyšetření kůže transmisí elektronovou mikroskopií

Aneta Esterková

I. PAÚ FN u sv. Anny, Brno

Na našem pracovišti se metodou transmisí elektronové mikroskopie vyšetřuje kůže nejčastěji při podezření na onemocnění Epidermolysis bullosa a CADASIL. Přednáška obsahuje základní informace o těchto onemocněních, navazuje vysvětlení významu transmisí elektronové mikroskopie a popisuje jednotlivé kroky zpracování excize kůže. Součástí je i to, jak se vyvarovat chybám při tomto vyšetření.

Postup při zhotovení velkoplošného histotopogramu

Milada Hakenová,

Jitka Křížová,

Brigita Veselá,

Ústav patologie 1.LF UK a VFN Praha

Zpracováním vzorku do supermegabloku a zhotovením histotopogramu se získá přehledný řez celým orgánem nebo jeho větším úsekem

poskytující přehled o vzájemných vztazích jeho jednotlivých složek. Využíváme této techniky ve vybraných případech u prostaty, děložního čípku a prsu.

Odlišnosti při prosycování, krájení a barvení supermegabloků oproti standardním blokům bude předmětem našeho sdělení.

Používáme atypický spotřební materiál: supermegakazety, supermegaformy, podložní a krycí skla.

Laboratorní zpracování GIT z endoskopického vyšetření

Pavla Krystková,

Viera Zvonařová

I. PAÚ FN u sv. Anny, Brno

Na histologických pracovištích obecně, a tím i v naší laboratoři, která zpracovává mikroexcize z GIT, se často setkáváme s nevědomostí zdravotních sester chirurgických pracovišť o správné fixaci, velikosti nádoby, správném označení zkumavek. Přednáška je koncipována jako informace, kterou i vy můžete na svých pracovištích použít, coby „model“, pro vaše dodavatele biologického materiálu k histologickému vyšetření. Jsou zde zahrnuty postupy fixace materiálu až po výsledný preparát, který je připraven pro diagnostiku lékařem.

HISTOLOGICKÁ TECHNIKA A METODOLOGIE II

ČSHL / Předsedající: D. Kvapilová, M. Ondráková, D. Indrová

čtvrtek / 10. 11. 2011 / 15.00–16.30

Trepanobiopsie

Kateřina Sedláčková

Marie Bártová

Ústav patologie LF UP a FN Olomouc

Proč se provádí a jak se histologicky zpracovává biopsie z lopatky kosti kyčelní?

Rutinní zpracování tvrdých tkání – jak na kost

Vladimíra Musilová

I. PAÚ FN u sv. Anny, Brno

V histologické laboratoři se často setkáváme se zpracováním tvrdých tkání.

Kalcifikovanou nebo tvrdou tkáň je nutné nejdříve odvápnit (dekalcifikovat) a poté zpracovat běžným způsobem. Přednáška se zabývá postupem zpracování kostí v rutinní laboratoři, a to od fixace až ke konečnému výsledku, preparátu.

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS KLINICKÁ A EXPERIMENTÁLNÍ PATOLOGIE

Předsedající: C. Povýšil, Š. Galbavý, A. Böör – čtvrtek / 10. 11. 2011 / 16.25–18.10

The application of next generation microdissection to the molecular analysis of cells isolated from complex tissues

prof. Paul Murray, Ph.D.

CRC Institute for Cancer Studies,
University of Birmingham,
Medical School Birmingham,
United Kingdom

Over recent years dramatic advances in molecular technology have provided new tools to analyse the underlying processes that result in disease. However the quality, reliability and interpretation of these data are highly dependent on the homogeneity of the cell type under investigation. Fundamentally, tissues are heterogeneous and complicated structures composed of admixtures of cell types.

Microdissection of tissue sections and cytological preparations has become an increasingly important technique for cell isolation, facilitating the in vivo examination of cells that are otherwise inaccessible by traditional methodology. Several methods of microdissection have been developed, ranging from ablation of unwanted cellular material to manual micro-manipulation, however, these approaches are frequently time consuming, tedious, imprecise and are highly dependent on operator dexterity. Such factors limit their practical usefulness.

This paper will consider the application of next generation microdissection to the molecular analysis of cells isolated from complex tissues and will focus on the downstream applications in cancer research.

Histopatologické porovnání dvou různých nosičů autologních chondrocytů a výsledků jejich transplantace do kloubních defektů u lidí

prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.,

doc. MUDr. Aleš Podškubka, CSc.,

doc. MUDr. Milan Handl, Ph.D.

Ústav patologie 1. LF UK a VFN

Ortopedická klinika 1. LF UK a FN Na Bulovce

Ortopedická klinika 2. LF UK

Univerzita Karlova v Praze

Spontánní hojení fokálních lézí kloubní chrupavky je velmi omezené. Při léčení těchto většinou posttraumatických defektů se v současné době využívá implantace autologních chondrocytů, narostlých na nosičích různého původu, což ve značné části případů přispívá k regeneraci chrupavkového krytu. V naší studii jsme posuzovali složení dvou různých typů nosičů autologních chondrocytů, které sestávaly buď z esteru kyseliny hyaluronové (Hyalograft C), nebo byl základem nosiče fibrinový materiál (Brno). Histopatologické i imunohistochemické vyšetření prokázalo značné rozdíly ve složení těchto dvou typů nosičů, které byly implantovány celkem 16 pacientům a po 10 – 12 měsících byly odebrány biotické vzorky k posouzení výsledků hojení. U nosiče italské provenience (alfa aktin pozitivní buňky) byla nově narostlá chrupavková tkáň tvořená převážně hyalinní chrupavkou spolu s chrupavkou vazivového typu. Navíc jsme v některých oblastech zaznamenali zbytky nosiče, tvořeného esterem kyseliny hyaluronové. Naproti tomu výsledky hojení u brněnské kultury (S-100 a alfa aktin pozitivní buňky) ukázaly vznik převážně hyalinní chrupavkové tkáně, která byla, ve srovnání s předchozí skupinou, vyzrálejší. Ve všech případech uspořádání kloubního chrupavkového krytu vykazovalo nepravidelnou distribuci chondrocytů a nedokončenou reparaci subchondrálního kostního platů. Chondrocyty nově vytvořené chrupavky byly z větší části S-100 protein a alfa aktin pozitivní.

Tyto nálezy potvrzují, že implantace autologních chondrocytů představuje vhodný způsob léčby rozsáhlejších kloubních defektů. Imunohistochemické vyšetření potvrdilo, že aktin pozitivní chondrocyty hrají v tomto procesu velmi pravděpodobně významnou roli.

Rizikové faktory operační léčby úrazů z pohledu morfológa

prof. MUDr. Štefan Galbavý, DrSc.^{1,2},

MUDr. Ján Paukovic, CSc.³,

MUDr. Jozef Šidlo, PhD.²

¹ Ústav laboratorních vyšetřovacích metod Vysoké školy zdravotnictva a sociálnej práce sv. Alžbety a Onkologického ústavu sv. Alžbety, Bratislava, Slovensko

² Ústav súdneho lekárstva, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko

³ I. Ortopedicko-traumatologická klinika LF UK a UN Bratislava

Úvod: Úlohou pitvy je rozhodnúť v spore medzi pozostalými, ktorí zpochybňujú zdravotnícku dokumentáciu a klinickým tímom. Podporuje nálezhom žalobcu rovnako ako aj chirurga v prípade podozrenia z postupu non lege artis.

Pacienti a metódy: Spádová oblasť 90 000 obyvateľov 102 lôžok. Ročne sa odlieči 3 000 pacientov. Počet operácií ročne 2 600.

Výsledky: Traumatizmus v 40%. Úmrtnosť 6,3%. Pitvanosť 17%.

Záver: Počet exitov stúpa s vekom. Dominuje polymorbidita. Neboli sťažnosti. Neboli „neočakávané diagnózy.“ Nízka pitvanosť = nízka výpovedná hodnota.

K otázkam kancerogenézy formaldehydu

prof. MUDr. Andrej Böör, CSc.¹,

RNDr. Juraj Kuchár, PhD.²

¹ Ústav patológie LF UPJŠ

a UN LP v Košiciach

² Ústav chemických vied,

Katedra anorganickej chémie

PF UPJŠ v Košiciach

Formaldehyd „naš každodenný“ je ubikvitárna chemická látka, ktorá je vyrábaná a používaná vo veľkom rozsahu s mnohými možnosťami využitia najmä v priemysle, poľnohospodárstve a medicíne. Naše skúsenosti sú v návaznosti na biocidné vlastnosti formaldehydu pri fixácii tkanív a čiastočne aj pre jeho dezinfekčné vlastnosti.

Vplyv cievneho zásobenia, hypoxie a ich vzájomného vzťahu na biologické správanie sa medulárneho karcinómu štítnej žľazy

Mgr. Lucia Feketeová¹,

Martina Ondříková¹,

MUDr. Pavol Janega, PhD.^{1,2},

MUDr. Filip Gabalec⁴,

prof. MUDr. Aleš Ryška, PhD.⁴,

doc. RNDr. Silvia Pastoreková, DrSc.³,
prof. MUDr. Pavel Babál, CSc.¹

¹ Ústav patologickej anatómie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava

² Ústav normálnej a patologickej fyziológie, Slovenská akadémia vied, Bratislava

³ Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Slovenská republika

⁴ Lékařská fakulta UK, Hradec Králové, Česká republika

Úvod: Včasná diagnostika medulárneho karcinómu štítnej žľazy (MTC) je dôležitá pre zamedzenie vzniku vzdialených metastáz, často rezistentných voči rádio- a chemoterapii. Cieвне zásobenie endokrinných žliaz je kľúčovým pre plnenie ich funkcie. Pri nádorovom raste dochádza k vyčerpaniu cieвнеho zásobenia a znemožneniu prístupu živín a O₂ potrebného pre rastúcu nádorovú hmotu. Z tohto pohľadu sa ukazuje zaujímavou karbonická anhydráza IX (CA IX) ako marker hypoxie. Cieľom prezentovanej práce je overenie expresie CA IX, PECAM-1 a ich vzájomný vzťah v tkanivách s MTC, a ich vplyv na progresiu nádoru.

Metodika: Analyzovali sme 19 archívnych vzoriek tkaniva s MTC. Rezy boli farbené imunohistochemicky s použitím monoklonálnej protilátky proti CA IX a monoklonálnej protilátky proti PECAM-1 (CD 31). Pozitivita bola vizualizovaná diaminobenzydínom a kvantifikovaná morfolometricky.

Výsledky: Pozitivita CA IX bola pozorovaná vo všetkých vyšetrovaných vzorkách. Pri porovnaní pozitivity oboch markerov sme pozorovali vzťah, kedy prípady so silnou pozitivitou CA IX vykazovali slabú CD 31 pozitivitu a naopak.

Diskusia: Vysoká expresia CA IX bola zistená najmä pri karcinóme prsníka, krčka maternice, obličiek a pľúc a je spájaná s horšou prognózou pacienta. Dokázali sme vysoký stupeň jej expresie v prípadoch malígnych MTC, ktorý bol inverzný k rozsahu vaskularizácie. Z klinických údajov pacientov bola u všetkých pacientov s prítomnými metastázami (6/19) pozorovaná vysoká expresia CA IX a súčasne nižšie cieвне zásobenie. Do budúcnosti je potrebné overiť vplyv vzťahu CA IX a vaskularizácie na metastatické správanie sa nádorov na rozsiahlejšom súbore pacientov a možno uvažovať nad terapeutickým využitím markera CA IX v súvislosti s prognózou pacienta.

Podporené grantovou úlohou Ministerstva zdravotníctva Slovenskej republiky: Diagnostické problémy ochorení štítnej žľazy – nové trendy v molekulárnej diagnostike, číslo: 2006/23-UK-02 a GUK 136/2011.

Vplyv frakcionovaných dávok ionizujúceho žiarenia na zmeny neurogenézy v mozgu za experimentálnych podmienok

MUDr. Soňa Báľentová, PhD.¹,

MUDr. Eva Hajtmanová, PhD.²,

Kinclová I.²,

prof. MUDr. Ján Lehotský, CSc.³,

prof. MUDr. Dušan Dobrota, CSc.³,

doc. MUDr. Marian Adamkov, CSc.¹

¹ Ústav histológie a embryológie Jesseniova lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Martin, SR

² Onkologické centrum Univerzitná nemocnica Martin, SR

³ Ústav lekárskej biochémie Jesseniova lekárska fakulta, Univerzita Komenského, Martin, SR

Subventrikulárna zóna (SVZ), lemujuca laterálne mozgové komory (LK), je jednou z dvoch mitoticky aktívnych oblastí v mozgu, ktorá si zachováva schopnosť neurogenézy a gliogenézy aj v dospelosti a môže slúžiť ako zdroj progenitorových buniek pre neuroregeneratívnu terapiu. Z progenitorových buniek SVZ vznikajú neskorším delením nezrelé neuróny – neuroblasty, ktoré migrujú pozdĺž vopred definovanej migračnej trasy – rostrálnej migračnej dráhy (RMS) do bulbus olfactorius (BO), kde dochádza k ich terminálnej diferenciácii a tvorbe funkčných spojení. Za normálnych fyziologických podmienok je proces novotvorby buniek úzko prepojený s ich výraznou stratou v dôsledku programovanej bunkovej smrti. Ionizujúce žiarenie môže spôsobiť značné poškodenie zdravého tkaniva mozgu. Miera poškodenia nervového tkaniva je priamo úmerná druhu žiarenia a jeho energii, celkovej dávke a frakcionácii ožiarovania, spôsobom ožiarovania, individualitou a ďalšími parametrami. Výsledky experimentov so zvieratami a poznatky získané v humánnej rádioterapii potvrdzujú, že neurotoxický účinok ionizujúceho žiarenia sa prejavuje akútnym poškodením CNS, ktoré je zvyčajne prechodné a reverzibilné a neskorými ireverzibilnými zmenami, ktoré sú medicínsky najzávažnejšie. V experimente sme použili biele samce potkanov kmeňa Wistar, vo veku 7–8 mesiacov. Celotelová dávka žiarenia cTD 4,0 Gy bola aplikovaná v 4 frakciách s dávkou na frakciu TD 1,0 Gy v týždňových intervaloch, zdrojom žiarenia 60Co (prístroj TERAGAM ÚJP Praha). Interval prežívania zvierat bol po ožiarení 30, 60 a 90 dní. Na označenie vybraných bunkových typov v tkanivových preparátoch sme použí-

li imunofluorescenčné farbenie na detekciu: proteínu Ki-67, markera pre proliferujúce bunky, doublecortinu (Dcx) pre nezrelé neuróny a glial fibrillary acidic protein (GFAP) pre zrelé astrocyty. Kvantitatívnu analýzu, t.j. počet pozitívnych, značených buniek vo vybraných oblastiach RMS, t.j. v prednej časti SVZ (anterior SVZ; aSVZ) vertikálnom ramene, ohybe a horizontálnom ramene sme vyhodnotili pomocou programu ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). U zvierat, prežívajúcich 30 dní po ožiarení, došlo k výraznému zníženiu počtu proliferujúcich Ki-67-pozitívnych buniek najmä vo vertikálnom ramene RMS. Z vybraných bunkových typov pozdĺž migračnej dráhy sme detekovali zvýšenú distribúciu nezrelých neurónov vo vertikálnom ramene a v ohybe RMS. Hoci sa počet astrocytov v iniciálnej časti RMS znížil, v ohybe a v horizontálnom ramene sme zistili ich zvýšené zastúpenie. Prechodný nárast proliferujúcich buniek v iniciálnom úseku RMS sprevádzal prudký pokles počtu Dcx-pozitívnych nezrelých neurónov do 60-teho dňa po expozícii v oblasti SVZa, vertikálnom ramene a v ohybe RMS. Počet astrocytov postupne klesal podľa kaudo-rostrálneho gradientu s maximálnym počtom v oblasti aSVZ a minimálnym zastúpením v horizontálnom ramene. Trend poklesu počtu Ki-67-pozitívnych buniek, nezrelých neurónov a astrocytov pokračoval do 90-teho dňa po ožiarení vo všetkých hodnotených oblastiach RMS. Experimentálne štúdie na zvieratách potvrdzujú všeobecne známy poznatok využívaný v humánnej rádioterapii, že aplikovanie viacerých frakcií dávky žiarenia je šetrnejšie voči tkanivu ako jednorazová expozícia. Z hľadiska tolerancie na ožiarenie prejavujú neuróny vyšší stupeň rádiosenzitivity ako gliové bunky (1, 2). V predchádzajúcej experimentálnej štúdii sme detekovali porovnateľné avšak dočasné zmeny, prejavujúce sa poklesom počtu nezrelých neurónov v priebehu 21 dní po frakcionovanej aplikácii a súčasne sme zistili krátkodobé zvýšenie počtu astrocytov. Výsledky našej štúdie potvrdzujú známy fakt o žiarením indukovanom výraznom úbytku počtu nezrelých neurónov, resp. proliferujúcich buniek v priebehu niekoľko mesiacov po expozícii a neschopnosti regenerácie a reparácie tejto straty (3). Niektoré štúdie uvádzajú, že dočasný nárast počtu astrocytov je možné vysvetliť žiarením indukovanou aktiváciou astrocytov (reaktívnou gliózou) a mikrogliu, ktorý pretrváva šesť mesiacov po frakcionovanej aplikácii (4, 5, 6). Žiarením indukovaná mikrogliu iniciuje aktiváciu astrocytov uvoľnením prostaglandínu E₂, ktorý je považovaný za kľú-

čový element, ktorý indukuje astrogliózu (1, 7). Na objasnenie mechanizmu vzniku tejto výraznej postradiačnej odpovede je však potrebné identifikovať ďalšie kľúčové molekuly, napr. cytokíny, prostaglandín apod. Záverom možno povedať, že najvýznamnejším limitujúcim faktorom radiačnej onkológie sú tolerančné dávky zdravých orgánov a tkanív v okolí nádoru a poznatky získané štúdiom následkov žiarenia na experimentálnej úrovni sú významný-

mi informáciami pre vývoj nových liečebných postupov.

Literatura:

1. Mizumatsu S et al. Cancer Res 2003;63:4021–4027.
2. Tada E et al. Exp Neurol 1999;160:66–77.
3. Snyder JS et al. Neuroscience 2005;130:843–852.
4. Ciccirello R et al. Neurosurgery 1996;38:772–779.
5. Mildenerberger M et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1990;18:1051–1060.
6. Yuan H et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006;66(3):860–866.
7. Hwang SY et al. Neurobiol Dis 2006;21:457–467.

