

UNIVERZITA KARLOVA

Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Kateřina Kamarádová

2019

Doktorský studijní program

Patologie

**PILOVITÉ LÉZE GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU A
VÝZNAM VÝSKYTU PILOVITÝCH ZMĚN VE SLIZNICI
PACIENTŮ S IDIOPATICKÝM STŘEVNÍM ZÁNĚTEM**

SERRATED LESIONS OF GASTROINTESTINAL TRACT AND
SIGNIFICANCE OF SERRATED CHANGES IN MUCOSA OF
INFLAMMATORY BOWEL DISEASE PATIENTS

MUDr. Kateřina Kamarádová

Školitel: prof. MUDr. Jan Laco, Ph.D.

Hradec Králové, 2019

Obhajoba dne:

Prohlášení

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy.

Hradec Králové, 2019

podpis autora:

Poděkování

Ráda bych na této straně poděkovala všem kolegům z Fingerlandova ústavu patologie včetně týmů v laboratořích i v archivu, především ale kolegům v laboratoři imunohistochemické a molekulární za vstřícnost a provedená vyšetření.

Jmenovitě pak pracovně děkuji:

prof. MUDr. Janu Lacovi, Ph.D. za školitelské rady stran přípravy publikací a vlastní disertace.

Přednostovi ústavu, prof. MUDr. Aleši Ryškovi, Ph.D., za podporu při grantových projektech, volnou ruku při přípravě přednášek a za cenné rady a brainstorming stran projektů i vlastních publikací.

RNDr. Haně Vošmikové za veškerý čas věnovaný provedení a vyhodnocení molekulárních vyšetření.

Osobně pak děkuji:

MUDr. Kláře Pavlíčkové za dlouholeté přátelství a morální podporu v průběhu celého PGS studia,

MUDr. Markétě Krupové za udržování pozitivní nálady v pracovně,

Alešovi a Simoně Svatošovým za možnost dekontaminace myšlenek ve vinařství Porta Bohemica

a rodičům – Jiřímu Kamarádovi za torpidní tlak i sdílení zkušeností s vědeckou prací a Evě Kamarádové za trpělivost...

...a nejvíce beztak

doc. PhDr. Kateřině Svatoňové, Ph.D. za finální osobní motivaci k dokončení studia.

Speciální poděkování patří Českým drahám a.s., díky jejichž spojením s variabilní mírou přestupů, odklonů a zpoždění vznikla velká část této práce na kolejích při pracovních přesunech mezi Hradcem Králové a Prahou.

Práce byla podpořena projektem MZ ČR - RVO (FNHK, 00179906) Fakultní nemocnice Hradec Králové a programem PROGRES Q40/11, programem BBMRI-CZ LM2015089 a programem BBMRI-CZ No: EF16 013/0001674.

Obsah

| | |
|--|----|
| <i>Prohlášení</i> | 1 |
| <i>Poděkování</i> | 2 |
| <i>Obsah</i> | 3 |
| <i>1. Seznam použitých zkratk</i> | 6 |
| <i>2. Souhrn</i> | 9 |
| <i>3. Summary</i> | 11 |
| <i>4. Teoretický úvod do problematiky</i> | 13 |
| 4.1. IDIOPATICKÉ STŘEVNÍ ZÁNĚTY | 13 |
| 4.1.1. Idiopatické střevní záněty – typy a histomorfologická charakteristika..... | 13 |
| 4.1.2. IBD-asociované neoplázie - dysplázie a kolorektální karcinom - rizika vzniku | 15 |
| 4.1.3. IBD dysplázie – morfologická kritéria, klasifikace..... | 15 |
| 4.2. PILOVITÉ LÉZE GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU | 19 |
| 4.2.1. Pravé pilovité polypy – morfologické charakteristiky dle platné WHO klasifikace a vztah k dysplázii | 19 |
| 4.3. KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM | 29 |
| 4.3.1. Základní klinické a morfologické charakteristiky KRK | 29 |
| 4.3.2. Molekulární vlastnosti KRK a dráhy kancerogeneze..... | 31 |
| 4.4. PILOVITÉ LÉZE U PACIENTŮ S IDIOPATICKÝM STŘEVNÍM ZÁNĚTEM | 35 |
| 4.4.1. Pravé pilovité polypy a IBD | 35 |
| 4.4.2. Nekonvenční slizniční léze a IBD..... | 38 |
| 4.5. CHARAKTERISTIKA VYŠETŘOVANÝCH IMUNOHISTOCHEMICKÝCH A MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ | 40 |
| 4.5.1. Charakteristika a funkce genu TP53 a proteinu p53 a význam v nádorových lézích GIT | 40 |
| 4.5.2. Charakteristika a funkce MLH1 a MMR proteinů a význam v nádorových lézích GIT..... | 43 |
| 4.5.3. Charakteristika a funkce MGMT a význam v nádorových lézích GIT | 46 |
| 4.5.4. Charakteristika genů KRAS/NRAS a BRAF a význam mutací v nádorových lézích GIT | 47 |
| <i>5. Cíle disertační práce</i> | 50 |
| <i>6. Materiál a metodika</i> | 51 |
| 6.1. CHARAKTERISTIKA STUDOVANÉHO SOUBORU | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 6.2. IMUNOHISTOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ A JEHO HODNOCENÍ | 53 |
| 6.2.1. Princip imunohistochemického vyšetření | 53 |
| 6.2.2. Princip vyhodnocení výsledků imunohistochemického vyšetření..... | 54 |
| 6.3 MOLEKULÁRNÍ VYŠETŘENÍ | 56 |
| 6.3.1. Příprava vzorků a izolace DNA | 56 |
| 6.3.2. Vyšetření mutačního stavu genů KRAS a NRAS | 56 |
| 6.3.3. Vyšetření mutačního stavu genu BRAF | 56 |
| 6.4 STATISTICKÁ ANALÝZA..... | 57 |
| 7. Výsledky | 58 |
| 7.1. DESKRIPTIVNÍ CHARAKTERISTIKY CELÉHO SOUBORU..... | 58 |
| 7.1.1. Charakteristiky souboru pacientů se slizničními lézemi | 58 |
| 7.1.2. Charakteristiky samostatné skupiny pacientů s IBD-asociovaným karcinomem..... | 60 |
| 7.2. Typy a četnost slizničních lézí a jejich vztah k typu IBD | 61 |
| 7.2.1. Morfologické charakteristiky nekonvenčních slizničních lézí ve skupině 1 a jejich vztah ke kolorektálnímu karcinomu | 65 |
| 7.2.2. Právě pilovité polypy a IBD dysplázie a jejich vztah ke KRK | 72 |
| 7.2.3. Výskyt více typů lézí u jednoho pacienta..... | 72 |
| 7.2.4. Morfologické charakteristiky studovaných IBD-asociovaných kolorektálních karcinomů..... | 75 |
| 7.3. VÝSLEDKY IMUNOHISTOCHEMICKÉHO VYŠETŘENÍ DLE MORFOLOGICKÝCH SKUPIN | 81 |
| 7.3.1. Výsledky imunohistochemického vyšetření v nekonvenčních lézích (PPL) skupiny 1 | 81 |
| 7.3.2. Výsledky imunohistochemického vyšetření v pravých pilovitých polypech..... | 83 |
| 7.3.3. Výsledky imunohistochemického vyšetření v IBD dysplázii a KRK | 83 |
| 7.4. MOLEKULÁRNÍ VÝSLEDKY | 85 |
| 7.4.1. Výsledky molekulárního vyšetření v nekonvenčních lézích (PPL) skupiny 1 | 85 |
| 7.4.2. Výsledky molekulárního vyšetření v pravých pilovitých polypech..... | 86 |
| 7.4.3. Výsledky molekulárního vyšetření v IBD dysplázii a KRK | 86 |
| 7.5. VZTAH IMUNOHISTOCHEMICKÝCH A MOLEKULÁRNÍCH VÝSLEDKŮ V JEDNOTLIVÝCH SKUPINÁCH K VÝSLEDKŮM V IBD-ASOCIOVANÝCH KRK..... | 87 |
| 8. Diskuze..... | 89 |
| 8.1. Pilovité léze u IBD pacientů | 89 |
| 8.1.1. Pilovité léze typu SEC, vilózní hypermucinózní změna aj. a IBD | 89 |
| 8.1.2. Právě pilovité polypy a IBD | 92 |
| 8.2. IBD-asociované KRK – diskuze morfologických, fenotypových a molekulárních charakteristik. | 93 |

