

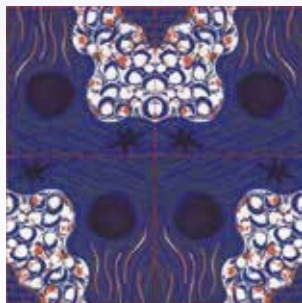
Program a abstrakty

Dni molekulovej patológie



Jitka Krejčová

***11. sympóziu molekulovej
patológie s medzinárodnou účasťou
a Martinské dni nelekárskych
pracovníkov v patológii***



Jitka Krejčová

***4. – 5. 6. 2015
Martin, hotel Turiec***



Pannoramic Slide Scanners



*DIGITÁLNA PATOLÓGIA –
riešenia pre klinické, vedecké
a edukačné aplikácie*

- automatizované skenovanie bioptických preparátov
- digitalizácia vo svetlom poli a fluorescencii
- tvorba digitálnych archívov, sieťová manipulácia, vzdialené hodnotenie – Digital Pathology Networking
- štandardizovaná kvantifikácia IHC, FISH a CISH preparátov



3DHISTECH

Distribútor Slovenská republika: Sysmex Slovakia s.r.o.

Trenčianska 47, 821 09 Bratislava, Slovenská republika · Telefón +421 2 6453 2881-2 · Fax +421 2 6428 1651 · office@sysmex.sk · www.sysmex.sk

Výrobca: 3DHitech Ltd

Konkoly-Thege Miklós út 29 – 33, H-1121 Budapešť, Maďarsko

Slovenská divízia Medzinárodnej akadémie patológie (SD-IAP)
Slovenská spoločnosť patológov SLS
Jesseniova lekárska fakulta Univerzity Komenského v Martine
Univerzitná nemocnica Martin
Ústav patologickej anatómie JLF UK a UN v Martine
Ústav klinickej a molekulárnej patológie LF UP a FN v Olomouci
Martinské bioptické centrum, s. r. o. v Martine
Spoločnosť SOLEN

Dni molekulovej patológie

**11. sympóziu molekulovej patológie s medzinárodnou účasťou
a Martinské dni nelekárskych pracovníkov v patológii**

4. – 5. jún 2015
Hotel TURIEC, Martin

PRESEDA ORGANIZAČNÉHO A VEDECKÉHO VÝBORU
prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc., ÚPA JLF UK a UN v Martine

ORGANIZAČNÝ A VEDECKÝ VÝBOR
prof. MUDr. Zdeněk Kolář, CSc. (Olomouc)
prof. MUDr. Jiří Ehrmann, PhD. (Olomouc)
MUDr. Peter Szépe, CSc. (Martin)
MUDr. Tomáš Balhárek, PhD. (Martin)

Podujatie je ohodnotené 11 CME kreditmi

Harmonogram	
Štvrtok 4. jún 2015	
8.30 – 10.00	Registrácia účastníkov – lobby hotela Turiec
10.00 – 10.15	Otvorenie podujatia
10.15 – 11.00	Prednášky pozvaných hostí
11.00 – 12.30	Moderná patológia pre klinickú prax
12.30 – 13.30	Obedná prestávka
13.30 – 14.50	Molekulová patológia nádorových ochorení I.
13.30 – 14.30	Paralelná sekcia: Martinské dni nelekárskych pracovníkov v (molekulevej) patológii
14.50 – 15.00	Prestávka
15.00 – 15.40	Využitie molekulevej patológie v klinickej praxi I. Sympóziu s podporou Novartis Pharma s.r.o., Slovensko
15.40 – 15.50	Prestávka
15.50 – 17.15	Molekulová patológia nádorových ochorení II.
17.15 – 17.30	Posterová sekcia – diskusia pri posteroch
19.30	Spoločná večera a spoločenský program (v priestoroch hotela Turiec)
Piatok 5. jún 2015	
8.30 – 9.20	Molekulová patológia nádorových ochorení III.
9.20 – 9.30	Prestávka
9.30 – 10.45	Využitie molekulevej patológie v klinickej praxi II. Sympóziu s podporou generálneho sponzora AstraZeneca
10.45 – 11.00	Prestávka
11.00 – 12.00	Nové metódy v molekulevej patológii
12.00 – 13.00	Obedná prestávka
13.00 – 14.30	Molekulová patológia nádorových ochorení IV.
14.30	Záver konferencie

Spracovala a vydala spoločnosť SOLEN, s. r. o.,

Adresa vydavateľstva: SOLEN, s. r. o., Ambrova 5, 831 01 Bratislava,
www.solen.sk, e-mail: solen@solen.sk

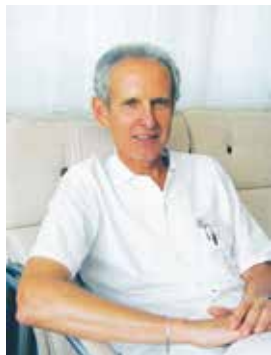
Redaktorka: Mgr. Miroslava Doubková, doubkova@solen.sk

Grafická úprava a sadzba: Ján Kopčok, kopcok@solen.sk

Ydavateľ nenesie zodpovednosť za údaje a názory autorov jednotlivých článkov či inzerátov.

Reprodukcia obsahu je povolená len s priamym súhlasom redakcie.

SOLEN
MEDICAL EDUCATION



Vážení hostia, milé kolegyně a kolegovia, milí priatelia molekulovej patológie,

vítam vás na podujatí **Dni molekulovej patológie** – 11. sym-
póziium molekulovej patológie s medzinárodnou účasťou a na
Martinských nelekárskych dňoch v mene vedeckého a organizačného
výboru podujatia. Vítam vás rovnako aj v mene hlavného usporiadateľa
podujatia – martinského univerzitného ústavu patológie, ktorý
v tomto roku prevzal symbolickú štafetu od organizátora predošlých
desiatich úspešných ročníkov Dní molekulovej patológie – univerzitného ústavu klinickej
a molekulovej patológie v Olomouci. Vďaka dlhoročnej spolupráci, v kontexte niekoľko desaťročí
trvajúcich dobrých kolegiálnych a priateľských vzťahov sme prijali výzvu našich kolegov a priateľov
z Olomouca a preniesli sme tak toto podujatie z krásnej slnečnej rovinatej oblasti Haná do rovnako
krásnej hornej Turčianskej záhradky a do mesta Martin – mesta považovaného za kultúrne
centrum Slovenska, mesta s už po niekoľko rokov najlepšie hodnotenou lekárskou fakultou v rámci
slovenského medicínskeho a zdravotníckeho vysokého školstva podľa uznávaných ratingových
hodnotení a najnovšie aj najlepšou univerzitnou nemocnicou. Túto výzvu sme prijali aj preto, že
hlavní usporiadatelia podujatia – náš martinský univerzitný ústav, jeho Jesseniova lekárska fakulta
Univerzity Komenského a Martinské bioptické centrum, s. r. o., patria medzi uznávané pracoviská
rozvíjajúce molekulovú patológiu a biológiu tak na akademickej, ako aj praktickej realizačnej úrovni
pre potreby dennej klinickej praxe.

Dnes niet pochýb o tom, že rozvoj genetiky a molekulovej biológie je hlavným ťahúňom roz-
voja modernej medicíny a jej jednotlivých súčastí vrátane onkologickej medicíny, prinajmenej od
začiatku nového milénia. My patológovia sme si uvedomili potrebu interdisciplinárnej až tímovej
spolupráce klinickej patológie s ďalšími medicínskymi odbormi a potrebu otvorenia našich labo-
ratórií špičkovým odborníkom medicínskych a nemedicínskych odborov. V našich laboratóriách
spracovávame tkanivové a bunkové vzorky pacientov s cieľom určenia diagnózy ochorenia, od-
hadu jeho prognózy a najnovšie, práve vďaka rozvoju molekulovej patológie, aj s bezprostredným
dosahom na voľbu a vhodnosť indikovania adekvátnej cielenej či biologickej liečby. Naším heslom
je neraz konštatovanie, že „the tissue is the issue“, keďže zmyslom našej práce je multidisciplinárna
a multiparametrická analýza vyšetrovaného tkaniva, na výsledky ktorej čaká zainteresovaný pacient
a proces jeho liečby manažujúci klinický lekár. Všetko, čo v uvedených procesoch zistíme, je tak
v mene hesla „the patient is the issue“, pretože všetky zistené výsledky sú aplikované v prospech
pacienta a prípadne aj jeho rodiny.

O to väčšia je zodpovednosť všetkých zainteresovaných pracovníkov v jednotlivých analýzach uvedených procesoch, a preto je dôležité o týchto procesoch a s nimi spojených problémoch diskutovať a vymieňať si vzájomne poznatky a skúsenosti. To je hlavný zmysel vytvorenej diskusnej platformy klinických a molekulových patológov, biológov, klinických a laboratórnych pracovníkov.

Predložený program sympózia molekulovej patológie poukazuje na neuveriteľnú šírku celej problematiky, ktorá je z rôznych aspektov skúmaná na zainteresovaných českých a slovenských pracoviskách, a to jednak v rovine vedeckých akademických analýz, ale rovnako aj v rovine aplikačných výstupov pre klinickú prax. Môže nás tešiť, že medzi účastníkmi sympózia prevládajú mladí pracovníci a mnohí doktorandi alebo mladí odborníci tesne po skončení doktorandského štúdia.

Preto vás všetkých vítam na našom spoločnom podujatí, prajem vám dobrú a žičlivú kongresovú atmosféru, obohatenie o nové skúsenosti, poznatky, o nové odborné kontakty a rovnako aj príjemný pobyt v meste Martin.

Lukáš Plank

ŠTVRTOK, 4. JÚN 2015

10.00 – 10.15

Otvorenie

prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc. (Martin) za účasti členov predsedníctva:

prof. MUDr. Ján Danko, CSc., dekan JLF UK v Martine

MUDr. Dušan Krkoška, PhD., MBA, riaditeľ UN v Martine

Mgr. art. Andrej Hrnčiar, primátor mesta Martin

prof. MUDr. Zdeněk Kolář, PhD., prednosta Ústavu klinickej a molekulovej patológie LF UP v Olomouci

10.15. – 11.00

PREDNÁŠKY POZVANÝCH HOSTÍ

Predsedníctvo: Kolář Z. (Olomouc), Plank L. (Martin)

10.15 – 10.35

Sedlák J., Zeman M. (Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava)

Regulácia signálnych dráh v cirkadiánnom kontexte – vyžiadaná prednáška

10.35 – 10.55

Hajdúch M. (Ústav molekulovej a translačnej medicíny Univerzity Palackého, Olomouc)

Proteomické metody v klinické diagnostice – vyžiadaná prednáška

Diskusia (5 min.)

11.00 – 12.30

MODERNÁ PATOLÓGIA PRE KLINICKÚ PRAX

Predsedníctvo: Ehrmann J. (Olomouc), Kajo K. (Bratislava)

11.00 – 11.10

Kajo K., Balogová S., Machálek K., Reis R, Biró C., Konečný M. (Bratislava)

Dilema zvaná nádory neznámeho primárneho pôvodu

11.10 – 11.20

Plank L. (Martin)

Pozitivita antigénu CD30+ v malígnych lymfómoch je prognosticky a prediktívne významným faktorom

11.20 – 11.30

Balhárek T., Barthová M., Farkašová A., Janáková Ľ., Mičák J., Szépe P., Plank L. (Martin)

Expresia TdT v agresívnych B-lymfómoch s viacerými zásahmi

11.30 – 11.40

Mičák J., Plank L., Farkašová A., Bartová M., Balhárek T., Szépe P. (Martin)

Bioptická analýza veľkobunkových B-lymfómov mozgu a miechy

11.40 – 11.50

Adamicová K., Fetisovová Ž. (Martin)

Genodermatózy v diagnostickom prostredí molekulárnej genetiky

11.50 – 12.00

Janega P., Janegová A., Celec P., Feketeová L., Babál P. (Bratislava)

Expresia sialyltransferáz ako potenciálny marker chorobných zmien štítnej žľazy

12.00 – 12.10

Babál P., Milcheva R., Feketeová L., Janegová A., Janega P. (Bratislava, Sofia)

Molekulárne mechanizmy v procese invázie svalovej bunky parazitom

Trichinella spiralis

12.10 – 12.25

Favy D. (Biocartis, Mechelen) – prezentačná prednáška

Idylla™ Biocartis fully automated, real-time PCR-based molecular diagnostics system

Diskusia (5 min.)

12.30 – 13.30

Obedná prestávka

13.30 – 14.50

MOLEKULOVÁ PATOLÓGIA NÁDOROVÝCH OCHORENÍ I.

Predsedníctvo: Čierna Z. (Bratislava), Bouchal J. (Olomouc)

13.30 – 13.40

Čierna Z., Janega P., Karaba M., Minárik G., Benca J., Sedláčková T., Gronesová P., Sieberová G., Macúch J., Pindžák D., Šufliarsky J., Danihel L., Mardiak J., Mego M. (Bratislava)

Asociácia prítomnosti cirkulujúcich nádorových buniek s expresiou vybraných proteínov v tkanive karcinómu prsníka

13.40 – 13.50

Mendelová A., Holubeková V., Katina S., Žúbor P., Plank L., Danko J., Lasabová Z. (Martin)

Incidenca výskytu *PIK3CA* mutácií v nádorovom tkanive prsníka v korelácii s histopatologickými vlastnosťami ochorenia

13.50 – 14.00

Bouchal J., Simkova D., Kharraishvili G., Ozdian T., Soukup T., Krupka M., Galandakova A., Dzubak P., Mickova A., Korinkova G. (Olomouc, Hradec Králove)

Glycoprotein asporin is upregulated by three-dimensional growth and promotes invasion of breast cancer cells

14.00 – 14.10

Šimková D., Kharraishvili G., Bouchal J. (Olomouc)

Asporin ovlivňuje migrační a invazní schopnosti nádorových buněk prsu

14.10 – 14.20

Šišovský V., Minárik G., Straka Ľ., Telková M., Rychlý B., Lasabová Z., Gemzová K., Petrovič R., Szemes T., Turňa J., Danihel Ľ., Repiská V. (Bratislava, Martin, Prešov)

Nádorový supresorový gén a proteín *tp53/P53* v normálnom endometriu a karcinóme endometria

14.20 – 14.30

Hatok J., Štefaniková A., Čapláková V., Kúdela E., Balhárek T. (Martin)

Mikrofluidné profílovanie expresie apoptotických génov endometriálneho karcinómu

14.30 – 14.40

Fröhlichová L., Gmitter F., Torday T. (Košice)

Využitie FISH metódy v diagnostike trofoblastovej choroby

14.40 – 14.50

Diskusia (10 min.)

14.50 – 15.00

Prestávka

15.00 – 15.40

VYUŽITIE MOLEKULOVEJ PATOLÓGIE V KLINICKEJ PRAXI I.

Sympóziu s podporou Novartis Pharma, s. r. o., Slovensko

Predsedníctvo: Plank L. (Martin), Hlavčák P. (Bratislava)

15.00 – 15.15.

Plank L. (Martin)

Prognostický a prediktívny význam testovania stavu ALK génu v bioptickom materiáli nemalobunkového pľúcneho karcinómu (15 min.)

15.15 – 15.30

Hlavčák P. (Bratislava)

Malígný melanóm – od mikroskopu k cielej terapii (15 min.)

Diskusia (10 min.)

15.40 – 15.50

Prestávka

15.50 – 17.15

MOLEKULOVÁ PATOLÓGIA NÁDOROVÝCH OCHORENÍ II.

Predsedníctvo: Lasabová Z. (Martin), Kalfusová A. (Praha)

15.50 – 16.00

Holubeková V., Mendelová A., Meršaková S., Švecová I., Kapustová I., Žúbor P., Danko J., Lasabová Z.

Význam hypermetylácie promótoru CDH1 génu ako potenciálneho biomarkera v skorej detekcii karcinómu krčka maternice

16.00 – 16.10

Kúdela E., Farkašová A., Balhárek T., Višňovský J., Plank L., Danko J. (Martin)

Úloha telomerázy v rozvoji karcinómu krčka maternice

16.10 – 16.20

Lasabová Z., Gemzová K., Buzalková V., Minárik G., Štanclová A., Szépe P., Plank L. (Martin)

Mutácie v géne *BRAF* u slovenských pacientov s gastrointestinálnymi stromálnymi nádormi

16.20 – 16.30

Kalfusová A., Hilská I., Kalinová M., Krsková L., Linke Z., Kodet R. (Praha)

Prediktívni význam molekulární diagnostiky pacientů s gastrointestinálním stromálním nádorem

16.30 – 16.40

Krsková L., Galgonková P., Hilská I., Fejfarová J., Kokošková A., Kalinová M., Kodet R. (Praha)

Detekce fúzního genu *NAB2-STAT6* u solitárních fibrózních nádorů

16.40 – 16.50

Leitnerová M., Copáková L. (Bratislava)

Možnosti genetickej diagnostiky pri sarkómoch na OLG NOÚ

16.50 – 17.00

Tomášová R., Pavlíková G., Kilián M., Pavlík T., Hojsíková I. (Bratislava)

Osteosarkóm z pohľadu genetika – prvé skúsenosti

Diskusia (15 min.)

17.15. – 17.30

POSTEROVÁ SEKCIA – diskusia pri posteroch

19.30 **Spoločná večera a spoločenský program** (v priestoroch hotela Turiec)

PIATOK, 5. JÚN 2015

8.30 – 9.20

MOLEKULOVÁ PATOLÓGIA NÁDOROVÝCH OCHORENÍ III.

Predsedníctvo: Halašová E. (Martin), Škarda J. (Olomouc)

8.30 – 8.40

Fialová B., Smešný Trtková K., Langová K., Kolář Z. (Olomouc)

Expresie androgenového receptoru u normálních a nádorových buněk prostaty ovlivněných látkami indukující epigenetické změny

8.40 – 8.50

Gachechiladze M., Skarda J., Janikova M., Mgebrishvili G., Kharashvili G., Kolek V., Grygarkova I., Klein J., Poprachova A., Arabuli M., Kolar Z. (Olomouc, Tbilisi)

Expression levels of Filamin A protein predict survival outcomes in non-small cell lung cancer patients treated with Carboplatin and Navelbine

8.50 – 9.00

Slováková P., Matáková T., Halašová E. (Martin)

Polymorfismus mismatch reparačních génů *hMLH1* a *hMSH2* a riziko karcinómu plic

9.00 – 9.10

Skarda J., Gachechiladze M., Tichy T., Kolek V., Grygarkova I., Klein J., Mgebrishvili G., Kharashvili G., Janikova M., Pitson M., Gomez-Brouchet A., Cuvillier O. (Olomouc, Adelaide, Toulouse)

The prognostic role of sphingosine kinase-1 and S1P lyase protein expression in patients with non-small cell lung cancer

Diskusia (10 min.)

9.20 – 9.30

Prestávka

9.30 – 10.45

VYUŽITIE MOLEKULOVEJ PATOLÓGIE V KLINICKEJ PRAXI II.

Sympóziu s podporou generálneho sponzora AstraZeneca

Predsedníctvo: Hlavčák P. (Bratislava), Scheerová K. (Martin)

9.30 – 9.45

Plank L. (Martin)

Plúcny karcinóm: od histologickej klasifikácie k diagnostike genetických zmien DNA v tkanive nádoru a voľne cirkulujúcej v plazme (15 min.)

9.45 – 10.00

Farkašová A., Scheerová K., Hutka Z., Plank L. (Martin)

Analýza mutačného stavu génu *EGFR* v biopticky vyšetrovanom tkanive nemalobunkového karcinómu pľúc v materiáli Martinského bioptického centra, s. r. o. (15 min.)

10.00 – 10.15

Scheerová K., Farkašová A., Hutka Z., Plank L. (Martin)

Analýza bioptických vzoriek nemalobunkového karcinómu pľúc so zameraním na nové kurabilné mutácie v géne *EGFR* (15 min.)

10.15 – 10.30

Baluchová K., Hlavčák P., Majer I. (Bratislava)

Genotypizácia klinicky významných *EGFR* mutácií z bronchiálnych sterov v materiáli Histopatologie, a. s. (15 min.)

Diskusia (15 min.)

10.45 – 11.00

Prestávka

11.00 – 12.00

NOVÉ METÓDY V MOLEKULOVEJ PATOLÓGII

Predsedníctvo: Plank L. (Martin), Ehrmann J. (Olomouc)

11.00 – 11.10

Mrozkowiak A., Jimmy J. (DAKO – An Agilent Technologies Company, Warszawa)
– prezentačná prednáška

SureFISH and fast IQFISH technology – new perspectives in molecular diagnostics

11.10 – 11.20

Kolmer D. (TissueGnostics, Viedeň – zastúpené BIOTECH, s. r. o., Bratislava) – prezentačná prednáška

New pathways in Digital Pathology – Contextual Image Analysis

11.20 – 11.25

Vytopilová S. (BioTech, Praha) – prezentačná prednáška

Simultánní IHC barvení více protilátkami – unikátní Multiplex technologie

11.25 – 11.35

Kubíková I. (GeneTICA, s. r. o., Praha) – prezentačná prednáška

NGS diagnostika somatických mutací

11.35 – 11.45

Jankowski S. (Thermo Fisher Scientific, GSD, Paris) – prezentačná prednáška

Využitie neininvazívnej metódy Tekutej Biopsie v nadväznosti na NGS analýzu a analýzu pomocou digitálnej PCR

11.45 – 11.55

Überall I., Balik V., Minařík J., Flodr P., Kolář Z. (Olomouc)

Využití analýzy obrazu v patologii – praktické aplikace

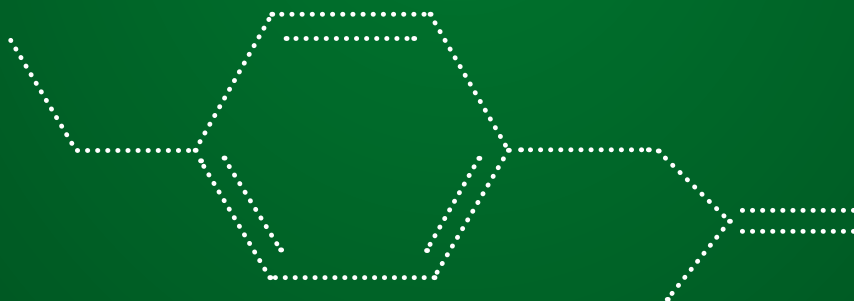
Diskusia (5 min.)

12.00 – 13.00

Obedná prestávka



TISÍCE PACIENTOV
PROFITUJÚCICH
Z LIEČBY



13.00 – 14.30

MOLEKULOVÁ PATOLÓGIA NÁDOROVÝCH OCHORENÍ IV.

Predsedníctvo: Závodná K. (Bratislava), Balhárek T. (Martin)

13.00 – 13.10

Kalman M., Plank L. (Martin)

Karcinogenéza sporadických kolorektálnych karcinómov z pohľadu histomorfológie a molekulovej biológie

13.10 – 13.20

Ticha I., Gnosa S., Xiao-Feng S. (Praha, Linköping)

Expression but not genetic variations of the MTDH gene is correlated to clinical outcome of colorectal cancer patients

13.20 – 13.30

Tilandyová P., Kalman M., Minárik G., Lasabová Z., Plank L. (Martin)

Naše skúsenosti s detekciou mutácií génu *RAS* v DNA izolovanej z parafínových rezov biopticky vyšetřovaného tkaniva pacientov s kolorektálnym karcinómom

13.40 – 13.50

Hajkova N., Ticha I., Dundr P. (Praha)

A single-centre experience with broader predictive testing for anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer patients

13.50 – 14.00

Závodná K., Markus J., Bartošová Z., Kajo K., Konečný M. (Bratislava)

Genetická diagnostika pri nádoroch kolorekta na OLG OÚSA

14.00 – 14.10

Kašubová I. (Martin)

Metódy detekcie mikrosatelitnej instability a inaktivácie tumorsupresorových génov hypermetyláciou CpG ostrovov v DNA sekvencii

VÝSKUM NADŠENIE NAPREDOVANIE



Copyright © 2015 Merck Sharp & Dohme Corp.,
a subsidiary of Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.
Všetky práva vyhradené.