Práca vznikla za podpory projektu „Centrum excelentnosti pre výskum v personalizovanej terapii (CEVYPET)“, ITMS:26220120053

a „Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení“ spolufinancovanými zo zdrojov EÚ a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

PLENÁRNÍ PROGRAM: SÁL PEGASUS VARIA

Předsedající: V. Mandys, I. Šteiner – pátek / 11. 11. 2011 / 9.00–11.00

Přínosy nové (2010)

WHO klasifikace

gastroenteropankreatických neuroendokrinních nádorů

prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.

Ústav patologie 3. lékařské fakulty UK
a FN Královské Vinohrady Praha

Histologická klasifikace gastroenteropankreatických neuroendokrinních nádorů (GEP-NEN) a s ní související hodnocení jejich biologického chování prodělávají v posledních desetiletích významné změny; to je dáno zejména podstatným rozšířením poznatků o povaze nádorového procesu a o vlastnostech nádorových buněk a v neposlední řadě i zvýšeným zájmem klinických lékařů o tuto skupinu nádorů souvisejícím s výsledky rozsáhlejších klinických studií.

Původní snahy o klasifikaci GEP-NEN („karcinoidů“) založené převážně na histologickém obrazu nádoru nebyly úspěšné. Klasifikace nebyla všeobecně přijata a navíc se ukázalo, že histologická stavba sama o sobě nehraje významnější roli v biologickém chování nádoru. Zcela nový přístup k histologické klasifikaci GEP-NEN znamenala klasifikace WHO vydaná v roce 2000 a následně upřesňovaná v letech 2003–2006. Jejím základním principem bylo, že „karcinoidní“ nádory nejsou definovány pouze histomorfologickým obrazem, ale i pozitivitou znaků neuroendokrinní diferenciace. Klasifikace zcela nově definovala jednotlivé typy NEN a v hodnocení jejich biologického chování vycházela i z lokalizace nádoru a mitotické a proliferační aktivity nádorových buněk. Histopatologické hodnocení nádoru bylo

doplněno tzv. klinicko-patologickou korelací, založené zejména na velikosti nádoru a rozsahu jeho růstu.

Pro možnost praktické aplikace v klinické praxi byla tato klasifikace přijata i většinou klinických pracovišť v Evropské unii. Poněkud odlišný byl přístup v USA, kde klasifikace WHO 2000 nebyla všeobecně přijata, zejména z důvodů zahrnutí progresu nádorů do stupně biologického chování („gradingu“), komplikovaných schémat klinicko-patologické korelace nádorů v jednotlivých lokalizacích a širšího zavedení kategorie nádorů o „nejistém biologickém chování.“ Rozdíly v přístupu evropských a amerických odborníků k diagnostice NEN podnítily širokou diskuzi, jejímž výsledkem byla formulace nové WHO klasifikace, která byla vydána v roce 2010.

Koncepce WHO klasifikace z roku 2010 vychází z toho, že NEN představují heterogenní skupinu nádorů, které se liší v závislosti na místě vzniku a na stupni diferenciace nádorových buněk. Pokud se týče hodnocení biologických vlastností, spadají NEN v této klasifikaci až na několik málo výjimek do kategorie nádorů maligních. Riziko agresivního chování (maligní potenciál) nádoru je určováno na základě hodnocení stupně diferenciace nádoru („gradingu“) a rozsahu jeho progresu („stagingu“) vztaženého k lokalizaci nádoru. Grading nádoru vychází ze základního mikroskopického obrazu a z mitotické a proliferační aktivity nádorových buněk. Staging dodržuje základní pravidla TNM systému pro jednotlivé lokalizace nádorů. Ke každému typu nádoru je přiřazen morfologický kód podle Mezinárodní klasifikace nádorů pro onkologii (MKN-O3).

V klasifikaci jsou definovány tři základní typy nádorů:

1. Neuroendokrinní tumor (NET) je definován jako dobře diferencovaný neuroendokrinní nádor sestávající z cytologicky převážně pravidelných polygonálních buněk uspořádaných do solidních hnízd, nebo trabekulárních (penticovitých) formací; méně obvyklá je tvorba většinou drobných tubulárních struktur. V některých nádorech mohou být tyto struktury kombinované. Nádorové buňky vykazují imunohistologickou pozitivitu znaků neuroendokrinní diferenciace, obvykle se používá detekce chromograninu A a synaptofysinu. Podle mitotické a proliferační aktivity nádorových buněk se NET dělí na nádory grade 1 (G1) a grade 2 (G2). NEN G1 jsou definovány velmi nízkou mitotickou aktivitou nádorových buněk, méně než 2 mitózy na 10 zorných polí mikroskopu při velkém zvětšení (HPF) a velmi nízkou proliferační aktivitu hodnocenou pomocí imunohistologické detekce nukleárního antigenu Ki-67 (Ki-67 index $\leq 2\%$). NET G2 jsou definovány zvýšenou mitotickou aktivitou nádorových buněk (2–20 mitóz / 10HPF) a jejich zvýšenou proliferační aktivitou (Ki-67 index 3–20%).
2. Neuroendokrinní karcinom (NEC) je definován jako špatně (nízce) diferencovaný maligní nádor, sestávající z malých fenotypicky primitivních nebo intermediárních buněk (malobuněčný karcinom), nebo z velkých buněk, často s vesikulárními jádry a obšírnější cytoplazmou (velkobuněčný karcinom). NEC je vždy G3, nádorové buňky

vykazujú vysokou aktivitu mitotickou (t 20 mitóz / 10HPF) i proliferačnú (Ki-67 index t 20%). Znaky neuroendokrinné diferenciácie jsou vyjádřeny variabilně, nejčastěji je difúzně pozitivní synaptofysin.

3. Smíšený adenoneuroendokrinní karcinom (MANEC) je nádor tvořený dvěma komponentami, jednak karcinomem žláзовým (adenokarcinomem), jednak karcinomem neuroendokrinním. Arbitrárně bylo stanoveno, že každá z těchto komponent musí tvořit minimálně 30% nádoru. Z toho vyplývá, že přítomnost ojedinělých rozptýlených neuroendokrinních buněk v adenokarcinomu neopravňuje k diagnóze MANEC.

Závěr: WHO histologická klasifikace GEP-NEN z roku 2010 je dalším významným krokem ke sjednocení názvosloví těchto nádorů i k jednoznačnému definování jejich biologického chování. K hlavním přednostem nové klasifikace patří podstatné zjednodušení s odstraněním podjednotek nádorů a její přiblížení ke klasifikaci NEN v plicní lokalizaci. Další předností je přesná definice pravidel pro grading a staging a pro kódování podle MKN-O3. Vzhledem k tomu, že zařazení daného nádoru do příslušné kategorie má bezprostřední vliv na volbu dalšího diagnostického postupu a terapeutické strategie, je nutné, aby nová WHO klasifikace GEP-NEN byla široce akceptována jak ze strany patologů, tak klinických lékařů.

Práce byla podpořena z výzkumného záměru „Onkologie“, MSM 0021620808 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Kalcifikovaná aortální stenóza – zánětlivé onemocnění

**prof. MUDr. Ivo Šteiner, CSc.,
MUDr. Lukáš Krbal,
MUDr. Jan Laco, Ph.D.,
MUDr. Tomáš Rozkoš
Fingerlandův ústav patologie,
LF UK a FN Hradec Králové**

Kalcifikovaná aortální stenóza (KAS) je dnes považována za formu aterosklerózy, a tedy, jako ona, zánětlivého původu. V našich předchozích pracích jsme prokázali v KAS přítomnost krevních a lymfatických cév, buněčných infiltrátů i metaplastických tkání chrupavky a kosti. Cílem nynější práce byla analýza buněčných infiltrátů.

Vyšetřili jsme 15 případů chirurgicky resekovaných kalcifikovaných aortálních chlopní

– histologicky a imunohistochemicky (CD20, CD79a, CD3, CD4, CD8, CD68, CD138, BJK, BJJ, IgA, IgD, IgG, IgG4 a IgM).

Nálezy ukazují KAS jako chronický zánět s polyklonálními infiltráty z lymfocytů, plazmatických buněk a histiocytů. V T-lymfocytech převažovaly CD4 nad CD8; v B-lymfocytech byla lehká převaha CD20 nad CD79a. V plazmatických buňkách převažovaly lambda – pozitivní nad kappa – pozitivními. V rámci CD138 – pozitivních plazmatických buněk bylo 24 % IgA-, 20 % IgD-, 41 % IgG- (včetně 11 % IgG4-) a 15 % IgM- pozitivních buněk.

KAS nesplňuje kritéria recentně popsané klinickopatologické jednotky IgG4 – sklerozující systémové choroby.

Obraz zánětu byl stejný u obou typů KAS – tzv. degenerativního/stařeckého (na normálně třícípé chlopni) a na vrozeně dvojčípé chlopni.

Na základě našich nálezů se často používá termín „degenerativní“ pro typ KAS postihující normálně třícípou aortální chlopeň jeví jako nepatřičný, a proto navrhujeme nahradit jej termínem „sklerotický.“

Nonparazitárne a nenádorové ochorenia GITu s výrazným zastúpením eozinofilných leukocytov

**prof. MUDr. Andrej Böör, CSc.,
MUDr. Katarína Dudriková,
MUDr. Ľudmila Babjaková,
prof. MUDr. Ivan Jurkovič, CSc.,
MVDr. Pavel Kočan, PhD.
Ústav patológie LF UPJŠ a UN LP v Košiciach**

Napriek nie zriedkavému výskytu eozinofilných leukocytov za ortologických podmienok, ale aj najmä ako súčasti bunkového infiltrátu pri zápalových zmenách gastrointestinálneho traktu, ich výrazné kvantitatívne zastúpenie je skôr menej častým nálezom histopatologickej praxe. Táto skutočnosť však neúplne korešponduje s nárastom alergicko-atopických ochorení v populácii. Z tohto hľadiska sa ukazuje potreba detailnejšieho štúdia tejto oblasti aj z morfológického pohľadu.

Eozinofilné leukocyty môžu byť jednak dominantným prejavom zápalového ochorenia, ide najmä prejavov eozinofilnej apendicitídy a cholecystitídy. Niekedy je však táto súčasť menej dominantná a prítomnosť ďalších komponentov v rámci tkanivových prejavov podmieňuje navýšenie komplexnosti lézie, a týka sa to aj formálnej patogenézy výskytu a zastúpenia eozinofilných leukocytov, ktorá často nie je doriešená (eozinofilný vred jazyka,

Vanekova choroba, eozinofilná cholangitída, eozinofilná pankreatitída). Navyše nedostatočné doriešenie niektorých morfológických aspektov takýchto zmien podmieňuje, že tieto sú niekedy označované aj ako granulomatózne lézie. U mnohých týchto chorôb napriek relatívne menej problémovej histopatologickej diagnostike a čiastočne aj ich zriedkavejšiemu výskytu, klinicko-morfológické komparácie sú nedostatočne sledované (funkčná dyspepsia, syndróm dráždivého čreva). Tu sa ukazujú možnosti detailného štúdia dôležitých interakcií medzi eozinofilmi a mastocyty.

V súčasnosti najväčšej pozornosti v písomníctve je venované eozinofilnej eozofagitíde a gastroenteritíde a to aj s navýšovaním možností pri riešení ich presných diagnostických kritérií.

V práci autori demonštrujú svoje skúsenosti pri ochoreniach s vysokým zastúpením eozinofilných leukocytov a diskutujú tiež niektoré otvorené otázky vyskytujúce sa pri ich hodnotení.

Cystitis papillaris imitující uroteliální tumor nízkého maligního potenciálu

**doc. MUDr. Jaroslava Dušková, CSc.,
Rosalie Jana Bennett
Ústav patologie 1.LF UK a VFN,
Vysoká škola zdravotní, Praha**

67letý muž sledovaný dva roky pro hyperplazii prostaty byl pro pobolívání v podbřišku a sonografické podezření na tumor měchýře cystoskopicky vyšetřen. Vzorky odebrané při tomto vyšetření byly zaslány s endoskopickou diagnózou infiltrující tumor - primozáchyt.

Mikroskopicky dominoval zánět v lamina propria a byly přítomné převážně širší, ojediněle i štíhlá papilární formace kryté urotem odpovídajícím reaktivní hyperplazii. Nález hodnocen jako PUNLMP. Další endoskopické vyšetření s dvouměsíčním odstupem a bioptické vyšetření z více lokalit vedly k diagnóze cystitis papillaris. Následně byla reklasifikována i první rozsahem limitovaná biopsie.

Cystitis papillaris představuje jeden z řady pseudotumorů vývodných cest močových (nejčastěji měchýře) s rizikem nadhodnocení, jak v zobrazovacích vyšetřeních, tak makroskopicky i histologicky.

Literatura:

1. Lane Z, Epstein JI. Polypoid/papillary cystitis: a series of 41 cases misdiagnosed as papillary urothelial neoplasia. Am J Surg Pathol. 2008 May;32(5):758–64.
2. Young RH. Papillary and polypoid cystitis: A report of 8 cases. Am J Surg Pathol. 12:542–546, 1988.

3. Varsano I, Savir A, Grünebaum M, Vogel R, Johnston JH. Inflammatory processes mimicking bladder tumors in children. *J Pediatr Surg.* 1975 Dec;10(6):909–12.
4. Afroz S, Taher MA. Cystitis mimicking bladder cancer on sonography. *AJR Am J Roentgenol.* 1988, Dec;151(6):1252–3.
5. Kim SH, Yang DM, Kim NR. Polypoid and papillary cystitis mimicking a large transitional carcinoma in a patient without a history of catheterization: computed tomography and magnetic resonance findings. *J Comput Assist Tomogr.* 2004 Jul–Aug;28(4):485–7.
6. Buck EG. Polypoid cystitis mimicking transitional cell carcinoma. *J Urol.* 1984, May;131(5):963.

Maligní PECom mediastina

MUDr. Tomáš Tichý¹,

MUDr. Petr Buzrla²,

prim. MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D.²,

MUDr. Marcel Mitták, Ph.D.³

¹ Ústav klinické a molekulární patologie
LF a FN Olomouc

² Ústav patologie FN Ostrava-Poruba

³ Chirurgická klinika FN Ostrava-Poruba

Nádory z perivaskulárních epiteloïdních buněk (PEComy) jsou mezenchymové nádory

tvořené epiteloïdními a vřetenitými buňkami s typickým myomelanocytárním imunofenotypem. Do této skupiny se řadí známé jednotky jako angiomyolipom, světlobuněčný (sugar) tumor plicí a lymfangioleiomyomatóza. Pro PEComy vyskytující se sporadicky ve vnitřních orgánech, kůži, kostech a měkkých tkáních byl navržen název PECom NOS. Prevalence PEComů NOS u žen je zjevná, biologické chování zahrnuje kategorie benigní, intermediární i maligní, nicméně kritéria malignity nejsou pevně stanovena.

Popisujeme případ 58leté ženy s objemným tumorem mediastina, která byla přijata k vyšetření pro bolest na hrudi a narůstající dušnost. Byla provedena tenkojehlová biopsie a ze získaného materiálu stanovena diagnóza vřetenobuněčný sarkom NS. Pacientka podstoupila rozšířenou pravostrannou pneumonektomii, při níž byl z předního mediastina odstraněn nádor velikosti 17 x 9 x 7 cm prorůstající do horního a středního laloku pravé plicí. V definitivním bioptickém materiálu byl

zjištěn epiteloïdní a vřetenobuněčný sarkom s vysokou mitotickou aktivitou a expresí myomelanocytárních markerů a byla stanovena diagnóza maligního PEComu. Osm let před touto operací pacientka prodělala hysterektomii pro myomatózní uterus, bioptický materiál byl revidován, struktury uterinního PEComu nebyly zjištěny. Uzavřeli jsme případ jako primární maligní PECom mediastina a doporučili jsme zvážit následnou terapii inhibitory kinázy mTOR (mammalian target of rapamycin). Na pozadí uváděného případu diskutujeme celou skupinu nádorů z perivaskulárních epiteloïdních buněk, uvádíme vznik koncepce těchto tumorů, kritéria malignity a genetický profil.

Nádory z perivaskulárních buněk jsou vzácné a maligní PEComy jsou vyjimečné. Podle našich znalostí nebyl maligní PECom mediastina dosud popsán. Je pravděpodobné, že chování PEComů může být i přes klasické morfologické znaky malignity relativně příznivé. Při cílené léčbě těchto nádorů lze využít inhibitory mTOR (sirolimus, temsirolimus).



Tissue-Tek® AutoWrite® Printers



Potisk písmeny, čísla nebo 1D / 2D čárovými kódy;
výkon: 900 kazetek nebo 800 sklíčků za hodinu;
pohodlná obsluha.



Tissue-Tek® Xpress® x Series



Tkáňový procesor umožňující kontinuální zpracování
vzorků a stanovení diagnózy ještě v tentýž den;
technologie šetrná k DNA / RNA;
bezxylenový proces;
výkon: 120 vzorků za hodinu.

SPOLEHLIVÁ ŘEŠENÍ PRO HISTOPATOLOGII

Tissue-Tek® AutoTEC® & Paraform®



Plně automatizovaná zalévací linka;
unikátní systém kazet Paraform, který umožňuje
orientaci vzorků již při přikrajování
a eliminuje jeho ztráty v průběhu procesu;
výkon: 120 vzorků za hodinu.



Tissue-Tek® Prisma® & Film®



Plně automatizované barvení a montování;
současně může probíhat až 11 barvicích programů;
bezkonkurenční rychlost a kapacita.



SALONEK ANDROMEDA

POSTERY

Ultrastrukturální obraz nádoru pankreatu

RNDr. Radko Novotný, Ph.D.¹,
prof. MUDr. Jiří Ehrmann, Ph.D.²,
MUDr. Igor Tozzi, Ph.D.³,
doc. MUDr. Roman Havlík, Ph.D.⁴,
MUDr. Jiří Kysučan⁴,
MUDr. Martin Loveček, Ph.D.⁴

- ¹ Laboratoř mikroskopických metod,
Lékařská fakulta Univerzity Palackého,
Olomouc, Česká republika
² Ústav histologie a embryologie,
Lékařská fakulta Univerzity Palackého,
Olomouc, Česká republika
³ II. interní klinika, Lékařská fakulta,
Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice
v Olomouci
⁴ I. chirurgická klinika, Lékařská fakulta,
Univerzita Palackého a Fakultní nemocnice
v Olomouci

Karcinogenezi doprovází mnoho změn, mezi které patří i ty ultrastrukturální (Springer 1980). Jednou z organel, podléhajících změnám, jsou i mitochondrie, které v buňkách tvoří mitochondriální síť (Benard 2007). Mitochondriální obraz odpovídá a mění se v závislosti na požadavcích buňky (Bereiter-Hahn 2008). Jedním z možných procesů, kterým se mitochondrie podílejí na karcinogenezi, je mutace jejich mtDNA (Brantová 2006). Tyto mutace následně vedou k funkčním změnám mitochondrií a následnému vzniku a progresi nádoru (Carew 2002).