| | |
|---|------------|
| 8.3 Diskuze vztahu IBD-asociovaného KRK k jednotlivým typům slizničních lézí | 94 |
| 8.3.1. <i>IBD-asociovaný KRK a dysplázie</i> | 94 |
| 8.3.2. <i>IBD-asociovaný KRK a pravé pilovité polypy</i> | 95 |
| 8.3.3. <i>IBD-asociovaný KRK a PPL</i> | 95 |
| 8.4. Endoskopické sledování pacientů s IBD a endoskopická prevence rozvoje kolorektální neoplázie a vztah k nekonvenčním lézím | 96 |
| 8.5. Limitace studie | 97 |
| 9. Závěry práce | 98 |
| 9.1. Témata a doporučení pro běžnou bioptickou praxi vyplývající z provedené studie..... | 99 |
| 9.2. Osobní přínos doktoranda: | 100 |
| 10. Seznam použité literatury..... | 101 |
| 11. Seznam popisek tabulek a obrazové dokumentace | 113 |
| 11.1. Tabulky | 113 |
| 11.2. Obrázky | 114 |
| 12. Přílohy..... | 116 |
| Příloha 1. Postup imunohistochemického vyšetření v barvicím automatu Ventana a postup ručního barvení. | 117 |
| Příloha 2: Příprava vzorků a izolace DNA z parafinových bločků | 118 |
| Příloha 3: Detekce mutací genu KRAS a NRAS pomocí real-time PCR pomocí AmoyDx® KRAS Mutation Detection Kit – Amoy Dx, AmoyDx® NRAS Mutation Detection Kit - Amoy Dx - zkrácený stručný postup vyšetření..... | 121 |
| Příloha 4. Detekce mutací genu <i>BRAF</i> metodou PCR s reverzní hybridizací produktu – BRAF StripAssay ViennaLab – zkrácený stručný postup | 123 |

1. Seznam použitých zkratek

5FU – 5-fluorouracil

AI – angioinvaze

ALM – adenoma-like mass, adenomu podobná léze

APC – adenomatous polyposis coli, adenomatózní polypóza střeva

AZ – Arizona

bp – base pair, pár bazí

BER – base excision repair, opravy excizí bazí

CA – California, Kalifornie

CD – Crohn's disease, Crohnova choroba

CIMP – CpG island methylator phenotype, hypermetylace CpG ostrůvků

CIMP-H – CpG island methylator phenotype-high, vysoký stupeň hypermetylace CpG ostrůvků

CIMP-L – CpG island methylator phenotype-low, nízký stupeň hypermetylace CpG ostrůvků

DALM – dysplasia associated lesion and mass, s dysplázií asociovaná léze a masa

DFS – disease-free survival, přežití bez onemocnění/choroby

ECP – ectopic crypt formation, tvorba ektopických krypt

EGFR – epidermal growth factor receptor, receptor pro epidermální růstový faktor

ext. – extramurální

FAP – familiární adenomatózní polypóza

FFPE – formalin fixed paraffin embedded, formolem fixovaný v parafinu zalitý (vzorek)

FNHK – Fakultní nemocnice Hradec Králové

GAP – GTPase activating protein, protein aktivující GTPázu

GEF – guanine nucleotide exchange factor, faktor pro výměnu guanosinu

GIT – gastrointestinální trakt

GDP – guanosin difosfát

GTP – guanosin trifosfát

HG, HGD – high-grade dysplasia, dysplázie vysokého stupně

HP – hyperplastický polyp

HSPA9 – heat-shock protein family A (Hsp70) member 9, člen 9 rodiny A proteinů teplotního šoku

IBD – inflammatory bowel disease, idiopatický střevní zánět

IBD-U – inflammatory bowel disease-unclassified, idiopatický střevní zánět-neklasifikovaný

IC – indeterminate colitis, indeterminovaná (neurčená) kolitida

int. – intramurální

KRK – kolorektální karcinom

LG, LGD – low-grade dysplázie, dysplázie nízkého stupně

LS – Lynchův syndrom

LU – lymfatické uzliny

LyAI – lymfangioinvaze

MA - Massachusetts

MAP – MUTYH-asociovaná polypóza

MGMT – O⁶-metylguanin DNA metyltransferáza

MMR – mismatch repair, oprava špatně zařazených bazí

MUTYH – MutY Human Homolog gene, lidský MutY homolog

NGS – next generation sequencing, multiparametrické sekvenování (tzv. sekvenace nové generace)

NOS – not otherwise specified, blíže nespecifikovaný

OS – overall survival, celkové přežití

PCR – polymerázová řetězová reakce

PFS – progression-free survival, přežití bez progresu

PI3K – phosphoinositol 3-kinase, fosfoinositol 3-kináza

Pn – perineurální šíření

PPL – předpokládaná/potenciální prekursorová léze

PPP – pravé pilovité polypy

PSC – primární sklerózující cholangitida

RB – retinoblastom-asociovaný protein, *RB* gen

RTU – ready to use, protilátka předředená výrobcem k okamžitému použití

SEC – serrated epithelial change, pilovitá epiteliální změna

S/M – synchronní/metachronní

SPS – serrated polyposis syndrome, syndrom pilovité polypózy

SP-U – serrated polyp, unclassified, pilovitý polyp, neklasifikovaný

SSA/P – sessile serrated adenoma/polyp, sesilní pilovitý adenom/polyp

SSA-D – sessile serrated adenoma with cytological dysplasia, sesilní pilovitý adenom s dysplázií

STR – short tandem repeat, krátké tandemové repetitivní sekvence

sTVA – serrated tubulovillous adenoma, pilovitý tubulovilózní adenom
SVC – subtle villous change, nepatrná vilózní změna
TA – tubulární adenom
TNM – Tumor Node Metastasis, TNM klasifikace
TSA – traditional serrated adenoma, tradiční pilovitý adenom
TVA – tubulovilózní adenom
sTVA – serrated tubulovillous adenoma, pilovitý tubulovilózní adenom
UC – ulcerative colitis, ulcerózní kolitida
UCAD – UC-adenoma, adenom u ulcerózní kolitidy
UCAG – UC-adenomatous growth, adenomatózní růst u ulcerózní kolitidy
USA - United States of America, Spojené státy americké
VA – vilózní adenom
VHL – von Hippel-Lindau
WHO – World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

2. Souhrn

Pacienti s idiopatickým střevním zánětem mají zvýšené riziko vzniku kolorektálního karcinomu z důvodu dlouhodobého chronického zánětu vedoucího k rozvoji IBD-asociované dysplázie, která je považována za konvenční prekursor pro IBD-asociovaný adenokarcinom a jejíž detekce je součástí prevence rozvoje KRK v rámci dlouhodobého sledování. [1] U pacientů s IBD jsou však popisovány i jiné nekonvenční slizniční změny s pilovitou a vilózní hypermucinózní morfologií, ale jejich preneoplastický potenciál není zcela objasněn. [3–4]

Cílem studie byla retrospektivní revize vzorků od pacientů s IBD se zaměřením na detekci různých typů slizničních změn včetně nekonvenčních lézí, IBD-dysplázie i IBD-asociovaného karcinomu a zhodnocení jejich vzájemného vztahu a imunohistochemických a molekulárních vlastností.

Revize zahrnovala chirurgické anebo endoskopické vzorky od pacientů s diagnózou IBD vyšetřené v průběhu 10leté periody. Zastižené slizniční léze byly rozděleny do 3 skupin. Do skupiny 1 byly zařazeny nekonvenční nebo potenciální prekursorové léze (PPL) s pilovitou nebo vilózní hypermucinózní morfologií, do skupiny 2 právě pilovité polypy splňující platná diagnostická kritéria a do skupiny 3 IBD-dysplázie a IBD-asociovaný kolorektální karcinom. Detailní morfologické hodnocení, imunohistochemické vyšetření exprese mismatch repair proteinů a/nebo MLH1, p53 a O⁶-methylguanine DNA metyltransferázy (MGMT) a molekulární vyšetření mutačního stavu genů *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* bylo provedeno ve všech detekovaných lézích.

V rámci studie byly revidovány vzorky celkem od 309 pacientů. U 51 pacientů jsme zastihli 88 slizničních lézí. Nejčastější byly léze ze skupiny 1. Pilovitá epiteliální změna (serrated epithelial change, SEC) byla detekována ve 41 vzorcích (46,6 %) a vilózní hypermucinózní změna v 6 vzorcích (6,8 %). Léze ze skupiny 1 byly charakterizovány ztrátou exprese MGMT v 44,6 % případů, aberantní expresí p53 a mutacemi genu *KRAS* v 42,9 % případů. Skupinu 2 tvořilo 15 pravých pilovitých polypů s mutacemi *KRAS* v obou případech tradičního pilovitého adenoma (TSA), 4 případech plochého pilovitého adenomu (SSA) a 4 případech hyperplastického polypu (HP). Skupinu 3 tvořilo šest IBD-dysplázií a 11 kolorektálních karcinomů (KRK). IBD-dysplázie vykazovala aberantní expresi p53 v polovině případů. IBD-asociované karcinomy byly morfologicky heterogenní a charakterizované ztrátou exprese MGMT a aberantní expresí p53 v 54,5 % případů. U sedmi případů KRK byla prokázána mutace genu *KRAS/NRAS* a v jednom případě genu *BRAF*. Šest lézí ze skupiny 1 bylo

sduženo s invazivním karcinomem a 2 z těchto lézí sdílely s karcinomem shodnou mutaci genu *KRAS*, resp. *BRAF*. U 19 pacientů jsme našli více lézí z různých skupin.