Merck Sharp & Dohme, s. r. o., so sídlom Mlynské nivy 43, Bratislava 821 09
Tel: +421 2 5828 2010, dpcoc_czechslovak@merck.com

14.10 – 14.20

Kašubová, I., Holubeková, V., Kalman M., Gemzová, K., Kršiaková, J., Plank, L., Lasabová, Z.

Identifikácia pacienta s Lynchovým syndrómom bez zaznamenanej rodinnej anamnézy pomocou metódy MSI, MSP pre *MLH1* a *BRAF* mutácie a NGS analýzy

Diskusia (10 min.)

14.30 **Záver konferencie**

ŠTVRTOK, 4. JÚN 2015

13.30 – 14.30

MARTINSKÉ DNI NELEKÁRSKÝCH PRACOVNÍKOV V (MOLEKULOVEJ) PATOLÓGII

Predsedníctvo: Szépe P. (Martin)

13.30 – 13.45

Balková R., Szépe P., Plank L. (Martin)

Štandardizácia a optimalizácia spracovania bioptického materiálu ako podmienka kvalitných výsledkov molekulovo-patologických analýz

13.45 – 14.05

Barthová M., Janáková Ľ. (Martin)

FISH metódy v patológii

14.05 – 14.20

Gemzová K., Vaňuchová A.ndrea (Martin)

Izolácia DNA z parafínových rezov a jej spracovanie metódami molekulovej biológie ako súčasť bioptickej diagnostiky

Diskusia (10 min.)



Obrázok: Farebná fotografia pľúcnej rakovinovej bunky zo skenovacieho elektrónového mikroskopu (SEM).

onko1ógia

fokus

Jeden cieľ: spoločný záujem o zlepšenie kvality života onkologických pacientov všade vo svete.

S radosťou Vám predstavujeme spoločnosť **TAKEDA ONCOLOGY**, ktorá bola doteraz známa pod menom **MILLENNIUM: THE TAKEDA ONCOLOGY COMPANY**. Naša misia je nemenná a naďalej sa usilujeme o vývoj nových liekov pre pacientov s rakovinou po celom svete, prostredníctvom našej oddanosti vede, prielomovým inováciám a nadšeniu zo zlepšovania kvality ich života.

Tento mimoriadny cieľ poháňa našu snahu objavovať, rozvíjať a prinášať prielomovú liečbu v onkológii. Sústreďovaním popredných vedeckých kapacít a mimoriadnych zdrojov globálnej farmaceutickej spoločnosti nachádzame inovatívne spôsoby zlepšovania liečby rakoviny. Patríme medzi špičku v onkologickom výskume a vybudovali sme portfólio terapií meniacich paradigmy. Aj keď sme v boji s rakovinou urobili veľký krok vpred, sme odhodlaní dokázať viac – tvrdo pracovať a dosiahnuť viac. To všetko budeme robiť s rovnakým odhodlaním, nadšením a podnikavým duchom, na ktorom stoja základy našej kultúry a vďaka ktorým sme dnes na čele onkologického výskumu.

Vieme, že naša misia nebude rýchla a ani jednoduchá, ale naša úloha je jasná: chceme liečiť rakovinu.



Spoločnosť Takeda je hrdým sponzorom organizácie XYZ.


ONCOLOGY

Viac informácií sa dozviete na našej webovej stránke www.takedaoncology.com.

Takeda Pharmaceuticals Slovakia s.r.o., Plynárenská 7B, 821 09 Bratislava,
tel: +421(0)2206026 00, fax: +421(0)220602602,
www.takeda.com

4. – 5. JÚN 2015

Poster č. 1

Blahovcová E., Račay P., Murín R., Dobrota D., Hatok J. (Martin)

Vplyv apoptotických inhibítorov na bunky multiformného glioblastómu *in vitro*

Poster č. 2

Látalová P., Pika T., Flodr P. (Olomouc)

Hevylite reagents – imunohistochemická studie

Poster č. 3

Steigerova J., Rarova L., Oklestkova J., Levkova M., Kolar Z., Strnad M. (Olomouc)

Molecular mechanisms of brassinosteroid action and receptor interactions in human hormone-(in)dependent carcinoma cells

Poster č. 4

Cizkova K., Steigerova J., Ehrmann J. (Olomouc)

The effect of fibrates on cell viability

Poster č. 5

Šarlinová M., Halašová E. (Martin)

Analýza mikroRNA u pacientov s kolorektálnym karcinómom

Poster č. 6

Flodr P., Minarik J., Pika T., Bacovsky J., Latalova P., Pusciznova P., Scudla V. (Olomouc)

Multiple myeloma and bone marrow microenvironment – immunohistochemical study

Poster č. 7

Jakša R. (Praha)

Sekundární Epstein-Barrové virus asociovaný veľkobuněčný B lymfom u pacienta s angioimunoblastickým T lymfomem – kazuistika

Poster č. 8

Janíková M., Kratochvílová R., Synková H., Godava M., Vodička R., Slavkovský R., Vrtěl R. (Olomouc)

Hodnotenie klinického dosahu variantov identifikovaných v génoch *BRCA1* a *BRCA2* pomocou MPS

Poster č. 9

Janíková M., Žižková V., Škarda J., Kharashvili G., Kolář Z. (Olomouc)

Prognostický význam miR-23b u pacientov s NSCLC

Poster č. 10

Kharashvili G., Bouchal J., Kral M., Mgebrishvili G., Kolar Z. (Olomouc)

Skp2 associates with Slug, androgen receptor and extracellular matrix proteins in patients with high Gleason score and lymph node metastasis of prostate cancer

Poster č. 11

Michálek J., Škarda J., Tichý T., Šmakal O., Král M., Kodet R. (Olomouc, Praha)

Neinvazivní high grade papilární uroteliální karcinom močového měchýře s kostní metaplazií u 3-letého chlapce

Poster č. 12

Šopíková B., Tichý T., Prikryl T. (Olomouc, Přerov)

Obrovskobuněčný tumor ledvinné pánvičky

Poster č. 13

Urbanovská I., Šimová J., Uvírová M., Kubová B., Konvalinka D., Měch R., Kalábová L., Žebráková I., Paleček T., Buzrla P., Tomanová R., Dvořáčková J. (Ostrava)

Somatické mutace v *IDH1* a *IDH2* genech u gliomů

Prednášky pozvaných hostí

Regulácia signálnych dráh v cirkadiánnom kontexte

Sedlák J.¹, Zeman M.²

¹Ústav experimentálnej onkológie SAV, Bratislava

²Prírodovedecká fakulta UK, Bratislava

Epidemiologické štúdie preukázali, že narušenie cirkadiánneho rytmu nočnou prácou a prácou na zmeny zvyšuje riziko rakoviny prsníka, čreva, prostaty, pľúc, ovárií a pečene a daný typ práce je klasifikovaný v skupine 2A – ako pravdepodobný karcinogén. Zároveň bolo dokázané, že delécia alebo inhibícia expresie hodinových génov zvyšuje progresiu nádorových procesov *in vitro* aj *in vivo*. Cirkadiánný systém riadi expresiu približne 10 % transkriptómu vrátane transkripcie génov regulujúcich bunkový cyklus c-MYC, WEE1, cyklin D a p21. Významnosť cirkadiánnnej regulácie pro-onkogénnych a tumor-supresorových génov potvrdzuje aj naša najnovšia štúdia, ktorá pomocou analýzy expresných profilov kandidátnych génov v nádoroch kolorekta, v porovnaní so zdravými časťami tkaniva, preukázala odlišný vzor expresie vyjadrený na dominantný hodinový gén *per2* (1).

Bolo dokázané, že na regulácii základnej cirkadiánnnej spätňoväzobnej slučky v centrálnom, ako aj v periférnych oscilátoroch sa podieľajú viaceré miRNA. Cirkadiánný systém zase ovplyvňuje tvorbu miRNA prostredníctvom regulácie expresie endonukleázy Dicer. Vzhľadom na tieto poznatky je reálny predpoklad, že analýza „tekutej biopsie“ z periférnej krvi môže zodpovedať niektoré otázky endokrinnnej regulácie pomocou exozómov.

Literatúra

1. Štorcelová M, Vicián M, Reis R, Zeman M, Herichová I. Expression of cell cycle regulatory factors *hus1*, *gadd45a*, *rb1*, *cdkn2a* and *mre11a* correlates with expression of clock gene *per2* in human colorectal carcinoma tissue. *Mol Biol Rep.* 2013;40(11):6351–6361.

Proteomické metódy v klinickej diagnostice – vyžiadaná prednáška

Hajdúch M.

Ústav molekulovej a translačnej medicíny Univerzity Palackého, Olomouc

Abstrakt nebol dodaný.

Moderná patológia pre klinickú prax

Dilema zvaná nádory neznámeho primárneho pôvodu

Kajo K.¹, Balogová S.², Machálek K.¹, Reis R.³, Biró C.¹, Konečný M.⁴

¹Ústav patológie SZU a OÚSA, Bratislava

²Klinika nukleárnej medicíny LF UK a OÚSA, Bratislava

³1. chirurgická klinika LF UK a UNB, Bratislava

⁴Oddelenie lekárskej genetiky OÚSA, Bratislava

Nádory neznámeho primárneho pôvodu („cancers of unknown primary” – CUP) tvoria 3 – 5 % všetkých malígnych nádorov. Z hľadiska histogenézy a klinickej prezentácie CUP predstavujú veľmi heterogénnu skupinu nádorov (karcinómy, neuroendokrinné tumory, sarkómy, melanómy, lymfómy), v ktorej sú najviac zastúpené adenokarcinómy.

Kľúčovým momentom diagnostického algoritmu CUP je bioptické vyšetrenie, ktoré je viacstupňové. Na prvej úrovni ide o dôkaz histogenetického pôvodu nádoru, nasleduje jeho ďalšia subtypizácia a na tretej úrovni sa získavajú informácie zamerané na identifikáciu orgánového pôvodu primárneho nádoru. Zlatým štandardom v bioptickej diagnostike CUP je imunohistochemická analýza. Pomocou nej je možné hodnotiť prítomnosť niektorých štruktúrálnych bunkových proteínov, respektíve rôznych transkripčných faktorov a bunkových produktov. Imunohistochemické vyšetrenie je založené na stratégii algoritmov, pomocou ktorých sa stavia diagnóza formou dôkazu alebo absencie vybraných markerov na jednotlivých

úrovniah algoritmu. Menej sa využívajú ďalšie techniky za účelom zhodnotenia ultraštruktúry, cytogenetických abnormít a v budúcnosti môže byť prínosná aj molekulová analýza CUP.

Diagnostika CUP je extrémne ťažká, pretože nejde o hodnotenie jedného nádoru, ale celého spektra histogeneticky a biologicky odlišných malígnych nádorov so značne rozdielnymi prognostickými charakteristikami a klinickou prezentáciou. Preto samotná bioptická diagnostika nie je schopná riešiť tento problém, a patológ sa tak stáva závislým od dodatočných klinických informácií a výsledkov zobrazovacích metód.

Na príkladoch niekoľkých kauzistik autori prezentujú rôzne scenáre CUP a poukazujú na nevyhnutnosť spolupráce viacerých medicínskych disciplín pri jej riešení.

Pozitivita antigénu CD30+ v malígnych lymfómoch je prognosticky a prediktívne významným faktorom

Plank L.^{1,2}

¹Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

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

CD30 antigén je jedným z troch receptorov – členov tzv. superrodiny faktora nádorovej nekrózy (TNF – sú to CD30, CD40 a RANK), ktorý je regulátorom proliferácie a diferenciácie lymfocytov (spolupodieľa sa na aktivácii signálnych dráh NF- κ B a MAPK). Je to transmembranózne uložený proteín s molekulovou hmotnosťou 120 kDa. Primárne bol opísaný v 80. rokoch minulého

storočia, keď bola proti nemu vyvinutá protilátka BerH2, dodnes úspešne používaná na jeho IHC detekciu, najmä v prípade diagnostikovania rôznych ML. Z nádorových buniek pacientov s CD30+ ML sa uvoľňuje do séra pacientov aj jeho solubilný proteolytický fragment (sCD30, hmotnosť 85 kDa). Už v minulosti existovali neúspešné snahy orientovať liečbu CD30+ ML na zablokovanie tohto antigénu, ktoré sa s rozvojom nových technológií zmenili na úspešnú onkologickú modalitu. IHC detekcia expresie CD30 antigénu je tak nielen dôležitým prvkom diagnostiky viacerých ML (a niektorých nádorov inej histogenézy), ale súčasne, keďže jeho expresia je relatívne obmedzená, aj veľmi dôležitým prediktívnym faktorom. Ukazuje sa, že nové modalita anti-CD30+ liečby sú úspešné aj v prípadoch nízkej hladiny CD30 molekúl v nádore. Preto stúpa zodpovednosť diagnostickej patológie v zmysle štandardizácie a optimalizácie IHC detekcie CD30 antigénu a jej implementácie do diagnostického panelu nielen klasického Hodgkinovho lymfómu, ale aj iných CD30+ ML B- aj T-pôvodu. Súčasťou tohto procesu je aj určenie hodnoty hraničnej („cut-off“) pozitivity, respektíve gradingu CD30+ expresie (do 5, 25, 50 a nad 50 % buniek nádoru).

Expresia TdT v agresívnych B-lymfómoch s viacerými zásahmi

Balhárek T.^{1,2}, Barthová M.¹, Farkašová A.², Janáková Ľ.¹, Mičák J.¹, Szépe P.^{1,2}, Plank L.^{1,2}

¹Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

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

Termín lymfómy s viacerými zásahmi sa spravidla používa na označenie zriedkavých

zrelých (periférnych) B-lymfómov s prestavbou dvoch alebo viacerých onkogénov s agresívnym klinickým priebehom a zvyčajne veľmi zlou prognózou. Najznámejším a najčastejším typom týchto lymfómov sú prípady kombinujúce prestavby génov *MYC* a *BCL2* alebo *BCL6* (tzv. lymfómy s dvomi zásahmi, „double-hit“, DHL) alebo prestavby vo všetkých troch uvedených lokusoch (tzv. lymfómy s tromi zásahmi, „triple-hit“, THL). Podľa platnej SZO klasifikácie lymfoidných neoplázií z roku 2008 sa tieto lymfómy zaraďujú do kategórie neklasifikovateľných B-lymfómov s črtami medzi difúznym veľkobunkovým B-lymfómom (DLBCL) a Burkittovým lymfómom (BL).

V niektorých prípadoch DHL/THL bola zaznamenaná expresia terminálnej deoxynukleotidylovej transferázy (TdT), čo spolu s morfológiou pripomínajúcou lymfoblasty a/alebo leukemickým priebehom býva príčinou diagnostických a terapeutických rozpakov, pretože tieto prípady bývajú v kontexte definícií SZO klasifikácie zaraďované do kategórie prekursorových neoplázií zo spektra akútnej B-lymfoblastovej leukémie a B-lymfoblastového lymfómu (B-ALL/B-LBL). V skutočnosti však pravdepodobne nejde o pravé prekursorové neoplázie, ale ide o unikátnu podskupinu DHL/THL, u ktorých môže byť reexpresia TdT dôsledkom akumulácie somatických hypermutácií B-buniek. Keďže časť DHL/THL vzniká sekundárne z folikulového lymfómu (FL), tieto prípady by mohli zároveň objasniť v minulosti opísané prípady tzv. „lymfoblastovej“ transformácie FL do prekursorovej neoplázie.

Podporené grantom MZ SR 2012/24-UKMA-1 a VEGA 1/0378/12.

Bioptická analýza veľkobunkových B-lymfómov mozgu a miechy

Mičák J., Plank L., Farkašová A., Bartová M., Balhárek T., Szépe P.

Ústav patologickej JLF UK a UNM a Martinské bioptické centrum, s. r. o., Martin

Úvod: Maligné lymfómy CNS (ML CNS) sú zriedkavé nádory – tvoria cca 2 – 3 % všetkých nádorov CNS. Viac ako 95 % ML CNS patrí do spektra difúzneho veľkobunkového B-lymfómu (DLBCL). Biologicky môže ísť o primárny ML vznikajúci v mozgu, mieche alebo v oku – tzv. PCNSL alebo o prejav systémovej diseminácie DLBCL iného ako CNS pôvodu (systémový ML CNS). PCNSL predstavuje v klasifikácii ML podľa SZO (2008) samostatnú a klinicky agresívnu nozologickú jednotku s nepriaznivou prognózou.

Cieľom práce je pilotná analýza veľkého súboru pacientov s veľkobunkovým B-lymfómom CNS ako súčasťou projektu zameraného na DLBCL všeobecne.

Materiál a metódy: V našom registri sme v rokoch 2004 – 2015 identifikovali 92 prípadov ML CNS, ktoré boli diagnostikované v neurochirurgických vzorkách mozgu a miechy. Bioptický materiál bol štandardne vyšetrený panelom histologických a imunohistochemických (IHC) vyšetrení. Zistené parametre morfológie a fenotypu týchto nádorov boli korelované s dostupnými klinickými údajmi. V časti prípadov (n = 56) boli vyšetrenia doplnené aj o FISH analýzu, predovšetkým na dôkaz prestavby génov relevantných pre stratifikáciu DLBCL, a to *C-MYC*, *BCL2*, *BCL6*, *IGH*. Táto nie je možná v prípadoch malej vzorky, v ktorých bolo tkanivo „spotrebované“ bioptickým vyšetrením.

Výsledky: Zo súboru 92 pacientov 88 prípadov zodpovedalo B-ML typu DLBCL a 4 prípady iným typom ML B- a T-pôvodu. Z 88 prípadov B-ML typu DLBCL v 10 išlo o disemináciu systémoveho DLBCL a 78 prípadov zodpovedalo definícii PCNSL. Ten bol morfologicky tvorený pruhmi a agregátmi prevažne centroblastov, v časti prípadov (n = 24) s angiocentrickým spôsobom rastu nádorovej lymfoproliferácie. IHC analýza týchto 78 prípadov dokázala vysoký výskyt „triple“ pozitívnej expresie MUM1, bcl-2 a bcl-6 proteínov (98 %, 90,5 %, 75,5 %) pri zriedkavosti pozitivity CD10 antigénu (14,5 %). Realizovanými FISH vyšetreniami v 51 prípadov PCNSL sme dokázali 3'deléciu v lokuse *C-MYC* (n = 3), zlom v lokuse *BCL2* (n = 1), zlom v lokuse *BCL6* (n = 6), 5'deléciu v lokuse *BCL6* (n = 3). Jeden prípad vykazoval zlom a 5'deléciu *BCL6* génu a jeden prípad zlom v lokuse *IGH*. V jednom prípade sme zistili 3'deléciu *C-MYC* génu a súčasne 5'deléciu *BCL6* génu. Prestavba *IGH/C-MYC* génov nebola detegovaná.

Závery: V predloženej práci boli v súlade so známymi údajmi identifikované:

- a. jednoznačná prevaha primárnych veľkobunkových B-lymfómov mozgu a miechy typu DLBCL (PCNSL);
- b. diagnosticky, biologicky a prognosticky relevantné parametre PCNSL: 1. „typický“ fenotyp PCNSL; 2. vysoký výskyt pozitívnej expresie c-myc a bcl-2 proteínu pri absencii prestavby *IGH/BCL2* génov; 3. častejší výskyt prestavby *BCL6* a *C-MYC* génu, respektíve dvoch génov súčasne.

Práca bola podporená: grantom Lymfómovej skupiny SR a projektmi MBRKM a BioMed Martin

(ITMS kód 26220220113, respektíve 26220220187), ktoré sú riešené na JLF UK a spolufinancované z prostriedkov EÚ.

Genodermatózy v diagnostickom prostredí molekulárnej genetiky

Adamicová K.¹, Fetisovová Ž.²

¹Ústav patologickej anatómie JLF UK, Martin

²Klinika dermatovenerológie JLF UK, Martin

Rozvoj molekulárnej genetiky v posledných tridsiatich rokoch významne ovplyvnil diagnostiku genodermatóz. Diagnostika genodermatóz sa v súčasnosti opiera o tri základné smery, ktoré sa vzájomne dopĺňajú:

- a) podrobná anamnéza a klinické vyšetrenie pacienta;
- b) ďalšiu časť predstavuje histologické vyšetrenie, kde pri väčšine genodermatóz ostáva zlatým štandardom elektrónová mikroskopia, imunofluorescenčné a imunohistochemické metódy. Histopatologickými postupmi možno genodermatózy deliť na tie, ktoré majú špecifický histologický obraz (Epidermolysis bullosa, lchtyózy, Urticaria pigmentosa a iné) a tie, ktoré majú histologické zmeny nešpecifické (Aplasia cutis congenita, Keratosis palmaris et plantaris a iné);
- c) posledná tretina diagnostiky sa opiera o ďalšie vyšetrovacie metódy, v ktorých dnes dominujú metódy molekulovej biológie (DNA, RNA molekulová analýza).

Znalosť jednotlivých príznakov pri genodermatózach, ich včasná diagnostika a dispenzarizácia pacientov predchádza závažným následkom ochorenia i trvalej invalidite pa-

cientov. V súčasnosti je známych asi 400 genodermatóz, ktoré sa delia do ôsmich základných skupín: keratodermie, pľuzgiernaté choroby, neurokutánne choroby, poruchy pigmentácie, ektodermálna dysplázia, metabolické poruchy, syndrómy s kožnými tumormi, ostatné genodermatózy (spojené s poruchou imunity, fotosenzitivitou, predčasným starnutím).

Incidencia genodermatóz je rôzna a líši sa v jednotlivých častiach sveta. V Európe je najfrekventovanejšou genodermatózou lchtyosis vulgaris 1 : 300, pri neurofibromatóze I je incidencia 1 : 2 500. Incidencia genodermatóz sa líši aj v rámci jednej skupiny ochorení. Kým Epidermolysis bullosa simplex má u nás incidenciu 1 : 50 000, autozomálne recesívna dystrofická Epidermolysis bullosa má incidenciu 1 : 300 000 narodených detí. Keďže diagnóza týchto chorôb na modernej úrovni je drahá, a preto často nedostupná, vo vyspelých štátoch vznikajú špecializované centrá, ktoré sústredia pacientov s určitou genodermatózou. Počet centier sa riadi podľa početnosti výskytu vrodenej chyby v danom teritóriu. Odborné centrá navzájom spolupracujú. Ich nádejou sú prvé správy o úspešných génových terapiách, do ktorých sa investujú stovky miliónov eur ročne a v ktorých pracujú početné tímy skúsených odborníkov.

Na našich pracoviskách patológie a molekulárnej genetiky je diagnostika genodermatóz zriedkavá. O to väčšie praktické problémy im prináša ich presná diagnostika. Na kazuistických prípadoch dvoch genodermatóz si dovoľujeme prezentovať bežný diagnostický postup pri nami určených Inkontinencia pigmenti a Epidermolysis bullosa congenita.