Ultrastrukturální změny mitochondrií nádorů se vyznačují heterogenitou a nespecifitou. Mitochondrie v rakovinných buňkách, nezávisle na histogenezi, jsou převážně průhledné s nateklou matrix, vyplněnou neuspořádanými a zdeformovanými kristami, s částečnou nebo úplnou kristolýzou, v některých případech s kondenzovaným vzhledem (Gabriel 2009). Zdá se, že variabilita morfologie je dána přítomností hypoxie-tolerantních a hypoxie-senzitivních nádorových buněk. Tolerance buňky na hypoxii souvisí pravděpodobně s existencí elektrondenzní matrix mitochondrií, které produkují adekvátní množství ATP mitochondriální respirací.

Naproti tomu buňky hypoxie-senzitivní obsahují mitochondrie nabobtnalé, s deformovanou strukturou krist případně s kristolýzou. Takové mitochondrie mají zanedbatelnou nebo

nulovou oxidativní fosforylaci, potřebnou ke glykolýze jako zdroji energie (Steinbach 2003).

Cílem studie je prověřit ultrastrukturální obraz nádorů pankreatu především s důrazem na stav mitochondrií.

*Tato práce je podporována grantem
IGA MZ CR NT11023 – 2010*

Význam a možnosti detekce zlomu genu ALK u nemocných s karcinomem plic

Ing. Mgr. Libor Staněk^{1,2,3},
MUDr. Adéla Berková¹,
Ing. Daniel Tvrdík, Ph.D.¹,
MUDr. Soňa Lísová¹,
doc. MUDr. Jaroslava Dušková, CSc.¹,
doc. MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.^{1,2},
prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.¹

- ¹ Ústav patologie, 1. LF UK a VFN, Praha
² Ústav biologie, LF UK v Plzni
³ Oddělení experimentální virologie,
ÚHKT, Praha

NSCLC se řadí na přední místo ve výskytu malignit diagnostikovaných v České republice (Pešek, 2011). S pokrokem biologické léčby se zvyšuje i náročnost a šíře vyšetření tohoto onemocnění (Staněk et al, 2010). Jedním z markerů sledovaných v poslední době se jeví zlom genu ALK (anaplastic lymphoma kinase) (Choi YL, Soda M., 2010).

Na našem pracovišti detekujeme tento zlom od roku 2010 pomocí FISH analýzy (Fluorescenční in situ hybridizace) s break-apart sondou – LSI ALK Dual Color (Abbott Molecular). Tato sonda je směsí sond green – orange, které překrývají gen ALK a vytvářejí žlutý fúzní signál, kdy ve zdravé tkáni bez přítomnosti translokace detekujeme dva žluté signály.

Cílem této studie bylo zhodnotit hybridizaci sondy pro detekci genu ALK na různém plicním materiálu, a to plicní tekutině (bronchiální laváž) – cytospin, cytologickém barveném nátěru (M/G-G/R) a z resekované nebo punktované tkáně (parafín).

Kazuistika č. 1: U pacienta (58 let t) byl vyšetřený punktát z oblasti nadledviny prostoupen dobře diferencovaným adenokarcinomem, nepochybně metastatického původu. V diferenciální diagnostice přichází v úvahu jako primární nádor karcinom plic.

Expres EGFR prokázána imunohistochemicky (Dako) v 50 % nádorových buněk. Mutační analýza genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR) byla provedena metodou Real-Time PCR s použitím kitu TheraScreen (Roche) z izolované DNA z parafinového bloku nepotvrdila přítomnost aktivujících mutací. Následně byly z bloku nakrájeny 2 řezy 2–3 µm, odparafinovány a byla hybridizována sonda LSI ALK Dual Color (Abbott Molecular). Vyhodnocení preparátu neprokázalo detekci zlomu a tedy účast v translokaci genu ALK (2p23) – signály 2F.

Kazuistika č. 2: U pacienta (78 let) byl zpracován vzorek tekutiny (4 ml) z bronchiální laváže. Tekutina byla stočena na cytocentrifuze (Univerzal 16) při 1300 ot/min. Cytospin byl obarven a použit k cytologickému vyšetření, které ukázalo přítomnost dlaždicových epitelů regresivně změněných s velkou příměsí respiračních epitelů. Dále velké množství protáhlých buněk původu v malobuněčném karcinomu. Z cytospinu byla provedena izolace DNA a provedeno vyšetření mutační analýzy genu pro EGFR, mutace nalezena nebyla. Následně byla na skla (cytospin) hybridizována sonda LSI ALK Dual Color (Abbott Molecular). Vyhodnocení preparátu neprokázalo detekci zlomu a tedy účast v translokaci genu ALK (2p23) – signály 2F.

Kazuistika č. 3: U pacienta (76 let) byly vyšetřeny nátěry barvené MGG vysoce buněčného charakteru s přítomností trsů buněk odpovídajících cytomorfoloickými znaky nemalobuněčnému karcinomu. Jelikož byla skla zamontována, byla skla 24 hodin ponechána ve xyleny, poté bez odbarvení izolována DNA a provedeno vyšetření mutační analýzy genu pro EGFR, mutace nalezena nebyla. Na odmontovaná skla byla hybridizována sonda LSI ALK Dual Color (Abbott Molecular). Vyhodnocení preparátu neprokázalo detekci zlomu, a tedy účast v translokaci genu ALK (2p23) – signály 2F.

Závěrem lze konstatovat, že je možné velice dobře analyzovat veškeré predikční a diagnostické markery u plicních karcinomů pomocí molekulárně biologických metod a současně na tyto materiály (cytologický nátěr, laváž, resekát, punktát) hybridizovat sondu LSI ALK Dual Color a provést reprodukovatelné vyhodnocení.



Ing. Milena Španělová - SpinChem
Těšínská 6, 31200 Plzeň
tel., fax: +420 377 265 214
info@spinchem.cz, www.spinchem.cz

Zajistíme pro Vás

produkty pro široké spektrum použití.
Zastupujeme řadu zahraničních firem a nabízíme sortiment
pro výzkumné i praktické využití v medicíně a různých přírodních vědách.

Adipogen AG, Switzerland	http://www.adipogen.com
Biomol GmbH (Německo)	http://www.biomol.de
Covance Research Products Inc. USA	http://www.crpinc.com
Exalpha Biologicals, Inc. MA, USA	http://www.exalpha.com
Jackson ImmunoResearch Labs, Inc. PA, USA (UK)	http://www.jacksonimmuno.com
ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Israel	http://www.prospecbio.com
Santa Cruz Biotechnology, Inc. CA, USA	http://www.scbt.com
Spectrum Laboratories, Inc. USA (NL)	http://eu.spectrumlabs.com

Nabízíme služby při dovozu produktů i od jiných firem podle vašich potřeb

Literatura:

1. Choi YL, Soda M., et al. EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK. *E Engl J Med*, 2010, 363: 1734–1739.
2. Pešek M. Brongogenní karcinom a jeho diagnostika. *Postgraduální medicína*, 2011, 6:680–686.
3. Staněk L, Tvrdík D, et al. Možnosti molekulární diagnostiky mutací EGFR receptoru pro biologickou léčbu pomocí inhibitorů tyrosinkinázy u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. *Studia Pneumologica et Phthiaseol.*, 2010, 3:110–113.

Význam molekulární a cytogenetické diagnostiky transformace folikulárního lymfomu do DLBCL – kazuistika

Ing. Mgr. Libor Staněk^{1,2,3},

MUDr. Radek Jakša¹,

MUDr. Zuzana Velenská¹,

MUDr. Adéla Berková¹,

Ing. Daniel Tvrdík, Ph.D.¹,

MUDr. Soňa Lísavá¹,

prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.¹

¹ Ústav patologie, 1. LF UK a VFN, Praha

² Ústav biologie, LF UK v Plzni

³ Oddělení experimentální virologie, ÚHK, Praha

Transformace je důsledkem vzniku nových abnormalit v genomu lymfomových buněk. Somatické mutace protoonkogenů významných v procesu vzniku maligního lymfomu (PIM-1, PAX-5, RhoH/TTF a c-MYC) se objevují u více jak 50 % difuzních velkobuněčných B-lymfomů (DLBCL) vznikajících de novo, zatímco jsou vzácné u FL. U transformujících se FL byly mutace těchto genů nalezeny u 55 % případů. U transformujících se FL byla rovněž nalezena inaktivace genu p53 a ztráta exprese genu p16, podobně jako změny v oblasti genů pro variabilní část těžkého řetězce imunoglobulinu (IgVH). Transformace byla popsána u téměř všech lymfomů. Nejčastějším typem sekundárního agresivního lymfomu je DLBCL, do kterého se transformuje 25–30 % FL. Z histologické klasifikace je transformace charakterizována ztrátou nodulárního charakteru růstu, přítomností difuzní proliferace velkých buněk a zvýšenou mitotickou aktivitou a ve vzorku tkáně často nalezneme jak oblasti s nízkou maligní, tak s vysokou maligní komponentou.

U námi popsaného případu byla v lymfatické uzlině nádorová infiltrace lymfomem non-Hodgkinova typu. Nádor byl nekrotický, převážně nodulární struktury, s pruhy kolageního vaziva. Cytologicky byl nádor tvořený smíšenou populací malých buněk charakteru centrocytů a velkých blastických buněk charakteru centroblastů. Počet centroblastů byl nerovnoměrný,

místy do 15/HPF 40x, místy nad 15/HPF 40x. Nález odpovídal folikulárnímu lymfomu grade 2–3a. Asi v 1/3 nádoru byla velká uzlovitá ložiska tvořena pouze blastickými buňkami převážně centroblasty s disperzními imunoblasty, což odpovídalo transformaci do DLBCL. Imunofenotyp nádorových buněk: CD20+, bcl2+, bcl6+, CD10+, CD23+, MUM1-. CD3 byl pozitivní v T lymfocytech. Proliferační aktivita (Ki-67 index) byla nerovnoměrná, místy 10–20 %, v partiích odpovídajících DLBCL však byla až 90 %. Po makrodisekci byla tedy provedena molekulární analýza přestavby těžkého řetězce imunoglobulinového genu metodou PCR, s použitím kitu IdentiClone IGH Gene Clonality Assay, který testuje segmenty VH-FR1/JH, VH-FR2/JH, VH-FR3/JH, DH1-6/JH a DH7/JH, která byla pozitivní na detekci přestavby imunoglobulinového genu (DH7/JH). Následně byl ukrojen řez o síle 2–3 µm, který cytomorfo-metricky odpovídal oblasti DLBCL a byla metodou FISH testována translokace t(14;18)(q32;q21) – IgH/bcl2 sondou IGH/BCL2 DC DF Translocation Probe (Abbott Molecular), která se nachází u FL. Po vyhodnocení byla prokázána translokace t(14;18)(q32;q21) – signály 2-6F1-4G1-4O a v popsáných imunoblastech byly nalezeny nadpočetné fúzní i jednotlivé signály. Cytomorfo-metricky předpokládaná transformace FL do DLBCL, byla na základě přítomné translokace plně potvrzena.

Prognóza nemocných s transformovaným lymfomem je nepříznivá a medián jejich přežívání po transformaci se pohybuje v rozmezí 7–20 měsíců. Z tohoto důvodu je velice důležité správně klasifikovat a na základě molekulárních metod popsat transformované lymfomy.

Možnosti ve sledování mutací genů signálních drah u pacientů s NSCLC pro indikaci inhibitorů tyrosinkinázy

Ing. Mgr. Libor Staněk^{1,2,3},

Ing. Daniel Tvrdík, Ph.D.¹,

MUDr. Soňa Lísavá¹,

MUDr. Ivana Vítková¹,

MUDr. Marie Ludvíková, Ph.D.^{1,2},

prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.¹

¹ Ústav patologie, 1. LF UK a VFN, Praha

² Ústav biologie, LF UK v Plzni

³ Oddělení experimentální virologie, ÚHK, Praha

Bronchogenní karcinom je u mužů nejčastějším maligním onemocněním v České republice (90/100 000). U žen je tato četnost nižší (30/100 000) a řadí toto onemocnění na třetí místo oproti

ostatním malignitám. Obecně se bronchogenní karcinomy dělí na skupinu malobuněčných (20–30 %) a nemalobuněčných (70–80 %) (Zatloukal et al, 2001). Pro léčbu nemalobuněčných karcinomů plic (NSCLC) se jeví jako vhodný kandidát inhibitory tyrosinkinázy – erlotinib a gefitinib. Jedná se o malé molekuly, které se specificky vážou na tyrosinkinázovou doménu a brání autofosforylaci receptoru a následné aktivaci signální kaskády. Ne u všech pacientů je však zaznamenána pozitivní odpověď na tuto léčbu, což koreluje s aktivací mutací genu pro EGFR (receptor epidermálního růstového faktoru) (Tony S. Mok et al, 2010). Je tedy nutné pro individuálně zaměřenou léčbu, stanovení molekulárně biologických znaků, a to exprese a amplifikace genu pro EGFR za souběžné analýzy aktivujících mutací EGFR a mutační změny genu KRAS a BRAF (Staněk et al, 2010), v současné době také stanovení fúze genu EML- ALK (Pešek, 2011).

Cílem této studie bylo zhodnocení mutační analýzy genu pro EGFR z izolované DNA QIAamp DNA Mini Kit, metodou Real-time PCR s využitím kitu TheraScreen: EGFR29 Mutation Kit (Roche), pomocí něhož lze detekovat nejčastější mutace genu EGFR na kodonech 18 a 21 s využitím technologie DxS Scorpions. Tato technologie umožňuje detekci sledovaných mutací na pozadí genomové DNA divokého typu v reálném čase. Dále provést analýzu mutací na 12 a 13 kodonu genu k-ras, který je za normálních podmínek aktivovaný EGFR a je považován za jeden z nejčastějších onkogenů u NSCLC. U mutační analýzy genu k-ras jsme použili stejnou technologii PCR v reálném čase za použití kitu TheraScreen: K-RAS Mutation Kit (Roche). BRAF jehož mutace V600E propůjčuje buňkám transformační aktivitu, protože simuluje fosforylaci na T599 a/nebo S602 v aktivní doméně proteinu byl stanoven hybridizací vyizolované DNA na stripu KRAS/ BRAF StripAssay (ViennaLab). Exprese EGFR byla potvrzena imunohistochemicky kit EGFR pharmDx DakoCytomation (Dako) a amplifikace příslušného genu metodou FISH (Abbott).

Do sledované skupiny bylo zařazeno 20 pacientů s NSCLC v průběhu let 2010 a 2011. U všech pacientů byla prokázána exprese a amplifikace genu pro EGFR. Mutační změny EGFR byly detekovány u 6 pacientů, z toho u 3 pacientů se jednalo o mutaci G719X v exonu 18, v jednom případě se jednalo o inserce v exonu 20 a poslední dva pacienti měli mutaci R858R v exonu 21. U ostatních (14) pacientů byl detekován divoký typ. Mutace na genu KRAS byla nalezena u 4 pacientů na 12 kodonu (12ARG, 12ASP). Mutace genu BRAF byla nalezena u 3

pacientů. U žádného z pacientů nebyla nalezena mutace EGFR a současně mutace genu pro KRAS. Oproti tomu všechny mutace genu BRAF byly nalezeny současně s mutací genu KRAS.

Závěrem lze říci, že lze velice snadno sledovat mutační změny na celé signální kaskádě a zůstává jen otázkou pro klinické využití, zda mohou tyto mutační změny ovlivnit výběr pacientů pro biologickou léčbu.

Literatura

1. Pešek M. Brongogenní karcinom a jeho diagnostika. Postgraduální medicína, 2011, 6:680–686.
2. Staněk L, Tvrdík D, et al. Možnosti molekulární diagnostiky mutací EGFR receptoru pro biologickou léčbu pomocí inhibitorů tyrosinkinázy u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic. *Studia Pneumologica et Phthiseol.*, 2010, 3:110–113.
3. Tony S. Mok, et al. Gefitinib or Carboplatin-Paclitaxel in Pulmonary Adenocarcinoma, *NEJM*, 2009, 3: 947–957.
4. Zatloukal P, Petruželka L. Karcinom plic. Grada, Praha, 2001.

Problematické diagnózy při endoskopické ultrasonograficky navigované tenkojehlové aspirační biopsii pankreatu (EUS-FNA)

Mgr. Jarmila Šustíková¹,
MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D., MIAC^{1,2},
RNDr. Magdalena Uvírová¹,
MUDr. Vladimír Židlík¹,
MUDr. Petra Dopitová¹,
MUDr. Dušan Žiak^{1,2}

¹ CGB laboratoř a.s.,

² FNO Ostrava

Úvod: Endoskopická ultrasonograficky navigovaná tenkojehlová aspirační biopsie pankreatu (EUS-FNA) je v současné době již standardní diagnostický nástroj ložiskových i cystických lézí pankreatu. V této oblasti jde o šetrnou diagnostickou metodu s minimálním rizikem komplikací (riziko 0,05–0,5 %).

Materiál: Od roku 2007 do roku 2011 jsme v naší laboratoři vyšetřili 501 případů pankreatických lézí, kde byl materiál získán metodou EUS-FNA. Největší část tvořily případy diagnosticky jednoznačné, a to zejména primární adenokarcinom pankreatu. Menší skupinu tvořily diagnosticky obtížné případy s ojedinělou falešně pozitivní diagnózou. Představujeme několik obtížně diagnostických případů. Dva případy falešně pozitivních výsledků malignity, kdy se jednalo o akutní pankreatitidu. Jeden případ epitelioidního leiomyosarkomu napodobujícího adenokarcinom. Dále případ neuroendokrinního tumoru, který byl diagnostikován jako adenokarcinom, inflamatorní myofibroblastický tumor cytologicky diagnostikován jako tumor neuroendokrinního typu a aspirace z lymfatické

uzliny s podezřením na metastázu melanomu, kde se v definitivní biopsii jednalo o antrakosilikotické změny.

Závěr: Metoda EUS-FNA je v poslední době velmi rozšířená, šetrná a oblíbená diagnostická metoda, avšak je nutné připustit její limitace ve srovnání s biopsií materiálem z resekátů. Tyto limitace jsou markantnější zejména u cystických a zánětlivých lézí.