Výsledky této práce potvrzují existenci slizničních změn odlišných od konvenční IBD-dysplázie a rozšiřují znalosti o jejich imunohistochemických a molekulárních vlastnostech i jejich vztahu ke karcinomu. Povědomí o těchto lézích je nutné v rámci prevence jejich přehlédnutí a poddiagnostikování, a to vzhledem k jejich potenciální roli v IBD-asociované kancerogenezi.

3. Summary

Patients with inflammatory bowel disease (IBD) have an elevated risk of developing colorectal carcinoma (CRC) due to the continuous long-standing chronic inflammation leading to development of IBD-associated dysplasia. [1] IBD-dysplasia is regarded as a conventional precursor lesion for IBD-associated adenocarcinoma and its detection is the subject of surveillance and CRC prevention program. [2] Other types of non-conventional but suspicious mucosal changes with serrated and villous hypermucinous morphology have also been reported in IBD patients but preneoplastic potential of these lesions is still not well elucidated. [3–4]

The aim of the study was to retrospectively review samples from IBD patients focusing on detection of various mucosal lesions including non-conventional lesions, IBD-dysplasia as well as IBD-associated carcinoma and evaluation of their relationship and immunohistochemical and molecular properties.

Surgical specimens and/or endoscopic biopsy samples of IBD patients examined during a 10-year period were reviewed. Detected mucosal lesions were divided into three groups - group 1 (non-conventional or putative precursor lesions – PPLs) with serrated or villous hypermucinous morphology, group 2 (true serrated polyps fulfilling valid criteria), and group 3 (IBD-associated dysplasia and colorectal carcinoma). Detailed morphological evaluation, immunohistochemical analysis of mismatch repair (MMR) proteins and/or MLH1, p53 and O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) expression, and molecular analysis for *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* gene mutation was performed in all lesions.

Overall, samples from 309 IBD patients were reviewed. A total of 88 mucosal lesions were found in 51 patients. Most common were lesions from group 1 with superficial serrated epithelial change seen in 41 samples (46.6 %) and villous hypermucinous change in 6 (6.8 %). Lesions from group 1 were characterized by loss of MGMT expression in 44.6 %, aberrant p53 expression, and by mutations in *KRAS* gene in 42.9 % of cases. Group 2 consisted of 15 true serrated polyps with mutation in *KRAS* gene in both cases of TSA and in *BRAF* gene in 4 cases of SSA and HP. Six conventional IBD-dysplasia cases and 11 carcinomas were seen in group 3. IBD-dysplasia was characterized by aberrant p53 expression in half of the cases. IBD-associated carcinomas were morphologically heterogenous and characterized by loss of MGMT expression and aberrant p53 expression in 54.5% of cases. Seven CRC cases harbored mutation of *KRAS/NRAS* and one case of *BRAF*. Six lesions from group 1 were associated

with invasive carcinoma and two of the lesions shared the same mutation in *KRAS* and *BRAF*, respectively. More than one type of lesion from different groups was found in 19 patients.

Our results prove the existence of mucosal changes other than conventional IBD-dysplasia in mucosa of IBD patients and extend the knowledge about their immunohistochemical and molecular properties and relation to carcinoma. Awareness of these changes is necessary to prevent their missing and under-reporting due to their potential role in IBD-related carcinogenesis.

4. Teoretický úvod do problematiky

4.1. IDIOPATICKÉ STŘEVNÍ ZÁNĚTY

4.1.1. Idiopatické střevní záněty – typy a histomorfologická charakteristika

Idiopatické střevní záněty (inflammatory bowel disease, IBD) představují skupinu chronických zánětlivých onemocnění, která postihují především střevní sliznici a zahrnují dvě hlavní diagnostické jednotky, ulcerózní kolitidu (UC) a Crohnovu chorobu (CD).

Indeterminovaná kolitida (IC) a idiopatický střevní zánět, neklasifikovaný (IBDU) jsou termíny používané pro dočasnou diagnózu kolitidy, u které nelze v době prezentace jednoznačně rozlišit mezi UC a CD na základě histomorfologického, endoskopického a radiologického nálezu. Diagnóza IC je rezervována pro patologickou diagnostiku z resekátu střeva, IBDU lze použít u pacientů, u kterých jsou k dispozici pouze endoskopické vzorky. [1]

UC i CD představují dlouhodobě probíhající zánětlivé onemocnění vznikající na základě interakce mezi genetickými, environmentálními i endogenními faktory, včetně poruch mikrobiomu. Idiopatické střevní záněty postihují především mladší dospělé pacienty s vrcholem výskytu mezi 15.–35. rokem věku [5–6] a komplexní klinickou klasifikací dle tzv. Montrealské klasifikace [7] Oba typy IBD se mohou vyskytovat i v nižším dětském věku a pak hovoříme o tzv. pediatrické IBD (mladší 17 let), časně (early onset, mladší 10 let věku), velmi časně (very early onset, mladší 6 let věku) a infantilní IBD (mladší 2 let věku). [8–9] Obě onemocnění mohou vznikat postupně a progredovat, ale abruptní nebo fulminantní průběh je také možný [1] Ulcerózní kolitida postihuje především sliznici tlustého střeva s iniciálním postižením rekta a vzestupným šířením zánětu orálním směrem. Crohnova choroba představuje diskontinuální a transmurální zánět postihující jak tenké střevo (s predilekcí v terminálním ileu), tak tlusté střevo ve formě tzv. skip lézí (střídání nepostižených a postižených úseků střeva). [1,5]

Histologické vyšetření endoskopických biopsií (případně resekátů) slouží jak ke stanovení diagnózy, tak pro dlouhodobé kontrolní sledování pacientů. Vzhledem k podobnosti některých klinicko-patologických charakteristik UC a CD je přesné stanovení typu IBD někdy možné až na základě interdisciplinární korelace. Histologicky UC a CD sdílejí některé morfologické změny, mezi které patří např. změna architektiky žlázek jako projev chronického zánětu a kryptitida a kryptové pseudoabscesy charakterizující aktivitu zánětu. Odlišujícími znaky jsou naopak charakter a rozsah postižení střeva (s případnou extraintestinální prezentací u CD), různou intenzitou zánětu (denzní kontinuální u UC),

přítomností granulomů (CD) nebo přidružených komplikací (fisury a píštěle u CD). [10–12] Pro spolehlivé stanovení diagnózy je pak nutný odběr alespoň po 2 bioptických vzorcích z nejméně 5 úseků střeva včetně rekta a terminálního ilea. [10]

Ulcerózní kolitida je obvykle omezena na postižení rekta a v různém rozsahu i kolon, zánětlivé postižení je nicméně kontinuální. Zánět obvykle postihuje pouze sliznici a submukózu vyjma fulminantních případů, kdy může být postižena celá stěna střeva s hlubokými ulceracemi vedoucí v některých případech k rozvoji toxického megakolon. [1, 13–14] V rámci histologických změn neexistuje jednoznačný morfologický diagnostický znak typický pro UC. Histologická diagnostika se opírá o hodnocení architektonických změn žlázek, mezi které patří rozvětvené nebo rozdvojené žlázy, jejich úbytek, resp. atrofie a hyperplázie povrchového epitelu s pseudovilózní a pseudopolypózní stavbou. Změny architektoniky jsou přítomny u většiny případů, nicméně jejich rozvoj závisí na délce trvání zánětu a v časných fázích nebo u dětských případů nemusí být jednoznačně patrné. [15] Dalšími parametry jsou intenzita, distribuce a složení zánětlivého infiltrátu. Komponenta neaktivního zánětu u UC je tvořena difúzní intenzivní lymfoplazmocytární celulizací postihující sliznici. V rámci UC je často zachycena tzv. bazální plazmocytóza. Známkou aktivity je pak přítomnost neutrofilů jak ve slizničním pojivu, tak v povrchovém epitelu, mezi epitelem krypt (kryptitida), anebo v lumen krypt (kryptové pseudoabscesy). Aktivní zánět provází destrukce epitelu ve smyslu tvorby povrchových erozí a vředů nebo destrukce krypt v hloubce sliznice. Destrukce krypt může být doprovázena vznikem mukofagických (kryptolytických) granulomů, ale epiteloïdní granulomy bez vazby na destrukci krypt nebo v hlubších částech střeva (typické pro CD) zastiženy nejsou. Další pomocné parametry pro diagnózu IBD typu UC jsou reaktivní změny v epitelu s úbytkem hlenu nebo metaplázie s Panethovými buňkami [1]