Expresia sialyltransferáz ako potenciálny marker chorobných zmien štítnej žľazy

Janega P.^{1,3}, Janegová A.¹, Celec P.², Feketeová L.¹, Babál P.¹

¹Ústav patologickej anatómie LF UK, Bratislava

²Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK, Bratislava

³Ústav normálnej a patologickej fyziológie, SAV, Bratislava

Úvod: Nádory štítnej žľazy sú známe často ťažkou diferenciálnou diagnostikou benígnych a malígnych procesov. Žiadny samostatný marker dosiaľ nepreukázal jednoznačný diferenciálno-diagnostický potenciál s dostatočnou špecifitou a senzitivitou. Práve rôzna glykozylácia vrátane sialyzácie povrchových glykokonjugátov sa ukazuje ako zaujímavý diagnostický marker v mnohých nádorových procesoch. Cieľom práce bolo zhodnotiť zmeny sialyzácie glykokonjugátov pri patologických procesoch postihujúcich tkanivo štítnej žľazy so zameraním na molekulárne mechanizmy týchto zmien.

Materiál a metódy: Hodnotený súbor tvorili prípady malígnych nádorov štítnej žľazy (malígneho klasického a folikulárneho variantu papilárneho, folikulárneho, onkocytárneho, anaplastického a medulárneho karcinómu), benígnych nádorov (mikrofolikulárneho a onkocytárneho adenómu), autoimunitných chorôb (Hashimotovej a Graves-Basedowovej tyreoiditídy) a prípady nenádorových parenchymatóznych strúm (po 10 prípadov z každej diagnózy). Sialyzácia povrchových glykokonjugátov bola hodnotená lektínovou histochemiou pomocou lektínov viažucích kyselinu sialovú,

a to: lektínom z *Tritrichomonas mobilensis* (TML) vysokošpecifickým pre kyselinu sialovú bez preferencie jej väzby, aglutinínom zo *Sambucus nigra* (SNA) viažucim preferenčne kyselinu sialovú v jej 2,6-väzbe a leukoaglutinínom z *Maackia amurensis* (MAL) viažucim preferenčne kyselinu sialovú v jej 2,3-väzbe. Výsledky boli kvantifikované morfometricky a korelované s Western-blotovou analýzou. Transkripcia sialyltransferáz SIAT1, 4A, 4B, 4C, 6, 7B a 8B zodpovedných za väzbu kyseliny sialovej a neuraminidáz NEU1 a 2 zodpovedných za jej uvoľňovanie z väzby bola analyzovaná prostredníctvom realtime RT-PCR

Výsledky: Benígne adenómy a parenchymatózne strumy vykazovali len slabú expresiu sialyzovaných glykokonjugátov na folikulárnych bunkách. Signifikančný vzostup pozitivity sialyzovaných glykokonjugátov bol pozorovaný v prípadoch folikulárneho a papilárneho karcinómu ($210,0 \pm 24,97\%$, respektíve $207,8 \pm 9,5\%$) a onkocytárneho karcinómu ($193,4 \pm 9,9\%$) a koreloval so vzostupom sialyzácie proteínov hodnotiteľnou Western-blot analýzou. Sialyzácia proteínov v benígnych adenómoch bola menej výrazná, ale bola zvýšená v porovnaní s parenchymatóznymi strumami. Sialyzácia glykokonjugátov v prípadoch medulárneho a anaplastického karcinómu bola slabá a nepravidelná. Zaujímavý je nález vyššej expresie sialyltransferázy SIAT4B a 4C so vzostupom expresie neuraminidáz NEU1, respektíve NEU2 v prípade medulárneho a anaplastického karcinómu štítnej žľazy v porovnaní s benígnymi procesmi. Naopak, vzostup expresie SIAT4C bez zmien, respektíve s poklesom expresie neuraminidáz bol zaznamenaný v prípadoch papilárneho, respektíve folikulárneho a folikulárneho variantu papilárneho karcinómu.

Záver: Chorobné zmeny štítnej žľazy sprevádzajú zmeny v expresii kyseliny sialovej, sialyltransferáz a neuraminidáz. Poukázali sme na zvýšenú expresiu kyseliny sialovej v prípadoch dobre diferencovaných karcinómov štítnej žľazy v porovnaní s benígnymi adenómami a tkanivom štítnej žľazy bez známkov zápalového alebo nádorového procesu. Vzhľadom na často zložitú diferenciálnu diagnostiku práve týchto ochorení môže táto skutočnosť prispieť k spresneniu diagnostického procesu, môže byť zaujímavá aj s ohľadom na možné nové terapeutické postupy v budúcnosti.

Podporené APVV-0282-11.

Molekulárne mechanizmy v procese invázie svalovej bunky parazitom *Trichinella spiralis*

Babál P.¹, Milcheva R.², Feketeová L.¹, Janegová A.¹, Janega P.^{1,3}

¹Ústav patologickej anatómie LF UK, Bratislava

²Bulharská akadémia vied, Sofia, Bulharsko

³Ústav normálnej a patologickej fyziológie, SAV, Bratislava

Úvod: Trichinelóza je život ohrozujúca parazitárna choroba, pri ktorej sa larvy parazitického červa zavrtávajú do buniek priečne pruhovaného svalu. Predkladaná práca prináša nové poznatky o podrobnostiach mechanizmov podieľajúcich sa na procese apoptózy vlákien kostrových svalov, ktoré sa transformujú na štruktúru nazývanú „nurse cell“ po invázii parazitickými nematódami *Trichinella spiralis*.

Materiál a metódy: Imunohistochemicky hodnotíme spôsob aktivácie, prejavu a subcelu-

lárnú distribúciu apoptózu indukujúceho faktora (AIF), apoptotické proteázy aktivujúceho faktora 1 (Apaf-1), Bcl-2 priradeného proteínu X (Bax), Bcl-2, kaspázy-3, hypoxiou indukovaného faktora 1-alfa (HIF-1 α), poly (ADP-ribóza) polymerázy-1 (PARP-1), jadrového antigénu proliferujúcich buniek (PCNA) a survivinu v zasiahnutej časti priečne pruhovaných myofibríl v rôznych časových intervaloch po invázii *T. spiralis*. Následne sme kinetiku expresie AIF, kaspázy-3, PARP-1 a HIF-1 α hodnotili semi-kvantitatívne a pomocou real time RT-PCR.

Výsledky: Získané výsledky ukázali, že začiatok transformácie buniek kostrových svalov po invázii *T. spiralis* je spojený s aktiváciou od kaspáz nezávislej apoptózy sprostredkovanej AIF, ktorá predchádza apoptotickej dráhe sprostredkovanej kaspázou. Prejavy AIF a kaspázy-3 sú charakteristické pre počiatočnú fázu vývoja „nurse cell“ buniek, ich aktivita v priebehu procesu postupne oslabuje a v starších bunkách absentuje. Uvoľnenie AIF nie je výsledkom nadmernej aktivácie jadrového PARP-1, ale pravdepodobne je dôsledkom prechodných ischemických podmienok vytvorených v postihnutom svalovom vlákne, ako naznačuje zvýšená regulácia HIF-1 α . Vyvinutá „nurse cell“ bunka má jadrá s morfológiu aktivovaných jadri, so zvýšenou hladinou PCNA a survivinu, ktorých expresia je črtou proliferujúceho tkaniva.

Záver: Zdá sa, že počiatočne zvýšená a následne znížená regulácia faktorov apoptózy v bunkách kostrových svalov predstavuje adaptačný mechanizmus umožňujúci zabývanie a prežívanie parazitov v svalových bunkách hostiteľského organizmu.

Idylla™, Biocartis' fully automated, real-time PCR-based molecular diagnostics system

Favy D.

Biocartis, Mechelen, Belgium

Idylla™, Biocartis' fully automated, real-time PCR-based molecular diagnostics system is designed to offer fast access to clinical molecular diagnostic information, anywhere and anytime. The Idylla™ system works on-demand in virtually any laboratory setting, allowing even de-centralized laboratories to rapidly report results. Idylla™ covers the entire process from sample to result in a time frame of 40 to 150 minutes.

This allows laboratories to report same-day results, so physicians have the information needed to make timely decisions. The fully integrated system enables clinical laboratories to perform a broad range of applications, including oncology, infectious diseases and genetic testing.

About 50 percent of all melanomas harbor mutations in the BRAF oncogene. Idylla™, Biocartis' fully automated, real-time PCR, offers fast and easy access to high-quality biomarker

data. Idylla™ BRAF Mutation Test allows detection of BRAF mutations directly from FFPE (1) tissue sections in 90 minutes with less than 2 minutes hands-on time. A game-changing technology when time matters most.

About 50 % of all metastatic colorectal tumors harbor mutations in exons 2, 3 and 4 of the KRAS oncogene¹. Idylla™, Biocartis' fully automated, real-time PCR, offers fast and easy access to high quality biomarker data. The Idylla™ KRAS Mutation Assay allows detection of KRAS mutations directly from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections in approx. 2 hours with less than 2 minutes hands-on time. The Idylla™ KRAS Mutation Assay is capable of detecting 21 relevant KRAS mutations: 7 mutations in codons 12 and 13 (exon 2), 9 mutations in codons 59 and 61 (exon 3) and 5 mutations in codons 117 and 146 (exon 4); at an average sensitivity of 1 % based on research data. The game-changing real-time PCR based technology uses a unique combination of ARC primers and MNAszymes, which allows very high sensitivity and specificity combined with high multiplexing capability.

Molekulová patológia nádorových ochorení I.

Asociácia prítomnosti cirkulujúcich nádorových buniek s expresiou vybraných proteínov v tkanive karcinómu prsníka

Čierna Z.², Janega P.¹, Karaba M.², Minárik G.³, Benca J.², Sedláčková T.³, Gronesová P., Sieberová G., Macúch J., Pindák D.², Šufliarsky J.², Danihel L.¹, Mardiak J.², Mego M.²

¹Ústav patologickej anatómie LF UK, Bratislava

²2. onkologická klinika LF UK a NOÚ, Bratislava

³Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK Bratislava

Úvod: Karcinóm prsníka patrí medzi najčastejšie šie malígne nádorové ochorenia u žien celosvetovo aj na Slovensku. Primárny karcinóm prsníka patrí medzi relatívne dobre liečiteľné ochorenie, no karcinóm prsníka v štádiu vzdialených metastáz je vo väčšine prípadov nevyliciteľné ochorenie. Proces metastázovania predstavuje sled po sebe nasledujúcich dejov, do ktorých je zapojených množstvo mechanizmov, faktorov a signálnych dráh. Cirkulujúce nádorové bunky predstavujú heterogénnu populáciu buniek priamo zodpovedných za vznik vzdialených hematogénnych metastáz. Identifikácia markerov korelujúcich s prítomnosťou CTC môže pomôcť k odhaleniu molekúl, ktoré by mohli byť kľúčové v iniciácii nádorovej diseminácie a ktoré by sa mohli stať cieľovými v protinádorovej liečbe. Epitelovo-mezenchymálny prechod predstavuje proces premeny epitelovej bunky na

bunku s mezenchymálnym fenotypom. Proteíny urokinázového plazminogén aktivujúceho systému sa podieľajú na diseminácii nádorovej choroby rôznymi mechanizmami. Matrix metaloproteinázy sú skupinou enzýmov schopných štiepiť proteíny extracelulárnej matrix, a tým napomáhajú rozsevu primárneho nádoru.

Materiál a metódy: Do translačnej štúdie sme zaradili pacientky s primárnym karcinómom prsníka z databázy Jednotky translačného výskumu Národného onkologického ústavu v Bratislave, ktoré podstúpili chirurgickú liečbu. Od každej pacientky bola odobratá periférna krv na detekciu cirkulujúcich nádorových buniek a analýzu sledovaných plazmatických proteínov a nádorové tkanivo prsníka. Biopické vzorky sme spracovali metódou tissue microarray, zhodnotili v základnom farbení HE a imunohistochemicky s použitím protilátok proti sledovaným proteínom (TWIST1, SLUG, uPA, uPAR, PAI-1, MMP1). Expresiu proteínov v primárnom nádore sme korelovali s prítomnosťou cirkulujúcich nádorových buniek v periférnej krvi, s analyzovanými plazmatickými faktormi (D-dimér, tkanivový faktor) a s klinicko-patologickými charakteristikami pacientok.

Výsledky: Expresia transkripčného faktora TWIST1 bola zvýšená v nádoroch s vyšším T štádiom podľa TNM klasifikácie nádorov. Zvýšené hladiny plazmatického D-diméru boli asociované s prítomnosťou epitelových aj mezenchymálnych cirkulujúcich nádorových buniek. Nezistili sme koreláciu medzi expresiou proteínov uPA systému v nádorovom tkanive a prítomnosťou

CTC v krvi pacientok. Ukázali sme koreláciu expresie matrix metaloproteinázy 1 v nádorovom tkanive s prítomnými CTC s mezenchymálnym fenotypom. Zvýšenú expresiu MMP1 sme zistili v nádoroch so známami agresivity.

Záver: Výsledky našej štúdie naznačujú, že molekula MMP1 by sa mohla stať cieľovou v protinádorovej liečbe využitím jej inhibítora. Chýbanie korelácie expresie proteínov uPA systému s CTC môže znamenať, že CTC by mohli byť priamo zapojené do aktivácie koagulácie a zvýšené množstvo CTC môže byť markerom agresívnejšej choroby so zvýšeným rizikom venózneho tromboembolizmu. Sledovanie prítomnosti CTC v krvi pacientok s karcinómom prsníka by mohlo vyselektovať skupinu pacientok vhodných na profylaktickú antikoagulačnú liečbu.

Podporené VEGA 1/0724/11 a 1/0044/15.

Incidencia výskytu *PIK3CA* mutácií v nádorovom tkanive prsníka v korelácii s histopatologickými vlastnosťami ochorenia

Mendelová A.¹, Holubeková V.¹, Katina S.¹, Žúbor P.², Plank L.³, Danko J.², Lasabová Z.¹

¹Ústav molekulovej biológie JLF UK a UNM, Martin

²Gynekologicko-pôrodnícka klinika JLF UK a UNM, Martin

³Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

PIK3CA je onkogén, ktorý má najvyššiu frekvenciu gain of function mutácií v nádore prsníka, ale jeho prognostický význam je stále kontroverzný. Cieľom tejto štúdie je analýza „hotspot“ mutácií v *PIK3CA* géne a ich korelácia s histopatologickými vlastnosťami ochorenia. Parafínové bločky boli

získané od 135 pacientok s karcinómom prsníka s charakterizovanými histologickými a imuno-histochemickými vlastnosťami vrátane stupňa diferenciácie nádoru (G), stavu regionálnych miestnych uzlín (pN), estrogénového receptora, progesterónového receptora a HER2 stavu. Exóny 9 a 20, kódujúce helikálnu a kinázovú doménu *PIK3CA* génu, boli podrobené sekvenčnej analýze v súbore 135 pacientok s malígnym ochorením prsníka. V sledovanom súbore sme detegovali spolu 39 (28,5 %) mutácií v *PIK3CA* géne s približne rovnakou frekvenciou výskytu mutácií v exóne 9 a 20 (14 %, 14,6 %, respektíve). V exóne 9 sme detegovali mutácie E542K (6/19), E545K (10/19), Q546K (2/19) a R555R (1/19). Pravdepodobnosť výskytu týchto mutácií bola významne zvýšená v dukálnom type karcinómu prsníka ($p < 0,0001$) a v skupine pacientok s nižším stupňom diferenciácie ($p = 0,0126$). Mutácie v exóne 20 (H1047R, H1047Y a G1049R) boli asociované s vyšším vekom pacientok ($p < 0,0001$). Okrem toho, výskyt mutácie E542K bol významne zvýšený v skupine pacientok s ER+ ($p = 0,0059$), PR+ ($p = 0,0058$) a HER2- ($p = 0,0058$) nádorom a bez prítomných metastáz v axile ($p = 0,0327$). Tieto výsledky naznačujú, že mutácie v exóne 9 *PIK3CA* génu by mohli byť priaznivým prognostickým faktorom. PI3K signálna dráha hrá dôležitú úlohu v rozvoji ľudského nádoru prsníka a prevalencia dysregulácie tejto dráhy podporuje jeho potenciál ako možného terapeutického cieľa.

Táto práca bola podporená projektom „Zvýšenie možností kariérneho rastu vo výskume a vývoji v oblasti lekárskeho rastu vo výskume a vývoji v oblasti lekárskeho rastu“, ITMS kód projektu: 26110230067 spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho sociálneho fondu.

Glycoprotein asporin is upregulated by three-dimensional growth and promotes invasion of breast cancer cells

Bouchal J.¹, Simkova D.¹, Kharraishvili G.¹, Ozdian T.², Soukup T.³, Krupka M.⁴, Galandakova A.⁵, Dzubak P.², Mickova A.¹, Korinkova G.¹

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

²Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

³Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine in Hradec Kralove, Charles University, Hradec Kralove, Czech Republic

⁴Department of Immunology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

⁵Department of Medical Chemistry and Biochemistry, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

Asporin belongs to small leucine rich proteoglycans family and its crucial characteristic is ability to bind collagens and initiate their mineralization. Asporin plays important role in normal development, in particular of cartilage, bone and teeth. Although asporin can now be found in multiple cancer related studies, its role in breast cancer is

not clear. We have performed in silico search and found Hs578T breast cancer cell line with asporin expression which we confirmed by quantitative RT-PCR and western blotting. Human dental pulp stem cells were used for validation of asporin antibodies. Out of multiple testing, we found that asporin can be downregulated by bone morphogenetic protein 4 (BMP4) while upregulation may be facilitated by serum-free cultivation or by three dimensional growth in stiff Alvetex scaffold. Downregulation by shRNA inhibited invasion of Hs578T through collagen type I matrix while adhesion and spheroid growth were not affected. Invasion of asporin-negative MDA-MB-231 and BT549 breast cancer cells through collagen type I was enhanced by recombinant asporin. In line with other studies, we have confirmed asporin expression by RNA scope in situ hybridization in cancer associated fibroblasts in invasive breast cancer. We haven't found any reliable antibody for immunohistochemistry. In conclusion, asporin expression may be regulated by different stimuli from tumor microenvironment, such as 3D culture, starvation or BMP4, which may in turn modulate extracellular matrix and invasion of breast cancer.

Asporin ovlivňuje migrační a invazní schopnosti nádorových buněk prsu

Šimková D.^{1,3}, Kharraishvili G.^{1,2}, Bouchal J.^{1,2}

¹Ústav klinické a molekulární patologie, Olomouc

²Ústav molekulární a translační medicíny, Olomouc

³Ústav biologie, Olomouc

Úvod: Glykoprotein asporin, člen rodiny small leucine rich repeat I, je intenzivně studován v sou-

vislosti s osteoartritidou. Asporin je zvýšene exprimován u rychle se remodelujících tkání a jeho abnormální exprese byla detekována i u některých typů nádorů. Jeho konkrétní role v progresi nádoru a metastazování není známa, ukazuje se ovšem, že je schopen aktivovat koordinovanou invazi buněk nádoru s fibroblasty asociující s nádorem.

Materiál a metody: Invazní buněčné linie izolované z nádoru prsu byly kultivovány v běžných podmínkách a ve 3D kultuře (matrice Alvetex®). Jednotlivé knock-in a knock-out modely byly testovány pomocí kvantitativní PCR, western blot analýzy a přístroje RTCA na detekci adheze/migrace/invazivity v reálném čase. Jako bariéra při invazních testech byla použita vrstva kolagenu I a pro chemoatrakci bylo použito fetální bovinní sérum.

Výsledky: V porovnání se standartní kultivací byla exprese asporinu signifikantně zvýšena u buněk Hs578t kultivovaných na polystyrenové matrici Alvetex®. U knock-in ani u knock-out buněk jsme nepozorovali žádné morfologické změny. Invazní schopnost přes kolagenovou zátku u knock-in modelu MDA MB 231 byla snížena, stejně jako adheze a migrace. Adheze knock-out modelu HS578t byla signifikantně vyšší v porovnání s netransfekovanými buňkami. Invazivita všech tří klonů tohoto modelu byla snížena oproti kontrole.

Závěr: Knock-in a knock-out modely ukázaly rozdílný efekt asporinu na invazní a migrační chování buněk. Abnormální exprese asporinu v rámci komplexní interakce nádoru s mikroprostředím může mít vliv na zvýšenou motilitu buněk a tím přispívat ke vzniku a progresi metastáz.

Podpořeno grantem MZČR NT13573, NS9956 A 1960/11.

Nádorový supresorový gén a protein tp53/P53 v normálním endometriu a karcinóme endometria

Šišovský V.^{1,4}, Minárik G.^{3,4}, Straka Ľ.⁷, Telková M.⁵, Rychlý B.⁸, Lasabová Z.⁵, Gemzová K.^{5,6}, Petrovič R.², Szemes T.⁴, Turňa J.⁴, Danihel Ľ.¹, Repiská V.²

¹Ústav patologickej anatómie LF UK a UNB, Bratislava

²Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB, Bratislava

³Ústav molekulárnej biomedicíny LF UK a UNB, Bratislava

⁴Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta UK a UNB, Bratislava

⁵Ústav molekulovej biológie JLF UK, Martin

⁶Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

⁷Klinická patológia Prešov, s. r. o., Prešov

⁸Cytopathos, s. r. o., Bratislava

Úvod: Karcinóm endometria (CaE) je najčastejšia neoplázia pohlavnej sústavy ženy (1, 2). Rôzne histologické podtypy CaE (endometrioidný, serózný, ...) boli identifikované do súčasnosti (3). CaE sa delia na dva základné typy: endometrioidný (vzniká v hyperplázii endometria, má menej agresívne správanie) a ne-endometrioidný (v atrofii endometria, agresívne správanie) (4). *tp53* je nádorový supresorový gén (17p13) (5) kódujúci na deoxyribonukleovú kyselinu (DNA) jadra bunky sa nadväzujúci (6 – 8) fosfoprotein P53, 53 kDa (9), strážca genómu (10), transkripčný

faktor génov (6 – 8, 11), ktorý sprostredkováva reakcie bunky na rozmanité druhy genotoxického stresu (12 – 14) zabránením deleniu bunky (13) a/alebo navodením excíznej opravy DNA alebo apoptózy (15). Alterácie *tp53* majú za následok nenormálny P53 s dlhším biologickým polčasom, ktorý sa hromadí v bunke (16) a stráca funkciu (14).

Ciel: Hodnotiť vzťah medzi histomorfologickým vzťahom normálneho endometria a CaE a medzi stupňom expresie *tp53/P53* a alterácií *tp53*.

Materiál a metódy: 40 vo formalíne fixovaných a do parafínu zaliatých ľudských bioptických hysterektomických a kyretážnych tkanivových vzoriek s normálnym proliferáčnym endometriom (10 x), endometrioidným stupňa G1 (10) a G3 (10) a seróznym (SC) (10) histologickým podtypom CaE sme hodnotili imunohistochemicky s monoklonovou myššou protilátkou (Dako, Glostrup Denmark), svetelným mikroskopom semikvantitatívne, na prítomnosť expresie *tp53/P53* v jadrách epitelových buniek endometria; a metódami molekulovej biológie s použitím DNA oligonukleotidov (Sigma Genosys/Aldrich, St. Louis, MO) a s použitím priamej sekvenčnej analýzy polymerázovej reťazovej reakcie DNA amplikónov na prítomnosť alterácií sekvencie DNA exónov 5 až 8 *tp53*.

Výsledky: Expressia *tp53/P53* a mutácie (substitúcie) *tp53* mali vzťah len k agresívnemu (SC) typu CaE.

Záver: V normálnom endometriu expressia *tp53/P53* nie je prítomná. Expressia *tp53/P53* a mutácie *tp53* sú združené s agresívnym (seróznym) typom cae.