Benigní smíšený duktuloinsulární tumor pankreatu

MUDr. Daniela Kurfürstová,

MUDr. Jana Janková,

doc. MUDr. Martin Tichý, CSc.

Ústav klinické a molekulární patologie
Lékařské fakulty University Palackého
a Fakultní nemocnice v Olomouci

Klinické údaje: 68letá žena, která byla v září 2010 hospitalizována v nemocnici v Přerově pro bronchopneumonii. Zde jí bylo provedeno CT vyšetření břicha, při kterém byl náhodně zjištěn tumor těla pankreatu. Následovalo interní a endokrinní vyšetření, které neprokázalo endokrinní sekreci tumoru. Pacientka podstoupila resekci kaudy a těla pankreatu spojenou se splenektomií.

Makroskopický popis: Dodáno nám bylo tělo a kauda pankreatu velikosti 150×40×25 mm. V těle byl přítomný ohraničený solidní tumor bílošedé barvy, tuhé konzistence velikosti 15×13×15 mm.

Mikroskopický popis: Tumor byl histologicky ohraničený okolní tkání pankreatu, solidně alveolárně utvářený. Mezi solidními partiemi byly patrné četné tubulární struktury. Ložiskově jsou v tumoru depozita amorfního materiálu. Mitózy, nekrózy, perineurální šíření či angioinvasze nebyly přítomny. Imunohistochemická analýza prokázala v solidních partiích pozitivitu synaptofyzinu, chromograninu, CD56, negativní bylo AE1–AE3, CK7, CK8, CK19 a proliferace aktivita Ki67 byla do 2%. Tubulární struktury vykazovaly naopak pozitivitu AE1–AE3, CK7, CK8, CK19, PAS, Müller, negativní byl synaptofyzin, chromogranin, CD56 a proliferace aktivita těchto struktur byla také do 2%.

Diskuze: Endokrinní tumory pankreatu nejsou příliš časté a tvoří přibližně 1–2% všech pankreatických neoplazií. Mohou být hormonálně aktivní (inzulinom, glukagonom, somatostatinom, gastrinom) či inaktivní. Makroskopicky jsou většinou dobře ohraničené a solitární. Podle jejich biologické povahy rozlišujeme benigní, nejistého biologického chování a dále dobře

diferencované endokrinní karcinomy, nízké diferencované endokrinní karcinomy. Popisovaný nádor svým morfologickým vzhledem i imunohistochemickým vyšetřením odpovídá benignímu smíšenému tumoru, avšak tento ekvivalent jsme v literatuře nenašli. V červenci 2007 byla v *Journal of Pancreas* uveřejněna kazuistika (4) popisující smíšený tumor těla pankreatu tvořený serózním cystadenomem a endokrinním tumorem, který byl dle autorů do té doby popsán celkem v pěti případech. Tumor byl tvořen solidními a dále cystickými partiemi, kde byla velikost cyst od 2 do 25 mm a vystlány byly kubickým epitelem s obsahem glykogenu (PAS pozitivní). Solidní partie exprimovaly chromogranin. Na rozdíl od tohoto tumoru v našem případě nebyly přítomny cysty, pouze početné tubulární struktury, které byly ložiskově mírně dilatované. K této diagnóze jsme se nakonec nepřiklonili. Naše diagnóza se opírá o článek, který byl publikován v *American Journal of Surgical Pathology* v roce 2004 (5), kde autoři popisují studii 16 případů tumorů pankreatu, které nazývají *duktuloinsulární*. Jejich snahou bylo prokázat, zda tyto tubuly jsou zavzaté do endokrinního tumoru, nebo jsou nádorového původu. Vycházeli z úvahy, že pokud jsou tyto tubulární formace neoplastické, bude v nich možné detekovat genetické změny vyskytující se v některých dalších duktálních neoplaziích pankreatu, jako jsou například mutace KRAS, inaktivace *DPC4*, *TP53* a amplifikace *ERBB2*. V neposlední řadě by endokrinní buňky a tubulární struktury měly společný klonální původ. Ani jednu z těchto teorií se nepodařilo potvrdit a ze závěru studie vyplývá, že tubuly přítomné v tumorech jsou s největší pravděpodobností původní struktury pankreatu zavzaté do endokrinního tumoru.

Výsledky retestování HER2 u karcinomů prsu různými metodami na Ústavu patologie 1. LF UK a VFN v Praze

MUDr. Zuzana Velenská,

MUDr. Jan Galko,

prof. MUDr. Ctibor Povýšil, DrSc.,

Ing. Daniel Tvrdík, Ph.D.

Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Praha

V první fázi jsme v rámci studie „Retestování HER2 negativních karcinomů prsu“ vyšetřovali certifikovaným kitem Ventana a metodou SISH 67 případů karcinomu prsu s předchozím negativním výsledkem (0, 1+) v imunohistochemickém vyšetření. Při vyšetření certifikovaným kitem Ventana bylo jako pozitivní označeno

16 případů (23,9%; 10 x 2+, 6 x 3+), u nichž jsme provedli kontrolní vyšetření certifikovaným kitem Herceptest, a to s negativními výsledky (13 x 0, 3 x 1+). Při vyšetření metodou SISH byly jako pozitivní označeny 3 případy (4,5%; poměr počtu kopií genu Her-2/neu a centromer chromozomu 17 se pohyboval od 2,0 do 2,2), u nichž jsme provedli kontrolní vyšetření metodou FISH, rovněž s negativními výsledky (poměr počtu kopií genu a centromer chromozomu se pohyboval od 1,4 do 1,6).

Ve druhé fázi jsme srovnávali výsledky certifikovaného kytu Ventana a certifikovaného kytu Herceptest u 43 případů karcinomu prsu zároveň s vyšetřením metodou FISH. K neshodě došlo u tří případů (jeden případ byl ve Ventaně pozitivní (2+), zatímco v Herceptestu negativní (1+), u ostatních dvou tomu bylo naopak (Ventana 0, resp. 1+, Herceptest 2+ a 2+)), přičemž FISH neprokázala amplifikaci genu v žádném z nich (poměr počtu kopií genu a centromer chromozomu byl vždy roven 1,00).

Nestin and collagen triple helix repeat containing 1 in triple negative breast cancer

Gvantsa Kharishvili, M.D.¹,

Dana Šimková, MSc.¹,

Magdaléna Čížková, M.D.²,

Kateřina Bouchalová, M.D., Ph.D.²,

Giorgi Mgebrishvili, MSc.¹,

prof. Zdeněk Kolář, M.D., CSc.¹,

Jan Bouchal, MSc., PhD.¹

¹ Laboratory of Molecular Pathology and Department of Clinical and Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

² Laboratory of Experimental Medicine, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

Background: We have shown that nestin expression is higher in breast carcinoma with a basal phenotype (Kolar et al., 2007) and CTHRC1 and periostin may predict bone metastasis of breast cancer (Kharishvili et al., 2011). Our aim therefore was to examine the simultaneous role of nestin and CTHRC1 in breast cancer progression.

Material and methods: Archival formalin-fixed paraffin-embedded 173 invasive breast cancer samples classified into WHO histotypes and luminal, triple negative and Her2 subtypes were immunohistochemically stained with CTHRC1, periostin, nestin and vimentin antibodies.

Staining was evaluated with histoscore and neoangiogenesis was assessed as a number of nestin positive new vessels. Degree of inflammation was evaluated on HE-stained slides. Data was statistically processed by non-parametric Mann-Whitney U test, Spearman correlation coefficient and Pearson Chi-Square.

Results: Both CTHRC1 stromal ($p=0.013$) and nestin epithelial expression ($p=0.001$) were higher in triple negative subtype. We found strong association between nestin expression in cancer cells and CTHRC1 stromal expression in advanced stage patients ($r=0.614$; $p=0.007$). Nestin expression was also associated with vimentin expression in breast cancer cells ($r=0.491$; $p<0.001$). Both nestin and vimentin showed positive association with degree of inflammation, in particular in triple negative ($r=0.422$; $r=0.521$; both $p<0.001$) patients. We observed higher nestin positivity in patients with lymph node metastases and high periostin stromal expression ($p=0.031$).

Conclusions: For the first time, we report association between CTHRC1 and nestin expression in patients with advanced breast cancer. Further investigation is needed to better clarify their role in inflammation and breast cancer progression.

This work was supported by grants NS 9956-4, MSM 6198959216, infrastructure support CZ.1.05/2.1.00/01.0030 and LF_2011_009.

The role of NFkappaB signaling pathway – potential prognostic and predictive factor in diffuse large B-cell lymphoma

MUDr. Patrik Flodr²,

MUDr. Zuzana Kubová¹,

doc. MUDr. Tomáš Papajík, CSc.¹,

MUDr. Tomáš Tichý²,

Mgr. Eva Sedláková²,

Mgr. Michaela Šváchová²

¹ Department of Hemato-oncology, Faculty Hospital Olomouc

² Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and Faculty Hospital Olomouc

DLBCL constitutes app. 30–40% of non-Hodgkin lymphomas (Armitage et al. 1998). Few studies used an immunohistochemical detection for a stratification of DLBCL (Colomo et al. 2003). Two major patterns of gene expression by gene array technology have been proposed, (Alizadeh

et al. 2000) dividing into prognostically significant subgroups in a Germinal centre B-cell-like (GCB) and an Activated B-cell-like (ABC) DLBCL. Expected 5-year over-all survival in GCB and ABC DLBCL is app. 70%, 39% resp. (WHO 2001). First publication describing NFkappaB pathway is mentioned in 1986 (Sen et al.) and comprises family of transcription factors with an important role in a cell proliferation, antiapoptotic function and differentiation. NFkappaB signaling pathway is referred to as a central mediator of an immune response and controls the expression of many proteins. NFkappaB signaling pathway regulates survival of normal and malignant B-cells by controlling the expression of cell death regulatory genes (Karin et al. 2002). Constitutive activation of NFkappaB signaling pathway may contribute to the lymphomagenesis of DLBCL. The sorting in GC and post-GC DLBCL group from FFPE tissue blocks with an application of indirect immunohistochemistry was carried out according to the immunoprofile as detected in GC and non-GC B-cells. So-called "Hans classifier" encompasses CD10, Bcl6 and MUM1/IRF4. The GC group was signed if detected positive expression of CD10 and BCL6 and negative expression of MUM1/IRF4 and non-GC group sorting in a vice versa manner. During the activation of NFkappaB pathway free NFkappaB monomers translocate to the nucleus and nuclear positivity is observed in particular DLBCL groups. In our pilot file of DLBCL cases ($n=76$) we evaluated expression of NFkappaB (p50, p52, p65) in GC ($n=14$), non-GC ($n=15$) and "grey-zone" types ($n=47$) with detected nuclear localization of NFkappaB expression ($n=57$, 7, 15 resp.) without clear-cut linkage to the three mentioned groups of DLBCL. Currently extended file ($n=112$) is being sorted according to our design both in conventional tissue blocks and tissue microarray (TMA) and we expect at least analogous heterogeneity of expression NFkappaB of evaluated cases. Described assay is a part of "translation research" in DLBCL which may play an important role in sorting of DLBCL and a potential role in "tailored therapy" in particular cases of the DLBCL disease. Supported by MSM 6198959205 and IGA NT11103.

Naše první zkušenosti se zavedením needle core biopsie tumoru ledvin ve FNO

MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D.¹,

MUDr. Petr Buzrla²,

MUDr. Radoslava Tomanová²,

Mgr. Ivona Zavacká¹,

RNDr. Magdalena Uvírová³,

MUDr. Martin Fabišovský⁴

¹ Lékařská fakulta Ostravská univerzita

² Ústav patologie Fakultní nemocnice v Ostravě

³ CGB laboratoř a.s. Ostrava

⁴ Oddělení urologie Fakultní nemocnice v Ostravě

Úvod: Diagnóza tumorózních lézí ledvin je založena převážně na vyšetření zobrazovacími technikami. Pokrok diagnostických postupů výrazně změnilo zavedení CT vyšetření, které nejen zpřesnilo diagnostickou metodiku zobrazovacích metod, ale také způsobilo dramatický nárůst incidence nádorů ledvin. V současné době je více než třetina nádorů ledvin objevena náhodně. Právě drobné léze jsou diagnostickým a současně i terapeutickým problémem. V léčbě malých nádorů ledvin se ukázaly jako velmi přínosné minimálně invazivní metody typu radiofrekvenční ablace (RFA) a kryoterapie. Perkutánní biopsie v takových případech je jedinou metodou k získání správné diagnózy a zvolení terapeutického postupu. Používání této metodiky však není běžné a má v řadách kliniků četné odpůrce. Jejich hlavními argumenty pro provádění tohoto odběru jsou obavy z nádorového rozsevu, odběrových komplikací, histopatologických pochybností vyúsťujících ve falešně pozitivní výsledky. Zatímco obavy z komplikací při odběru neumí patolog ovlivnit, histopatologické pochybnosti se snažíme řešit. Za použití IHC ev. molekulárně genetických vyšetření jsme schopni provést diagnostiku nádorových lézí ledvin poměrně exaktně.

Materiál a metodika: V Ústavu patologie FNO jsme provedli vyšetření needle core biopsie u 16 pacientů a po ní následovala totální nebo částečná nefrektomie. Histologické zpracování core biopsie bylo ve zkráceném odvodňovacím režimu, následovalo vyšetření s barvením Hematoxylin-eosin, PAS a PAS po digesci, které bylo doplněno o imunohistochemické metody s použitím α -methylacyl-CoA racemase (AMACR), cytokeratin 7 (CK7), and CD10, CD117, MIA, vimentin, HSA, HMB45. Stanovení diagnózy bylo provedeno do 48 hodin. Materiál z následné částečné nebo totální nefrektomie byl zpracován klasicky v 24 hodinovém odvodňovacím režimu. Barvení a imunohistochemické vyšetření bylo provedeno obdobně jako u core biopsie, výsledek byl uvolněn do 5 pracovních dnů. Molekulárně genetické vyšetření se provádí ve vybraných případech prostřednictvím fluorescenční in situ hybridizace.

Výsledky: Ze 16 needle core biopsií bylo diagnostikováno 11 světlobuněčných karcinomů, 1 chromofóbní karcinom, 1 onkocytom, 1 angiomyolipom a 2 karcinomy NS. V následných 15 provedených částečných či totálních nefrektomiích korelovaly výsledky core biopsie s resekátem ve všech případech, zpřesnění diagnózy bylo provedeno u dvou NS karcinomů, kde jeden z nich byl typický světlobuněčný karcinom, druhý odpovídal karcinomu z renálních buněk (dif.dg. asociace s translokací Xp 11.2) Stanovené skóre dle Fuhrmannové se shodovalo ve více než 50 % srovnávaných případů.

Závěr: Core biopsie nádorů ledvin poskytuje dostatečné množství materiálu pro bioptickou diagnostiku a grade, s použitím IHC i stanovení podtypu renálního karcinomu. Zavedení molekulárně genetického vyšetření zpřesňuje diagnostiku tumoru, je však časově náročnější.

Diskuse: Nádory ledvin jsou pravděpodobně jednou z posledních neoplázií, kde je terapeutický zákrok prováděn bez předcházející histologické diagnózy. Zavedení needle core biopsie tumorů ledvin umožňuje zpřesnit předoperační status. Dle literárních údajů je diagnostická přesnost core biopsie ledvin v rozlišení maligních a benigních nádorů 90 %. Přesnost biopsie ledvin pro podtyp nádorů je 80–90 %, ale přesnost pro jaderný stupeň dle hodnocení Fuhrmannové je pouze 50–75 %. Naše výsledky se shodují s literárními údaji.

Přítomnost klonálních buněk v nenádorové lymfadenopatii s folikulární hyperplazií

MUDr. Jan Soukup¹,

MUDr. Vít Campr¹,

prof. MUDr. Roman Kodet, CSc.¹,

RNDr. Marcela Mrhalová, Ph.D.¹,

RNDr. Markéta Kalinová, Ph.D.¹,

MUDr. Ester Mejstříková²

¹ Ústav patologie a molekulární medicíny,

² LF UK a FN v Motole, Praha

² Klinika dětské hematologie a onkologie,

² LF UK a FN v Motole, Praha

U 14letého chlapce s krční lymfadenopatií jsme vyšetřili uzlinu histologicky, imunohistochemicky, metodou průtokové cytometrie, a dále metodou PCR a FISH. Morfologicky šlo o nenádorovou lymfadenopatii s folikulární hyperplazií. Průtoková cytometrie prokázala klonální populaci (4 % buněk) s expresí řetězce kappa. Tento nálezn odpovídal i imunohistochemické restrikci řetězce kappa v disperzních plazmatických buňkách germinálních folikulů.

Metoda PCR neprokázala klonální přestavbu imunoglobulinových řetězců (IGK, IGL ani IGH). Metoda FISH na úrovni mRNA rovněž nedetegovala restrikci kappa.

Závěr: Průkaz klonální populace v lymfatické uzlině je vždy alarmující, neznamená však vždy malignitu a může se vyskytnout i v rámci nenádorové lymfadenopatie. Naše kazuistika poukazuje, že samostatný výsledek průtokové cytometrie může být zavádějící a měl by vždy být korelovan s morfologickým obrazem.

Podpořeno Výzkumným záměrem FN v Motole MZO/FNM2005/6704 a Výzkumným záměrem 2. LF UK v Praze MSM0021620813.

Molekulárně genetická vyšetření u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (NSCLC)

Mgr. Jarmila Šimová^{1,2},

Mgr. David Konvalinka¹,

Mgr. Barbora Kubová¹,

Mgr. Irena Urbanovská¹,

Mgr. Michaela Jalůvková¹,

RNDr. Magdalena Uvírová^{1,2},

Mgr. Jana Žmolíková¹,

Iveta Žebráková¹,

MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D.²

¹ CGB laboratoř a.s., Laboratoř molekulární genetiky a patologie, Ostrava

² Lékařská fakulta,

Ostravská Univerzita, Ostrava

Úvod: Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) je velmi závažným nádorovým onemocněním, které bývá ve více než 70 % případů odhaleno v pokročilém stádiu. Akcelerovaný rozvoj tohoto onemocnění klade vysoké nároky na rychlost, přesnost stanovení konečné diagnózy a zahájení vhodného léčebného postupu. Léčebné možnosti zahrnují chirurgické odstranění nádoru, radioterapii, chemoterapii a v současné době také tzv. cílenou biologickou léčbu. Cílená biologická léčba vyžaduje rychlou, citlivou a přesnou identifikaci genetických změn, které mohou predikovat účinnost této cílené léčby (terapeutickou odpověď). V současnosti identifikace genetických změn (mutací) v onkogenech EGFR, KRAS a ALK asociovaných s NSCLC napomáhá výběru pacientů, kteří mohou profitovat z této cílené biologické léčby.