Crohnova choroba postihuje různé segmenty gastrointestinálního traktu s predilekcí v proximálním kolon a terminálním ileu. Od ulcerózní kolitidy se odlišuje nepravidelnou distribucí zánětlivých změn s tvorbou tzv. skip lézí, při kterých se nepravidelně střídají postižené a nepostižené úseky střeva. Dalším rozdílem oproti UC je nepravidelně distribuovaná, ale transmurální zánětlivá infiltrace stěny střeva a tvorba píštělí. Časné zánětlivé léze u CD pak zahrnují drobné aftoidní slizniční vředy, nepravidelné okrsky nekróz epitelu včetně mikroulcerací a tvorba drobných bazálních kryptových vředů. [1] Mezi pozdější známky patří tvorba hlubších fisur. Kryptové abscesy jsou oproti UC zastiženy méně často. [14] Klíčovým znakem Crohnovy choroby jsou granulomy definované jako skupiny

epiteloidních buněk monocytárně/makrofagického původu s nebo bez přítomnosti mnohjaderných buněk. Granulomy mohou být formované, sarkoidního typu nebo rozvolněné. [6, 14–15] Přítomny jsou jak ve sliznici, tak v hlubších partiích střešní stěny. Míra záhytu granulomů v diagnostických bioptických vzorcích kolísá mezi 15–85 % a vzácně překračuje 50–60 %. [1] Další morfologické znaky přítomné častěji u CD jsou neuronální hyperplázie, pylorická metaplázie sliznice, lymfangiektázie a hypertrofie svaloviny. [14–15]

4.1.2. IBD-asociované neoplázie - dysplázie a kolorektální karcinom - rizika vzniku

V obou případech, ovšem s predominancí u UC, je dlouhodobě zánětlivě iritovaná a regenerující sliznice ohrožena akumulací genetických změn a rozvojem neoplázie, včetně rizika vzniku KRK, a to v závislosti na délce trvání onemocnění, včetně časného rozvoje IBD v dětském věku, a na rozsahu postižení střeva. [16–18] Dalšími rizikovými faktory v rozvoji KRK, především u pacientů s UC, jsou přidružená primární sklerózující cholangitida (PSC) a přetrvávající aktivita zánětu. [5, 16] Riziko rozvoje dysplázie a KRK je u IBD pacientů vyšší oproti zdravé populaci. [17, 19] Starší studie udávaly celkovou prevalenci KRK až 3,7 % a kumulativní riziko po 30 letech trvání IBD až 18 %. [19] Pravidelná endoskopická i histologická kontrola a lepší detekce suspektních změn ve sliznici vede patrně ke snížení roční incidence IBD-asociovaného KRK i kumulativního rizika, které je v recentních studiích pouze 2,63 %, nicméně je stále vyšší než riziko pro běžnou populaci. Největší rozdíly jsou pak při výpočtu rizika pro mladší populaci do 50 let. [20–22]

4.1.3. IBD dysplázie – morfologická kritéria, klasifikace

Uznávanou prekursorovou lézí pro IBD-asociovaný kolorektální karcinom je dysplázie střešního epitelu. Obecně IBD dysplázie připomíná dysplázii v tubulárních adenomech střeva nekolitických pacientů a zahrnuje cytologické změny jako je variabilita uložení a velikosti jader, jejich shlukování a pseudostratifikace a změny v charakteru jaderného chromatinu. Morfologicky tak IBD dysplázie splňuje obecná kritéria pro dysplázii dle definice Riddel et al. z roku 1983, dle které dysplázie představuje jednoznačně neoplastický epitel bez známek invaze do lamina propria sliznice. [23]

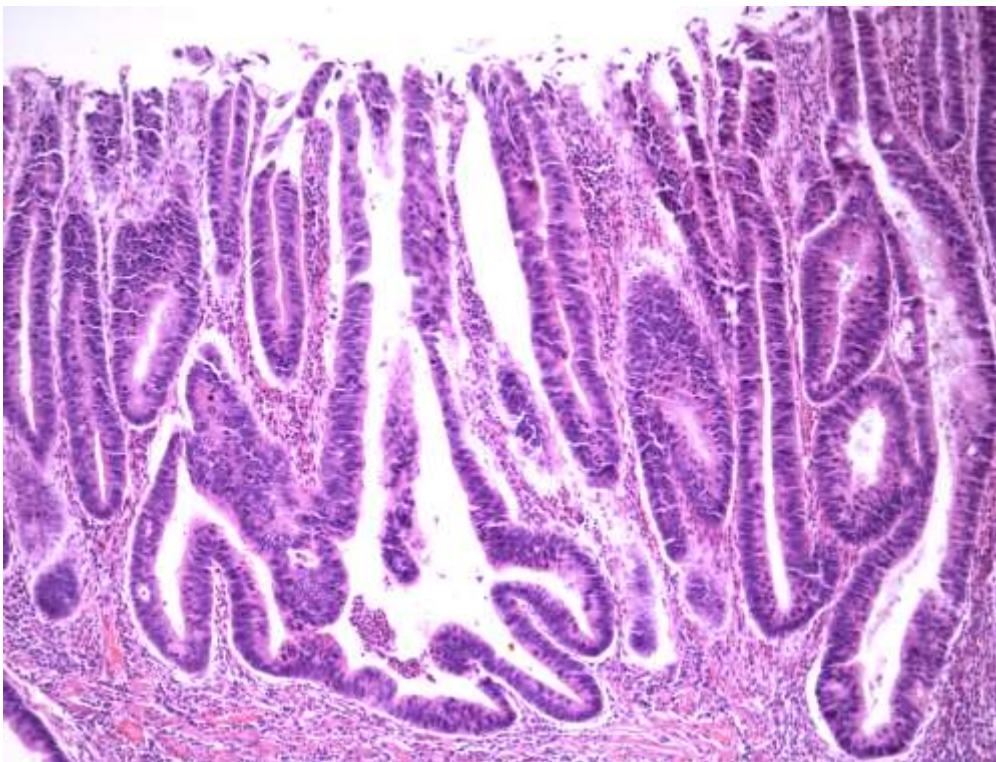
Ještě nedávno byly slizniční dysplastické změny u IBD děleny morfologicky na elevované nebo ploché a odlišovány termíny DALM (dysplasia associated lesion and mass, léze a masa asociovaná s dysplázií) a ALM (adenoma-like mass, adenomu podobná masa). [24–25] Tyto termíny byly nicméně opuštěny a dysplastické slizniční léze u pacientů s IBD jsou nyní

rozděleny na základě endoskopického nálezu na a) viditelnou dysplázií polypoidní nebo nepolypoidní (plochou nebo s depresí) a b) neviditelnou dysplázií, která je detekována patologem na mikroskopické úrovni v náhodně odebraném necíleném vzorku bez endoskopicky jasného morfologického korelátu. [2]

Histologicky se nyní užívá název IBD dysplázie a slizniční léze se dělí do čtyř kategorií: 1 – bez dysplázie; 2 – nález neurčitý pro dysplázií; 3. dysplázie nízkého stupně (low-grade, LGD) a 4. dysplázie vysokého stupně (high-grade, HGD) viz Obr. 1. [5–6, 26–27]

Adekvátní počet bioptických vzorků odebraných pro diagnostiku dysplázie v rámci IBD přesně určen není. Nicméně pro UC je navržen počet 6–10 vzorků z různých míst a současné doporučení navrhuje biopsovat střevo v intervalu po 10 cm. [5, 10]

Obr. 1: IBD dysplázie, high-grade. Barvení HE, zvětšení 100x.