Literatúra u autora

Podporené 2007/28-UK-05-MZSR.

Mikrofluidné profilovanie expresie apoptotických génov endometriálneho karcinómu

Hatok J.¹, Štefaniková A.¹, Čapláková V.¹, Kúdela E.², Balhárek T.³

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK a UNM, Martin

²Gynekologicko-pôrodnícka klinika JLF UK a UNM, Martin

³Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

Úvod: Endometriálna sliznica je fyziologicky pravidelne vystavovaná nadmernej estrogénovej stimulácii, čím dochádza k proliferáčnym a hyperplastickým zmenám. Kým simplexná hyperplázia a komplexná hyperplázia (adenomatózna bez atypií) veľmi zriedkavo progredujú do karcinómu, adenomatózna hyperplázia endometria s atypiami je prekursorom endometriálneho karcinómu (ECa). Okrem pôsobenia estrogénov na endometrium (END), zohráva dôležitú úlohu aj apoptóza, ktorá kontroluje bunkovú homeostázu počas menštruačných cyklov. Samotná apoptóza je regulovaná viacerými génmi, špeciálne však Bcl-2 génovou rodinou, avšak ich úloha pri ECa nie je presne definovaná. Preto sme sa v našej štúdií zamerali na profilovanie apoptotických génov na rozdielnych skupinách endometriálnych biopsií.

Materiál a metódy: Vytvorili sme tri rôzne skupiny vzoriek: i) kontrolná_1 (proliferáčne END, n = 14); ii) kontrolná_2 (sekrečné END, n = 2); iii) karcinómová (endometriálny adenoCa endometrioidného typu, n = 29). Po izolácii celkovej RNA z bioptických vzoriek sme vykonali reverznú transkripciu a následnú cDNA použili

na kvantitatívnu analýzu pomocou real-time PCR v mikrofluidnom formáte. Samotnou array (Applied Biosystems TaqMan Human Apoptosis Array) dokážeme stanoviť 93 génov pre jednu vzorku.

Výsledky: Na základe určenia absolútnych hladín expisie mRNA pre apoptotické proteíny sme pri korelácii dvoch skupín považovali za významné zmeny v hodnotách nad 2 (nadregulované) alebo pod -2 (podregulované). Medzi karcinómovou skupinou a kontrolami sme detegovali 8 génov s nadexpresiou, z toho bola polovica Bcl-2 rodiny (Bcl-2L14, Bcl-2A1, BIK, Bcl-2L11). Podobné výsledky sme zaznamenali, aj keď sme ako kontroly použili iba proliferatívne END. Pri sekrečnom endometriu sme okrem 6 nadexprimovaných génov zaznamenali aj 4 podexprimované (BIRC3, BIRC7, FASLG a Bcl-2L10). Naopak, pri korelácii sekrečného END oproti proliferatívnejmu poukazujeme až na 42 deregulovaných génov.

Záver: Zdá sa, že molekulárne zmeny génov vnútornej aj vonkajšej apoptotickej dráhy zohrávajú dôležitú úlohu pri cyklickom formovaní endometriálneho tkaniva. Ich význam v spojení s rozvojom karcinómového diferencovania sme detegovali na minimálnej úrovni. Dôležitá však bude analýza samotných proteínov pomocou imunohistochemickej a Western blotovej metódy.

Táto práca bola podporená projektom APVV-0224-12 a projektom „Zvýšenie možnosti kariérneho rastu vo výskume a vývoji v oblasti lekárskeho vied“, ITMS kód projektu: 26110230067 spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho sociálneho fondu.

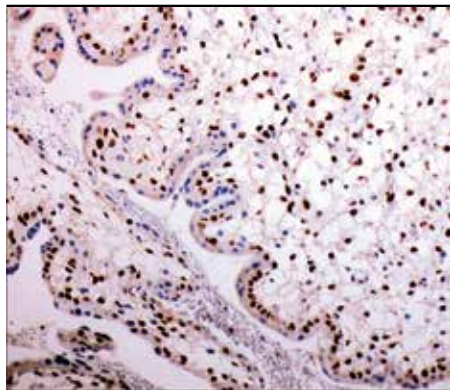
Využitie FISH metódy v diagnostike trofoblastovej choroby

Fröhlichová L., Gmitter F., Torday T.
Oddelenie patológie, UN L. Pasteura,
Košice

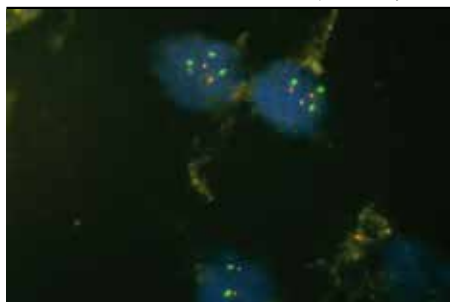
Rozlíšenie medzi hydatidóznymi molami a nonmolárnymi hydropickými abortmi a ďalšia subklasifikácia na kompletnú molu (CM) a parciálnu molu (PM) vo FFPE vzorkách má význam nielen pre klinický manažment pacientok, ale aj na sledovanie rizika vzniku perzistujúcej trofoblastovej choroby (CM 15 – 20 % a PM 0,5 – 5 %), ktorá môže viesť až k vzniku choriokarcinómu. Štúdiami bolo dokázané aj zvýšené riziko vzniku metastatickej gestačnej trofoblastovej choroby a trofoblastových tumorov.

Diagnostika a klasifikácia molárných gravidít je zatažená veľkou „inter- a intraobserver“ variabilitou, často s komplikovaným morfológickým rozlíšením hlavne medzi parciálnou molou a hydropickým abortom vyskytujúcimi sa v bežnej rutinnej praxi takmer každého patológa. Dnes je okrem morfologickej diagnostiky štandardom aj používanie imunohistochemického stanovenia proteínu p57, ktoré relatívne spoľahlivo odliší kompletnú molu (strata expisie p57 v cytotrofoblaste a stromálnych bunkách klkov) od parciálnej moly (PM), kde je expresia zachovaná podobne ako v hydropickom aborte (HA). Morfológické rozlíšenie parciálnej moly a hydropického abortu môže byť niekedy zložité aj pre skúseného patológa, keďže v oboch prípadoch je zachovaná p57. Autori viacerých štúdií preto hľadali ďalšiu optimálnu, efektívnu a prakticky ľahko aplikovateľnú metódu, ktorá by umožnila ich odlíšenie. Ako užitočnou doplnujúcou metódou sa zdá FISH, ktorá je schopná na

Obrázok 1. Silná jadrová pozitivita p57 v cytotrofoblaste a stromálnych bunkách klkov parciálnej moly



Obrázok 2. Triploidné jadrá stromálnych buniek klkov značené HER2 FISH sondou v parciálnej mole



FFPE vzorkách dokázať ploidiu v trofoblastových štruktúrach. Pre parciálnu molu je vo väčšine prípadov charakteristická triploidia (dva krát paternálna a jeden krát maternálna zložka genómu, 69XXX alebo 69XXY) a pre hydropický abort je vo

viac ako 80 % prípadov charakteristická diploidia. Práve tieto zistenia viedli autorov rôznych štúdií k použitiu FISH metódy. Samozrejme, v dnešných podmienkach a kvalitách molekulovo genetických laboratórií je možnosť dôkazu ploidiie aj inými metódami, napríklad PCR short tandem repeat, avšak nie je možné ich vykonať rutinne na oddeleniach patológie pod dohľadom patológa v korelácii s morfológickým obrazom a sú technicky aj finančne náročné.

Na našom pracovisku sme sa inšpirovali štúdiou, ktorá použila HER2 FISH sondu na potvrdenie ploidiie v CM, PM aj HA. Počas rokov 2013 – 2015 sme vyšetrili 13 prípadov s nejednoznačnou diagnózou a klasifikáciou, pričom výsledky z FISH vyšetrenia ploidiie pomohli v korelácii s histomorfológiou a imunohistochemickým dôkazom p57 k definitívnemu záveru patológa.

Údaje viacerých štúdií a naše skúsenosti ukazujú, že kombinácia morfológického záveru, imunohistochemického dôkazu p57 a FISH dôkazu ploidiie HER2 FISH sondou (s možnosťou použitia aj iných sond) sa zdá efektívnou a dostupnou vyšetrovacou stratégiou pri nejednoznačných prípadoch. FISH metóda, ktorá je vo viacerých patologických laboratóriách zavedená, rutinne používaná a zoštandardizovaná, tak môže slúžiť patológovi aj ako pomocná metóda pri identifikácii CM, PM a HA.

Využitie molekulej patológie v klinickej praxi I.

Sympóziu s podporou Novartis Pharma, s. r. o., Slovensko

Prognostický a prediktívny význam testovania stavu *ALK* génu v bioptickom materiáli nemalobunkového pľúcneho karcinómu

Plank L.^{1,2}

¹Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

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

Karcinóm pľúc patrí medzi zhubné nádory s najvyššou incidenciou a mortalitou v našej populácii. Prognóza a liečebné výsledky pacientov s týmto nádorom patrili donedávna v onkológii medzi tie horšie. Termín „karcinóm pľúc“ predstavuje v skutočnosti skupinu etiologicky, patogeneticky, klinicky – a dnes už vieme, že aj geneticky, heterogénnych ochorení. V bioptickej patológii sa zaužívalo tradičné delenie karcinómov pľúc na malo- a nemalobunkové (ďalej NSCLC), tvorené nádormi typu adenokarcinóm, skvamocelulárneho a veľkobunkový karcinóm, pričom recentne – v očakávaní novej klasifikácie SZO, bola publikovaná nová klasifikácia pľúcnych adenokarcinómov. Súčasne došlo k nahromadeniu nových poznatkov z genetiky a molekulej biológie týchto nádorov a boli identifikované mutácie, respektíve prestavby viacerých génov vo funkcií tzv. genetických „poháňáčov“ (drivers) karcinogenézy NSCLC.

Medzi najdôležitejšie gény v tomto zmysle pre NSCLC patria gény *EGFR*, *ALK* a *KRAS*. Tento

vývoj vyústil do možnosti indikovania novej tzv. cielej liečby zameranej na blokádu geneticky aktivovanej signálnej dráhy, ktorá udržuje nádorovú proliferáciu. Nové terapeutické modality dostupné aj pacientom v SR (a ČR) viedli k potrebe rozvoja molekulej diagnostickej patológie NSCLC v tesnej väzbe na jeho bioptickú diagnostiku. Na základe pôvodných klinických štúdií sa na indikovanie biologickej liečby blokujúcej *ALK* gén vyžaduje dôkaz zlomu tohto génu, ktorý je súčasťou jeho pomerne zložitej prestavby. Súčasne sa v praxi overili ďalšie metódy verifikácie stavu *ALK* génu v NSCLC, a to najmä imunohistochemický (IHC) dôkaz expresie dôsledku uvedenej prestavby – *ALK* proteínu.

V prezentácii práce predkladáme vlastné výsledky testovania stavu *ALK* génu v bioptických vzorkách takmer 700 pacientov s *EGFR* nemutovaným NSCLC a diskutujeme o potrebe paralelného testovania tohto stavu metódou FISH s použitím zlomovej aj *ALK/EML4* fúznej sondy, IHC expresie *ALK* proteínu (s protilátkou D5F3 na platforme BenchMark Ventana) a o konkordancii, respektíve diskordancii výsledkov FISH verus IHC analýzy. Zistené výsledky poukazujú na skutočnosť, že v prípade aplikácie IHC analýzy ako skríningovej metódy existuje nezanedbateľné riziko nespoznania prestavby *ALK* génu u časti pacientov. Aj preto, nehovoriac o potrebe identifikácie tzv. rezistentných foriem prestavby *ALK* génu, vzniká potreba overovania niektorých výsledkov ďalšími diagnostickými modalitami.

Táto štúdia bola podporená grantovým projektom MZSR 2012/24-UKMA-1 „Detekcia prediktívne relevantných parametrov v diagnostickom algoritme bioptického vyšetrenia karcinómu hrubého čreva a pľúc“ a projektom financovaným zo štruktúrnych fondov EÚ „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin)“, ITMS kód 262202201787.

Malígny melanóm – od mikroskopu k cieľenej terapii

Hlavčák P.

Histopatológia, a. s., Bratislava

Malígny melanóm je malígny tumor derivovaný z melanocytov. Jeho incidencia v beľošskej populácii dramaticky rastie tak celosvetovo, ako aj v rámci Slovenskej republiky. Včasná diagnostika je pre liečbu rozhodujúca – 95 % pacientov diagnostikovaných v 1. štádiu prežíva 5 rokov, naproti tomu, percento prežívania v 4. štádiu sa pohybuje medzi 5 a 22 %. Kritická úloha patológie v multidisciplinárnej starostlivosti o pacientov s melanómom, v ére dynamicky sa meniacej personalizovanej, precízne cieľenej terapie, je čoraz zjavnejšia. Klasická mikroskopická

diagnostika stále predstavuje základňu, na ktorej stavajú sofistikovanejšie molekulárne metodiky. Tie umožňujú spresniť klasifikáciu, prognózu a výber pacientov na cieľnú terapiu. Prezentácia ponúka v stručnom prehľade základné aspekty morfolologickej diagnostiky s dôrazom na rozhodujúce prognostikátory. Demonštruje jednak dostupné imunohistochemické farbenia, ale aj náročnejšie metodiky – napríklad FISH, CGH a ich význam v klasifikácii a diferenciálnej diagnostike problematických melanocytárnych proliferácií. Nanajvýš aktuálnou súčasťou diagnostiky sa stáva molekulárne testovanie melanómu, najmä dvoch dôležitých signálnych dráh zapojených do genézy melanómu – dráhy MAPK a dráhy AKT/PI3K. Aktivácia oboch dráh vedie k proliferácii podmienenej kľúčovými aktivačnými mutáciami, medzi inými v génoch *BRAF*, *RAS*, *MEK*, *GNAQ*, *GNA11*, *KIT*. Každá z týchto mutácií má v niečom odlišnú klinickú prezentáciu, s prognostickým a prediktívnym významom pre liečbu. Dramatickú, hoci prevažne prechodnú, klinickú odpoveď zaznamenala cieľná terapia zameraná špecificky na *BRAF* V600E mutovaný melanóm.

Molekulová patológia nádorových ochorení II.

Význam hypermetylácie promotóra *CDH1* génu ako potenciálneho biomarkera v skorej detekcii karcinómu krčka maternice

Holubeková V.¹, Mendelová A.¹, Meršaková S.^{1,2}, Švecová I.², Kapustová I.², Žúbor P.², Danko J.², Lasabová Z.¹

¹Ústav molekulovej biológie JLF UK a UNM, Martin

²Gynekologicko-pôrodnická klinika JLF UK a UNM, Martin

E-cadherín je transmembránový glykoproteín kódovaný *CDH1* génom a zohráva kľúčovú úlohu v bunkovej adhezii, potláča invazivitu nádorov, tvorbu metastáz a má účasť na bunkovej signalizácii. Intenzívnou štúdiou mnohých typov ľudských nádorov bola zistená znížená, respektíve žiadna expresia E-cadherínu, čo môže byť asociované s epiteliálno-mezenchymálnou tranzíciou (EMT), keď sa epiteliálne bunky môžu meniť na mezenchymálne cez mnohokrokový proces. Naša hypotéza bola založená na fakte, či je metylácia *CDH1* génu detegovateľná v cervikálnych vzorkách, a tak by potenciálne mohla byť využiteľná v skríningu rakoviny krčka maternice. Vyšetrovali sme hypermetyláciu promotórovej oblasti *CDH1* génu v rôznych typoch cervikálnych vzoriek vrátane cervikálneho epitelu bez abnormalít ($n = 47$), nízkostupňových (LSIL, $n = 34$) a vysokostupňových skvamózných intraepiteliálnych lézií (HSIL, $n = 46$) a invazívnych karcinómov ($n = 13$). Prítomnosť hypermetylácie promotórovej oblasti *CDH1* génu bola vyšetrená pomocou metylačne

špecifickej PCR (MSP-PCR) a vplyv na transkripciu *CDH1* génu bol hodnotený pomocou relatívnej kvantifikácie. Zistili sme prítomnosť hypermetylácie *CDH1* génu pri 20,6 % (7/34) LSIL, 21,7 % (10/46) HSIL a 46,2 % (6/13) karcinómoch. Potvrdili sme, že prítomnosť hypermetylácie promotórovej oblasti *CDH1* génu bola významne asociovaná s formovaním cervikálnej lézie, respektíve karcinómu ($p = 0,0005$) a expresia tohto génu bola výrazne znížená pri vzorkách s metyláciou *CDH1* promotóra ($p = 0,048$). Tieto výsledky naznačujú, že E-cadherín by mohol byť vhodným biomarkerom v skorej detekcii a špecifickej diagnostike karcinómu krčka maternice, a tiež by mohol vylepšiť manažment pacientok s karcinómom krčka maternice.

Podakovanie: Táto štúdia bola podporená projektmi Nadácia Výskum Rakoviny, ITMS 26110230067 „Zvýšenie možností kariérneho rastu vo výskume a vývoji v oblasti lekárskej vied“ a ITMS 26220220113 „Molekulová diagnostika rakoviny krčka maternice“, ktoré sú spolufinancované zo zdrojov EÚ.

Úloha telomerázy v rozvoji karcinómu krčka maternice

Kúdela E.¹, Farkašová A.², Balhárek T.², Višňovský J.¹, Plank L.², Danko J.¹

¹Gynekologicko-pôrodnická klinika JLF UK a UNM, Martin

²Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

Úvod: Integrácia ľudského papillomavírusu do genómu epitelových buniek krčka maternice

je kľúčovým krokom v indukcii malígnych zmien. Multikroková povaha karcinogenézy obsahuje v sebe sekvenčné akumulácie genetických zmien, ktoré vedú k progresii a invazívnemu rastu.

Ciele: Cieľom tejto štúdie bolo vyhodnotiť a korelovať amplifikáciu chromozomálnych oblastí 3q26 a 5p15 kódujúcich enzým telomerázu v jednotlivých cytologických a histologických podskupinách pacientok a porovnať senzitivitu a špecificitu amplifikačných testov s cytológiou, kolposkopickým vyšetrením a HPV DNA statusom.

Metódy: Práca prebiehala na Gynekologicko-pôrodníckej klinike v spolupráci s Ústavom patologickej anatómie JLF UK a UNM v Martine v rokoch 2011 – 2014. Prospektívna longitudinálna kontrolou podložená štúdia zahŕňala 131 pacientok. V práci sme sa zamerali na FISH diagnostiku amplifikácie oblastí kódujúcich súčasť enzýmu telomerázy (sonda FHACT – 3q26, 5p15) v cytologickom materiáli. Na cytologických preparátoch bolo manuálne hodnotených 100 atypických buniek, pričom sme analyzovali a korelovali amplifikačný vzor buniek. Štatistické výpočty boli prevedené pomocou programu PASW statistics 18 (IBM®) software. Korelácie medzi cytologickým, histologickým obrazom, HPV DNA statusom a FISH amplifikačným vzorom chromozomálnych oblastí 3q26 a 5p15 boli hodnotené pomocou chi-squared testu a neparametrického Man-Whitney U-testu.

Výsledky: Výsledky ukázali, že amplifikácia telomerázových génov rastie so stupňom dysplázie smerom k invazívnemu ochoreniu ($p < 0,001$). Zatiaľ čo nárast amplifikácie 3q26 je badateľný už pri CIN 2 léziách ($p < 0,01$), amplifikácia 5p15 je posunutá až smerom k CIN 3/CIS ($p < 0,001$). Samotné amplifikácie chromozomál-

nych oblastí vykázali vzájomnú koreláciu, ako aj koreláciu s pozitívou hrHPV ($p < 0,01$).

Záver: Analýza amplifikácie oblastí 3q26 a 5p15 môže v budúcnosti slúžiť na diferenciálnu diagnostiku cervikálnych lézií a na určenie ich malígneho potenciálu. Vysoká špecificita testov môže navýšiť excelentnú senzitivitu HPV DNA testu, a tak vytvorí ideálnu kombináciu pre sekundárny skrining. Správny manažment a diagnostické postupy, ďalej tzv. „cost effectiveness“ a selekcia pacientok, u ktorých je potrebný chirurgický zákrok, sú základným kameňom spoľahlivého preventívneho a liečebného programu.

Mutácie v géne *BRAF* u slovenských pacientov s gastrointestinálnymi stromálnymi nádormi

Lasabová Z.¹, Gemzová K.^{2,3}, Buzalková V.³, Minárik G.⁴, Štanclová A.³, Szépe P.³, Plank L.³

¹Martinské centrum pre biomedicínu BioMed, divízia Onkológia, Martin

²Ústav molekulevej biológie JLF UK a UNM, Martin

³Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

⁴Ústav molekulevej biomedicíny JLF a UNM, Martin

Úvod: Gastrointestinálne stromálne nádory (GIST) sú vysokorezistentné na konvenčnú chemoterapiu a rádioterapiu, ale, naopak, sú senzitívne na inhibítory tyrozínkinázových (TK) receptorov. Približne 10 až 15 % GIST-ov bez mutácie v *KIT* a *PDGFRa* génoch sa označuje ako tzv. „wild-type“ GIST-y (WT GISTy), ktoré sú menej citlivé na inhibíciu TK receptorov. Jedným

z dôvodov zníženej citlivosti môže byť aktivácia signálnej dráhy *RAS-BRAF*.

Materiál a metódy: V martinskom ÚPA, ktoré je v SR v pozícii Národného centra bioptickej diagnostiky GIST-ov, sme v rokoch 2004 – 2014 diagnostikovali GIST-y 705 pacientov v pred-terapeutickej fáze. Vzorky nádorovej DNA boli izolované z formalínom fixovaných a do parafínu zaliatych tkanivových rezov a následne vyšetrené pomocou dideoxysekvencie na prítomnosť mutácií génov *KIT* (v exónoch 7, 9, 11, 13) a *PDGFRA* (v exónoch 12, 14 a 18). Do našej štúdie sme zaradili vzorky 150 pacientov zaradených do skupiny WT GIST-ov a 150 pacientov s *KIT/PDGFRA* pozitívnymi GIST-ami. Na detekciu mutácie génu *BRAF* V600E sme využili alelovo-špecifickú PCR a dideoxysekvenciu.

Výsledky: Podiel *BRAF* pozitívnych pacientov (V600E a K601N) v súbore všetkých vyšetrených pacientov je 4,33 % (13/300), v súbore pacientov s WT GIST-om 6,67 % (10/150) a v súbore pacientov v predošlých analýzach potvrdenou *KIT/PDGFRA* mutáciou 2 % (3/150). Dideoxysekvenciou bola *BRAF* mutácia potvrdená iba v 5 prípadoch, čo poukazuje na nízky počet *BRAF* pozitívnych buniek v nádorovej mase.

Záver: *BRAF* mutácie môžu ovplyvniť odpoveď na liečbu imatinib-mesylátom u pacientov s WT GIST-ami, ale pravdepodobne aj v istej časti tých, u ktorých bola dokázaná aktivujúca mutácia v géne *KIT* citlivá na imatinib. Preto sa domnievame, že je žiaduce zvážiť zaradenie analýzy mutácií *BRAF* génu do diagnostického algoritmu bioptického vyšetrenia pacientov s GIST-om.

Podporené edukačným grantom Novartis Oncology Slovensko.