Materiál a metody: Na našem pracovišti provádíme u pacientů s NSCLC rutinní stanovení přítomnosti mutací v EGFR genu. Nově jsou také pacienti s wt EGFR testováni na přítomnost

přestavby ALK genu za vzniku EML4-ALK fúzního genu. Analýzu genetických změn v nádorové DNA provádíme pomocí vhodné molekulárně biologické metody: nejčastěji pomocí real-time PCR (kit TheraScreen EGFR RQ PCR kit), fragmentační analýzy, přímého sekvenování, primer extension analýzy (SNaPshot assay) a mutant-enriched PCR. DNA pro analýzu je izolována z bioptického materiálu (parafínové bloky) i cytologických vzorků s ověřenou histologickou diagnózou. Analýza přestaveb ALK genu (2p23) se provádí na histologických preparátech metodou FISH.

Výsledky: V období 11/2010 až 9/2011 bylo analyzováno 140 vzorků nádorových DNA pacientů s NSCLC a bylo zachyceno 8 (5,7 %) pacientů nesoucích aktivační mutace v EGFR genu. Spektrum prokázaných mutací bylo zastoupeno 4x delecí v exonu 19, 3x mutací L858R a 1x mutací G719X v EGFR genu. V období 7/2011–9/2011 bylo vyšetřeno 5 pacientů na přítomnost přestavby ALK genu. Tato přestavba nebyla prokázána ani v jednom z případů.

Diskuze: Aktivační mutace v genu pro EGFR korelují s odpovědí na léčbu pomocí tyrozinkinázových inhibitorů – TKIs: gefitinib (Iressa) nebo erlotinib (Tarceva). Frekvence výskytu mutací v genu pro EGFR se udává mezi 5–20 % v závislosti na populaci. Přestavby ALK genu za vzniku EML4-ALK fúzního genu u pacientů s wt EGFR slouží jako prediktor léčebné odpovědi při léčbě ALK inhibitorem (Crizotinib). Přestavby ALK genu se vyskytují přibližně u 5 % pacientů s NSCLC. Naše výsledky vyšetření korelují s výše uvedenými literárními údaji, přičemž nulový záchyt přestavby ALK genu souvisí pravděpodobně s velmi malým počtem dosud vyšetřených pacientů. Přítomnost některých mutací v EGFR genu, jako např. T790M, stejně tak jako přítomnost mutací v K-ras genu a přestaveb ALK genu predikuje rezistenci na léčbu pomocí TKIs.

Závěr: Stanovení mutačního statutu nádoru může poskytnout účinný nástroj pro stanovení efektivní strategie a volby léčebného postupu u pacientů s NSCLC. V případě rezistence může být predikován alternativní způsob terapie.

Progesterónový receptor v normálním endometriu a v I. a II. type karcinómu endometria

MUDr. Vladimír Šišovský, PhD.^{1,2,3},
MUDr. Michal Palkovič, PhD.^{1,2},
doc. MUDr. Ján Porubský, CSc.¹,
prof. MUDr. Ľudovít Danihel, CSc.^{1,2}

¹ Ústav patologickej anatomie, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského

v Bratislave a Univerzitná nemocnica Bratislava, Bratislava, Slovenská republika

² Patologicko-anatomické pracovisko, Úrad pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou, Bratislava, Slovenská republika

³ Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava, Slovenská republika

Úvod: Progesterónový receptor (PR), 98 kDa proteín, patrí k vnútrobunkovým steroidovým receptorom, do nadrodiny transkripčných faktorov; spolu s progesterónom hrá centrálnu koordinačnú rolu v regulovaní reprodukčných udalostí spojených so založením a udrжанím gravidity (ovulácia, vývin žliaz maternice a mliečnej žľazy), a neurobehaviorálneho prejavu v súvislosti s pohlavnou vnímavosťou. Jeho vysoká expresia je združená s niektorými bunkami, napr. normálne, hyperplastické a neoplastické bunky mliečnej žľazy, ako aj epitelové a myometriové bunky maternice.

Cieľ: Hodnotiť vzťah medzi morfológiou normálneho endometria a karcinómu endometria, a medzi stupňom expresie PR.

Metódy: Archívne, vo formálne fixované a do parafínu zaliate, ľudské bioptické (po hysterektómii a kyretáži) tkanivové vzorky s normálnym proliferačným endometriom, s endometrioidným stupňa histologickej diferenciácie G1 a G3 a so svetlobunkovým podtypom karcinómu endometria sme vyšetřili imunohistochemicky, svetelným mikroskopom semikvantitatívne, na expresiu PR v jadrách epitelových buniek endometria.

Výsledky: Expresia PR bola vysoká v normálnom proliferačnom endometriu, ale postupne klesala so stupňom histologickej diferenciácie endometrioidného podtypu karcinómu endometria (typ I – menej agresívny). V svetlobunkovom podtype karcinómu endometria (typ II – agresívny) expresia PR nebola prítomná.

Záver: Vysoká expresia PR je v normálnom proliferačnom endometriu. Malígnu zmeny endometria sprevádza pokles expresie PR. Endometrioidný podtyp (typ I) tvorí PR, zatiaľ čo svetlobunkový podtyp (typ II) karcinóm endometria nie. Množstvo PR je nepriamo úmerné stupňa diferenciácie endometrioidného karcinómu endometria. Hodnotenie PR imunohistochemicky by mohol byť relevantný faktor využiteľný v biomedicínskom výskume ako aj klinickej praxi.

Podporené grantom 2007/28-UK-05 MZ SR „Imunohistochemická a molekulovo-genetická analýza karcinómu endometria.“

Cytometrická analýza obsahu DNA, status hormonálnych receptorov a expresia HER2

v karcinóme prsníka

RNDr. Miroslava Vallová¹,
RNDr. Peter Kuliffay, PhD.¹,
prof. MUDr. Štefan Galbavý, DrSc.^{1,2}

¹ Ústav laboratórných vyšetřovacích metód Vysokej školy zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety a Onkologického ústavu sv. Alžbety, Bratislava, Slovensko

² Ústav súdneho lekárstva, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, Slovensko

Laserová skenovacia cytometria, jedna z nových metód v histopatologickej diagnostike nádorových chorôb, ponúka viaceré možnosti použitia pri štúdiu biologických vlastností nádorových buniek a objektívnej kvantifikácii bunkových subpopulácií.

Objektívne stanovenie prognostických a prediktívnych markerov pri karcinóme prsníka má dôležitú úlohu pre výber vhodnej terapie a stanovení prognózy. V práci sme sa zamerali na hľadanie súvislostí medzi hodnotami S-fázy, DNA indexu a statusu estrogénových (ER) a progesterónových (PR) receptorov, expresie HER2, Ki67 a p53.

Na analýzu sme použili 140 vzoriek karcinómu prsníka (113 vzoriek s invazívnym duktálnym karcinómom, 11 s invazívnym lobulárnym karcinómom, 16 s iným histologickým typom). Vzorky na cytometrickú analýzu sme pripravili z čerstvo odobratého nefixovaného nádorového tkaniva pomocou mechanickej dezintegrácie. Po fixácii sme bunky zafarbili monoklonálnou protilátkou proti cytokeratínu konjugovanou s FITC (CK-FITC) na odlišenie CK+ nádorových buniek a na farbenie jadier sme použili propídi-um jodid. Status hormonálnych receptorov, Ki67, p53 a HER2 sme stanovili imunohistochemickou metódou na parafínových rezoch.

V analyzovanom súbore sme zistili štatisticky významný vzťah medzi hodnotami DNA indexu a S-fázy ($p < 0,05$). Hodnoty S-fázy boli vyššie v tumoroch s vyšším obsahom DNA. Populácie buniek exprimujúcich hormonálne receptory mali významne nižší DNA index a S-fázu ($p < 0,05$). HER2 pozitívne nádorové bunky vykazovali vyššiu proliferáciu vyjadrenú vyššou hodnotou S-fázy. Nádory neexprimujúce hormonálne receptory ani HER2 mali prevažne aneuploidný obsah DNA a vysokú hodnotu S-fázy. Populácie nádorových buniek so strednou a vysokou hodnotou S-fázy viac exprimovali Ki67 a p53 ($p < 0,05$).

The relationship of IL-4 cytokine gene polymorphisms, HRCT score and histopathological score in patients with idiopathic pulmonary fibrosis

doc. MUDr. Martina Vašáková, Ph.D.,

MUDr. Martina Šterclová, Ph.D.,

MUDr. Tomáš Olejář, Ph.D.,

RNDr. Libor Kolesář,

Ing. Jelena Skibová,

MUDr. Radoslav Matěj, Ph.D.

Department of Pathology and Molecular Medicine, Thomayer University Hospital Prague

Introduction: Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a serious disease with unknown cause where an influence of cytokine gene polymorphisms is presumed in the etiology and pathogenesis. We have compared high resolution computed tomography (HRCT) alveolar (AS) and interstitial score (IS) and histopathologic score with IL-4, and IL-4RA cytokine gene polymorphisms in patients with IPF.

Subjects and methods: Forty six IPF patients, mean age 65,7 (range 36–85), 27 women and 19 men were all Caucasians from the Czech Republic. IPF was diagnosed according to ATS ERS Statement. All but three patients had evaluable HRCT investigation. Fourteen patients had surgical lung biopsy. The HRCT results were evaluated by an experienced viewer using the IS and AS scales, which were based on the IPF HRCT description system from Gay et al. The histopathological evaluation of lung tissue specimens was performed by experienced histopathologist using these parameters: myofibroblast foci (MFF), inflammation, eosinophils, granulomas and Ashcroft criteria for grading a fibrosis. The IL-4 and IL-4 RA gene polymorphisms were characterized utilizing a PCR with sequence-specific primers method.

Results: HRCT AS were higher in carriers of IL-4 haplotypes 1 TTC and TTT IL-4 (-1098) (-590) (-33) ($p=0.0423$). Ashcroft score tended to be more pronounced in IPF patients with IL-4 haplotype 2 (-1098) (-590) (-33) GCC and MFF were more frequent in TCC carriers. IL-4 RA +1902 allele G and IL-4 -590 allele T were more frequent in patients with higher HRCT AS. No correlation was observed between HRCT and histopathological score.

Conclusions: We assume from our data that the polymorphisms of IL-4 and IL-4RA genes (genes of cytokines with regulatory activity) might influence the phenotype of IPF as shown by measurable changes in HRCT and

histopathological investigations. The correlation of functionally relevant alleles and haplotypes of promotor region of IL-4 (especially allele T in loci -33 and -590) with AS could mean that active changes, i.e. new alveolar lesions with initial fibrosis, is more prominent in these individuals. The correlation with histopathological score is less clear, it could be caused by evaluation of single (or few) samples of lung tissue from one or two places, which might not be representative for the whole lung fibrotic process. The results could be also be influenced by relatively small sample of patients with surgical lung biopsies.

The study was supported by grant IGA MZCR NR- 9131 and NS10423-3/2009.

Analysis of HGG-02 cell line with loss of EGFR gene copy derived from childhood glioblastoma multiforme

Mgr. Jan Škoda¹,

Mgr. Jakub Neradil, Ph.D.^{1,2},

Mgr. Tomáš Loja, Ph.D.¹,

MUDr. Karel Zitterbart, Ph.D.²,

MUDr. Zdeněk Pavelka²,

doc. MUDr. Eva Brichtová, Ph.D.³,

prof. RNDr. Jana Šmardová, CSc.⁴,

RNDr. Iveta Valášková⁵,

prof. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D.^{4,6},

prof. MUDr. Jaroslav Štěrba, Ph.D.²,

doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., M.Sc.^{1,2}

¹ Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno

² Department of Pediatric Oncology, University Hospital Brno

³ Department of Pediatric Surgery, Orthopedics and Traumatology, University Hospital Brno

⁴ Institute of Pathology, University Hospital Brno

⁵ Department of Medical Genetics, University Hospital Brno

⁶ First Department of Pathological Anatomy, St. Anne's University Hospital, Brno, Czech Republic

The aim of this study was to perform a detailed cytogenetic and molecular genetic analysis of HGG-02 cell line derived from tumor of 14.5-year-old boy with glioblastoma multiforme who showed an atypical long-term survival after surgery and radio/chemotherapy – 45 months till now (1). Formalin-fixed, paraffin embedded tumor tissue and the corresponding HGG-02 cell line derived from this tumor were analyzed using

G-banding, fluorescence in situ hybridization (FISH), immunohistochemistry (IHC), and immunocytochemistry (ICC). Using FISH, we identified a very unusual genetic change – a loss of EGFR gene copy in both the tumor tissue and the HGG-02 cell line. In accordance with the cytogenetic findings, IHC and ICC did not demonstrate overexpression of EGFR in the tumor tissue or HGG-02 cells. Lower EGFR expression level was also identified in HGG-02 cell line using RT-PCR and immunoblotting, if compared with GM7 glioblastoma cell line with normal EGFR gene copy number (2). To understand cancer regulatory pathways that contribute to HGG-02 tumor phenotype, expression profiling and antibody arrays were applied. HGG-02 expression profile revealed upregulation of 126 genes (regulating cell cycle, apoptosis and signaling pathways induced by growth factors) and downregulation of 10 genes (proteins organizing or interacting with extracellular matrix) in comparison with GM7 cells. Furthermore, we identified upregulated signaling through ErbB2, ErbB3, HGFR, MSPR and neurotrophic tyrosine kinase receptor family in HGG-02 cells, as well as reduced phosphorylation in EGFR, Axl and insulin receptor. To conclude, obtained data suggests candidate signal pathways that may play role in acquisition of unusually favorable phenotype of this tumor.

This work was supported by grants VZ MSM0021622415, IGA MZCR NR/9125-4 2006, GACR 204/08/H054.

Literatura

1. Veselska R., Skoda J., Loja T., Zitterbart K., Pavelka Z., Smardova J., Valaskova I., Hermanova M., Sterba J. (2010) Childs Nerv Syst 26:841–846.

2. Loja T., Chlapek P., Kuglik P., Pesakova M., Oltova A., Cejpek P., Veselska R. (2009) Oncol. Rep. 21:119–27.

Analýza pacientů s pokročilým NSCLC s dlouhotrvajícím přežitím bez progresu při léčbě EGFR tyrozinkinázovými inhibitory

MUDr. Ondřej Fiala¹

prof. MUDr. Miloš Pešek, CSc.²

MUDr. František Brůha²

RNDr. Marek Minárik, PhD.³

¹ Onkologické a radioterapeutické oddělení FN Plzeň

² Klinika TRN FN Plzeň

³ Centrum aplikované genomiky solidních nádorů (CEGES), Genomac, Praha

Východisko: Mezi moderní léčebné modalita v pneumoonkologii patří biologicky cílená

léčba tyrozinkinázoými inhibitory blokujícími aktivaci kaskády receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR). Erlotinib a gefitinib jsou EGFR tyrozinkinázoové inhibitory (EGFR-TKI) užívané k léčbě pokročilého NSCLC. Celosvětově probíhá intenzivní výzkum zaměřený na hledání prediktorů účinnosti biologicky cílené léčby. Dobře známá je zejména úloha mutací EGFR a KRAS.

Cíle: Autoři vybrali soubor pacientů s relativně dlouhým časem do progresu (progression free survival, PFS) při léčbě EGFR-TKI a tento soubor blíže analyzují.

Metodika: Soubor má celkem 493 pacientů s pokročilým NSCLC, léčených EGFR-TKI 334 mužů a 159 žen. 237 pacientů s adenokarcinomem, 196 s epidermoidním karcinomem, 55 s dediferencovaným karcinomem a 5 s BAC, 349 kuřáků, 94 nekuřáků a u 50 pacientů nebylo možno údaj dohledat, 50 pacientů s mutací EGFR, 51 s mutací KRAS. Z výchozího souboru byla vybrána skupina pacientů s PFS 180 dní a více při léčbě EGFR-TKI, a ta byla blíže analyzována. Statistické srovnání bylo provedeno pomocí Fischerova a χ^2 testu.

Výsledky: Z původního souboru 493 pacientů bylo u 106 (21,5 %) dosaženo PFS 180 dní a více. V této skupině bylo 68 mužů a 38 žen, 75 kuřáků, 26 nekuřáků a u 5 pacientů nebylo možné údaj dohledat, 56 pacientů s adenokarcinomem, 37 s epidermoidním karcinomem, 11 s dediferencovaným karcinomem a 2 s BAC. U 27 pacientů byla prokázána mutace EGFR, u 8 byla prokázána mutace KRAS, u 62 bylo vyšetření na mutace EGFR a KRAS negativní a 9 nebylo vyšetřeno. U 12 pacientů byla prokázána amplifikace EGFR, 26 pacientů bylo vyšetření na amplifikace EGFR negativní a 68 pacientů nebylo vyšetřeno. Vliv přítomnosti mutace EGFR na PFS byl statisticky signifikantní ($p=0,002$). Vliv mutace KRAS ($p=0,212$), pohlaví ($p=0,426$), kuřáctví (0,352) a histologického typu (0,601) na PFS nebyly statisticky signifikantní.

Závěr: Provedená analýza potvrdila pozitivní prediktivní potenciál mutací EGFR a nepotvrdila negativní prediktivní potenciál mutace KRAS na efekt léčby EGFR-TKI. Mezi pacienty s PFS 180 a více dnů bylo 58,6 % pacientů, u kterých nebyla prokázána přítomnost mutace EGFR a přesto ti pacienti z léčby dobře profitovali. Nepřítomnost aktivačních mutací EGFR ani přítomnost mutace KRAS nelze považovat za kritéria vylučující léčbu EGFR-TKI u pacientů s pokročilým NSCLC.