Podle platných doporučených postupů je nutné odlišit diferenciálně diagnostické situace mezi regenerativním epitelem bez jasné dysplázie (tedy negativní pro dysplázií), regenerativní změny s atypii (neurčitý pro dysplázií), IBD dysplázií a sporadickým konvenčním adenomem. Odlišení regenerativních atypií může být někdy v terénu chronického zánětu problematické. Regenerativní a degenerativní změny v epitelu zahrnují úbytek hlenu, zvětšení

jader s patrnými jádérky a mitotickou aktivitu v kryptách. [1] Pokud se mitotická aktivita vyskytuje i v horní části krypt nebo v povrchovém epitelu, lze tento nálezu považovat za abnormální a spíše svědčící pro dysplázii. Přesto je odlišení lézí z kategorie „neurčitý pro dysplázii“ (indefinite for dysplasia) od LG dysplázie zatíženo nízkou shodou dokonce i mezi erudovanými gastrointestinálními patology. [10]

Rozlišení IBD dysplázie od konvenčního adenomu může být obdobně obtížné jako předchozí situace, je nicméně velice důležité vzhledem k odlišnému terapeutickému řešení obou lézí. V dané situaci je možné se řídit několika pomocnými diagnostickými parametry jako je věk pacienta, lokalizace dysplastické léze a morfologie endoskopická i mikroskopická. Konvenční adenomy obvykle vyrůstají proximálně od zánětlivě změněné části kolon a představují ostře ohraničenou lézi tvořenou stejně velkými dysplastickými žlázkami bez přilehlé ploché dysplázie v okolí. Pacienti jsou obvykle starší 60 let s kratším trváním onemocnění a v neaktivním stadiu. [10–11] Naopak pro IBD dysplázii je typický nižší věk pacientů, delší trvání, větší rozsah postižení střeva a aktivita IBD. Dysplastické žlásky v rámci IBD dysplázie jsou pak nepravidelné, různě velké a mohou se střídát s nepostiženými žlázkami v hloubce sliznice i s fokusy nedysplastického epitelu při povrchu. [10–11]

Tato kritéria lze použít jak pro UC, tak pro CD. Endoskopické odběry okolní ploché sliznice a nálezu chronického zánětu a dysplastických změn mohou podpořit diagnózu IBD dysplázie vznikající v zánětlivém terénu.

Neméně důležité je nicméně i rozlišení low-grade a high-grade dysplázie z důvodu odlišných rizik pro rozvoj KRK. U pacientů s HGD především v plochých nebo neviditelných lézích byl prokázán synchronní nebo časně navazující karcinom až u 42–67 % případů [11] Naopak progresse LGD je nižší a riziko vzniku KRK je popisováno u menšího počtu pacientů (3–8 %). [11] Nicméně faktory, které ovlivňují progresi LGD do HGD nebo KRK, jsou především makroskopicky nepolypoidní (plochá nebo neviditelná) charakter léze, rozsah dysplastické léze větší než 1 cm a opakovaná diagnóza „nejistý pro dysplázii“ v předchozích endoskopických vyšetřeních. [28]

Některé studie se ve snaze o zlepšení diagnostiky zaměřují na identifikaci pomocných vyšetření pro detekci IBD-dysplázie a odlišení od nedysplastického epitelu nebo sporadických adenomů. Nejvíce studovaným vyšetřením je imunohistochemická detekce exprese p53 v dysplastickém epitelu kopírující genetické změny při rozvoji IBD dysplázie. Aberantní

exprese p53 je nicméně detekována pouze v části případů dysplázie, může být zastižena i v malém procentu regenerativních změn a je nutné tedy takové vyšetření interpretovat s vysokou obezřetností. [10] Téma je dále podrobněji diskutováno v kap. 4.5.1.

Celkově je nicméně rozlišení tíže dysplázie, typu léze (sporadický adenom versus dysplázie u IBD) a regenerativních změn zásadní pro rozhodování ohledně dalšího terapeutického postupu, včetně určení četnosti kontrolních endoskopických vyšetření, nebo pro rozhodování o následné chirurgické léčbě včetně profylaktické kolektomie, která je indikována u pacientů s detekovanou high-grade IBD dysplázií. [5–6, 10]

4.2. PILOVITÉ LÉZE GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU

Pilovité neboli serrated léze gastrointestinálního traktu představují heterogenní skupinu lézí charakterizovaných pilovitým nebo hvězdovitým uspořádáním žlázové epiteliální komponenty v podélném, resp. příčném řezu. Pilovitá změna vzniká v důsledku zvýšené proliferace epitelu bez adekvátní apoptózy části enterocytů, které pak exofyticky prominují do lumen krypty a mění tak tubulární vzhled žlázek na pilovitý, resp. hvězdovitý na příčném řezu. Hlavní skupinu pilovitých lézí představují pravé pilovité polypy, v současné době definované dle stále platné WHO klasifikace pro nádory gastrointestinálního traktu [29], které jsou podrobně popsány v samostatné části 4.2.1. a jejichž vztah k idiopatickým střevním zánětům (IBD) bude komentován následně v kapitole 4.4.1.

Druhou, početně menší skupinu tvoří pouze slizniční změny s pilovitým vzhledem, které ale nesplňují kritéria pro pravé polypy. V rámci gastrointestinálního traktu je jim v současné době věnována větší pozornost u pacientů s idiopatickými střevními záněty (IBD), a to včetně studia jejich možného nádorového potenciálu. Tato skupina nekonvenčních slizničních lézí obsahuje hlavní dvě léze pojmenované ve studiích nejčastěji jako pilovitá epiteliální změna (serrated epithelial change, SEC) a vilózní hypermucinózní změna. Tyto léze budou popsány v kapitole 4.4.2. přímo ve vztahu k IBD.

4.2.1. Pravé pilovité polypy – morfologické charakteristiky dle platné WHO klasifikace a vztah k dysplázii

Pravé pilovité polypy rozdělujeme v současné době na tři hlavní kategorie: 1. hyperplastický polyp (HP); 2. sesilní pilovitý polyp/adenom (SSA/P) a 3. tradiční pilovitý adenom (TSA). Toto rozdělení pilovitých polypů bylo oficiálně zakotveno až ve WHO klasifikaci tumorů gastrointestinálního traktu z roku 2010. [29] Před touto klasifikací existovalo pouze rozdělení na hyperplastický polyp a adenomatózní léze, a to včetně tzv. pilovitého adenomu (serrated adenoma) v rámci předchozí WHO klasifikace vydané v roce 2000. [30] V posledních zhruba 20 letech došlo k rozsáhlé reklasifikaci pilovitých lézí včetně nové či upravené nomenklatury, definování jejich molekulárních vlastností a přehodnocení vztahu těchto lézí k hereditárním polypózám a kolorektálnímu karcinomu.

Vlastnosti pilovitých polypů včetně molekulárních charakteristik jsou shrnuty v Tabulce 1. Molekulární změny v PPP jsou v této kapitole pouze stručně zmíněny a budou dále podrobněji popsány ve vztahu k rozvoji KRK v kapitole 4.3.2.

Tab. 1: Typy pilovitých polypů, jejich molekulární vlastnosti a vztah ke KRK

| Typ pilovitého polypu, podíl ve skupině | Velikost v mm | Lokalizace v rámci GIT | Dysplázie | Molekulární vlastnosti | Asociace se syndromem | Asociace s KRK |
|---|-------------------------------|-------------------------------------|--|---|-----------------------|----------------|
| HP (~ 75 %) | < 5 mm | rektum | ne | MVHP – mutace <i>BRAF</i> GCHP – mutace <i>KRAS</i> , <i>CIMP-H</i> | ano – SPS, MAP | minimální |
| SSA/P (15–25 %) | > 5 mm, plošné léze nad 10 mm | proximální (pravostranné) kolon | bez nebo s, LGD/HGD 1. pilovitý typ 2. konvenční typ | mutace <i>BRAF</i> , <i>CIMP-H</i> , *metylace <i>MLH1</i> , <i>p16</i> a <i>MGMT</i> , SSA–D MSI | ano – SPS, MAP, FAP | ano |
| TSA (< 1 %) | > 5 mm, ~ 30 % nad 10 mm | distální kolon – rektum, rektosigma | ano LGD/HGD | #mutace <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , * <i>CIMP-H</i> – metylace <i>MLH1</i> , <i>MGMT</i> | SPS | ano |

* obvykle v pokročilých lézích s dysplázií (SSA-D nebo TSA s HGD)