Prediktívny význam molekulárnej diagnostiky pacientů s gastrointestinálnim stromálnim nádorem

Kalfusová A.¹, Hilská I.¹, Kalinová M.¹, Krsková L.¹, Linke Z.², Kodet R.¹

¹Ústav patológie a molekulárnej medicíny, 2. LF UK a FN Motol, Praha

²Oncologická klinika, 2. LF UK a FN Motol, Praha

Úvod: Gastrointestinální stromální tumory (GIST) tvoří nejpočetnější skupinu mesenchymálních nádorů gastrointestinálního traktu. Charakterizovány jsou aktivačními mutacemi genů *KIT* a *PDGFRA*. U pacientů s nemutovanými geny *KIT* a *PDGFRA* se v menším zastoupení (3 – 20 %) vyskytují mutace v genu *BRAF*. V léčbě pacientů s metastazujícím, neresekovatelným nebo recidivujícím GIST je terapeuticky indikován inhibitor aktivovaných receptorových tyrosinkináz, imatinib mesylát (IM). Odezvu na léčbu ovlivňuje rozvoj získané rezistence. Rezistence vzniká u části pacientů v průběhu terapie IM, zejména na podkladě vzniku sekundárních mutací.

Metodika: Mutační analýzu primárních a sekundárních mutací genů *KIT* a *PDGFRA* jsme stanovovali prostřednictvím sekvenování DNA Sangerovou metodou. Konkrétně jsme vyšetřovali exony 9, 11, 13, a 17 genu *KIT* a exony 12, 14, a 18 genu *PDGFRA*. Mutace v genu *BRAF* jsme rovněž vyšetřovali pomocí sekvenční PCR a určením pořadí nukleotidů v exonu 15.

Výsledky: V období roků 2007 – dosud jsme přítomnost primárních a sekundárních mutací vyšetřovali v souboru 191 pacientů. Primární mutace jsme detekovali u 155 pacientů (81 %). Sekundární mutace jsme prokázali u 8 pacientů (z celkového

množství 99 analyzovaných pacientů léčených IM – 8 %). Přítomnost mutace (V600E) genu *BRAF* jsme zjistili u 2 pacientů (6,5 %) z 31 analyzovaných pacientů bez mutací v genech *KIT* a *PDGFRA*.

Závěr: Molekulární diagnostika primárních mutací umožňuje předpovědět citlivost/rezistenci nádoru na terapii. Mutační analýza sekundárních mutací umožňuje vysvětlit vznik získané rezistence a selhávání terapie IM. Pacienti s *GIST* s výskytem mutace v genu *BRAF* mohou profitovat z terapie inhibitory *BRAF*.

Projekt podporován: Projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN Motol) IG 6006, GAUK 198 213 a OPVK CZ.2.16/3.1.00/24022

Detekce fúzního genu *NAB2-STAT6* u solitárních fibrózních nádorů

Krsková L., Galgonková P., Hilská I., Fejfárková J., Kokošková A., Kalinová M., Kodet R.

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

Solitární fibrózní nádor (SFT) je vzácný vřetenobuněčný nádor dospělých. Nejčastěji se vyskytuje v dutině hrudní a v 10 – 30 % případů se může chovat maligně. Obvykle vychází z pleury, může se také vyskytovat i na peritoneu, ale i ve tkáních bez přítomnosti serózy. Histologický obraz je často variabilní, nicméně histologický obraz spolu s imunohistochemickým vyšetřením většinou umožňují přesnou diagnózu. Na základě histopatologického vyšetření nelze vždy předvídat klinické chování, což zůstává problémem.

Vliv fúzního genu *NAB2/STAT6*, vzniklého inverzí chromozómu 12, na patogenезi onemocnění, lokalizaci nádoru a na biologické chování nádoru není dosud dobře prozkoumán. V této studii jsme se

zaměřili na detekci fúzního transkriptu *NAB2/STAT6* a jeho zlomových variant s cílem zjistit, zda má typ fúzního transkriptu vliv na patogenезi a prognózu SFT. Vyšetřili jsme 20 pacientů se SFT (16 žen, 4 muži) ve věkovém rozmezí 21 – 81 let (medián věku 59 let). Kvalitní RNA z FFPE bloků vhodnou pro další molekulární zpracování se podařilo vyizolovat u 18 pacientů (90 %). Pomocí RT-PCR a metodou přímého sekvenování jsme prokázali fúzi *NAB2/STAT6* u 17 z 18 pacientů. U 13 pacientů s pleurální/plicní lokalizací SFT jsme prokázali fúzi exonu 4 genu *NAB2* s exonem 2 genu *STAT6* (2 x maligní forma SFT). Variantní místo zlomu jsme identifikovali u 4 pacientů (2 x extra-pleurální lokalizace – SFT s úseky lipomatózního hemangiopericytomu; 2 x plicní lokalizace SFT). U jednoho nádoru klasifikovaného jako SFT malé pánve se fúzní transkript nepodařilo prokázat.

Naše výsledky ukazují, že RT-PCR detekce fúzního genu *NAB2/STAT6* je vhodným vyšetřením zvláště u pacientů s atypickou lokalizací SFT, kde může být histopatologická diagnostika obtížná. K zjištění prognostického dopadu jednotlivých variant fúzního transkriptu budeme soubor pacientů se SFT dále rozšiřovat.

Podpořeno projektem (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL) a „OPVK CZ.2.16/3.1.00/24022“.

Možnosti genetickej diagnostiky pri sarkónoch na OLG NOÚ

Leitnerová M., Copáková L.
Oddelenie lekárskej genetiky NOÚ, Bratislava

Sarkómy predstavujú heterogénnu skupinu malígnych mezenchymálnych tumorov so zložitou histologickou klasifikáciou a silnou geneticou pre-

dispozíciou. Bunkový pôvod mnohých sarkómov je však stále nejasný. Metódy molekulovej genetiky nielen pomáhajú pri pochopení molekulárneho mechanizmu patogenézy sarkómov, ale aj demonštrujú nové vzťahy medzi rozličnými typmi. Molekulárna klasifikácia založená na genetických zmenách rozdeľuje sarkómy do dvoch hlavných skupín. Prvú skupinu predstavujú sarkómy s relatívne jednoduchým karyotypom a špecifickou translokáciou, ktorej výsledkom je najčastejšie aberantný transkripčný faktor (napríklad *EWS/FLI* pri Ewingovom sarkóme) alebo s bodovou mutáciou (napríklad mutácia génu *KIT* pri gastrointestinálnych tumoroch). Druhú skupinu predstavujú sarkómy bez špecifickej genetickej aberácie, avšak s komplexnými zmenami karyotypu (napríklad pri leomyosarkómoch). Patria sem zmeny počtu chromozómov a mutácie typu nebalansovaných translokácií, delécie a amplifikácie. Zaujímavosťou je, že tumory s translokáciami sa často objavujú u detí a mladistvých, teda u pacientov, u ktorých tumorigenéza nastala z relatívne malého počtu genetických udalostí. Zatiaľ čo u starších pacientov je prednostný výskyt tumorov, pri ktorých chýba špecifická genetická udalosť, teda došlo k akumulácii genetických udalostí (množstvo zmien v rôznych signálnych dráhach počas dlhého obdobia).

Medzi štandardne používané metódy detekcie genetických zmien pri tejto skupine ochorení patrí metóda FISH. Metóda umožňuje identifikovať špecificky zmeny v konkrétnych oblastiach (napríklad amplifikácie oblasti 12q13-15 u WD/DD liposarkómov) alebo prestavby konkrétnych génov (napríklad *FOXO1* pre rabdomyosarkómoch). Rovnako na našom oddelení používame metódu FISH. Diagnostiku však pokrývame aj na molekulárnej úrovni identifikáciou fúznych transkriptov metódou RT-PCR. Citlivosť metódy umožňuje nielen iníciaľne stanovenie markerov,

ale aj následnú detekciu minimálneho reziduálneho ochorenia pri podozrení na relaps ochorenia alebo pri podozrení na infiltráciu kostnej drene primárnym ochorením. Keďže čerstvé tumorové tkanivo máme k dispozícii na vyšetrenie len sporadicky, zaviedli sme izoláciu a následné vyšetrenie RNA z parafínového bloku. Vzhľadom na metodické limity oboch metódik a aj na základe našich skúseností sa ako optimálne javí ich vzájomná kombinácia.

Osteosarkóm z pohľadu genetiky – prvé skúsenosti

Tomášová R.¹, Pavlíková G.¹, Kilián M.², Pavlík T.², Hojsíková I.¹

¹ Oddelenie lekárskej genetiky, Medirex, a. s., Bratislava

² II. ortopedicko-traumatologická klinika LF UK a UNB, Bratislava

Z aspektu cytogenetiky sú osteosarkómy typom nádorov s komplexnými zmenami genómu, a to i na úrovni jednotlivých buniek. V takmer 70 % prípadov boli pozorované genetické zmeny s prítomnosťou viacerých klonov a rôznou mierou heterogenity, ktorá sa odráža v pestrom zastúpení chromozómových aberácií. Tieto nádory vykazujú množstvo štruktúrnych a numerických zmien v zmysle straty alebo zisku genetického materiálu. Typické sú kruhové, tzv. ring chromozómy s amplifikáciami dôležitých génov, ktoré sú spojené s progresiou ochorenia a zvýšeným metastatickým potenciálom. Okrem ring chromozómov sa pri osteosarkómoch vyskytujú aj double-minut a marker chromozómy, ale aj množstvo nebalansovaných translokácií a inverzií.

Prezentujeme prípad 48-ročného muža s diferenciálnou diagnózou parosteálny osteosarkóm (POS) so zaujímavým genetickým príbehom.

Molekulová patológia nádorových ochorení III.

Expresie androgenového receptoru u normálných a nádorových buněk prostaty ovlivněných látkami indukující epigenetické změny

Fialová B.^{1,2}, Smešný Trtková K.^{1,2}, Langová K.³, Kolář Z.^{1,2}

¹Laboratoř molekulární patologie, Ústav klinické a molekulární patologie LF Univerzity Palackého, Olomouc

²Ústav molekulární a translační medicíny LF Univerzity Palackého, Olomouc

³Ústav lékařské biofyziky Lékařské fakulty Univerzity Palackého, Olomouc

Úvod: Androgenový receptor (AR) hraje klíčovou roli při vzniku a progresi karcinomu prostaty (KP). Důsledkem androgenové deprivace terapie vzniká často obtížně léčitelný kastračně-rezistentní karcinom prostaty (KRKP). Metylace DNA a acetylace histonů jsou epigenetickými modifikacemi, které mohou ovlivňovat signální dráhy AR. U některých KRKP byla zjištěna snížená exprese AR v důsledku metylačních změn úseků genu androgenového receptoru, které mohou vést k jeho inaktivaci – umlčení (*silencing*). Cílem naší práce bylo zjistit, zda-li účinky inhibitoru DNA metyltransferáz – 5-Aza-2'-deoxycytidinu (Aza-dC) a inhibitoru histonových deacetyláz – butyrátu sodného (NaB), mohou ovlivnit expresi metylovaného genu AR u buněk na androgeny necitlivé prostatické nádorové linie DU145, reprezentující KRKP. Z našich výsledků vyplývá, že Aza-dC a NaB mohou ve vhodné kombinaci

přispívat k epigenetickým změnám vedoucím k regulaci exprese androgenového receptoru.

Metody: Buňky nenádorové linie RWPE1 a nádorové buňky linie DU145 byly ovlivněny Aza-dC, NaB a jejich kombinacemi s cílem ovlivnit expresi AR mechanismem demetylace DNA a reacylace histonů. Podstatou experimentů bylo na úrovni cDNA potvrdit epigeneticky indukovanou expresi AR. Chromatinová imunoprecipitace kombinovaná s kvantitativním real-time PCR sloužila k analýze důsledků acetylací/deacetylací na úrovni histonů H3 a H4.

Výsledky: U nádorových buněk linie DU145, největší efekt na demetylaci genu AR spojenou se zvýšenou acetylací histonů měla kombinace obou použitých inhibitorů. Normální buňky prostaty, v porovnání s buňkami nádorovými, reagovaly na ovlivnění inhibitory s menší intenzitou. Naše výsledky by mohly pomoci k objasnění mechanismu působení inhibitorů histonových deacetyláz a inhibitorů DNA metyltransferáz jako součást doplňující epigenetické terapie pacientů s KRKP.

Tato práce byla podpořena grantem LF_2015_008.

Expression levels of Filamin A protein predict survival outcomes in non-small cell lung cancer patients treated with Carboplatin and Navelbine

Gachechiladze M.¹, Skarda J.¹, Janikova M.¹, Mgebrishvili G.¹, Kharaisvili G.¹, Kolek V.²,

Grygarkova I.², Klein J.³, Poprachova A.⁴, Arabuli M.⁵, Kolar Z.¹

¹Department of Clinical and Molecular Pathology, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc, Czech Republic

²Department of Tuberculosis and Respiratory Diseases, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc and University Hospital Olomouc

³Laboratory of Experimental Medicine, Departments of Pediatrics and Oncology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc and University Hospital Olomouc

⁴Department of Normal Anatomy, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University Olomouc

⁵Department of Normal Anatomy, Tbilisi State Medical University, Tbilisi, Georgia

Objective: Resistance to cytotoxic chemotherapeutic drugs represent the major impediment for the successful treatment of non-small cell lung cancer patients. Recently, it has been shown that cytoskeletal protein Filamin A is required for efficient DNA damage repair and modulates cisplatin sensitivity *in vitro*. We investigated the relationship between the expression levels of filamin A protein and survival outcomes in non-small cell lung cancer patients, treated with adjuvant Carboplatin and Navelbine.

Methods: We analysed filamin A protein expression in resection specimens from 135 non-small cell lung cancer patients, from which

73 patients were treated with adjuvant Carboplatin and Navelbine, and 62 patients did not receive adjuvant treatment. Archived formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue sections were stained immunohistochemically using EP2405Y antibody against C-terminus of filamin A.

Results: Cox regression analysis of survival showed that increased expression of filamin A protein (histoscore > 90) is significantly related with shorter overall survival (HR = 1,005, 95 % CI (1,000; 1,010), p = 0,037) and disease free survival (HR = 1,004, 95 % CI (1,001; 1,008), p = 0,017) in patients with adjuvant platinum-based chemotherapy. Such relationship was not seen in patients without adjuvant treatment.

Conclusion: Filamin A expression might represent a novel potential predictive marker of platinum-based treatment outcome in patients with non-small-cell lung cancer.

Polymorfizmus mismatch reparačných génov *hMLH1* a *hMSH2* a riziko karcinómu pľúc

Slováková P.¹, Matáková T.², Halašová E.¹

¹Ústav lekárskej biológie JLF UK, Martin

²Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Martin

Úvod: Karcinóm pľúc obsadzuje popredné miesta v incidencii aj mortalite nádorových ochorení vo svete, rovnako aj v Slovenskej republike. Gény *hMLH1* a *hMSH2* patria k hlavným členom rodiny mismatch reparačných génov. Zmeny v mismatch reparačných génoch sú často spájané so vznikom spontánnych aj dedičných nádorov. V našej štúdii typu case-control sme sa zamerali na štúdium vybraných jednonukleotidových polymorfizmov rs1800734

a rs2303425 mismatch reparačných génov a ich vzťahu k rozvoju karcinómu pľúc v Slovenskej populácii.

Materiál a metódy: Do štúdie typu case-control bolo zahrnutých 483 pacientov s diagnózou karcinómu pľúc a 484 zdanlivo zdravých jedincov kontrolnej skupiny. Genotypizácia bola uskutočnená pomocou metódy PCR-RFLP.

Štatistická analýza bola vykonaná pomocou Fisherovho exaktného testu v dominantnom aj recesívnom genetickom modeli. Rozdiely v distribúcii alel, genotypov a ich vzájomných kombinácií boli stanovené Chí-kvadrát testom. Na určenie sily asociácie medzi rôznymi genotypmi (respektíve genotypovými kombináciami) vybraných reparačných génov a sledovaným ochorením bol vypočítaný stupeň pravdepodobnosti (OR) a 95 % interval spoľahlivosti nameraných hodnôt (95 % CI). Za štatisticky významnú bola považovaná hodnota $p < 0,05$.

Výsledky: Stanovenie populačnej frekvencie vybraných polymorfizmov reparačných génov *hMLH1* (rs1800734) a *hMSH2* (rs2303425) bolo uskutočnené u všetkých sledovaných jedincov. Medzi skupinou pacientov a kontrolnou skupinou neboli signifikantné rozdiely vo frekvencii alel. Riziko vzniku karcinómu pľúc bolo v celkovej skupine štatisticky významne zmenené pri nasledujúcich genotypoch vybraných reparačných génov: C_C *hMSH2* (OR = 2,29; $p = 0,021$), G_A génu *hMLH1* (OR = 0,67; $p = 0,003$). Pri prerozdelení pacientov podľa pohlavia bolo štatisticky významne zmenené riziko vzniku karcinómu pľúc v skupine žien pri nasledujúcich genotypoch polymorfizmov vybraných reparačných génov: C_C génu *hMSH2* (OR = 5,04; $p = 0,01$) a G_A polymorfizmu génu *hMLH1* (OR = 0,5; $p = 0,0017$).

Pri štatistickej analýze dvojkombinácií genotypov vybraných reparačných génov bolo riziko vzniku sledovaného ochorenia signifikantne zmenené v nasledujúcich prípadoch: v celkovej skupine *hMLH1* A_A + *hMSH2* C_C (OR = 1,85, $p = 0,006$), *hMLH1* G_A + *hMSH2* T_C (OR = 0,74; $p = 0,002$), *hMLH1* G_A + *hMSH2* C_C (OR = 0,78; $p = 0,003$), v skupine mužov u dvojkombinácie genotypov *hMLH1* G_A + *hMSH2* T_C (OR = 0,78; $p = 0,04$) a v skupine žien: *hMLH1* A_A + *hMSH2* C_C (OR = 2,30 $p = 0,03$), *hMLH1* G_A + *hMSH2* T_T (OR = 0,75; $p = 0,05$) a *hMLH1* G_A + *hMSH2* C_C (OR = 0,64; $p = 0,04$).

Záver: Na základe uvedených výsledkov môžeme usudzovať, že sledované polymorfizmy vybraných reparačných génov môžu ovplyvňovať zmenu rizika karcinogenézy pľúc, pričom ich výsledný efekt poukazuje na medzipohlavnú odlišnosť. Na spresnenie a hodnovernosť výsledkov je potrebné rozšírenie výskumu vplyvu polymorfizmov na väčšiu populáciu pri súčasnom zachovaní jej homogenity.

Práca bola podporená grantom Ministerstva školstva SR APVV-0412-11.

The prognostic role of sphingosine kinase-1 and S1P lyase protein expression in patients with non-small cell lung cancer

Skarda J.¹, Gachechiladze M.¹, Tichy T.¹, Kolek V.², Grygarkova I.², Klein J.³, Mgebrishvili G.¹, Kharashvili G.¹, Janikova M.¹, Pitson M.⁴, Gomez-Brouchet A.^{5,6,7,8}, Cuvillier O.^{5,6,7}

¹Laboratory of Molecular Pathology and Department Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and

Dentistry, Palacky University, Olomouc, Czech Republic

²Department of Tuberculosis and Respiratory Diseases, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and Faculty Hospital in Olomouc, Czech Republic

³1st. Department of Surgery, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and Faculty Hospital in Olomouc, Czech Republic

⁴Centre for Cancer Biology, University of South Australia and SA Pathology, Adelaide SA, Australia

⁵CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Toulouse, France

⁶Université de Toulouse, UPS, IPBS, Toulouse, France

⁷Equipe Labellisée Ligue contre le Cancer, Toulouse, France

⁸Institut Universitaire du Cancer Toulouse Oncopôle, Toulouse, France

*Contributed equally to this work.

Background: Sphingosine 1-phosphate (S1P) has emerged as a key lipid mediator that promotes tumor cell proliferation, survival, migration and angiogenesis. Sphingosine kinase-1 (SphK1) and S1P lyase are the main enzymes that control synthesis and degradation of S1P. Herein we report for the first time the prognostic and predictive value of both SphK1 and S1P lyase expression in patients with non-small cell lung

cancer (NSCLC) treated with adjuvant platinum-based chemotherapy.

Material and methods: Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from 120 NSCLC patients were stained immunohistochemically using antibodies against SphK1 and S1P lyase, and the results correlated with all available clinicopathological factors.

Results: Cross-tabulation of SphK1 expression and survival showed that the risk of relapse is higher in patients with increased SphK1 expression (histoscore ≥ 75), irrespective of the stage (Odds ratio = 3,333, overall accuracy = 68,8 %, $p = 0,01$). Univariate Cox regression model of survival also showed the increase of the risk of relapse in patients with SphK1 ≥ 75 expression ($p = 0,006$, HR = 1.004, 95 % CI [1,001; 1,006]). Multivariate survival analysis, using the Cox regression method showed that SphK1 represents an additional risk factor for NSCLC relapse, together with disease grade, stage, tumor size (T) and nodal status (N) ($p = 0,038$, HR = 2,048 95 % CI [1,039; 4,037]). Increased cytoplasmic expression of S1P lyase was significantly related to the increased risk of NSCLC progression in patients with stage III – IV NSCLC ($p = 0,022$).

Conclusion: Collectively, our data suggest that the immunohistochemical detection of sphingolipid metabolism pathway enzymes, particularly SphK1 and S1P lyase might represent promising prognostic markers in NSCLC patients treated with adjuvant platinum-based chemotherapy.

Využitie molekulej patológie v klinickej praxi II.

Sympóziu s podporou generálneho sponzora AstraZeneca

Plúcny karcinóm: od histologickej klasifikácie k diagnostike genetických zmien DNA v tkanive nádoru a voľne cirkulujúcej v plazme Plank L.^{1,2}

¹Ústav patologickej anatómie, Jesseniova lekárska fakulta Univerzity Komenského a Univerzitná nemocnica v Martine,

²Martinské bioptické centrum, s. r. o., Martin, Slovensko

Bioptické vyšetrenie tkaniva (zhubného) nádoru vedúce k stanoveniu diagnózy (určeniu typu nádoru a podľa možnosti aj gradingu, resp. stagingu nádorového ochorenia) je „conditio sine qua non“ pre voľbu adekvátnej terapeutickkej modality ako súčasť celkového terapeutického manažmentu onkologického pacienta. V posledných 10 – 15 rokoch došlo k rozvoju nových liečebných možností, ktoré sú „cielené“ na biologicky a prediktívne relevantné genetické zmeny v DNA nádorovej bunky – tzv. molekulo-biologické a genetické biomarkery. Tieto zmeny je žiaduce verifikovať v predterapeutickom, ako aj postterapeutickom období – napr. v prípade vzniku rezistencie na liečbu, metastatickej alebo lokálnej progresie nádorového ochorenia, jeho relapsu a pod. V podstate doteraz platí (resp. donedávna platilo), že pre všetky uvedené vyšetrenia – počnúc bioptickou diagnostikou až po identifikáciu biomarkerov je nevyhnutné získať dostatočné množstvo nepoškodeného tkaniva nádoru (*bioptické vyšetrenie tkaniva nádoru*), alebo buniek nádoru (*cytologické*

vyšetrenie buniek nádoru). Takto získané vzorky v optimálnom prípade umožňujú následné genetické a molekulo-biologické analýzy „markerov“ – obyčajne buď cestou analýzy DNA izolovanej z buniek/tkaniva nádoru, alebo metódami in-situ hybridizácie priamo v reze nádorového tkaniva (prípadne v cytologickom preparáte). Splnenie podmienky získania tkaniva nádoru pre komplexnú bioptickú aj genetickú analýzu pacientov s karcinómom pľúc nie je jednoduché ani v predterapeutickom období, a už vôbec nie v období po predošlej liečbe. Platí to pre všetky typy karcinómov, ale najmä pre kategóriu nemalobunkových karcinómov pľúc (NSCLC) a obzvlášť pre pľúcny adenokarcinóm. Jeho histopatologická typizácia prešla v posledných 4-5 rokoch zásadnými zmenami a tieto už majú aj priamy vzťah k identifikácii mutácií, resp. prestavby génov vo funkcii tzv. genetických „poháňačov“ (drivers) karcinogenézy NSCLC.