Changes in gene expression in neuroblastoma and medulloblastoma cell lines during induced differentiation by combined treatment with all-trans retinoic acid and LOX/COX inhibitors

RNDr. Petr Chlápek, DiS.^{1,2,4},
Mgr. Martina Rádová, Ph.D.¹,
Mgr. Jakub Neradil, Ph.D.^{1,2},
MUDr. Karel Zitterbart, Ph.D.²,
prof. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D.^{3,4},
prof. MUDr. Jaroslav Štěrbá, Ph.D.²,
doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D., MSc.^{1,2}

¹ Department of Experimental Biology,
School of Science,
Masaryk University, Brno

² Department of Pediatric Oncology,
University Hospital Brno

³ Institute of Pathology,
University Hospital Brno

⁴ Institute of Pathologic Anatomy,
St. Anne's University Hospital, Brno,
Czech Republic

Retinoids are known to be effective inducers of cell differentiation both in vivo and in vitro. This feature predetermines them for the use in recent antitumor therapy. In our study, we investigate possibilities of enhancement of the ATRA-induced differentiation by combined treatment with inhibitors of lipoxygenases (LOX) or cyclooxygenases (COX). Two neuroblastoma cell lines, SK-N-BE(2) and SH-SY5Y, and two medulloblastoma cell lines, Daoy and D283 were used in this study. For combined treatment, caffeic acid was chosen as an inhibitor of 5-LOX and celecoxib as an inhibitor of COX-2. Possible molecular mechanisms of this combined treatment were examined by expression profiling using Human Cancer Oligo GEArray (Superarray, SABiosciences). In selected candidate genes (CDKN1A, GDF15, HLA-C, HMGA1, TIMP1), results from expression profiling were confirmed by RT-PCR. These analyses showed a concentration-dependent increase in gene expression of genes known to be involved in the process of retinoid-induced differentiation such as GDF15, genes involved in cytoskeleton rearrangements etc. In both medulloblastoma cell lines increased expression of proapoptotic gene TAp73 was detected by RT-PCR after combined treatment.

In general, our results also indicated lower sensitivity of medulloblastoma cell lines to this combined treatment. To conclude, obtained data support our initial hypothesis that ATRA-

induced cell differentiation may be enhanced by the combined application with LOX/COX inhibitors.

This study was supported by grants

IGA NR9341-3/2007, GACR 204/08/H054,

VZ MSM 0021622415 and IGA MZCR NS10218-3/2009.

Klinicko-patologické korelace exprese nestinu ve tkáni duktálního adenokarcinomu pankreatu včetně analýzy perineurálního šíření

MUDr. Jiří Lenz,
MUDr. Petr Karásek,
RNDr. Jiří Jarkovský, Ph.D.,
MUDr. Katarína Mučková,
prof. MUDr. Petr Dítě, DrSc.,
prof. MUDr. Zdeněk Kala, CSc.,
doc. RNDr. Renata Veselská, Ph.D.,
prof. MUDr. Markéta Hermanová, Ph.D.
I. patologicko-anatomický ústav,
Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně,
LF MU Brno

Úvod: Intermediární filamentum nestin je považováno za marker kmenových/progenitorových buněk v různých tkáních. Exprese nestinu byla také popsána v různých typech solidních nádorů. Ve tkáni duktálního adenokarcinomu pankreatu se předpokládá role nestinu v procesu buněčné migrace, invazivnosti a metastazování a nestin je zvažován jako terč pro případnou biologickou léčbu.

Metodika: Exprese nestinu byla imunohistochemicky vyšetřena na souboru 117 resekalizovaných duktálních adenokarcinomů pankreatu, byla analyzována a korelována s vybranými klinicko-patologickými parametry včetně perineurálního šíření. Současně byla provedena analýza exprese nestinu v nervových vláknech tkání chronické pankreatitidy.

Výsledky: Z vyšetřených 117 duktálních adenokarcinomů pankreatu bylo 79 nestin negativních (67,5 %) a 38 nestin pozitivních (32,5 %). Statisticky signifikantní korelaci mezi expresí nestinu a vybranými klinicko-patologickými parametry jsme neprokázali. Stupeň diferenciace tumoru ($p<0,001$) a postižení lymfatických uzlin ($p=0,009$) potvrdily svoji roli nezávislých prognostických faktorů. Perineurální šíření bylo zaznamenáno celkem u 94 duktálních adenokarcinomů pankreatu (80,3 %), statisticky signifikantní korelaci s expresí nestinu jsme neprokázali. Exprese nestinu byla prokázána v nervových vláknech ve tkáni duktálního adenokarcinomu pankreatu i chronické pankreatitidy.

Závěr: Naše studie potvrdila úzký vztah nestinu a biologického procesu tumorigeneze duktálního adenokarcinomu pankreatu. Význam exprese nestinu jako potenciálního prognostického markeru prokázán nebyl na rozdíl od významu sledovaných konvenčních prognostických faktorů. Současně nebyla prokázána signifikantní korelace mezi expresí nestinu v nádorových buňkách a perineurálním šířením karcinomu. Exprese nestinu, jenž byla prokázána v nervových vláknech tkání duktálního adenokarcinomu pankreatu i chronické pankreatitidy, zdá se, reflektuje proces tzv. neurálního remodelingu zodpovědného za pankreatickou neuropatii.

Interactions of platinum (II) complexes containing substituted 6-benzylaminopurines as ligands with microsomal cytochromes P450

Mgr. Vlastimil Mašek, Ph.D.^{1,3},

Bc. Monika Harvanová^{1,3},

Bc. Martina Michalová^{1,3},

Mgr. Zuzana Matušková^{1,3},

doc. RNDr. Eva Anzenbacherová, Ph.D.²,

Mgr. Pavel Štarha, Ph.D.⁴,

prof. RNDr. Zdeněk Trávníček, Ph.D.⁴,

prof. RNDr. Pavel Anzenbacher, DrSc.^{1,3}

¹ Department of Pharmacology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

² Department of Medical Chemistry and Biochemistry

³ Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc

⁴ Regional Centre of Advanced Technologies and Materials & Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Science, Palacky University Olomouc

Interaction of nine forms of human hepatic cytochromes P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, and CYP3A4) with four oxaliplatin and two transplatin derivatives was studied using pooled human microsomes. The most important inhibition is that of CYP3A4 form observed for all oxaliplatin-derived complexes. CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19 activities were also inhibited at least by one of four oxaliplatin complexes at concentrations reaching 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Non-significant inhibition was shown for CYP2C8 indicating low probability of interactions with, for example, warfarin. To determine the clinical significance, concentrations of the oxaliplatin derivatives co-

responding to maximal oxaliplatin plasma levels were also tested. At these concentrations of inhibitors, a decrease to 40 % of control activity was seen for CYP3A4. This finding could negatively influence the future application of the tested complexes in antitumor therapy. In the case of the transplatin derivatives, an important decrease of enzymatic activity for CYP2D6, CYP2C9, and CYP2C19 (to 30–10 % of control) was found. For inhibitor concentration reaching maximal oxaliplatin plasma level, inhibition of CYP2C9 and CYP2D6 was detected but the decrease corresponds only to 70–80 % of control which is clinically not relevant.

This work was supported by the Czech Science Foundation (Grant P208/10/P466).

The infrastructural part of this project (Institute of Molecular and Translational Medicine) was supported by the Operational Programme Research and Development for Innovations (Project CZ.1.05/2.1.00/01.0030 and CZ.1.05/2.1.00/03.0058).

Studium účinku derivátů odvozených od cholestanu na prsní nádorové buněčné linie

Mgr. Jana Steigerová, Ph.D.^{1,2},

Mgr. Kateřina Křížová^{1,2},

Mgr. Lucie Rárová, Ph.D.³,

Mgr. Jana Oklešťková, Ph.D.³,

Mgr. Michaela Šváchová⁴,

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc.^{1,2},

prof. Ing. Miroslav Strnad, CSc.³

¹ Laboratoř molekulární patologie, Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc

² Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP a FN Olomouc

³ Laboratoř růstových regulátorů, PŘF UP Olomouc a Ústav experimentální botaniky AV ČR, Olomouc

⁴ Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP a FN Olomouc

Cholestanové deriváty jsou novou skupinou látek, jejichž mechanismus působení není na molekulární úrovni kompletně prozkoumán. Jedná se o analoga polyhydroxylových derivátů sterolu představujících jeden z typů regulátorů růstu rostlin. Některé syntetizované deriváty cholestanu testované in vitro vynikaly také výraznou cytotoxickou aktivitou na savčí buňky. Na základě strukturálních motivů těchto látek se dá předpokládat, že jedním z možných vysvětlení silných cytotoxických účinků by mohla

být vazba na receptory pro steroidní hormony. Práce je zaměřena na studium efektu vybraných derivátů cholestanu u hormonálně senzitivních a hormonálně nesenzitivních buněčných linií odvozených od karcinomu prsu. Cílem této studie je zjistit vliv vybraných derivátů na proliferaci buněk, buněčný cyklus, genovou expresi a indukci apoptózy u buněčných linií odvozených od karcinomu prsu a zjistit případné rozdíly mezi expresí klíčových proteinů u hormonálně citlivých a hormonálně necitlivých buněk, které by napomohly lépe pochopit mechanismy nádorové progresse a perspektivně vést k vývoji účinnější terapie.

Na základě MTT testu byl u mamárních hormonálně senzitivních (MCF-7) a hormonálně nesenzitivních (MDA-MB-468) nádorových buněčných linií sledován účinek studovaných derivátů KAR6299 a 1966 na buněčnou viabilitu a proliferaci po dobu 24, 48 h a byla určena koncentrace IC50. Oba typy látek inhibovaly buněčnou viabilitu u obou nádorových buněčných linií. Pro další experimenty byly použity koncentrace látek 5, 15, 30 a 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (24 a 48 h). Pomocí průtokové cytometrie byly sledovány změny distribuce buněk v rámci buněčného cyklu po ovlivnění buněk testovanými deriváty. U buněk MCF-7 byla zjištěna blokáda buněk v G1 fázi buněčného cyklu po ovlivnění látkou KAR 6299 za současného snížení zastoupení buněk ve zbývajících fázích cyklu. U buněk MDA-MB-468 nebyly zaznamenány výraznější změny. Pomocí průtokové cytometrie byla také provedena analýza malých jaderných částic, subG1 frakce buněčného cyklu, které jsou spojovány s apoptózou buněk. Oba typy studovaných látek zvyšovaly procento ve frakci subG1 buněk, přičemž u buněk MCF-7 byl efekt látky 1966 nejvýraznější. Western blot analýza prokázala, že testované deriváty vedou u sledovaných buněčných linií ke změnám exprese některých proteinů uplatňujících se při regulaci buněčného cyklu a apoptózy. U buněčné linie MCF-7 citlivé na estrogeny byly pomocí imunofluorescenční detekce a Western blot analýzy zjištěny změny lokalizace androgenového receptoru (AR) a estrogenového receptoru (ER- α , - β) doprovázené poklesem exprese těchto proteinů nejvýrazněji po 48 h působení testovaných látek v koncentraci 30 a 40 μM .

Zjistili jsme, že cholestanové deriváty mají schopnost inhibovat buněčnou proliferaci a vyvolat změny buněčného cyklu i hladin některých proteinů regulujících buněčný cyklus. Získané výsledky by mohly přispět k bližší specifikaci účinku studovaných látek na hormonálně citlivé a necitlivé lidské nádorové linie a případně přinést

vysvětlení odlišné terapeutické odpovědi nádorů s rozdílnou histogenezi a hormonální rezpozibilitou. Nelze vyloučit případné využití těchto derivátů jako potenciálních protinádorových léčiv.

Tato práce je financována za přispění grantů MSM 6198959216, IGA MZ ČR NT11060 a GAČR 303/09/H048.

Méně časté lokalizace dobře diferencovaných neuroendokrinních karcinomů

**Mgr. Hana Bielníková¹,
prof. MUDr. Jirka Mačák, CSc.^{1,2},
MUDr. Radoslava Tomanová¹,
MUDr. Petr Buzrla¹,
MUDr. Fádi Fakhouri¹,
doc. MUDr. Jaroslav Horáček, CSc.^{1,2},
MUDr. Jana Dvořáčková, Ph.D., MIAC^{1,2},
MUDr. Jiří Plášek³,
MUDr. Jiří Dokulil⁴**

¹ Ústav patologie

Fakultní nemocnice Ostrava

² Lékařské fakulty Ostravské univerzity

³ Interní klinika Fakultní nemocnice Ostrava
a Lékařské fakulty Ostravské univerzity

⁴ Onkologická klinika Fakultní nemocnice
Ostrava a Lékařské fakulty Ostravské univerzity

Dobře diferencované neuroendokrinní karcinomy (WDNEC) se většinou objevují v gastrointestinálním nebo dýchacím traktu, kde se odvozují z neuroendokrinních buněk, které jsou umístěny ve sliznicích. Ve vzácných případech vznikají primárně v játrech a ledvinách. V těchto případech je však vždy nutné na prvním místě vyloučit možnost metastazování těchto nádorů do výše uvedených orgánů. To nebývá v řadě případů snadné i při využití nejnovějších diagnostických metod jako je např. ¹¹¹In- octreoscanová scintigrafie. Jednoznačně může k tomuto problému přispět pitva pacienta.

V tomto sdělení uvádíme dva případy.

V prvním případě šlo o 72letého muže s primárním WDNEC jater, který byl nakonec potvrzený pitvním nálezem. Klinickým vyšetřením a ¹¹¹In- octreoscanovou scintigrafií byla zjištěna sekundární nádorová ložiska v obratlech, pánevi, dlouhých kostech a v lebce. Při pitvě bylo zjištěno, že játra jsou výrazně multinodulárně infiltrována nádorem, jehož histologická struktura vytvářela aciny na periferii s palisádovitým uspořádáním. Tato ložiska středně velkých buněk plynule přecházela do malých hyperchromních

nádorových elementů. Imunohistologie odpovídala WDNEC. Nádor exprimoval následující markery: chromogranin A, synaptofyzin, CD56, NSE, Ki-67 v úsecích nejvyšší aktivity asi 5 %/10 HPF. V tomto případě byl velmi podrobně vyšetřen gastrointestinální trakt včetně pankreatu, avšak s negativním výsledkem. Autoři se domnívají, že nádor vycházel z roztroušených neuroendokrinních buněk intrahepatických žlučových cest.

V druhém případě šlo o 36letého muže, u kterého byl zjištěn cystický WDNEC pravé ledviny. Nádor byl velikosti 8 x 8 x 7 cm a skládal se z velké nádorové cysty o průměru 6 cm, ke které přiléhaly solidní bělavé nádorové uzly, které se vyklenovaly nad povrch ledviny. Histologický obraz ukázal, že nádor má trabekulární uspořádání s tendencí tvorby adenoidních až cystických struktur. Imunohistologicky nádor exprimoval následující markery: chromogranin A, synaptofyzin, CD 56 fokálně, vimentin, glukagon fokálně, pankreatický polypeptid (PP) fokálně, cytokeratiny (AE1–AE3) fokálně; Ki-67 bylo pozitivní u 1–2 %/HPF. Protilátky proti serotoninu, kalcitoninu a somatostatinu s nádorovými buňkami nereagovaly. V elektronově-mikroskopickém vyšetření byla přítomna neurosekreční granula velikosti 150 nm. Mitotická aktivita byla velmi malá, méně než 1 mitóza/10 HPF. Po nefrektomii asi za tři měsíce byly zjištěny zvětšené lymfatické uzliny retrokaválně, v histologickém obraze s metastázami WDNEC. Čtyři roky po nefrektomii u pacienta nebyla zjištěna progresse nádoru a pacient se cítí dobře. ¹¹¹In- octreoscanová scintigrafie neukázala žádná další nádorová ložiska.

Neuroendokrinní buňky nebyly v normální histologii ledviny prokázány, a proto je histogeneza primárního neuroendokrinního nádoru ledviny nejistá.

Patomorfologie žilních štěpů

doc. MUDr. Jaroslav Horáček, CSc.¹

MUDr. Radim Brát, Ph.D.²

¹ Ústav patologie Lékařské fakulty Ostravské univerzity v Ostravě, Ústav patologie Fakultní nemocnice Ostrava

² Kardiokirurgické centrum Fakultní nemocnice Ostrava

The authors present histopathological changes in the ends of 96 harvested vein grafts prior to their implantation into the coronary bed. They compared acute changes with a focus on the endothelium when two harvesting techniques

were used, the traditional long incision over the entire course of the great saphenous vein and endoscopic harvesting.

The biopsy material, the vein wall from the proximal and distal ends of the graft, was processed using the paraffin technique with basic staining and immunohistochemistry assay. Endothelial damage corresponded to desquamation, granulocyte formation with the presence of fibrin, partly with formation of tiny defects with bleeding and leukostasis in capillaries of the vasa vasorum. Assessment of the changes was contributed to by immunohistochemistry assay using Factor VIII, CD34, HSA and Laminin antibodies and by Trichrome and VG chemical stains. Chronic changes could be added to the picture of phlebosclerosis.

In 38 cases of the 96 grafts, i.e. 40 %, acute changes included microscopic endothelial damage. Of those, changes in the endothelium were associated with traditional open harvesting in 14 cases and with endoscopic harvesting in 24 cases.

Zjišťování mutačního statusu genu BRAF u zhoubného novotvaru štítné žlázy

**MUDr. Jindřich Lukáš, CSc.¹,
doc. Mgr. Jiří Drábek, PhD.²,
RNDr. Marta Dziechciarková, PhD.²,
MUDr. Martin Syřůček¹,
Miroslava Rabčanová²,
Veronika Holinková, DiS.²,
Mgr. Jana Stránská, PhD.²,
Mgr. Sylwia Jančík²,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, PhD.²**

¹ Oddělení patologie,

Nemocnice Na Homolce, Praha

² Laboratoř experimentální medicíny,
Ústav molekulární a translační medicíny,
Lékařská fakulta Univerzity Palackého
a FN Olomouc

Nádory štítné žlázy jsou malignitami endokrinního původu se stoupající incidencí. Vznik a růst těchto nádorů zahrnuje genetické a epigenetické změny, ze kterých jsou nejdůležitější mutace, aktivující signální dráhy MAPK a PI3K-AKT. Mezi časté mutace patří chromozomální přestavby RET/PTC a PAX8/PPARγ, bodové mutace v genech RAS a bodové mutace v genu BRAF. Etiologicky jsou chromozomální přestavby asociovány s expozicí radioaktivnímu záření, zatímco bodové mutace jsou asociovány s chemickými mutageny, mezi kterými může figurovat i nadbytek jódu ve výživě.

Detekce mutací (převážně detekce mutace V600E genu BRAF) v současné době aspiruje na pozici diagnostického a prognostického markeru nádoru štítné žlázy, přestože dostatečně přesné údaje o roli BRAF v iniciaci a progresi nádoru nejsou zatím dostupné.

V tomto projektu jsme retrospektivně sledovali BRAF mutační status u českého souboru pacientů s nádorem štítné žlázy ($n > 100$). Pacienty jsme rozdělili dle velikosti nádoru, papilárního/folikulárního statusu a přítomnosti více fokusů. Z parafinového bločku jsme provedli mikrotomový řez, z něj izolovali DNA a stanovili přítomnost mutace BRAF Val600Glu dvoubarevným genotypizačním systémem na bázi qPCR TaqMan. U multifokálních nádorů s prokázanou přítomností BRAF mutace jsme po zachytné laserové mikrodisekci provedli genotypizaci BRAF i pro jednotlivé fokusy.