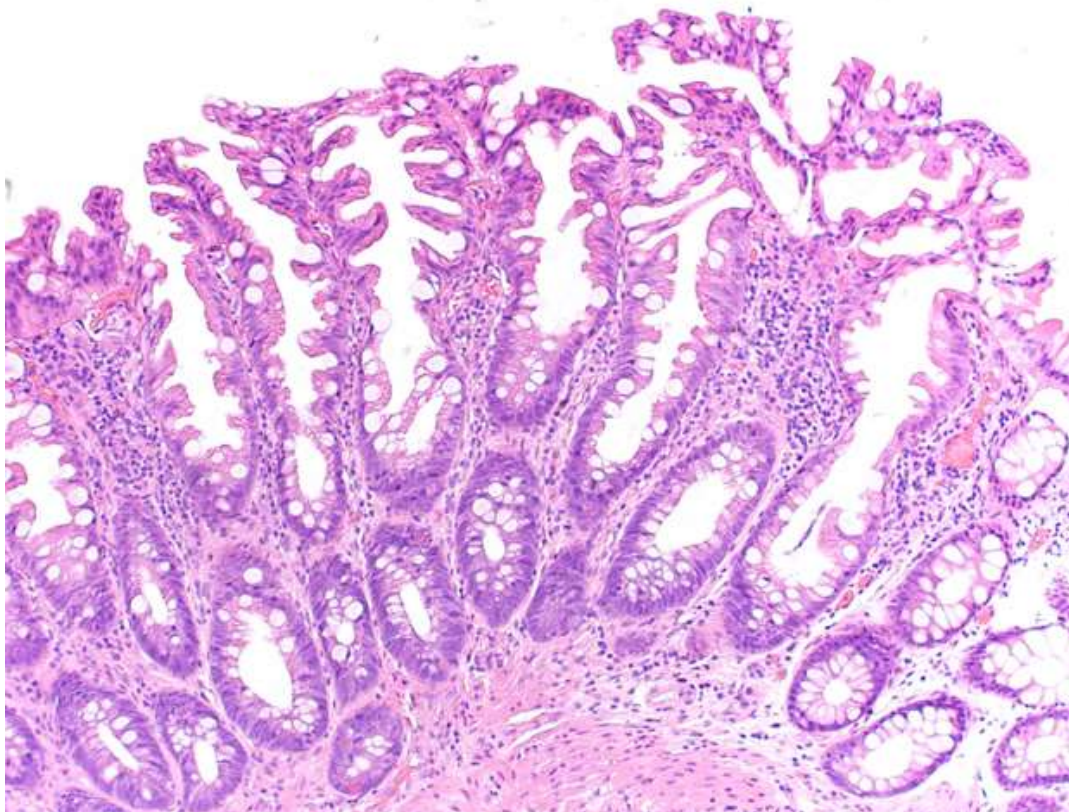
vzhledem k raritnosti rozdílné výsledky studií stran mutačního stavu *KRAS/BRAF* a *MLH1* metylace

Zkratky: CIMP-H – vysoký stupeň hypermetylace CpG ostrůvků; FAP – familiární adenomatózní polypóza; GIT – gastrointestinální trakt; GCHP – hyperplastický polyp bohatý na pohárkové buňky; HGD – high–grade dysplázie; HP – hyperplastický polyp; KRK – kolorektální karcinom; LGD – low–grade dysplázie; MAP – MUTYH asociovaná polypóza; MVHP – mikrovesikulární hyperplastický polyp; SPS – syndrom polypovité polypózy; SSA/P – sesilní pilovitý adenom/polyp; SSA-D – sesilní pilovitý adenom s dysplázií; TSA – tradiční pilovitý adenom

4.2.1.1. Hyperplastický polyp (HP)

Hyperplastické polypy (dříve nazývané metaplastické) jsou nejdéle známou lézí a nejčastěji se vyskytují v distálním kolon a mohou být vícečetné. Velikostně se pohybují mezi 1 až 5 mm a obvykle nepřesahují rozměr 10 mm. Histologicky je možné dále HP rozdělit do dalších podtypů podle vzhledu a množství pohárkových buněk na HP bohatý na pohárkové buňky (goblet cell rich, GCHP), mikrovesikulární HP (MVHP) a na hlen chudý HP (mucin-poor, MP/HP). Klinický význam tohoto rozdělení je však minimální. Histologicky jsou HP tvořeny prodlouženými rovnými kryptami s různým stupněm pilovitých změn. Pilovité formace jsou v horních dvou třetinách krypty, tato část je také lehce dilatovaná. Proliferace, včetně případné mitotické aktivity, je patrná v dolní třetině krypt, baze krypt jsou úzké a obsahují hojně neuroendokrinní buňky. Jádra MVHP a GCHP jsou obvykle blandního vzhledu (Obr. 2). HP chudý na mucin vykazuje jaderné atypie spíše reaktivního typu. Dysplázie patrná není. Hyperplastické polypy obvykle vykazují vysoký stupeň metylací CpG ostrůvků v promotorech různých genů (CIMP-H), v hyperplastických polypech mikrovesikulárního typu je obvykle zastižena mutace genu *BRAF*. HP bohaté na pohárkové buňky jsou častěji mutovány v genu *KRAS*. [29, 31]

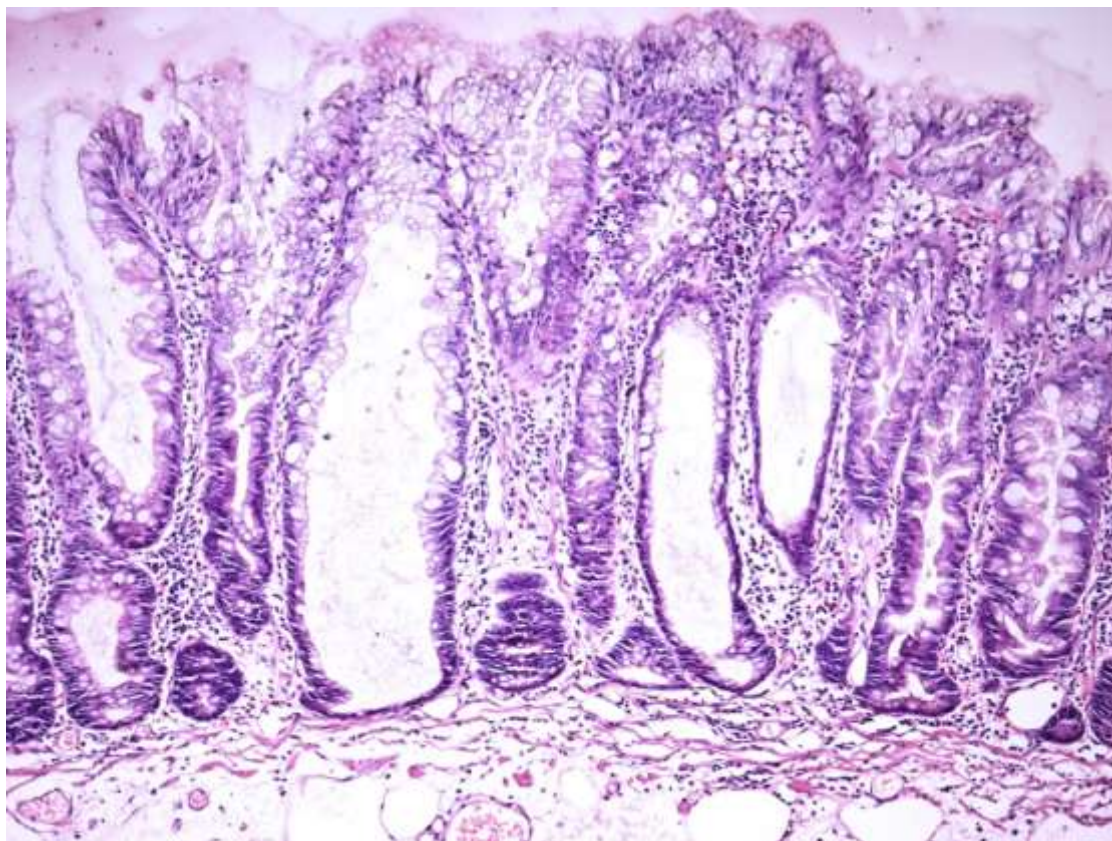
Obr. 2: Hyperplastický polyp. Pilovité změny jsou zastiženy pouze v horní polovině krypt, dysplastické změny zastiženy nejsou. Barvení hematoxylin-eosin (HE), zvětšení 40x.