Dnes prudko pribúdajú poznatky o aktívnych verus rezistentných mutáciách/prestavbách génov *EGFR*, *ALK*, *MET*, *ROS1* a ďalších v bunkách NSCLC. Súčasne pribúdajú nové diagnosticko-analytické možnosti komplexnejšej genetickej analýzy nádorovej DNA metódami analýzy panelu génov, exómov alebo celých genómov, možnosti sledovať nielen mutačnú evolúciu nádoru (i identifikovať jednotlivé klonov a evolúciu subklonov), ale urobiť aj kvantitatívnu analýzu somatických mutácií. Navyše dnešné metódy umožňujú z krvi, resp. plazmy onkologického pacienta izolovať cirkulujúce tumorové bunky

(CTC), alebo cirkulujúcu nádorovú (tumorovú – ďalej ctDNA). Tieto postupy sa literárne označujú ako „tekutá biopsia“ (z angl. „liquid biopsy“) ako protiklad klasickej „tkanivovej biopsie“. Nové diagnostické a analytické modalitty nadobúdajú obrovský význam práve pre pacientov s pľúcnym karcinómom, u ktorých v priebehu liečby vznikajú buď nové terapeuticky ovplyvniteľné mutácie, alebo mutácie spôsobujúce rezistenciu na používanú liečbu. Implementáciou všetkých uvedených diagnostických postupov za podmienky optimálnej multidisciplinárnej spolupráce sa patológ stáva súčasťou tímu odborníkov, ktorí môžu prispieť k snahe zmeniť nádorové ochorenie typu pľúcneho karcinómu na keď už nie vyliečiteľné, tak aspoň na „chronické“ ochorenie.

Táto štúdia bola podporená grantovým projektom MZSR 2012/24-UKMA-1 „Detekcia prediktívne relevantných parametrov v diagnostickom algoritme bioptického vyšetrenia karcinómu hrubého čreva a pľúc“ a projektom financovaným zo štrukturálnych fondov EÚ „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin)“, ITMS kód 262202201787.

Analýza mutačného stavu génu EGFR v biopticky vyšetranom tkanive nemalobunkového karcinómu pľúc v materiáli Martinského bioptického centra, s. r. o.
Farkašová A.^{1,2}, Scheerová K.¹, Huřka Z.^{1,2}, Plank L.^{1,2}

¹Martinské bioptické centrum, s. r. o., Martin

²Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

Úvod: Celosvetovo je karcinóm pľúc jedným z najčastejších typov rakoviny. Navyše,

v porovnaní s inými typmi rakoviny je aj jednou z hlavných príčin úmrtia onkologických pacientov. Primárne karcinóm pľúc rozlišujeme na malobunkový (SCLC) a nemalobunkový (NSCLC) karcinóm pľúc. NSCLC predstavuje približne 80 % až 85 % všetkých prípadov karcinómu pľúc a delí sa na tri hlavné podtypy: adenokarcinóm (AC), epidermoidný (spinocelulárny) karcinóm (SP) a veľkobunkový karcinóm. AC je charakteristický odlišnými genetickými zmenami v nádorových bunkách, ktoré súvisia so vznikom a s progresiou ochorenia, a zároveň ovplyvňujú ich rozdielnu citlivosť na dnes klinicky významnú cieľnú terapiu. V tomto podtype NSCLC zohráva v súčasnosti z hľadiska terapie dôležitú úlohu gén *EGFR*, ktorý definuje molekulovú podskupinu tohto ochorenia.

Metódy: Parafínové tkanivové rezy z 1 001 konzekutívnych biopsií NSCLC (apríl 2012 – máj 2015) boli analyzované prostredníctvom alelovo-špecifickej PCR (systém Cobas 4800) primárne za účelom zistenia prítomnosti mutácií v géne *EGFR*. Vzorky zahŕňali 830 prípadov AC, 97 prípadov SP, 47 prípadov bolo zaradených do kategórie NSCLC, NOS, 4 prípady predstavovali zmiešanú formu NSCLC a 12 iný typ karcinómu. V 11 vzorkách už nebolo prítomné dostatočné množstvo nádorových buniek na stanovenie histologického typu a identifikáciu stavu *EGFR* génu.

Výsledky: V 85 % vyšetovaných prípadoch (839/990) nebola detegovaná žiadna mutácia v géne *EGFR*. V 12 % vyšetovaných prípadoch (119/990) sme identifikovali prítomnosť mutácií v géne *EGFR*. V 3 % vyšetovaných prípadov nebolo možné zhodnotiť stav *EGFR* génu vplyvom nedostatočnej koncentrácie alebo výraznej alterácie vyzolovanej DNA.

Záver: Vyšetrenie mutačného stavu *EGFR* génu v bioptických vzorkách pacientov s NSCLC má veľký význam najmä z terapeutického hľadiska. V závislosti od terapeutického algoritmu umožňuje takáto genetická analýza poskytnúť pacientom s NSCLC alternatívu ku konvenčnej liečbe v podobe cieľenej terapie. Z tohto pohľadu, ale aj z hľadiska kvantitatívneho množstva odoberaných bioptických vzoriek a faktu, že veľká časť pacientov s NSCLC je v čase diagnózy iresekovateľná, je nevyhnutné nastoliť taký algoritmus vyšetřovania molekulových podtypov NSCLC, ktorý by umožnil spoľahlivý a rýchlo dostupný výsledok.

Táto štúdia bola podporená grantovým projektom MZSR 2012/24-UKMA-1 „Detekcia prediktívne relevantných parametrov v diagnostickom algoritme bioptického vyšetřenia karcinómu hrubého čreva a pľúc“ a projektom financovaným zo štruktúrálnej fondov EÚ „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin)“, ITMS kód 262202201787.

Analýza bioptických vzoriek nemalobunkového karcinómu pľúc so zameraním na nové kurabilné mutácie v géne EGFR

Scheerová K.¹, Farkašová A.^{1,2}, Huťka Z.^{1,2}, Plank L.^{1,2}

¹Martinské bioptické centrum, s. r. o., Martin

²Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

Úvod: Nemalobunkový karcinóm pľúc (NSCLC) predstavuje približne 80 % až 85 % všetkých prípadov pľúcnych karcinómov. Jeden z jeho hlavných podtypov, adenokarcinóm (AC), je charakteristický rôznymi genetickými zme-

nami nádorových buniek, ktorých identifikácia je nevyhnutná vo vzťahu k indikácii príslušnej cieľenej terapie. Jednou z takýchto genetických zmien je výskyt mutácií v géne *EGFR*, ktoré môžu mať odlišný vplyv na efekt podávanej terapie. Použitie cieľenej terapie umožňuje dramatické zlepšenie odpovede a klinický prínos bez nutnosti počiatočnej liečby cytotoxickými chemoterapeutikami. No napriek nedávnomu pokroku v liečbe tohto ochorenia predstavuje celkové 5-ročné prežívanie pacientov v USA len 15 %.

Metódy: Parafínové tkanivové rezy z 1 001 konzekutívnych biopsií NSCLC (apríl 2012 – máj 2015) boli analyzované prostredníctvom alelovo-špecifickej PCR (systém Cobas 4800) primárne za účelom zistenia prítomnosti mutácií v géne *EGFR*. Táto metóda umožňuje identifikáciu 41 aj zriedkavých, mutácií v exónoch 18, 19, 20 a 21 génu *EGFR*.

Výsledky: V 12 % vyšetřovaných prípadoch (119/990) sme identifikovali prítomnosť mutácií v géne *EGFR*. 92 % (110/119) prípadov pozitívnych na prítomnosť mutácie v géne *EGFR* predstavovali prípady s tzv. aktivačnými mutáciami. Z toho väčšinu, 63,6 % (70/110) tvorili prípady s identifikovanou deléciou v exóne 19. 34,5 % (38/110) tvorili prípady s bodovou mutáciou v exóne 21 (L858R) a 1,8 % (2/110) tvorili prípady s bodovou mutáciou v exóne 18 (G719X). Len v 4 % (5/119) vyšetřovaných prípadov sme detegovali samostatnú, tzv. rezistentnú mutáciu v géne *EGFR* (exon 20 ins). V 3 % (4/119) prípadov sme identifikovali prítomnosť viacerých mutácií súčasne. Konkrétne v troch prípadoch prítomnosť aktivujúcej (exón 18 – G719X) aj rezistentnej mutácie (exón 20 – S768I). V jednom prípade sme detegovali ako deléciu exónu 19, tak aj bodovú mutáciu v exóne 20 (T790M).

Záver: V poslednom období pribúdajú stále nové poznatky o viacerých typoch mutácií génu *EGFR* v súvislosti s terapeutickým efektom u pacientov s NSCLC. Rozdiely v odpovedi na terapiu sú badateľné aj v rámci skupiny tzv. aktivujúcich mutácií. Niektoré mutácie, ktoré boli donedávna označované ako rezistentné, v období tyrozínkinázových inhibítorov 2. generácie získavajú kurabilný status. Z tohto pohľadu je identifikácia špecifických mutácií génu *EGFR* esenciálna na nastavenie adekvátnej terapie u pacientov s NSCLC.

Táto štúdia bola podporená grantovým projektom MZSR 2012/24-UKMA-1 „Detekcia prediktívne relevantných parametrov v diagnostickom algoritme bioptického vyšetrenia karcinómu hrubého čreva a pľúc“ a projektom financovaným zo štrukturálnych fondov EÚ „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin)“, ITMS kód 262202201787.

Genotypizácia klinicky významných *EGFR* mutácií z bronchiálnych sterov v materiáli Histopatologie, a. s.

Baluchová K.¹, Hlavčák P.¹, Majer I.²

¹Histopatológia, Inc., Bratislava

²Klinika pneumológie a ftizeológie II. LF UK a UNB, Bratislava

Plúcne karcinómy (LC) sú histologicky a molekulárne heterogénne ochorenia, ktoré na Slovensku dominujú v počte novodiagnostikovaných onkologických ochorení a vedú v počte asociovaných úmrtí. Diagnostika LC v poslednej dekáde pokročila najmä v molekulárnej typizácii nádorovej proliferácie a následnej cieľenej molekulárnej terapie (CMT) tyrozínkinázovými inhibítormi (TKI). TKI-terapia je však účinná len pre úzku LC podskupinu prevažne adenokarcinómov

a najmä s aktivačnými mutáciami v intracelulárnej doméne receptora pre epidermálny rastový faktor (*EGFR*).

Selekcia pacientov vhodných na CMT štandardne prebieha z operačných resektátov suspektného tkaniva, čo predstavuje invazívny odber vhodný len pre limitovanú skupinu pacientov. Pre ostatných pacientov preto opisujeme vyšetrenie z bronchiálnych sterov, ktorých menej invazívny ambulantný odber umožňuje rozšíriť realizáciu molekulárnych vyšetrení indikujúcich CMT. Vo vyšetřovanom súbore sme identifikovali 32 adenokarcinómov, 40 skvamocelulárnych karcinómov, 12 veľkobunkových karcinómov a 2 bližšie neurčené karcinómy. Po kontrole celularity, zastúpenia nádorových buniek a parametrov izolovanej genomickej DNA (gDNA) sme pomocou kvantitatívnej PCR vyšetřili na klinicky významné somatické *EGFR* mutácie 86 pacientov, z ktorých sme 12 (13,95 %) odporučili na *EGFR*-TKI terapiu. Najčastejšou *EGFR* HIT-a (hybné intervenčnou terapiou kontrolovateľné aberácie) v somatizóme, pojmy, ktoré zavádzame a definujeme v tejto štúdiu, boli delečné mutácie v exóne 19, pričom sa u jedného pacienta vyskytla v kombinácii s TKI rezistentnou p.T790M mutáciou v exóne 20. Optimalizácia vstupných parametrov cytologických odberov a izolovanej gDNA umožnila 100 % úspešnosť *EGFR* analýz.

V štúdiu opisujeme metodiku vyšetřenia mutačného statusu *EGFR* z bronchiálnych sterov, ktorá je menej invazívna, spoľahlivá a spĺňa všetky kritériá rutínnej molekulárnej diagnostiky. Multidisciplinárny prístup *EGFR* genotypizácie klinicky relevantných somatických mutácií z bronchiálnych sterov umožňuje rozšírenie spektra slovenských pacientov s LC na CMT.

Nové metódy v molekulovej patológii

SureFISH and fast IQFISH technology – new perspectives in molecular diagnostics

Mrozowski A., Jimmy J.

DAKO, An Agilent Technologies

Company

Cancer cells contain chromosomal rearrangements that result in oncogene activation. Identification of genes' structure alteration is crucial in establishing proper diagnosis.

Agilent has developed a new generation of fluorescently labeled in situ hybridization (SureFISH) probes for the detection of these rearrangements. SureFISH probes are comprised of thousands of unique long oligonucleotides that are tiled across the targeted chromosomal specific regions. The oligonucleotides are synthesized using Agilent's Oligonucleotide Library Synthesis (OLS) technology. SureFISH probes are designed to detect the translocated sequences using both break-apart and dual fusion strategies. Custom designs can be generated that target almost any genomic region, allowing for the production of probes that are not possible using other methods.

Another breakthrough invention is IQFISH Fast Hybridization Buffer that facilitates the fastest FISH testing on the market. Using SureFISH probes in combination with IQFISH Fast Hybridization Buffer allow the completion of FISH procedure in less than 4 working hours.

Wide SureFISH portfolio of probes, possibility of custom design and fast IQFISH testing opens new perspectives in molecular diagnostics.

New pathways in Digital Pathology – Contextual Image Analysis

Kolmer D.

TissueGnostics, Viedeň – zastúpené

BIOTECH, s. r. o., Bratislava

Quantitative image analysis is a tool that has proven itself in biomedical research, but still has to make a larger contribution in diagnostics. There are multiple reasons for this, one of them being handling the complex and large amounts of data created.

TissueGnostics has introduced a method of handling this complexity by introducing the first Tissue Cytometry Systems some ten years ago.

With immune scoring and related methods looking like a promising prognostic method in oncology, TissueGnostics has developed two new paradigms and integrated them into its analysis software: Contextual Image Analysis and Tissue Sociology.

Simultánní IHC barvení více protilátkami – unikátní Multiplex technologie

Vytopilová S.

BioTech, Praha

Biocare Medical je osvědčeným lídrem v poskytování Multiplex detekce, které umožňují souběžné IHC barvení více protilátek na jediném sklíčku.

Inovativní micro-polymer technologie užívající AP (alkalická fosfatáza) a HRP (křenovou peroxidázou) je určena pro rychlé multiplex barvení. Mikro-polymer umožňuje značné zvýšení citlivosti při barvení a je optimalizován pro lidskou tkáň.

Multiplex IHC zjednodušuje interpretaci a zvyšuje produktivitu laboratoře, zatímco dramaticky snižuje náklady na činidla i na práci.

NGS diagnostika somatických mutací

Kubíková I.

GeneTiCA, s. r. o.

Do diagnostiky somatických mutací se kromě zavedených technologií, jako je hybridizace nebo RT-PCR, začínají prosazovat nové technologie. Kromě digitální PCR je to pak zejména NGS, která umožňuje hluboké sekvenování vybraných úseků genů či celých genů. Dostupná NGS řešení umožňují provádět rutinní diagnostiku a v případě využití rozšířených panelů i studie zaměřené na nové potenciální cíle.

Illumina řešení nabízí panel Trusight Tumor, který cílí na vybrané mutace u 26 genů. Panel je založen na sekvenování ampliconů přičemž primery jdou navrženy tak, že sekvenujeme každé vlákno specifickou sadou primerů.

Multiplicom nabízí panely pro diagnostiku somatických mutací jak z biopsií, tak i z parafinových řezů. Panel SOMATIC1 zahrnuje geny *KRAS*, *NRAS* a *BRAF*. Jedná se o triplex, ale panel lze rozdělit a pak diagnostikovat zvláště plex 1 (*KRAS*, *NRAS* a *E15 BRAF*) a plexy 2 a 3 (*BRAF*). Pro nemalobuněčné karcinomy plic je pak určen kit EGFR (exony 18 – 21). Panel GIST pro diagnostiku gastrointestinálního tumoru pak cílí na geny *cKit* a *PDGFR- α* . Celé řešení je založeno na dvou PCR reakcích. Výhodou je možnost panely kombinovat a sekvenovat vše v jednom běhu.

U diagnostiky somatických mutací je důležitá citlivost metody. U technologie NGS dosahujeme požadované citlivosti pomocí vysokého počtu čtení. Kapacita sekvenátoru MiSeq nám v kombinaci s volbou vhodného sekvenačního čipu umožní dosáhnout ekonomicky rozumné ceny v závislosti na počtu vzorků a počtu a velikosti sekvenovaných genů.

Využití neinvazivní metody Tekutej Biopsie v nadváznosti na NGS analýzu a analýzu pomocí digitální PCR

Jankowski S.

Thermo Fisher Scientific, GSD, Paříž, Francúzsko

Spracovanie a analýza vzoriek s využitím neinvazivných metód, ako napríklad Liquid Biopsy, ponúka viacero pozitívnych vplyvov nielen na pacientov, a keďže sa v praxi stretávame s množstvom vzoriek v podobe krvi, je pre výskum, rovnako ako pre klinickú prax, dôležité využívať pracovné postupy, ktoré umožňujú s týmito vzorkami narábať efektívne a spracovať ich bez zbytočnej časovej náročnosti. Jedným zo spôsobov je spojenie platforiem pre Liquid Biopsy, ktoré takéto vzorky spracovávajú a pripravujú na analýzu so systémami NGS detekcie a systémami pre digitálnu PCR. Či už ide o detekciu zameranú na cirkulujúce tumorové bunky, alebo cfDNA, tak uplatnenie týchto metódik má pred sebou ešte veľkú budúcnosť.

Využití analýzy obrazu v patologii – praktické aplikace

Überall I.¹, Balik V.², Minařík J.³, Flodr P.¹, Kolář Z.¹

¹Ústav klinické a molekulární patologie, LF UP, Olomouc

²Neurochirurgická klinika, FN Olomouc, Olomouc

³Hematoonkologická klinika, FN Olomouc, Olomouc

Tématem příspěvku bude stručný úvod do problematiky analýzy obrazu jako kvantifikační metody. Budou popsány výhody a nevýhody

analýzy obrazu a bude upozorněno na metodické limity při jejím použití. Rovněž bude komentována možnost kombinace počítačové analýzy obrazu a virtuální mikroskopie. Nastíněna bude problematika měření fraktální dimenze jako možného diagnostického nástroje. V praktické části přednášky budou akcentovány příklady klinického využití analýzy obrazu a praktické aplikace

na Ústavu klinické a molekulární patologie, a to jak na ústavu samotném (IHC obrazová analýza), tak při spolupráci s klinikami Fakultní nemocnice v Olomouci (měření tloušťky žilních splavů *dura mater* (Neurochirurgická klinika) a měření histomorfologických parametrů kostní hmoty u mnohočetného myelomu (Hematoonkologická a III. interní klinika).

Molekulová patológia nádorových ochorení IV.

Karcinogenéza sporadických kolorektálnych karcinómov z pohľadu histomorfológie a molekulovej biológie

Kalman M., Plank L.

Ústav anatomickej patológie JLF UK a UNM, Martin

Konzultačné centrum bioptickej diagnostiky ochorení krvotvorby JLF UK a UNM, Martin

Kolorektálny karcinóm je jedným z najčastejších zhubných epitelových nádorov a jednou z najčastejších príčin úmrtia na malignitu vo svete. Na základe poznatkov z histomorfológie a molekulárnej genetiky dnes poznáme niekoľko spôsobov, akými vzniká KRK, a môžeme ich podľa toho rozdeliť na skupinu sporadických, hereditárnych a IBD asociovaných. Najväčšiu skupinu tvoria sporadické KRK, pri ktorých rozoznávame dve hlavné cesty karcinogenézy. Približne 70 % sporadických KRK vzniká z konvenčných adenómov a sú asociované prevažne s mutáciou *APC*, *KRAS* a *p53* génov, ako aj s vyššou frekvenciou chromozómovej nestability. Na druhej strane je tu minoritná, no o to heterogénnejšia skupina sporadických KRK vznikajúca z prekursorových lézií označovaných ako serátne adenómy, ktorá je na molekulovo-genetickej úrovni asociovaná s metyláciou CpG ostrovčekov, mutáciou *BRAF* alebo *KRAS* génu a častou mikrosatelitovou nestabilitou. Výskum v tejto oblasti prináša nové poznatky o biológii tumoru a otvára nové možnosti vo vzťahu k prognóze a terapii.

Podporené grantovým projektom MZSR 2012/24-UKMA-1 „Detekcia prediktívne relevantných parametrov v diagnostickom algoritme bioptického vyšetrenia karcinómu hrubého čreva a pľúc“ a projektom financovaným zo štrukturálnych fondov EÚ „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin)“, ITMS kód 262202201787.

Expression but not genetic variations of the MTDH gene is correlated to clinical outcome of colorectal cancer patients

Ticha I.^{1,2}, Gnosa S.¹, Xiao-Feng S.¹

¹Division of Oncology, Department of Clinical and Experimental Medicine, Faculty of Health Sciences, County Council of Östergötland, University of Linköping, Linköping, Sweden

²Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Objective: Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer in men and the second in women worldwide. The therapy of CRC has been critically improved during the past two decades, but the treatment response varies significantly between different treatments and patients. Therefore it is necessary to search for biomarkers related to more suitable prognosis and treatment. Metadherin (*MTDH*; MIM#610323), also called Astrocyte elevated gene 1 (*AEG-1*), is located at chromosome 8q22 and involved

in carcinogenesis. Amplification of loci 8q22 has been shown in CRC and other malignancies. MTDH protein is markedly overexpressed in many types of cancers. The *MTDH* polymorphisms have been related to breast or ovarian cancer susceptibility. The aim of this study was to analyze *MTDH* genetic alterations and expression and relationship to clinicopathological variables in CRC.

Methods: We analysed variants and expression of *MTDH* by direct sequencing, qPCR, and/or immunohistochemistry in 593 CRC tumors (including 158 rectal cancer patients from the Swedish clinical trial of preoperative radiotherapy (preRT)).

Results: We described 29 novel exonic/intronic variants in the *MTDH* gene. 4/8 exonic variants were assessed pathogenic (*in silico*). *MTDH* mRNA and protein was up-regulated in primary tumors and metastases compared with normal mucosa ($p < 0,006$). In rectal cancer patients from the Swedish trial of preRT, high *MTDH* expression correspond with higher risk of distant recurrence and disease-free survival ($p = 0,009$, $p = 0,007$ respectively) only in patients receiving preoperative RT, independently of the tumor stage.

Conclusion: Expression of *MTDH* is an independent prognostic factor for distant recurrence and disease-free survival in rectal cancer patients after treatment with preoperative RT. We did not find prognostic or predictive value of the *MTDH* genetic variants in CRC.

The study was supported by grants from the Swedish Cancer Foundation, Swedish Research Council, the Health Research Council in South-East Sweden, and the LiU cancer network.