Prezentujeme a diskutujeme průkaz mutace BRAF Val600Glu v multifokálních i monofokálních nádorech štítné žlázy našich pacientů.

Projekt byl částečně financován z grantů CZ.1.05/2.1.00/01.0030, MPO TIP FR T11 525, MSM6198959216.

Hladina metalothioneinu u pacientů s Hodgkinovým lymfomem

Ing. Jiří Sochor, Ph.D.¹,
Ing. David Hynek, Ph.D.¹,
RNDr. Michal Masařík, Ph.D.²,
prof. RNDr. Marie Stiborová, CSc.³,
prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.⁴,
MUDr. Jarmila Kruseová⁴,
RNDr. Vojtěch Adam Ph.D.¹,
doc. Ing. René Kizek Ph.D.¹

¹ Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

² Ústav patologické fyziologie, Masarykova univerzita, Brno

³ Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha

⁴ Klinika dětské hematologie a onkologie, II. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Hodgkinův lymfom (HL) je méně časté nádorové onemocnění lymfatického systému postihující zejména mladé pacienty. Příznakem tohoto onemocnění pak jsou zvětšené lymfatické uzliny (1). Přestože je kurabilita u tohoto onemocnění vysoká (až 90%) (2), můžeme díky včasné diagnostice zahájit strategii léčení dříve a dobu terapie zkrátit. V posledních letech je studována

zvýšená exprese nízkomolekulárního proteinu metalothioneinu (MT). Předpokládá se, že koncentrace MT souvisí s koncentrací těžkých kovů, xenobiotik či léčiv. Mnohé studie však poukazují na obsah hladiny MT v souvislosti s onkologickými onemocněními (3–5). V naší studii jsme sledovali devět pacientů s onemocněním HL ve věku od 2 do 12 let. V krevním séru těchto pacientů byla sledována hladina MT. Kontrolní skupinu tvořilo devět jedinců stejného věkového složení, bez onkologického onemocnění a bez užívání léčiv.

Zjistili jsme, že hladiny metalothioneinu v krevním séru pacientů s HL byla jeho průměrná hladina $1,90 \pm 0,50 \mu\text{M}$. U skupiny kontrolní byl obsah tohoto proteinu v průměru $0,78 \pm 0,20 \mu\text{M}$. U pacientů s nádorovým onemocněním byla tedy hladina MT více jak dvojnásobná (nárůst o 246%).

Poděkování: Tato studie byla podpořena granty IGA MZ 10200-3 a NanoBioTEC Cell GA ČR P102/11/1068.

Literatura:

1. Bonadonna, G., Historical review of Hodgkin's disease. British Journal of Haematology, 2000. 110(3): p. 504–511.
2. Ganesan, P., et al., Hodgkin's lymphoma-long-term outcome: an experience from a tertiary care cancer center in North India. Annals of Hematology, 2011. 90(10): p. 1153–1160.
3. Krizkova, S., et al., Metallothionein – a promising tool for cancer diagnostics. Bratislava Medical Journal-Bratislavské Lekarske Listy, 2009. 110(2): p. 93–97.
4. Krizkova, S., et al., Electrophoretic fingerprint metallothionein analysis as a potential prostate cancer biomarker. Electrophoresis, 2011. 32(15): p. 1952–1961.
5. Masarik, M., et al., Level of metallothionein, glutathione and heat-stable proteins in tumours from patients with head and neck cancer. International Journal of Molecular Medicine, 2010. 26

Vliv platinových cytostatik na oxidační stres a životnost buněk

Ing. Jiří Sochor, Ph.D.¹,
Jaromír Gumulec²,
RNDr. Michal Masařík, Ph.D.²,
RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.¹,
doc. Ing. René Kizek, Ph.D.¹

¹ Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

² Ústav patologické fyziologie, Masarykova univerzita, Komenského náměstí, Brno

Je dobře známo, že chemoterapeutická léčba platinovými cytostatiky vytváří u pacientů při léčbě rakoviny reaktivní formy kyslíku (ROS) (1). Nedávné studie prokázaly, že způsob buněčné smrti závisí ve velké míře právě na závažnosti oxidačního poškození (2).

V naší práci jsme se zabývali přezkoumáním vlivu protinádorových léčiv cisplatinu, carbo-

platiny a oxaliplatiny (v koncentracích 0; 10; 30; 50; 80; 100; 150; 180; 200; 250 $\mu\text{mol l}^{-1}$) na životnost buněk vlivem toxického účinku těchto léčiv na DNA. K experimentu byly použity buněčné linie odvozené z nádorů prostaty PC-3, PNT1A a 22RV1. Životnost buněk byla sledována pomocí MTT testu, oxidační zátěž pomocí antioxidační aktivity, pomocí metod DMPD, blue CRO5 a Free Radical. MTT testy a testy antioxidační aktivity byly mezi sebou matematicky vyhodnoceny, byl odvozen vztah mezi množstvím léčiva a oxidačním poškozením buněk. Naším cílem bylo u sledovaných léčiv určit IC50 a zjistit, jakou mírou oxidačního stresu jsou buňky v této koncentraci stresovány, což bylo vyjádřeno pomocí antioxidační aktivity. S postupně se zvyšující koncentrací platinových léčiv viabilita buněk klesala. Pomocí lineární regrese byla vy počítána inhibiční koncentrace pro jednotlivé buněčné linie.

Buněčná linie 22RV1 byla nejcitlivější na oxaliplatinu s hodnotou IC50 49,90 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Po kultivaci s carboplatinou vykazovala největší citlivost buněčná linie PNT1A, hodnota IC50 byla 101,20 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Na cisplatinu byla nejsenzitivější buněčná linie 22RV1 s hodnotou IC50 23,80 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

Z měření antioxidační aktivity bylo zjištěno, že úměrně klesá se zvyšujícími se dávkami aplikovaných cytostatických léčiv. Byly nalezeny matematické závislosti mezi jednotlivými metodami antioxidační aktivity a mezi životností buněk. Nejvyšších korelačních koeficientů bylo dosaženo mezi metodou „Free radicals“ a buněčnou linií PC3 s přidávkou cisplatinu ($r^2=0,934$) a oxaliplatiny ($r=0,922$). Korelační koeficienty metody blue CRO5 byly se sledovanými linie- mi velmi nízké (cisplatinu $r^2=0,219$, oxaliplatinu $r^2=0,157$, carboplatina $r^2=0,198$).

Ze získaných výsledků můžeme určit, jakou měrou protinádorová léčiva přispívají k oxidačnímu poškození a apoptóze buněk. Další výzkum bude směřován na diskuzi o potenciálních mechanismech, které mohou apoptotické dráhy regulovat.

Práce vznikla za podpory grantů GA ČR 301/09/P436 RECAMPT GA AV IAA401990701, NANIMEL GA ČR 102/08/1546 a IGA MZ 10200-3.

Literatura:

1. Krizkova, S., et al., An Adsorptive Transfer Technique Coupled with Brdicka Reaction to Reveal the Importance of Metallothionein in Chemotherapy with Platinum Based Cytostatics. International Journal of Molecular Sciences, 2010. 11(12): p. 4826–4842.
2. Ozben, T., Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. 96(9): p. 2181–2196.

Vztah mezi hladinou PSA a obsahem thiolových sloučenin u pacientů s karcinomem prostaty

Ing. Jiří Sochor, Ph.D.¹,

Mgr. Ondřej Zítka¹,

Ing. David Hynek, Ph.D.¹,

Mgr. Natalia Cernei¹,

RNDr. Michal Masařík, Ph.D.²,

RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.¹,

doc. Ing. René Kizek, Ph.D.¹

¹ Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

² Ústav patologické fyziologie, Masarykova univerzita, Komenského náměstí, Brno

V současné době existuje řada markerů pro diagnostiku a sledování prognózy u karcinomu prostaty jako gen p53, HER2, RAS onkogen. Nejspolehlivější a doposud nejpožívanější metodou však stále zůstává detekce prostatického specifického antigenu (PSA) (1, 2). Přestože incidence tohoto onemocnění v České republice stoupá, mortalita, díky diagnostice, klesá (3). Avšak časnější diagnostika tohoto nádorového onemocnění může spočívat na dalších biochemických markerech. Je známo, že (γ -glutamylcysteinylglycin) je hlavní antioxidant v lidských buňkách, v organismu převažuje jeho redukovaná forma (GSH). Buňky se před oxidačním stresem chrání neenzymatickým odstraněním volných radikálů za vzniku oxidované formy glutathionu (GSSG). Stanovení GSH a poměru GSH/GSSG lze tedy využít jako markeru oxidačního stresu. Specifický protein metalothionein je v mnoha studiích (4, 5) označován za univerzální potenciální marker onkologických onemocnění a byl využit i v našem experimentu.

V naší studii jsme se zaměřili na stanovení GSH, GSSG a jejich poměru a na sledování hladiny metalothioneinu v krvi u pacientů s karcinomem prostaty. Získané výsledky byly matematicky vztaženy k hodnotám PSA.

Analýzy byly prováděny u 35 pacientů s karcinomem prostaty ve věku od 54 do 79 let s průměrem 66 let a u 8 zdravých jedinců, kteří tvořili kontrolní skupinu. Hladina PSA se u pacientů pohybovala v rozmezí od 1,4 do 6,4 ng ml⁻¹ s průměrem 2,4 ng ml⁻¹, GSH/GSSG od 0,6 do 6,7 s průměrem 4,3 a obsah metalothioneinu se pohyboval od 0,97 do 2,42 μ M s průměrem 1,91. U skupiny kontrolní se hodnoty PSA pohybovaly od 0,06 do 0,14 s průměrem 0,11 ng ml⁻¹, GSH/GSSG od 7,8 do 13,8 s průměrem 9,4 a obsah metalothioneinu se pohyboval od 0,51 do 1,04 μ M s průměrem 0,82.

Naším cílem bylo zjistit, zda-li poměr glutathionu a obsah metalothioneinu u skupiny onkologických pacientů je ve vzájemném vztahu s obsahem PSA. Toto bylo vyjádřeno pomocí korelačních koeficientů, korelace mezi PSA a GSH/GSSG dosahovala hodnoty $r^2=0,378$, hodnota mezi PSA a obsahem metalothioneinu byla $r^2=0,589$. Korelační koeficienty nepoukázaly na přímou závislost mezi jednotlivými markery. Byly však zaznamenány velké rozdíly mezi hodnotami poměru GSH a GSSG, které byly výrazně (v průměru o 119 %) vyšší u kontrolní skupiny než u skupiny pacientů s nádory prostaty. Také rozdíly v hodnotách obsahu metalothioneinu mezi skupinou kontrolní a skupinou pacientů byly velmi výrazné, u pacientů bylo hodnoty v průměru vyšší o 229 % než u skupiny kontrolní.

Tato práce byla podpořena projekty IGA MZ 10200-3, MAGEN NIF 2011, NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068 a IGA MENDELU 1/2011.

Literatura:

1. Jonsson, H., et al., Uptake of prostate-specific antigen testing for early prostate cancer detection in Sweden. *International Journal of Cancer*, 2011. 129(8): p. 1881–1888.
2. Dahl, M., et al., Sarcosine induces increase in HER2/neu expression in androgen-dependent prostate cancer cells. *Molecular Biology Reports*, 2011. 38(7): p. 4237–4243.
3. Ondrusova, M., et al., Trends in prostate cancer incidence and mortality before and after the introduction of PSA testing in the Slovak and Czech Republics. *Tumori*, 2011. 97(2): p. 149–155.
4. Krizkova, S., et al., Electrophoretic fingerprint metallothionein analysis as a potential prostate cancer biomarker. *Electrophoresis*, 2011. 32(15): p. 1952–1961.
5. Krizkova, S., et al., Metallothionein – a promising tool for cancer diagnostics. *Bratislava Medical Journal-Bratislavské Lekarske Listy*, 2009. 110(2): p. 93–97.

Stanovení oxidačního stresu u nádorových buněk vystavených působení cytostatických léčiv

Ing. Jiří Sochor, Ph.D.¹,

Dr. Ing. Branislav Ruttkay-Nedecký¹,

RNDr. Michal Masařík, Ph.D.²,

prof. RNDr. Marie Stiborová, CSc.³,

prof. MUDr. Tomáš Eckschlager, CSc.⁴,

RNDr. Vojtěch Adam, Ph.D.¹,

doc. Ing. René Kizek, Ph.D.¹

¹ Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

² Ústav patologické fyziologie, Masarykova univerzita, Komenského náměstí

³ Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha

⁴ Klinika dětské hematologie a onkologie, II. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Praha

Nejdiskutovanější otázkou při léčbě nádorových onemocnění je toxicita podávaných léčiv (1, 2). Oxidační stres, jako reakce na protinádorová léčiva, není doposud uspokojivě prozkoumán a přímé měření reaktivních kyslíkových radikálů nebo markerů oxidačního stresu je v klinické medicíně stále obtížné, případně vyžaduje velmi náročnou laboratorní instrumentaci. Snahou je pochopit nejprve procesy na úrovni jednotlivých buněk v izolovaném/neutrálním prostředí za definovaných podmínek a bez působení vnějších vlivů.

V naší práci byl sledován oxidační status na modelových nádorových buněčných liniích odvozených z nádorů prostaty (PC-3, PNT1A a 22RV1). Buněčné linie byly kultivovány s protinádorovými léčivy karboplatinou, cisplatinou, oxaliplatinou v koncentracích 0; 10; 30; 50; 80; 100; 150; 180; 200 a 250 μ mol l⁻¹ a léčivy doxorubicinem a elipticinem v koncentracích 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 10; 12; 15 μ mol l⁻¹.

Cílem našeho experimentu bylo stanovení míry oxidačního stresu u nádorových buněk a u buněk s přidavkem cytostatického léčiva. Míra tohoto stresu byla stanovena pomocí antioxidační aktivity, jež byla sledována pomocí tří principiálně rozdílných fotometrických metod: FRAP, DPPH a ABTS. Metody jsou založeny na reakci sledované molekuly s volnými radikály, kdy se měří absorbance vzniklého komplexu, která se přepočítá na ekvivalentní množství antioxidantu Trolox (TE). Čím tedy byla v buňce nižší antioxidační aktivita, tím byla hodnota ekvivalentu Troloxu nižší a v buněčných lysátech se nacházelo více volných radikálů podporujících oxidační stres.

Stanovením oxidačních změn v buňkách metodou FRAP a ABTS byla zjištěna nejnižší antioxidační aktivita u buněčné linie 22RV1 při koncentraci karboplatiny 100 μ mol l⁻¹ a to 0,06 mg l⁻¹ (TE). U buněčné linie PNT1A byla nejnižší antioxidační aktivita 0,35 mg l⁻¹ (TE) po vystavení buněk cisplatině o koncentraci 100 μ mol l⁻¹.

Nejvýznamnější výsledky můžeme shrnout do těchto bodů:

- (i) po kultivaci buněčných linií s přidavkem cytostatik dochází ke snižování jejich antioxidačního stavu;
- (ii) všechny buněčné linie (PC-3, 22RV1 i PNT1A) jsou citlivější na doxorubicin než na platिनové deriváty;
- (iii) nejnižší antioxidační aktivita (až 10 krát nižší) byla zjištěna po podání léčiv karboplatiny a cisplatin.

Práce vznikla za podpory grantů CYTORES GA ČR P301/10/0356 Liga proti rakovině Praha, RECAMPT GA AV IAA401990701 a IGA MZ 10200-3.

Literatura:

1. Zanella, A., et al., Cytotoxicity in human cancer cells and mitochondrial dysfunction induced by a series of new copper(I) complexes containing tris(2-cyanoethyl)phosphines. *Investigational New Drugs*, 2011. 29(6): p. 1213–1223.
2. Zong, D., et al., Chemosensitization by phenothiazines in human lung cancer cells: impaired resolution of gamma H2AX and increased oxidative stress elicit apoptosis associated with lysosomal expansion and intense vacuolation. *Cell Death & Disease*, 2011, 2.

Stanovení polymorfizmů v genech pro glutathion-S-transferázy v souvislosti s chemoprotektivním účinkem fytochemikálií zeleniny rodu Brassica a jejich vliv na riziko kolorektálního karcinomu

Mgr. Renata Héžová¹,

MUDr. Julie Bienertová-Vašků²,

MUDr. Milana Šachlová, CSc. et Ph.D.¹,

prof. MUDr. Anna Vašků, CSc.²,

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.¹,

Mgr. Lenka Radová, Ph.D.⁴,

MUDr. Igor Kiss, Ph.D.¹,

prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.¹,

RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.^{1,3}

¹ Masarykův onkologický ústav,

Klinika komplexní onkologické péče, Brno

² Ústav patologické fyziologie,

Lékařská fakulta MU, Brno

³ Středoevropský technologický institut,

MU, Brno

⁴ Laboratoř experimentální medicíny,

Institut molekulární a translační medicíny,

Univerzita Palackého, Olomouc

Brassica je rod řádu rostlin křížatých (Cruciferae), do kterého spadá například hlávkové zelí, čínské zelí, kapusta, květák či brokolice. Důkazy o chemoprotektivním efektu těchto rostlin potvrzují epidemiologické studie z celého světa, ve kterých byl potvrzen pozitivní vztah mezi konzumací tohoto druhu zeleniny a sníženým rizikem nádorových onemocnění různých lokalizací včetně tlustého střeva a konečníku. Předpokládáme, že polymorfismy v biotransformačních enzymech druhé fáze – glutathion-S-transferázách (GSTA1, GSTM1, GSTT1, GSTP1) vedoucí k jejich snížené aktivitě mohou být dalšími genetickými faktory, které utváří schopnost jedince mít prospěch z potenciálně chemoprotektivního účinku fytochemikálií obsažených v zelenině rodu Brassica a sníženému riziku vzniku kolorektálního karcinomu. V naší práci jsme na souboru 197 pacientů s kolorektálním karcinomem a 212 zdravých kontrol stanovili polymorfismy glutathion-S-transferázách (GSTA1 C69T, del GSTM1, del GSTT1, GSTP1 A105G) k riziku

vzniku kolorektálního karcinomu. Z periferní krve pacientů a zdravých kontrol jsme izolovali DNA. Polymorfismus A105G jsme stanovili pomocí alelické discriminace metodou TaqMan Real-Time PCR, GSTA1 C69T metodou PCR-RFLP a delece v GSTM1 a GSTT1 jsme určili pomocí multiplex PCR, přičemž primery byly navrženy do oblasti delece, jako interní pozitivní kontrolu jsme použili gen pro albumin. Prokázali jsme statisticky signifikantní asociaci mezi AA a AG genotypem v GSTP1 A105G A>G a snížené riziko vzniku kolorektálního karcinomu pro heterozygotní genotyp (OR 0,64; 95 % CI; 0,42–0,98, p=0,043). U ostatních stanovených genotypů nebyl nalezen statisticky významný výsledek. Naše data naznačují, že AG genotyp u A105G v GSTP1 může mít za následek snížené odbourávání chemoprotektivních fytochemikálií ze zeleniny rodu Brassica a snižovat tak riziko kolorektálního karcinomu.