4.2.1.2. Sesilní pilovitý adenom/polyp (SSA/P, bez dysplázie a s dysplázií)

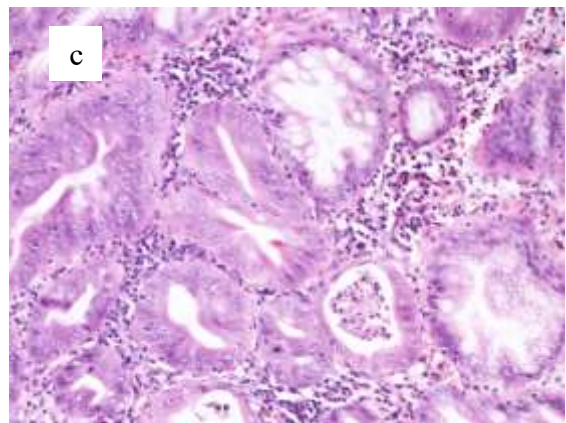
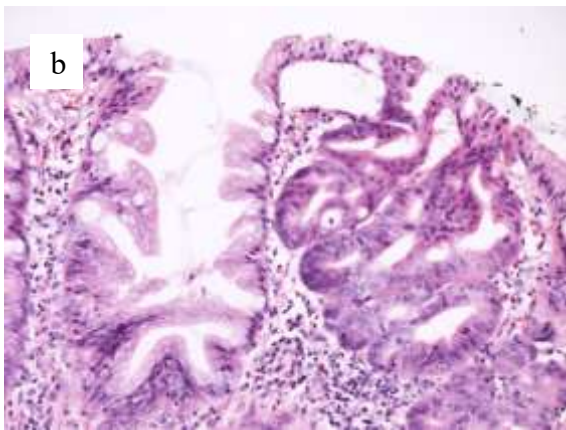
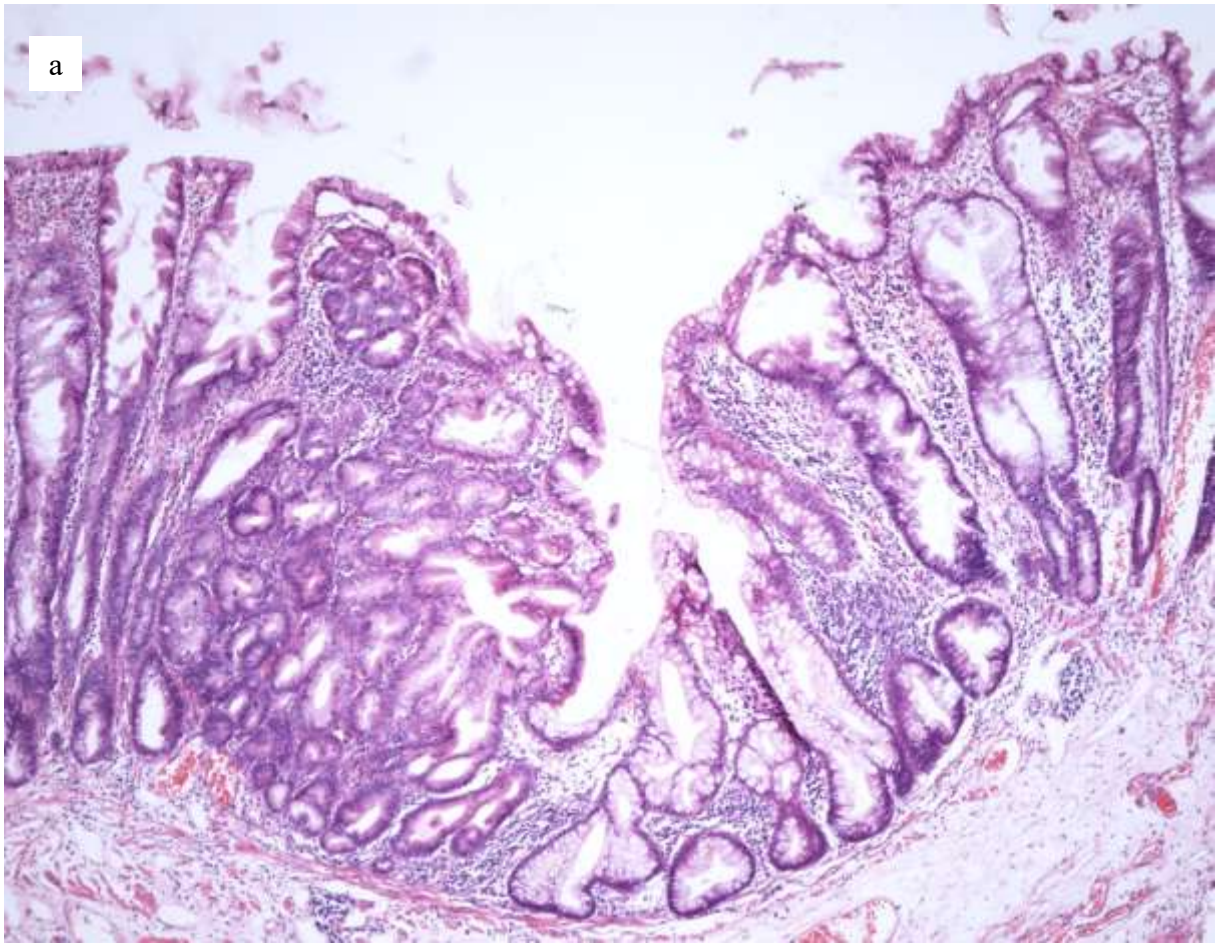
Sesilní pilovitý adenom/polyp byl de facto terminologicky definován poprvé v roce 1996 v rámci studie případů nově popsané pilovité polypózy autory Torlakovic et al. [32] a do té doby byla patrně většina SSA/P hodnocena jako HP nebo v případě přítomné dysplázie jako pilovitý adenom dle WHO klasifikace z roku 2000. [30] Dle současných znalostí tvoří SSA/P zhruba 15–25 % ze skupiny pilovitých adenomů a vyskytuje se především v proximální části kolon. Jedná se o přisedlé léze obvykle větší než 5–10 mm, mohou se však vyskytovat i větší plošné léze. Užití názvu adenom/polyp odráží rozdílné názory na pojmenování této léze, která v základu vykazuje blandní jaderné vlastnosti a část autorů nepovažuje za vhodné užití názvu adenom při nepřítomnosti dysplastických změn. Histologicky je SSA/P obvykle plochá léze s prodlouženými kryptami s výraznou pilovitou změnou. Na rozdíl od HP jsou pilovité formace patrné v celé délce krypty. Proliferační zóna není umístěna do baze krypty, ale obvykle laterálně a krypty jsou asymetrické. Baze krypt jsou navíc dilatované až cysticky rozšířené nebo jeví laterální protruze do tvaru písmene „L“ nebo obráceného písmene „T“. Jádra SSA/P mohou být nenápadná a blandní nebo vykazovat různý stupeň atypií (vezikulární jádra) a mohou mít patrná jádérka. Některé léze obsahují dystrofické pohárkové buňky a typická je ztráta neuroendokrinních buněk z krypt. Mitotická a proliferační aktivita může být přítomna v kterékoliv části polypu včetně horní třetiny, často asymetricky a nepravidelně. [33] Lézi lze klasifikovat jako SSA/P, pokud alespoň dvě až tři sousední krypty vykazují výše uvedené změny (Obr. 3). [29, 31]

Obr. 3. Sesilní pilovitý adenom/polyp bez dysplázie (SSA/P). Barvení HE, zvětšení 40x.



Submukóza u některých SSA/P vykazuje nápadnou lipomatózní přeměnu. Vcelku častým nálezem je protruze bazálních žlázek přes muscularis mucosae pod obrazem tzv. pseudoinvaze nebo invertovaného typu růstu. [31] Dysplázie se u SSA/P vyskytuje ve dvou morfologických variantách. První a častější je adenomatózní dysplázie typická pro sporadické konvenční adenomy s protáhlými hyperchromními jádry, úbytkem hlenu a bazofilní cytoplazmou. Tyto léze se pak nazývají SSA s cytologickou dysplázií (SSA-D). SSA/P s fokusy konvenční (tubulární nebo tubulovilózní) adenomatózní dysplázie představují stupeň v rámci progresu do KRK. [31] Druhou formou dysplázie je tzv. pilovitá (serrated) dysplázie s proliferací kuboidálních buněk s hojnou eozinofilní cytoplazmou, se zvětšenými atypickými vezikulárními jádry a s prominentním jadérkem (Obr. 4). Přestože je tento typ dysplázie méně častý, je některými autory považován také za histologický biomarker progresu do KRK. [34] SSA/P jsou podobně jako HP obvykle spojeny s hypermetylacemi CpG ostrůvků, mutacemi v genu *BRAF* a případně s mikrosatelitní nestabilitou (MSI), a to u SSA s cytologickou dysplázií (SSA-D). [29, 31, 35]

Obr. 4: SSA/P s cytologickou dysplázií pilovitého typu, a – léze v přehledném zvětšení, b, c – detaily dysplastických změn ve stejné lézi. Barvení HE, zvětšení 40x (a) a 200x (b, c).