Naše skúsenosti s detekciou mutácií génu *RAS* v DNA izolovanej z parafinových rezov biopticky vyšetřovaného tkaniva pacientov s kolorektálnym karcinómom

Tilandyová P.¹, Kalman M.^{1,2}, Minárik G.³, Lasabová Z.⁴, Plank L.^{1,2}

¹Martinské bioptické centrum, s. r. o., Martin

²Ústav patologickej anatómie JLF a UNM, Martin

³Katedra molekulevej biológie PriF UK, Bratislava

⁴Ústav molekulevej biológie JLF, Martin

Úvod: Kolorektálny karcinóm často a rýchlo metastázuje (mCRC) a patrí medzi najčastejšie zhubné nádorové ochorenia v našej populácii. V manažmente pacientov sa využívajú nové modality tzv. cieľenej liečby – blokády EGFR receptora anti-EGFR monoklonovými protilátkami. Ich indikovanie si sprvu vyžadovalo „len“ imunohistochemický dôkaz expresie EGFR proteínu v biopticky vyšetřovanom tkanive CRC, neskôr sa ukázal významnejší stav génov rodiny *RAS*, a to *KRAS* a recentne aj *NRAS*. Stanovenie ich mutačného stavu má prediktívny význam, lebo prípady s mutovaným stavom sú rezistentné na liečbu EGFR inhibítormi. Celkovo približne 40 % pacientov s mCRC nesie mutácie v exóne 2 a 3 génu *KRAS* v kodónoch 12, 13 a 61, ktoré boli doteraz testované rutinne aj na našom pracovisku. Ďalších 10 – 15 % pacientov môže mať iné novo testované mutácie, a to génu *KRAS* v exóne 4 v kodónoch 117 a 146, alebo génu *NRAS* v exónoch 2 – 4 v kodónoch 12, 13, 59, 61, 117 a 146.

Metódy: Na základe požiadaviek onkologickej praxe sme doplnili existujúce doterajšie

možnosti detekcie mutácie génu *KRAS* v DNA izolovanej z parafínových rezov biopticky vyšetrotovaného tkaniva o analýzu mutácií v exóne 4 génu *KRAS* a o vo všetkých troch exónoch génu *NRAS*. Po testovaní rôznych analytických modalít a validácií nových analýz sme do rutinej praxe zaviedli uvedené doplnenie testov pomocou analyzátoru Cobas® Z 480, ktorý uskutočňuje detekciu mutácie analýzou krivky topenia T_m pomocou hybridizačných sond. V práci predkladáme výsledky diskutovaných analýz DNA získanej pod kontrolou patológa z biopsií mCRC testovaných v období 11/2008 – 04/2015.

Výsledky: Od novembra 2008 sme stanovili mutačný status v géne *KRAS* a od konca roku 2013 mutačný status v géne *NRAS* v súbore 3 234 pacientov, pričom pacienti bez mutácie predstavujú 54 % z celkového počtu pacientov, pacienti s mutáciou 46 %. V sérii 503 prípadov mCRC, v ktorých sme v priebehu obdobia 11/2013 – 04/2015 v súlade s doteraz existujúcimi normami testovania stavu *KRAS* zistili stav tzv. *KRAS* exón 2 a 3 „wild-type“, sme dodatočnou analýzou zmien ostávajúcích exónov *KRAS* a *NRAS* zistili: a) mutáciu génu *KRAS* v kodóne 117 exónu 4 u 6 pacientov (1,2 % prípadov súboru), b) mutáciu *KRAS* v kodóne 146 exónu 4 u 24 pacientov (4,8 %), c) mutáciu génu *NRAS* v kodóne 12/13 exónu 2 u 24 pacientov (4,8 %), d) mutáciu génu *NRAS* v kodóne 61 exónu 3 u 15 pacientov (3 %), zatiaľ čo e) v žiadnom prípade sme nezistili mutáciu v kodónoch 117 a 146 exónu 4 génu *NRAS*.

Záver: Zaviedli sme metódu komplexného testovania somatických mutácií génov *RAS* dostupnú každému pacientovi s mCRC, ktorého bioptický materiál spĺňa akceptované štandardy

testovania. Frekvencia výskytu zistených mutácií v exónoch 4 génu *KRAS* a v exónoch 2 a 3 génu *NRAS* v našom súbore je porovnateľná s výskytom mutácií udávanom v iných podobných prehľadných analýzach. Výsledky nami implementovaných testov sa stali dôležitým prediktorom cieľenej liečby pacientov s mCRC pomocou anti-EGFR monoklonových protilátok.

Táto štúdia bola podporená projektom MZ SR 2012/24-UKMA-1.

A single-centre experience with broader predictive testing for anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer patients

Hajkova N., Ticha I., Dundr P.

Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

Objective: Since late 2013 the evidence of wild type *KRAS* and *NRAS* in exons 2 – 4 have been required before initiating anti-EGFR treatment (cetuximab and panitumumab) in Czech metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. The aim of this report is to show the importance of inclusion of exon 4 of *KRAS* and *NRAS* exons 2 – 4 into predictive testing compare with previous testing only in *KRAS* exons 2 – 3.

Methods: DNA from 231 formalin-fixed paraffin-embedded tissue, collected between January 2014 – March 2015, was isolated using QIAamp DNA Mini Kit or cobas DNA Sample Preparation Kit. Samples with $\geq 10\%$ of tumour cells were examined. Macro-/micro-dissection was applied when needed. Techniques based on real-time PCR and melting analysis (Diacarta;

LightMix; Cobas) or multiplex PCR followed by hybridization (Strip Assay, Vienna Lab) were applied.

Results: *KRAS* mutations in exons 2 and 3 were in 35,1 % (81/231) patients. Broader testing identified additional 25,3 % (38/150) *RAS* mutations: 10,7 % (16/150) in *KRAS* exon 4, 8,7 % (13/150) and 6 % (9/150) in *NRAS* exon 2 and 3, respectively.

Conclusion: Extension of *RAS* testing revealed another 16,5 % (38/231) of mCRC carriers of *RAS* mutation who are unlikely to benefit from anti-EGFR treatment. Inclusion of other genetic factors related to prognosis and/or prediction is necessary to improve targeted therapy.

This work was supported by Charles University in Prague, project PRVOUK-P27/LF1/1.

Genetická diagnostika pri nádoroch kolorekta na OLG OÚSA

Závodná K.¹, Markus J.¹, Bartošová Z.¹, Kajo K.², Konečný M.¹

¹Oddelenie lekárskej genetiky, Ústav laboratórnej medicíny, OÚSA, Bratislava
²Ústav patológie SZU a OÚSA, Bratislava

Vznik a vývoj kolorektálneho karcinómu súvisí s akumuláciou viacerých genetických zmien. Tieto zmeny, respektíve mutácie môžu ovplyvňovať biologické vlastnosti tumoru (napríklad rýchlosť rastu, schopnosť tvoriť metastázy, odpoveď na liečbu). Vzhľadom na tento fakt sa mutačný stav génov postupne začína využívať v klinickej praxi ako prognostický a prediktívny marker.

Na OLG OÚSA sa vyšetrujú mutácie v génoch *RAS* (*KRAS/NRAS*), ktoré predstavujú štandardný prediktívny marker pri liečbe kolorektálneho karcinómu inhibítormi EGFR bunkového receptora.

Paralelne vyšetrujeme mutáciu p.V600E v géne *BRAF* s možnosťou využitia ako doplnkového prognostického a/alebo prediktívneho markera.

Ďalšou možnosťou genetickej diagnostiky pri nádoroch kolorekta je vyšetrenie mikrosatelitovej instability (MSI). MSI predstavuje pozitívny prognostický a negatívny prediktívny marker pre efekt 5-FU terapie u pacientov s kolorektálnym nádorom v štádiu II.

Vyšetrenie MSI a imunohistochemická analýza (IHC) MMR proteínov predstavuje aj vysokosenzitívny skrínigový test na hereditárny nepolypózny karcinóm kolorekta (Lynchov syndróm, HNPCC, LS) asociovaný s defektom v MMR reparačnom systéme DNA. Vyše 90 % HNPCC nádorov vykazuje MSI pozitivitu v porovnaní s 15 % sporadických kolorektálnych nádorov. Vhodným markerom na odlišenie sporadického MSI nádoru od HNPCC asociovaného nádoru je vyšetrenie mutácie p.V600E v géne *BRAF*. U pacientov s MSI pozitívnym nálezom navrhujeme realizovať genetickú konzultáciu zameranú na posúdenie osobnej a rodinnej anamnézy. Cieľom následného vyšetrenia je identifikovať kauzálnu mutáciu v *MMR* génoch vedúcu k vrodenej predispozícii na karcinóm kolorekta, prípadne iné typy nádorov (najmä endometria).

Na našom pracovisku vyšetrujeme zárodočné mutácie v *MMR* génoch *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* u pacientov, ktorí spĺňajú medzinárodné indikačné kritériá na uvedenie testovania. V prípade, ak sa u pacienta identifikuje kauzálna mutácia, je možné vyšetriť asymptomatických jeho príbuzných. U jedincov s mutáciou je následne možné indikovať preventívne opatrenia vedúce k odhaleniu HNPCC-asociovej nádorovej choroby v počiatočnom štádiu.

Pacienti s kolorektálnym karcinómom majú takto k dispozícii komplexný balík genetických vyšetrení, ktorý klinikovi poskytnú komplexnú informáciu o nádorovom ochorení – od potenciálnej odpovede na liečbu až po prípadné dedičné pozadie ochorenia.

Metódy detekcie mikrosatelitnej instability a inaktivácie tumorsupresorových génov hypermetyláciou CpG ostrovov v DNA sekvencii

Kašubová I.^{1,2}

¹Ústav molekulevej biológie JLF, Martin

²Ústav patologickej anatómie JLF a UNM, Martin

Mikrosatelitná instabilita je zmena dĺžky mikrosatelitov spôsobená inzerciou alebo deléciou repetitívnych sekvencií v nádorovom tkanive, ktoré porovnávame s dĺžkou sekvencií mikrosatelitov v zdravom tkanive toho istého jedinca.

Detekcia mikrosatelitnej instability je založená na PCR analýze a následnej fragmentovej analýze. Cieľom je zachytenie zmien v sledovaných markeroch, ktoré indikujú nestabilitu genómu. Pre detekciu mikrosatelitnej instability sa používa niekoľko markerových panelov. Po PCR reakcii realizovanej použitím komerčných kitov je produkt analyzovaný fragmentovou analýzou, založenou na kapilárnej elektroforéze a detekcii fluorescenčne značených fragmentov laserom. Výsledkom fragmentácie je digitalizácia signálu a následné vyhodnotenie fragmentácie pomocou softwaru GenMapper.

Pre stratifikáciu pacientov s kolorektálnym karcinómom a vysokým stupňom mikrosatelitnej instability je zároveň potrebné sledovať metyláciu v promótorovej oblasti mismatch repair

génov, najmä v géne *MLH1*. Prípadnú inaktiváciu tohto génu je možné detegovať metylačne špecifickou PCR a následným vyhodnotením výsledkov v agarózovej elektroforéze.

Aplikáciou uvedených metód molekulevej biológie pre klinickú diagnostiku je možné prispieť k stratifikácii pacientov s Lynchovým syndrómom a sporadickým karcinómom.

Táto štúdia bola podporená grantovým projektom MZSR 2012/24-UKMA-1 „Detekcia prediktívne relevantných parametrov v diagnostickom algoritme biooptického vyšetrenia karcinómu hrubého čreva a pľúc“ a projektom financovaným zo štruktúrálnej fondov EÚ „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin)“, ITMS kód 262202201787.

Identifikácia pacienta s Lynchovým syndrómom bez zaznamenatej rodinnej anamnézy pomocou metódy MSI, MSP pre *MLH1* a *BRAF* mutácie a NGS analýzy

Kašubová I.¹, Holubeková V.¹, Kalman M.², Gemzová K.^{1,2}, Kršiaková J.³, Plank L.², Lasabová Z.^{1,4}

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta

a Univerzitná nemocnica v Martine

¹Ústav molekulevej biológie JLF UK, Martin

²Ústav patologickej anatómie JLF UK a UNM, Martin

³Oddelenie lekárskej genetiky UNM, Martin

⁴Martinské centrum pre biomedicínu BioMed Martin, divízia Onkológia, Martin

Úvod: Lynchov syndróm je jedným z najčastejších hereditárnych nádorových syndrémov

spôsobený germinálnymi mutáciami v génoch systému MMR (mismatch repair) – *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. Jedným z diagnostických kritérií je detekcia mikrosatelitnej instability (MSI) v nádorovom tkanive pacientov so zaznamenanou rodinnou anamnézou. Následne je indikovaná sekvenácia uvedených génov. MSI je definovaná ako rozdiel vo veľkosti špecifických STR (short tandem repeats) sekvencií v nádorovom tkanive v porovnaní s ich veľkosťou v nenádorovom tkanive u tej istej osoby. Okrem germinálnych mutácií môže byť príčinou MSI aj somatická hypermetylácia CpG ostrovčiek v oblasti promótoru *MLH1* a iných génov a vyskytuje sa v sporadických kolorektálnych karcinómoch (KRK). V sporadických KRK s MSI je pozorovaný aj častý výskyt mutácie V600E génu *BRAF*. Stanovenie MSI v tkanivách pacientov s KRK spolu s identifikáciou proteínovej expresie pomocou imunohistochemie (IHC), hypermetylácie *MLH1* a mutácie V600E *BRAF* predstavujú nový nástroj na stratifikáciu pacientov so sporadickým a dedičným KRK.

Materiál a metodika: Zatiaľ sme analyzovali vzorky DNA od 100 pacientov operovaných v UNM s KRK diagnostikovaným na základe predchádzajúcich histopatologických vyšetrení. DNA sme izolovali z parafínových rezov a MSI analýza bola uskutočnená pomocou MSI Analysis System, Version 1 (Promega USA) s piatimi mononukleotidovými STR markermi v automatickom genetickom analyzátoe AB3500 podľa protokolu výrobcu. Ako MSI-H boli vyhodnotené vzorky s viac ako jedným nestabilným markerom, MSI-L predstavujú vzorky s jedným nestabilným markerom a MSS sú vzorky bez nestabilného markera. *BRAF* mutácie V600E sme analyzovali pomocou alelovo-špecifickej PCR a verifikovali sekvenáciou

podľa Sangera pomocou BDT v1.1 (Thermo Fisher, USA). Na detekciu metylácie *MLH1* sme využili nested metylačne-špecifickú PCR v promótorovej oblasti génu. Na NGS analýzu sme využili TrueSight Cancer Panel (Illumina, USA), knižnicu sme pripravili podľa návodu výrobcu a NGS analýzu sme previedli na zariadení MiSeq. Bioinformatické vyhodnotenie bolo spracované pomocou Variant Studio software za spolupráce so spoločnosťou Genetica.

Výsledky: Zo 100 vzoriek KRK sme zistili 17 s MSI-H, z ktorých 10 bez V600E mutácie v géne *BRAF*. Jeden pacient bol na základe týchto výsledkov (vrátane IHC) odporúčaný na genetickú konzultáciu. Z DNA izolovanej z krvi tohto pacienta bola v pomocou NGS analýzy zistená mutácia posunová mutácie, delécia 4 nukleotidov, ktorá dosiaľ nebola opísaná – c. 1627_1630del AAAG, p. (Glu544Lysfs*) v exóne 4 génu *MSH6*. Keďže pacient podstúpil aj molekulovú diagnostiku cez zazmluvneného poskytovateľa, bola táto mutácia potvrdená aj Sangerovou sekvenáciou a bola vylúčená aj delécia pomocou metódy MLPA.

Záver: Stanovenie MSI, analýza prítomnosti *BRAF* mutácie a *MLH1* metylácie spolu s imunohistochemickým vyšetrením MMR proteínov a v tkanivách pacientov s KRK nám dávajú nové možnosti skríningu pacientov s dedičným a sporadickým KRK.

Táto štúdia bola podporená grantovým projektom MZSR 2012/24-UKMA-1 „Detekcia prediktívne relevantných parametrov v diagnostickom algoritme bioptického vyšetrenia karcinómu hrubého čreva a pľúc“ a projektom financovaným zo štruktúrálnej fondov EÚ „Martinské centrum pre biomedicínu (BioMed Martin)“, ITMS kód 262202201787.

Postery

Vplyv apoptotických inhibítorov na bunky multiformného glioblastómu *in vitro*

Blahovcová E., Račay P., Murín R.,

Dobrota D., Hatok J.

Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Martin

Úvod: Multiformný glioblastóm je biologicky najagresívnejším a najčastejším sa vyskytujúcim druhom mozgového nádoru u dospelých. Klinickým štandardom v liečbe glioblastómu je operatívne odstránenie nádoru, rádioterapia a chemoterapia, pričom prognóza pre pacientov je horšia v porovnaní s inými typmi nádorov mozgu. Apoptotické inhibítory pôsobia selektívne ABT-737 (Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xl), BH3l (Bcl-xl), MIM-1 (Mcl-1) a predstavujú potenciálne nové možnosti v terapii nádorových ochorení.

Ciel: V našej práci sme študovali prežívanie ľudskej glioblastómovej bunkovej línie (T98G) po ovplyvnení selektívnymi apoptotickými inhibítormi (ABT-737, BH3l, MIM-1) *in vitro* a sledovali kvantitatívne zmeny v hladinách expície apoptotických génov pri bunkách multiformného glioblastómu po pôsobení apoptotických inhibítorov.

Materiál a metódy: Prežívanie glioblastómovej bunkovej línie T98G sme hodnotili pomocou cytotoxického metyl-tiazol tetrazoliového (MTT) testu. Zmenu v hladinách expície génov asociovaných s apoptózou (n = 93) sme kvantifikovali použitím TaqMan® Human Apoptosis Array medzi skupinami ovplyvnenými apoptotickými inhibítormi (individuálne) a kontrolnou skupinou glioblastómových buniek kultivovaných za štandardných podmienok.

Výsledky: Prežívanie buniek multiformného glioblastómu *in vitro* poukazyvalo na relatívnu rezistenciu proti apoptotickým inhibítormom

BH3l a MIM-1 (individuálne), zatiaľ čo ABT-737 mal inhibičný efekt aj v nízkych koncentráciách. Identifikovali sme niekoľko potenciálne apoptotických génov, ktoré preukazovali viac ako 2,0-násobnú zmenu v hladinách expície pri glioblastómových bunkách po ovplyvnení apoptotickými inhibítormi v porovnaní s intaktnou kontrolou.

Záver: Apoptóza je komplexný mechanizmus, ktorý zahŕňa množstvo vzájomne poprepájaných a ovplyvňujúcich sa bunkových dráh. Monitorovanie citlivosti bunkových línií proti novým látkam s potenciálne pozitívnym účinkom umožňuje hľadať nové terapeutické postupy v liečbe nádorových ochorení. Určenie odlišne exprimovaných ľudských génov asociovaných s apoptózou môže prispieť k pochopeniu mechanizmu apoptózy v glioblastómových bunkách.

Podakovanie: Práca bola podporená grantom APVV-0224-12.

Hevylite reagents – imunohistochemická studie

Látalová P.¹, Pika T.², Flodr P.¹

¹Ústav klinické a molekulární patologie LF UP, Olomouc

²Hematoonkologická klinika FN, Olomouc

Úvod: Hevy/light chain reagents jsou primární protilátky, které se váží současně na těžký a lehký řetězec imunoglobulinu. Oproti standardnímu samostatnému imunohistochemickému stanovení lehkých nebo těžkých řetězců může tato metoda přinést zvýšení senzitivity při vyšetřování plazmocytoidní nádorové populace.

Materiál a metody: Pilotní studie zahrnovala sedm pacientů s histologickou diagnózou plazmocytární myelom (dva pacienti IgG lambda, jeden

IgG kappa a jeden IgA kappa) a lymfoplazmocytární lymfom (LPL; dva pacienti IgM kappa a jeden IgM lambda). Imunohistochemická analýza byla provedena na řezech z parafinových tkáňových bločků standardně odvápněných trepanobiopstických vzorků a u jednoho pacienta s LPL také na vzorku lymfatické uzliny. Panel imunohistochemického vyšetření zahrnoval primární protilátky anti-CD138, anti-kappa, anti-lambda, anti-CD79a, anti-IgM, anti-IgG, anti-IgA a duální protilátky proti těžkému/lehkému řetězci (IgGkappa, IgGlambda, IgMkappa, IgMlambda, IgA kappa). Kombinace duální protilátky proti těžkému/lehkému řetězci byla vybrána pro konkrétní vzorky podle dříve diagnostikovaného typu produkovaného lehkého řetězce.

Výsledky: CD138+ buňky byly ve vzorcích zastoupeny v rozmezí 30 – 90 %. V polovině případů jsme pozorovali pozitivitu všech tří duálních protilátek, ve zbývajících čtyřech vzorcích byly pozitivní dvě duální protilátky (IgMkappa nebo IgMlambda, IgGkappa nebo IgGlambda). Při vyšetření protilátkami proti samostatným těžkým řetězcům byly ve všech vzorcích detekovány nádorové buňky s pozitivitou IgG, IgA pozitivita se vyskytovala pouze u případu IgA myelomu a IgM pozitivní buňky byly zjištěny pouze u lymfoplazmocytárního lymfomu.

Diskuze a závěr: V pilotní studii o používání duálních heavy/light chain primárních protilátek jsme zjistili vysoké zastoupení falešně pozitivních výsledků. Vzorky od pacientů s IgG myelomem byly pozitivní také v reakci s duální protilátkou s těžkým řetězcem IgM a IgA, ačkoliv samostatné stanovení anti-IgM a anti-IgA bylo negativní. Současnou pozitivitu IgM/lehký řetězec a IgG/lehký řetězec u vyšetřených LPL nelze spolehlivě hodnotit, neboť v těchto neoplastických buňkách je

exprese obou těžkých řetězců popisovaná. Jeden trepanobiopstický vzorek s LPL však byl pozitivní také s anti-IgAlambda, přičemž vyšetření anti-IgA bylo negativní. Z našich výsledků vyplývá, že použití heavy/light chain protilátek u vzorků kostní dřevě je značně limitováno s předpokladem neduální „single“ vazby jedné součásti duální protilátky. Předpokládáme i možný vliv preanalytické fáze zpracování vzorků při procesu odvápnění trepanobiopstických tkání. Tyto hypotézy je nutno ověřit v pokračování studie.

Molecular mechanisms of brassinosteroid action and receptor interactions in human hormone-(in) dependent carcinoma cells

Steigerova J.^{1,2}, Rarova L.³, Oklestkova J.⁴, Levkova M.², Kolar Z.^{1,2}, Strnad M.^{3,4}

¹Laboratory of Molecular Pathology, Department of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University, Olomouc
²Institute of Molecular and Translation Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University and Faculty Hospital in Olomouc
³Centre of the Region Haná for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Growth Regulators, Faculty of Science, Palacký University, Olomouc

⁴Laboratory of Growth Regulators, Palacký University & Institute of Experimental Botany ASCR, Olomouc

The study of plant-derived compounds with effect at the molecular level has become an important approach in the selection of new agents with

antitumour activity in humans. Brassinosteroids (BRs) are plant growth regulators representing a group of newly-discovered agents with relatively wide-ranging effects in plants. Like steroid hormones in animals, structurally BRs consist of a cholesterol skeleton with various hydroxyl substitutions and functional groups required for biological activity. To date, over 70 BRs have been identified in 50 plant species and currently over 40 brassinosteroid metabolites and their conjugates are known. Natural BRs and their synthetic derivatives caused growth inhibition, cell cycle arrest and initiation of apoptosis in different human cancer cell lines. Based on the structural motifs of these agents, a possible explanation for their cytotoxic effects is that they may bind to steroid receptors. In hormone-sensitive cancer cells derived from breast and prostate carcinomas, BR treatment resulted in alterations of localization and expression of the steroid hormone receptors (ER- α , ER- β , AR). The comparison of the effects of natural BRs and their analogues on steroid receptors, and detailed characterization of their influence on hormone-sensitive and hormone-insensitive human carcinomas, could both provide extend fundamental knowledge of hormone-receptor interactions and have valuable medical applications.