*Práce byla podpořena grantem IGA MZ
NS 10352-3/2009 a výzkumným záměrem
MZ0M0U2005.*

Stanovení jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) v miR-196-a2, miR-27a a miR 146a a jejich vliv na riziko kolorektálního karcinomu

Mgr. Renata Héžová¹,

Alena Kovaříková¹,

MUDr. Milana Šachlová, CSc. et Ph.D.¹,

MUDr. Julie Bienertová-Vašků²,

prof. MUDr. Anna Vašků, CSc.²,

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.¹,

Mgr. Lenka Radová, Ph.D.⁴,

prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.¹,

RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.^{1,3}

¹ Masarykův onkologický ústav,

Klinika komplexní onkologické péče, Brno

² Ústav patologické fyziologie,

Lékařská fakulta MU, Brno

³ Středoevropský technologický institut,

MU, Brno

⁴ Laboratoř experimentální medicíny,

Institut molekulární a translační medicíny,

Univerzita Palackého, Olomouc

MikroRNA (miRNA) jsou krátké nekódující RNA regulující expresi genů na posttranskripční úrovni. Deregulace mikroRNA (miRNA) je jednou z kauzálních událostí v kancerogenezi nádorů tlustého střeva a konečníku. Data z asociačních studií poslední doby prokázala souvislost jednonukleotidových polymorfizmů (SNP) rs11614913 u miR-196a2, rs895819 u miR-27a a rs2910164 u miR-146a s rizikem vzniku nádorového one-

mocnění prsu, plic, prostaty, ovarií a dalších solidních tumorů. Asociační studie u rs895819 a rs2910164 v souvislosti se vznikem kolorektálního karcinomu (CRC) dosud nebyly provedeny. SNP rs11614913 byl již studován v souvislosti s kolorektálním karcinomem u čínské populace.

V této práci jsme provedli asociační studii vztahu 3 polymorfizmů ve vybraných miRNA ke vzniku sporadického kolorektálního karcinomu. Z periferní krve 197 pacientů s CRC a 212 zdravých kontrol jsme izolovali DNA a pomocí TaqMan Real-Time PCR jsme provedli alelickou discriminaci. Následně jsme porovnali genotyp a frekvenci alel SNP u pacientů a kontrol. Žádná z provedených analýz neprokázala statisticky signifikantní výsledek. Naše data poukazují na chybějící asociaci mezi SNP rs11614913, rs895819 a rs2910164 a vznikem kolorektálního karcinomu.

*Práce byla podpořena grantem IGA MZ
NS 10352-3/2009 a výzkumným záměrem
MZ0M0U2005.*

Význam mikroRNA-21 u kolorektálního karcinomu

Bc. Andrej Bešše^{1,2},

Mgr. Sabina Ševčíková, Ph.D.³,

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.¹,

MUDr. Igor Kiss, Ph.D.¹,

prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.¹,

RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.^{1,2}

¹ Masarykův onkologický ústav, Klinika komplexní onkologické péče, Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno

³ Ústav patologické fyziologie, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno

MikroRNA (miRNA) tvoří velkou skupinu krátkých nekódujících RNA post-transkripčně regulujících genovou expresi. Schopnost miRNA inhibovat translaci onkogenů a nádorových supresorů dává předpoklad jejich zapojení do procesů kancerogeneze. V této studii jsme metodou Real-Time PCR sledovali vztah miR-21 ke klinicko-patologickým charakteristikám kolorektálního karcinomu (CRC) na souboru 44 pacientů. MiR-21 vykazovala v nádorové tkáni oproti normálnímu střevnímu epitelu mnohonásobně zvýšené hladiny (p<0,0001). K objasnění funkce miR-21 v patogenezi CRC jsme provedli in vitro studii na buněčné linii DLD1 odvozené od kolorektálního karcinomu DLD1. Za tímto účelem jsme do buněk transientně transfekovali inhibitor miRNA-21, což vedlo k reprodukci poklesu hladin miR-21 na 20–30 %

oproti expresi v buňkách transfekovaných kontrolním oligonukleotidem. Pro normalizaci dat byla použita malá jaderná RNA U6B (RNU6B), jejíž exprese nebyla transfekcí ani v jednom případě ovlivněna. Analyzovali jsme vliv miR-21 na viabilitu (MTT test), apoptózu (Annexin-V), buněčný cyklus (PI) a migraci (scratch assay). Vliv transfekce anti-miRNA-21 na proliferaci DLD1 buněk a jejich citlivost k panelu cytostatik (5-fluorouracil, SN-38, oxaliplatin) byl testován pomocí MTT testu. Pozorovali jsme trendy ale nikoliv signifikantní vliv utlumení hladin miR-21 na viabilitu, apoptózu, buněčný cyklus a citlivost k cytostatikům. Statisticky významný efekt však mělo snížení hladin miR-21 na migrační schopnost buněk. Buňky s utlumenou hladinou miR-21 vykazovaly pouze omezenou schopnost migrace ($p=0.016$), což naznačuje zapojení miR-21 spíše do pozdějších událostí v sekvenčním modelu kancerogeneze CRC.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR NS/9814-4/2008 a výzkumným záměrem MZMOU2005.

Identifikace a funkční analýza mikroRNA u pacientů s renálním karcinomem

**Mgr. Martina Rádová, Ph.D.^{1,2},
MUDr. Radek Lakomý¹,
MUDr. Alexandr Poprach¹,
MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.¹,
Mgr. Lenka Radová, Ph.D.³,
MUDr. Pavel Fabian, Ph.D.¹,
Bc. Robert Iliev²,
prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.¹,
RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.^{1,2}**

¹ Masarykův onkologický ústav,
Klinika komplexní onkologické péče, Brno

² CEITEC, Masarykova univerzita, Brno

³ Laboratoř experimentální medicíny,
UP Olomouc

Renální karcinom tvoří přibližně 3 % zhoubných nádorů dospělé populace a z urologických malignit dosahuje nejvyšší letality. Výzkum v oblastech vzniku a vývoje renálního karcinomu vedl k identifikaci klíčových signálních drah a následně i cílené protinádorové léčby prodlužující čas do progresu onemocnění případně i celkové přežití léčených pacientů. Jedním z nejmodernějších přístupů k molekulární charakterizaci solidních nádorů, včetně renálního karcinomu, je analýza mikroRNA. MikroRNA jsou krátké nekódující RNA tvořící mladou a velice progresivní oblast molekulárně-biologického výzkumu.

MikroRNA mají schopnost post-transkripčně regulovat genovou expresi a podle odhadu bioinformatiků jsou schopny regulovat až jednu třetinu lidských genů. Dnes již víme, že některé z těchto genů jsou také významné onkogeny či nádorové supresory. Geny regulované pomocí mikroRNA jsou nejen součástí procesu onkogeneze, podílejí se také na nádorové invazivitě, diseminaci nebo lékové rezistenci. V databáze lékařské literatury Pubmed přibývají v současnosti publikace na téma mikroRNA exponenciálně proto monitorování nových poznatků, ale i vlastní výzkum v této oblasti je velice žádoucí. Cílem naší práce bylo pomocí přístupu založeného na analýze expresních profilů 667 mikroRNA metodou kvantitativní Real-Time PCR arrays na souboru 38 světlobuněčných renálních karcinomů důkladně klinicky charakterizovaných pacientů identifikovat mikroRNA umožňující predikovat čas do progresu po nefrektomii. Výsledky studie potvrdily, že nádorová tkáň světlobuněčné formy renálního karcinomu vykazuje specifický expresní profil 54 mikroRNA ve srovnání s nenádorovým renálním parenchymem ($p<0.001$). Rovněž jsme prokázali, že na základě expresního profilu 15 mikroRNA lze identifikovat pacienty, u kterých se vyvinulo metastatické onemocnění do 12 měsíců po nefrektomii ($p<0.01$). Výsledky byly úspěšně validovány na nezávislém souboru pacientů pomocí individuálních Real-Time PCR assays, jimiž byl identifikován signifikantní prognostický potenciál miR-106b ($p=0.03$), miR-409 ($p=0.031$), miR-195 ($p=0.04$), miR-451 ($p=0.05$). MiR-210 jako jedna z miRNA z nejrozdílnější expresí mezi nádorovou a nenádorovou tkání byla dále funkčně charakterizována in vitro na buněčných liniích Caci-2 a ACHN. Výsledky budou součástí našeho sdělení.

Práce byla podpořena grantem IGA MZ NS 10361-3/2009 a výzkumným záměrem MZMOU2005.

Použití polymerázové řetězové reakce v reakčním objemu 1 µl pro detekci mutací genu EGFR

**Mgr. Jana Stránská, Ph.D.,
doc. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.,
Veronika Holinková, DiS.,
Miroslava Rabčanová,
Mgr. Petr Vojta,
doc. MUDr. Marián Hajdúch, Ph.D.
Laboratoř experimentální medicíny,
Ústav molekulární a translační medicíny,
Lékařská fakulta Univerzity Palackého
a Fakultní nemocnice v Olomouci**

Druhé místo na světě mezi maligními onemocněními zaujímají nádory plic. V České republice jsou na prvním místě v příčinách úmrtí na zhoubné nádory. U nemalobuněčných karcinomů plic vyšetřujeme mutace genu pro receptor epidermálního růstového faktoru (EGFR). EGFR je exprimován jak normálními, tak maligními buňkami, významným způsobem ovlivňuje průběh buněčného cyklu, buněčné proliferace a diferenciaci a přežití buňky. Mutace jsou jednou z příčin jeho nekontrolované aktivace. Proto je EGFR důležitým cílem pro protinádorovou terapii, kdy se inhibuje jeho funkce monoklonálními protilátkami nebo nízkomolekulárními tyrozinkinázoovými inhibitory a využívá se tak blokáda jeho signální dráhy v léčebných indikacích.

Přestože je v naší laboratoři PCR zavedená pro nádorovou diagnostiku a predikci na několik způsobů, stále hledáme možnosti, jak ušetřit (např. snížením objemu reakce) a jak maximálně využít omezené množství nádorového materiálu. Na real-time cyklérech Light Cycler 480 II (Roche) již běžně používáme objem reakce 10 µl, na 7500 Fast real-time PCR system (Life Technologies) 5 µl. Ve snaze minimalizovat objem reakce jsme využili nabídky zapůjčení PCR cykléru AmpliSpeed ASC200D (Beckman Coulter), umožňujícího provádět PCR reakci v objemu 1 µl na speciálně upraveném podložním sklíčku. Výrobce garantuje provedení PCR od vstupního množství DNA 100 pg.

Přístroj jsme využili k PCR detekci deleční mutace genu EGFR při vyšetření nemalobuněčného karcinomu plic s následnou fragmentační analýzou na genetickém analyzátoru CEQ 8800 (Beckman Coulter), agarózové elektroforóze nebo 2100 Bioanalyzer (Agilent). Vyzkoušeli jsme tři druhy reakčních směsí (míchaná z jednotlivých běžných chemikálií (Genetica), GoTaq® qPCR Master Mix (Promega) a AmpliGrid GoTaq® PCR System (Beckman Coulter). Jako nejlepší se ukázala být třetí uvedená reakční směs. Testovali jsme schopnost cykléru provést nejen standardní PCR (teplota denaturace 95 °C), ale i COLD PCR (co-amplification at lower denaturation temperature-PCR, 88 °C). V následné analýze jsme byli schopni detekovat delecii ze vstupního množství DNA 62,5 pg a při zastoupení 1,56 % mutované DNA ve wild-type DNA při standardním i COLD PCR principu. AmpliSpeed se tak jeví, že by mohl vyhovovat požadavkům na analýzu mutací DNA o nízké koncentraci (v našem případě plazmy).

Projekt byl částečně financován z grantů CZ.1.05/2.1.00/01.0030, MPO TIP FR T11 525, MSM6198959216. Za zapůjčení přístroje děkujeme firmě Beckman Coulter.

**Studium vybraných
transkribovaných
ultrakonzervovaných regionů
(T-UCR) u pacientů
s kolorektálním karcinomem**

Mgr. Jiří Šána^{1,2},

Bc. Simona Hankeová²,

MUDr. Marek Svoboda, Ph.D.¹,

MUDr. Radim Němeček¹,

prof. MUDr. Rostislav Vyzula, CSc.¹,

RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.^{1,2}

¹ Masarykův onkologický ústav,

Klinika komplexní onkologické péče,
Brno

² CEITEC – Středoevropský technologický
institut, Masarykova univerzita, Brno

Kolorektální karcinom (CRC) patří v České republice k nejčastějším nádorovým onemocněním. V léčbě tohoto onemocnění i přes vzrůstající náklady není dosahováno uspokojivých výsledků. V posledních letech stále větší pozornost směřuje na oblast nekódujících RNA, které hrají významnou roli v patogenezi mnoha nádorových onemocnění. Transkribované ultrakonzervované regiony (T-UCR) tvoří abundantní skupinu dlouhých nekódujících RNA delších než 200 bp lokalizovaných v intra- i v intergenových oblastech lidského genomu. Pilotní studie naznačují, že deregulace některých z nich může být asociována s tumorigenezí mimo jiné i CRC. Na základě literatury jsme vybrali 11 T-UCR (T-UCR-43, T-UCR-63, T-UCR-73, T-UCR-112,

T-UCR-134, T-UCR-145, T-UCR-230, T-UCR-266, T-UCR-339, T-UCR-388 a T-UCR-399) a na souboru 47 tkání CRC a párových nenádorových střevních sliznic validovali jejich možnou souvislost s CRC. Změny hladin analyzovaných T-UCR v nádorové tkáni a jejich korelace s klinicko-patologickými parametry studovaného souboru pacientů v současnosti vyhodnocujeme. Výsledky budou součástí našeho sdělení.

Práce byla podpořena granty IGA MZCR NS/10352-3/2009, IGA MZCR NS/9814-4/2008, výzkumným záměrem MZOMOU2005 a projektem "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropských regionálních rozvojových zdrojů.

Za původnost a obsahovou správnost příspěvků odpovídají autoři.

[illegible]

[illegible]

POŘADATELÉ**SOLEN**
MEDICAL EDUCATION

- SDPO ČOS ČLS JEP
- Ústav molekulární a translační medicíny LF UP a FN Olomouc
- Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc
- Česká společnost patologů ČLS JEP
- Slovenská spoločnosť patológov SLS
- Oddělení patologie Slezské nemocnice Opava
- Nadace pro výzkum rakoviny – Rakovina věc veřejná

**VII. DNY DIAGNOSTICKÉ, PREDIKTIVNÍ
A EXPERIMENTÁLNÍ ONKOLOGIE****XIX. SJEZD ČESKÝCH A SLOVENSKÝCH PATOLOGŮ****XCVII. DIAGNOSTICKÝ SEMINÁŘ ČESKÉ DIVIZE IAP****XIX. SJEZD ČESKÉ SPOLEČNOSTI
HISTOLOGICKÝCH LABORANTŮ****9.– 11. listopadu 2011, Olomouc****GENERÁLNÍ PARTNER****PARTNEŘI****Abbott Laboratories, s.r.o.****AstraZeneca Czech Republic s.r.o.****bamed, s.r.o.****Carl Zeiss spol. s r.o.****Diktovací systémy Philips & Newton Technologies****Elsevier Urban&Partner sp. z o. o.****Ing. Milena Španělová - SPINCHEM****IntellMed, s.r.o.****MEDESA s. r. o.****NIKON spol. s r.o.****Novartis s.r.o.****OLYMPUS CZECH GROUP, S.R.O., ČLEN KONCERNU****ZENA-R, spol. s r.o.****MEDIÁLNÍ PARTNEŘI****Onkologie****proLékaře**
www.prolekare.cz**maxdorf****GRADA®**

**POŘADATELÉ DĚKUJÍ UVEDENÝM FIRMÁM ZA SPOLUÚČAST
NA FINANČNÍM ZAJIŠTĚNÍ VŠECH UVEDENÝCH AKCÍ**



Behind every result is a patient who depends on it

The new cobas® oncology tests

Molecular diagnostic tests are changing the way patients are selected for cancer treatments. This year, Roche is introducing real-time, polymerase chain reaction (PCR) tests to aid clinicians in determining the best treatment options for their patients:

cobas® KRAS Mutation Test

To identify advanced colorectal cancer patients who are unlikely to respond to anti-EGFR monoclonal antibody therapy

cobas® 4800 BRAF V600 Mutation Test*

To help determine if a metastatic melanoma patient is eligible for treatment with vemurafenib

cobas® EGFR Mutation Test*

To help determine if a patient with non-small cell lung cancer is likely to benefit from treatment with small-molecule tyrosine kinase inhibitors that target EGFR

* Test in development

ROCHE, COBAS and LIFE NEEDS ANSWERS are trademarks of Roche.
©2011 Roche Molecular Systems, Inc. All rights reserved.
<http://molecular.roche.com>



cobas®
Life needs answers

OptiView – další důvod proč zvolit Roche



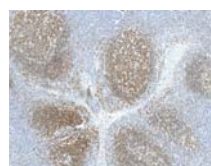
OptiView DAB jediný IHC detekční kit, který Vám umožní vidět to, co skutečně potřebujete

Nesrovnatelné – dynamická síla IHC detekčního kitu OptiView DAB Vám poskytne intenzivní signál, který si snadno sami přizpůsobíte každé protilátce. Tato inovativní technologie vám umožní:

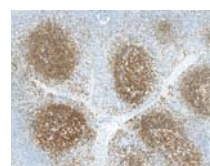
- detekovat i ty nejslaběji exprimované antigeny
- prakticky eliminovat pozadí
- zrychlit provedení většiny Vašich stanovení

Jedinečná čistota signálu, možnost řízení procesu a flexibilita jsou běžnými vlastnostmi každého stanovení kitem OptiView DAB – můžete tak poskytnout více informací nezbytných pro podporu rychlé a přesné diagnózy.

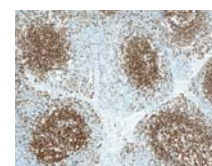
Rozdíl uvidíte na vlastní oči.



Competitor A
DAB detekce



Competitor B
DAB detekce



OptiView
DAB detekce

Pro více informací: www.ventanaOptiView.com

VENTANA, logo VENTANA a OptiView jsou chráněná označení Roche