This work was supported by grant LF_2015_008, LO1304 and LO1204.

The effect of fibrates on cell viability

Cizkova K.¹, Steigerova J.², Ehrmann J.^{1,2}

¹Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University, Olomouc

²Laboratory of Molecular Pathology &

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

Fibrates are clinically widely used drugs for treatment of dislipidemias. Moreover, there are a lot of studies describing their potential for cancer treatment and chemoprevention. That's why we studied effect of fenofibrate, bezafibrate and gemfibrozil on cell proliferation in three different human cell lines: one nontumorous cell line HEK293 (human embryonic kidney), and two carcinoma cell lines HepG2 (hepatocellular carcinoma), and HT-29 (human colorectal adenocarcinoma) by WST-1 cell proliferation assay. Our results show that at lower concentrations of all tested fibrates, viability of all tested cell lines is increased, whereas at higher concentrations, repression is apparent. Then we studied changes in expression of cell cycle regulatory proteins by immunocytochemistry. Our results shows increased number of cells expressing cyclin E and decreased number of cells expressing Cdc25A in all tested cell lines. Moreover, in HepG2 and HT-29 cell lines, cyclin A was elevated too. These effects are concentration-dependent. Cyclin E and cyclin A are regulators of late G1 and S phases of cell cycle. Both of these cyclins bind to cyclin-dependent kinase 2 (CDK2). For activation of these complexes, dephosphorylation by Cdc25A is required. Although it has been described that Cdc25A downregulation is enough for cell cycle arresting, we suppose that at maximum viability concentrations, Cdc25A downregulation is not sufficient for this effect. We suggest that fibrates could have beneficial effects only in treatment of certain types of tumours (as described in literature) however these effects are probably not general. Thus, their potential usage for cancer treatment should be considered carefully.

Analýza mikroRNA u pacientov s kolorektálnym karcinómom

Šarlinová M.¹, Halašová E.²

¹Ústav lekárskej biochémie JLF UK, Martin

²Ústav lekárskej biológie JLF UK, Martin

Úvod: Predpokladom úspešnej liečby nádorového ochorenia je v mnohých prípadoch jeho včasná diagnostika. Jednou z možností, ako nájsť nové spôsoby molekulárnej detekcie nádorového ochorenia, je využitie skupiny novoobjavených krátkych molekúl RNA – mikroRNA (miRNA), ktoré sú považované za novodobé biomarkery onkologických ochorení.

miRNA sú významné regulátory génovej expresie, ktoré kontrolujú fyziologické i patologické procesy v organizme. Tvoria skupinu nekódujúcich jednoreťazcových úsekov RNA, ktorých dĺžka sa pohybuje v rozmedzí 19 – 25 nukleotidov. Rôzne štúdie opisujú, že miRNA dokážu pôsobiť ako onkogény alebo nádorové supresory. Podieľajú sa na riadení proteosyntézy, sú schopné regulovať aktiváciu génov na posttranskripčnej úrovni a zúčastňujú sa na regulácii bunkového cyklu.

Metodika a materiál: V rámci štúdie bola analyzovaná expresia mikroRNA u 35 pacientov s diagnostikovaným kolorektálnym karcinómom a 30 kontrolných, zdanlivo zdravých jedincov. Zo vzoriek periférnej krvi bola vyizolovaná celková RNA a pomocou kvantitatívnej Real-Time PCR stanovená expresia 5 mikroRNA (*miR-143*, *miR-221*, *miR-21*, *let-7a*, *miR-155*). Na stanovenie vhodnej endogénnej kontroly a normalizáciu dát boli testované tri referenčné gény (*RNU6B*, *RNU44*, *RNU48*).

Výsledky: Na základe výsledkov softvéru GenEx sme na normalizáciu expresie študova-

ných mikroRNA použili ako vnútornú kontrolu referenčný gén *RNU48*. Hladiny miRNA sme tiež korelovali s vybranými klinicko-patologickými parametrami pacientov. Štatistické hodnotenie sme realizovali použitím Mann-Whitney a Kruskal-Wallis testu.

Záver: Stanovenie expresných profilov miRNA z krvi pacienta patrí medzi moderné spôsoby identifikácie biomarkerov na skorú diagnostiku nádorových ochorení a určenia prognózy či liečebnej odpovede pacientov.

Práca bola podporená grantom Ministerstva školstva SR APVV-0412-11.

Multiple myeloma and bone marrow microenvironment – immunohistochemical study

Flodr P.¹, Minarik J.², Pika T.², Bacovsky J.², Latalova P.¹, Pusciznova P.², Scudla V.²

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

² Department of Hemato-oncology, University Hospital, Olomouc, Czech Republic

Objective: Neoplastic milieu is an integral part of all malignant diseases including multiple myeloma and plays variable role in their development, retention/adhesivity, resistency or sensitivity to a therapeutic approach, homing and also paraneoplastic manifestations. Relatively genetical stabile milieu may play more important role in a new specific molecular therapeutic approaches and therefore should be contextually studied with neoplastic cells as complex neoplastic tissues. The expressions of

11 proteins were analysed in consecutive multiple myeloma specimens.

Methods: Bone marrow trephine biopsy specimens with multiple myeloma were included in our prospective study. FFPE tissues were processed in app. 5microm sections and placed on charged slides. The indirect immunohistochemical staining was applied after antigen retrieval and commercial primary antibodies were used for a detection of observed proteins. Standard secondary antibody and ABC method were included in visualisation. The expression of MIP1alfa, Annexin A2, TRAP, DKK-1, RANK, RANKL, OPG, Sclerotisin, Activin A, NFkappaB proteins (p50, p52, p65), p62 (sequestosome 1), and MMP9 was analysed.

Results: Bone marrow multiple myeloma specimens showed variable positivity of MIP1alfa in 61 % (cut-off point 20 %), Annexin A2 in 28 % (myeloma cells, cut-off point 30 %) and in 40 % (stromal cells, cut-off point 5 %), TRAP in 64 % (cut-off point 5 %), DKK-1 in 20 % (cut-off point 30 %), RANK in 44 % (cut-off point 30 %), RANKL in 66 %, OPG in 3,6 % (cut-off point 5 %), Sclerotisin in 100 % (cut-off point 90 %), Activin A in 36 % (cut-off point 30 %), cytoplasmic positivity of p50 in 24 %, p52 in 84 % (cut-off point 10 %), p62 in 100 % (cut-off point 10 %), p65 in 76 % (cut-off point 10 %) and positivity of MMP9 in 56 % (cut-off point 30 %).

Conclusion: Our preliminary study showed variable expression of observed proteins in multiple myeloma and its bone marrow microenvironment that implicate different biological „stage“, development and/or stromal plasticity in this complex hemato-oncological disease including myeloma cells itself and myeloma bone

disease. The knowledge of engaged signaling pathways may suggest more specific or tailored therapeutic approaches in a particular patient and also in his stabile or progressive multiple myeloma disease.

Supported by NT 14393.

Sekundární Epstein-Barrové virus asociovaný veľkobuněčný B lymfom u pacienta s angioimunoblastickým T lymfomem – kazuistika

Jakša R.

Ústav patológie 1. lekárskej fakulty
Univerzity Karlovy a VFN, Praha

Angioimunoblastický T lymfom (AITL) je jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich non-Hodgkinských T lymfomů, obvykle sa manifestuje generalizovanou lymfadenopatií, hepatosplenomegalií, horečkou, kožnými zmenami a ťadou jiných systémových príznakov. Vzácne se může u těchto nemocných vyvinout sekundární Epstein-Barrové virus asociovaný veľkobuněčný B lymfom dôsledkom imunodeficitu a následné klonální proliferace B imunoblastů infikovaných EBV. Vznik sekundární B lymfoproliferace je všeobecně považován za znak horší prognózy onemocnění se zkráceným celkovým přežitím.

My prezentujeme prípad 47-letého muže s generalizovanou lymfadenopatií a splenomegalií, u ktorého byl diagnostikovaný AITL z biopsie tříselné uzliny. Pacient podstoupil 4 cykly chemoterapie s CHOP (cyklofosamid, doxorubicin, vincristin, prednison), avšak choroba progredovala. Dvacet pět měsíců po stanovení primární diagnózy lymfadenopatie přetrvávala, navíc došlo k výsevu kožních eflorescencí. Proto

byla provedena biopsie axilárny uzliny súčasne s biosií kožní. V uzlině byl potvrzen AITL, v kůži pak sekundární EBV pozitivní veľkobuněčný B lymfom. Dle literárních údajů bylo doposud popsáno 23 případů tohoto typu.

Hodnotenie klinického dosahu variantov identifikovaných v génoch *BRCA1* a *BRCA2* pomocou MPS

Janíková M.^{1,2}, Kratochvílová R.¹,
Synková H.¹, Godava M.¹, Vodička R.¹,
Slavkovský R.², Vrtěl R.^{1,2}

¹Ústav lékařské genetiky a fetální medicíny FN a LF Univerzity Palackého, Olomouc

²Ústav molekulární a translační medicíny FN a LF Univerzity Palackého, Olomouc

Jedným z najčastejšie diagnostikovaných malígnych ochorení u žien je karcinóm prsníkov. V niektorých rodinách sa vyskytuje v niekoľkých generáciách, a vtedy sa označuje ako dedičný syndróm nádoru prsníkov a/alebo ovárií. U približne 5 – 10 % pacientok hovoríme o genetickej predispozícii na toto ochorenie, ktorá je daná prítomnosťou mutácií v génoch *BRCA1* a *BRCA2*. Na identifikáciu mutácií využívame v našom laboratóriu sekvenčné metódy, konkrétne priame sekvenovanie a masívne paralelné sekvenovanie (MPS). Veľkou výhodou prístupu MPS je rýchlosť analýzy, avšak vďaka množstvu získaných výsledkov môže byť ich samotná interpretácia problematická. Na prípravu knižnice na sekvenovanie génov *BRCA1* a *BRCA2* využívame BRCA MASTR™ Dx kit (Multiplicom). Samotné sekvenovanie prebieha na platforme Illumina,

system MiSeq. Na analýzu získaných výsledkov využívame Illumina BaseSpace a IGV softvér, pričom klinický dosah variantov je posudzovaný pomocou softvéru Variant Studio (Illumina). Okrem nich máme k dispozícii aj softvéry NextGENE® (Softgenetics) a Sophia DDM (Sophia Genetics). V niektorých prípadoch sme však zaznamenali určité nezrovnalosti medzi jednotlivými softvérmi, a to hlavne v určovaní klinického dosahu nájdených variantov. Preto si klinický dosah výsledkov získaných pomocou spomínaných softvérov overujeme i vo verejne dostupných databázach (napríklad <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Ensembl, UMD, LOVD). Príkladom takejto nezrovnalosti je synonymná mutácia c.693G > A (p. T231T) v géne *BRCA1*. Táto substitúcia ovplyvňuje zosťrih a dáva tak vzniknúť transkriptu s deletovaným exónom 11. Na základe tejto informácie bola táto mutácia vo februári 2013 označená ako patologická, na čo jednoznačne odkázal aj softvér Variant Studio s nadväznosťou na verejne dostupné databázy. Softvér Sophia DDM, ktorý využíva hlavne predikčné algoritmy, označil danú mutáciu ako variant nejasného významu. V apríli 2015 boli vo verejne dostupných databázach aktualizované informácie o mutácii c.693G > A, pričom došlo k jej preklasifikovaniu na variant neznámeho významu. Tento príklad teda ukazuje, že na analýzu a interpretáciu výsledkov získaných pomocou prístupu MPS je vhodnejšie využitie viacerých softvérov umožňujúcich presnejšiu klinickú interpretáciu. Zároveň dokazuje, že je nevyhnutné pravidelne sledovať aktualizácie informácií obsiahnutých vo verejne prístupných databázach. Tento komplexný prístup potom umožní kvalitnú diagnostiku pacientok s dedičným syndrómom nádoru prsníkov a/alebo ovárií.

Prognostický význam miR-23b u pacientov s NSCLC

Janíková M., Žižková V., Škarda J., Kharaišvili G., Kolář Z.

Ústav klinické a molekulární patologie a Laboratoř molekulární patologie FN a LF Univerzity Palackého, Olomouc
Ústav molekulární a translační medicíny FN a LF Univerzity Palackého, Olomouc

Napriek získavaniu nových poznatkov z oblasti biomarkerov a nových sľubných terapeutických možností na poli karcinómov pľúc 5 rokov od stanovenia diagnózy sa dožije menej než 11 % pacientov trpiacich nemalobunkovým karcinómom pľúc (NSCLC). Preto identifikácia nových biomarkerov u týchto pacientov predstavuje v súčasnosti veľkú výzvu. Relatívne nedávno boli za vhodné biomarkery navrhnuté molekuly mikroRNA (miRNA). Sú to pomerne stabilné, jednovláknové RNA, o dĺžke približne 22 nukleotidov, ktoré sa podieľajú na post-transkripcijnej regulácii expresie génov. Úloha miR-23b bola študovaná pri rôznych typoch nádorov, kde bol pozorovaný ako jej pozitívny, tak aj negatívny prognostický význam, v závislosti od typu nádoru. Pokiaľ nám je známe, jej význam u pacientov s NSCLC doteraz nebol určený. Preto sme sa, v rámci tejto retrospektívnej pilotnej štúdie, rozhodli kvantifikovať hladiny miR-23b v tkanivách získaných od 62 pacientov s NSCLC. Po izolácii celkovej RNA z parafínových blokov bola táto reverzne transkribovaná do cDNA a hladiny miR-23b a endogénnej kontroly RNU6B boli stanovené pomocou real-time PCR metódy s využitím tzv. TaqMan sond. Relatívna expresia miR-23b bola určená metódou $2^{-\Delta\Delta Ct}$ oproti nenádorovým kontrolám. Prognostický význam miR-23b bol zisťovaný po-

mocou Kaplan-Meierovej analýzy. Naše výsledky ukázali, že hladiny miR-23b boli u väčšiny pacientov znížené (57 pacientov), čo napovedá o jej novej úlohe ako tumor-supresorovej miRNA. Zároveň zvýšená expresia miR-23b bola signifikantne spojená s dlhším celkovým prežívaním pacientov s NSCLC (OS) ($p = 0,048$), a tiež vykazovala trend dlhšieho času do progresie ochorenia (PFS) ($p = 0,065$). Tieto výsledky teda naznačujú, že miR-23b by mohla slúžiť ako prognostický marker u pacientov s NSCLC.

Táto práca bola podporená grantami IGA MZCR NT13569, LF_2014_003 and NPU I LO1304.

Skp2 associates with Slug, androgen receptor and extracellular matrix proteins in patients with high Gleason score and lymph node metastasis of prostate cancer

Kharaišvili G.¹, Bouchal J.¹, Kral M.², Mgebrishvili G.¹, Kolar Z.¹

¹Laboratory of Molecular Pathology, Department of Clinical and Molecular Pathology, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic

²Department of Urology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital, Olomouc, Czech Republic

Background: The Skp2 F-box protein is the substrate recruiting component of the SCF (Skp1-Cullin 1-F-box) type of E3 ubiquitin-ligase complexes. Skp2 plays important role in prostate tumorigenesis which needs further elucidation.

Material and methods: Prostate cancer patients cohort (N = 101) was analyzed by immunohistochemistry for the following proteins (Skp2, AR, Ki-67, Slug, E-cadherin, beta-catenin, CTHRC1, periostin and versican) and statistically evaluated with clinico-pathological parameters. Coexpression study was performed using Opal Multiplex method.

Results: High Gleason score (> 8, N = 30) was significantly associated with higher nuclear Skp2 and lower E-cadherin expression ($p < 0,001$ and $0,011$, respectively) and with a trend for higher androgen receptor ($p = 0,062$). Patients with metastasis in lymph nodes (N = 29) had lower E-cadherin and cytoplasmic Skp2 ($p < 0,001$ and $0,018$, respectively), while nuclear Skp2, Slug (both nuclear and cytoplasmic), Ki-67 and androgen receptor showed a trend ($p = 0,176$, $0,103$, $0,032$, $0,079$ and $0,12$, respectively) towards higher expression in the prostate cancer cells. Similar changes of the mentioned proteins were observed also in risk categorization (based on serum PSA, pT classification and Gleason score).

Nuclear Skp2 slightly correlated with AR, periostin, versican and CTHRC1 in the whole patients cohort (Rs $0,37$, $0,34$, $0,21$ and $0,35$, respectively). In patients with high Gleason score, nuclear Skp2 potently correlated with AR, and nuclear Slug (Rs $0,53$ and $0,56$, respectively). In patients with metastasis into lymph nodes, nuclear Skp2 similarly correlated with nuclear Slug and AR (Rs $0,56$ and $0,37$, respectively) while androgen receptor further correlated with Ki-67 (Rs $0,50$). Although basal expression of Slug and Skp2 colocalized in the same cells, their increased expressions were mutually exclusive.

Conclusions: Skp2 correlates with androgen receptor, CTHRC1, periostin, versican and Slug which might contribute to aggressive prostate

cancer. Further mechanistical elucidation and clinical validation is needed.

Acknowledgements: This work was supported in part by grants NT13573 from the Czech Ministry of Health and NPU I LO1304 from the Czech Ministry of Education.

Neinvazivní high grade papilární uroteliální karcinom močového měchýře s kostní metaplazií u 3-letého chlapce

Michálek J.¹, Škarda J.¹, Tichý T.¹, Šmakal O.², Král M.², Kodet R.³

¹Ústav klinické a molekulární patologie, LF Univerzity Palackého Olomouc a FN, Olomouc, Česká republika

²Urologická klinika FN, Olomouc, Česká republika

³Ústav patologie a molekulární medicíny, FN Motol a 2. lékařská fakulta UK, Praha, Česká republika

Karcinomy močového měchýře z přechodného epitelu jsou u dětí velice vzácné. Prezentujeme případ 3-letého chlapce s náhle vzniklou atakou makroskopické hematurie a následně s recidivující mikroskopickou hematurií. Ultrazvukové vyšetření močového měchýře odhalilo na zadní stěně polypózní stopkatý tumornejvětší velikosti 12 mm, který byl následně cystoskopicky resekován. Histologicky byl diagnostikován high grade papilární uroteliální karcinom s úseky kostní metaplazie benigního vzhledu ve stromatu nádorových papil. Doposud se jedná o jediný známý případ papilárního uroteliálního karcinomu s kostní metaplazií u dětí. Bylo popsáno jenom několik málo kazuistik tohoto typu nádoru u dospělých jedinců. Diferenciální diagnostika nádoru

rů močového měchýře u dětí zahrnuje zejména 2 jednotky – nefrogenní adenom a hamartom, které mohou být navzájem odlišeny pomocí určitých histologických znaků a imunohistochemie.

Obrovs kobuněčný tumor ledvinné pánvičky

Šopíková B.¹, Tichý T.¹, Příkryl T.²

¹Ústav klinické a molekulární patologie LF Univerzity Palackého a FN, Olomouc, Česká republika

²Oddělení patologie, Nemocnice Přerov, Přerov, Česká republika

Úvod: Obrovs kobuněčné nádory (dále OBN) se běžně nacházejí v kostech, šlachových pochvách či měkkých tkáních. Postižení vnitřních orgánů je velmi vzácné. V oblasti ledvinné pánvičky bylo v anglicky psané literatuře dosud popsáno pouze 14 případů. Jejich původ a biologické chování zůstávají stále nejasné. Autoři jednotlivých sdělení se přiklánějí buď k epitelovému, nebo mezenchymovému původu, či odvozují vznik nádoru z nediferencovaných prekurzorů a kmenových buněk. Největší studie zahrnuje 6 případů urotelových OBN a dokumentuje jejich maligní chování i koincidence s urotelovými karcinomy běžného typu.

Případ: Demonstrujeme případ 85-letého muže s obrovs kobuněčným tumorem ledvinné pánvičky, který zemřel 5 měsíců po stanovení diagnózy na generalizaci nádorového onemocnění. Extenzivním vyšetřením ledvinné pánvičky byl prokázán neinvazivní urotelový papilární karcinom a urotelový karcinom *in situ*.

Závěr: Maligní chování OBN ledvinné pánvičky a jeho asociace s urotelovým karcinomem běžného typu podporuje domněnku o epitelovém původu těchto nádorů.

Somatické mutace v *IDH1* a *IDH2* genech u gliomů

Urbanovská I.^{1,2}, Šimová J.^{1,2}, Uvírová M.^{1,2}, Kubová B.¹, Konvalinka D.¹, Měch R.¹, Kalábová L.¹, Žebráková I.¹, Paleček T.³, Buzrla P.⁴, Tomanová R.⁴, Dvořáčková J.^{1,2,4}

¹CGB laboratoř, a. s., Ostrava

²Lékařská fakulta Ostravské univerzity, Ostrava

³Neurochirurgická klinika, FN Ostrava

⁴Ústav patologie, FN Ostrava

Úvod: Somatické mutace v *IDH1* a *IDH2* genech jsou často pozorovány u nízkostupňových astrocytomů, oligodendrogliomů, oligoastrocytomů a sekundárních glioblastomů. U jiných typů gliálních tumorů – u pilocytárního astrocytomu, ependymomu a primárního glioblastomu se tyto mutace nevyskytují, nebo se vyskytují velmi raritně.

IDH1 a *IDH2* geny kódují isocitrát dehydrogenázy, které katalyzují oxidativní dekarboxylaci isocitrátu na α – ketoglutarát za produkce NADPH. Mutace v *IDH1* genu jsou lokalizovány v kodonu 132 a přibližně v 90% případů se jedná o mutaci c.395G>A (p.R132H). Mutace v *IDH2* genu jsou vzácné a téměř exkluzivně se nacházejí v kodonu 172. Mutace v *IDH1* a *IDH2* genech jsou považovány za časnou událost v gliomogenezi a jsou spojovány s lepší prognózou a delším celkovým přežitím.

Materiál a metody: DNA z 80 vzorků nativní nádorové tkáně byla izolována kitem MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche), případně kitem NucleospinTissue XS (Macherey-Nagel). Analýza mutací v *IDH1/2* genech byla provedena pomocí primer extension analýzy (SNaPshot Multiplex Kit, Life Technologies) a po-

zitivní výsledky byly verifikovány pomocí sekvenování Sangerovou metodou.

Výsledky: V naší laboratoři bylo vyšetřeno 80 vzorků nádorové tkáně pacientů s gliomem. U 21 vzorků (26,25%) byla prokázána mutace v *IDH1* genu, z toho u 18 vzorků (85,7%) byla prokázána mutace c.395G>A (p.R132H), u 1 vzorku (4,8%) mutace c. 394C>T (p.R132C), u 1 vzorku (4,8%) mutace c.394C>G (p.R132G) a u 1 vzorku

(4,8%) byla prokázána mutace c.394C>A (p.R132S). U žádného z 80 vzorků nebyla prokázána mutace v *IDH2* genu.

Závěr: Frekvence nalezených mutací v *IDH1* genu u pacientů Moravskoslezského kraje s gliomem jsou v souladu s publikovanými údaji. Kromě prognostického významu mají mutace význam diagnostický při diferenciální diagnostice glioblastomů a nízkostupňových astrocytomů.



Spolupráca
Vzdelávanie
Zdroje
Závazok
Otvorenosť

generálny partner



hlavní partneri



partneri