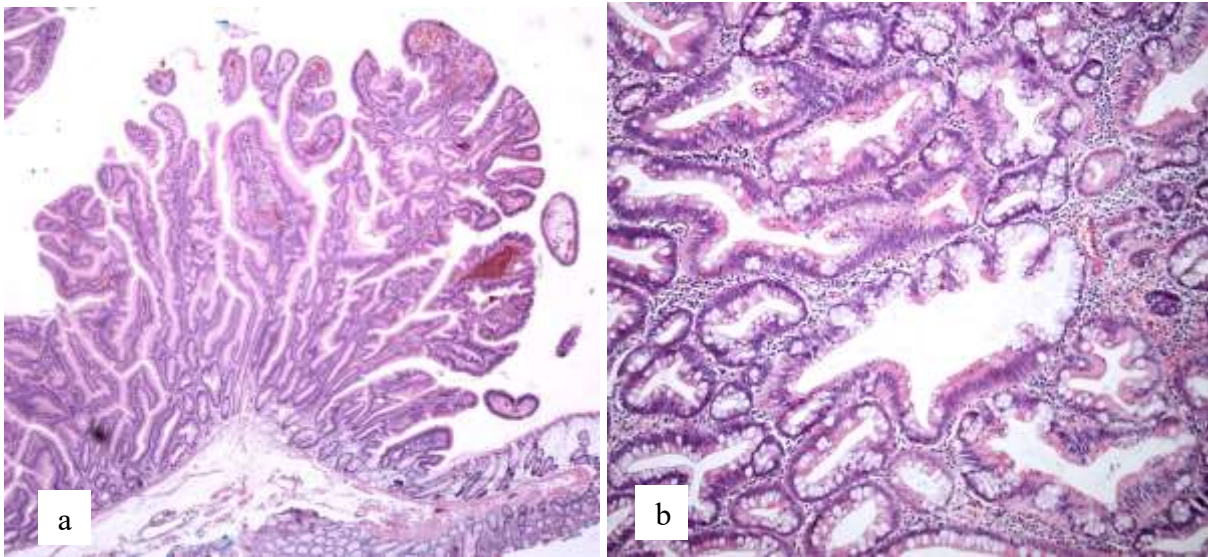


4.2.1.3. Tradiční pilovitý adenom (TSA)

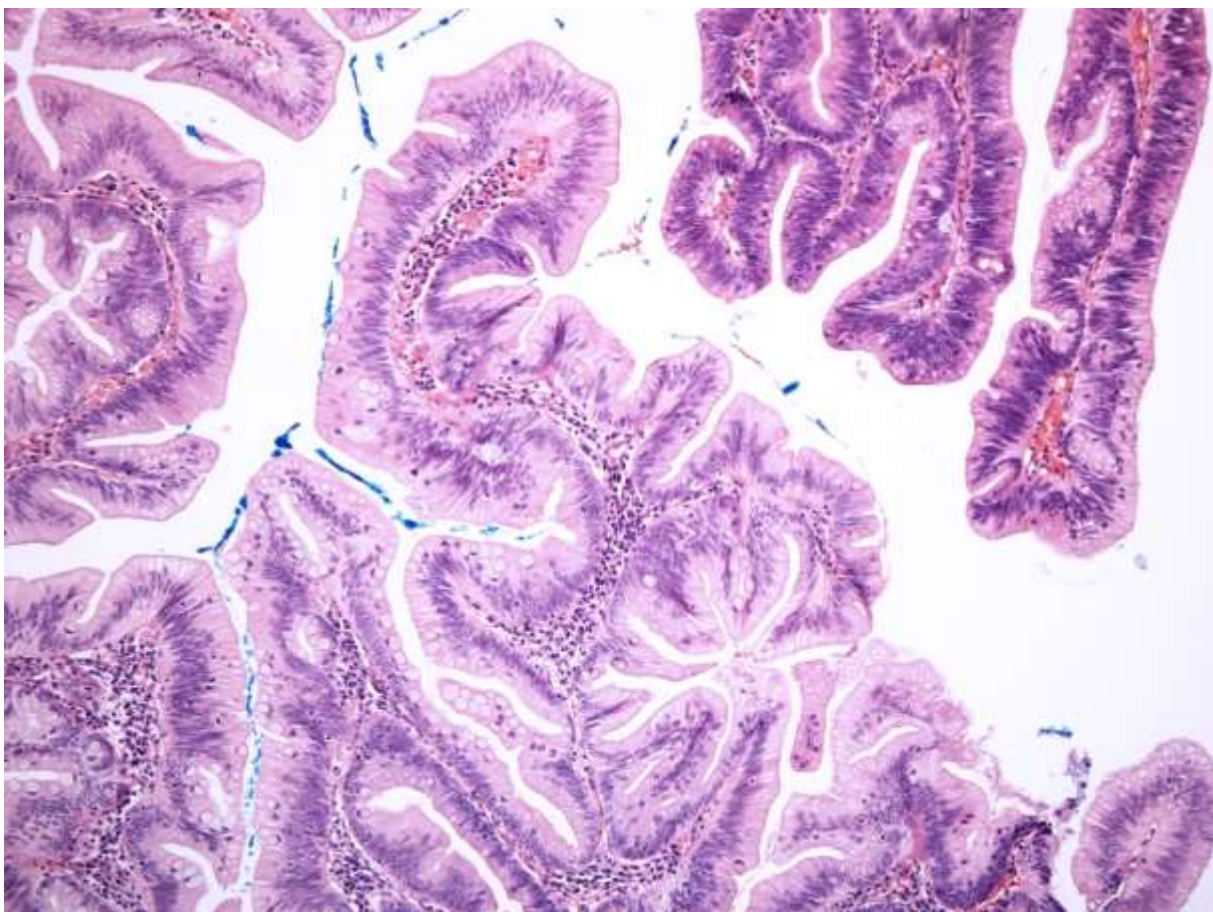
Tradiční pilovitý adenom je nejméně častý a tvoří zhruba 1 % z pilovitých polypů. Původní termín „pilovitý adenom (serrated adenoma)“ dle WHO klasifikace z roku 2000 patrně zahrnoval většinu lézí dnes klasifikovaných jako TSA, ale také SSA s dysplázií a konvenční adenomy s podílem pilovité architektiky. Za první popis TSA se považuje skupina 110 lézí popsanych v roce 1990 v rámci studie Longacre et al. [36] jako smíšené hyperplastické adenomatózní polypy/pilovité adenomy. V této studii byla zdůrazněna jejich predilekční lokalizace v rektosigmatu a větší velikost, pilovitá morfologie a asociace s dysplázií a možnou progresí do adenokarcinomu a bylo doporučeno považovat je za samostatnou jednotku. [36]

TSA se vyskytuje nejčastěji v distálním kolon s převahou v rektu a dosahuje obvykle velikosti větší než 5 mm, průměrně ale okolo 10 mm. Histologicky se jedná o komplexní, někdy protuberantní a lobulovanou lézi s viliformním růstem a cylindrickými epitelii s protáhlými až tužkovitými jádry a cytologickými známkami „dysplázie“, které jsou ale odlišné od konvenční dysplázie. Tyto úseky nejevují nápadnou proliferaci aktivitu a je stále kontroverzní otázkou, zda spíše nepředstavují metaplázii nebo senescentní populaci buněk. [31] Další morfologickou změnou, která představuje nejvýznamnější rozdíl oproti HP a SSA/P, je tzv. tvorba ektopických krypt (ECF, ectopic crypt formation). (Obrázek 5 a, b) Tvorba ECF vzniká na základě ztráty kotvení baze krypt k muscularis mucosae a do oblasti ECF je obvykle směřována i vyšší proliferace v Ki-67. [37] Podtypem TSA je tzv. filiformní pilovitý adenom s nápadně štíhlými epitelii a nápadně eosinofilní cytoplazmou. Při progresi se v TSA objevuje dysplázie jak konvenčního, tak pilovitého typu (Obr. 6). TSA mohou vykazovat mutaci v genu *KRAS* nebo *BRAF*, s progresí dysplázie stoupá frekvence hypermetylací CpG ostrůvků. [31,35]

Obr. 5: Tradiční pilovitý adenom (TSA), a – celá léze v přehledném zvětšení, b) s detailem na tvorbu ektopických krypt (ECF) Barvení HE, zvětšení 20x (a) a 100x (b).



Obr. 6: Tradiční pilovitý adenom (TSA) s konvenční adenomatózní dysplázií (vpravo nahoře). Barvení HE, zvětšení 100x.



4.2.1.4. Pilovité adenomy a pilovité polypózy

Pilovité adenomy jsou součástí několika definovaných familiárních polypózních syndromů. HP se může vyskytovat jako součást syndromu pilovité polypózy (SPS) stejně jako SSA/P, který navíc může být zachycen i u pacientů s familiární adenomatózní polypózou (FAP). Dále se HP a SSA/P vyskytují jako součást tzv. MUTYH-asociované polypózy (MAP). Gen *MUTYH* je lidský homolog genu *Escherichia coli* mutY. Gen *MUTYH* je zodpovědný za opravy DNA v rámci excize bazí (BER - base excision repair) a mutace v tomto genu vedou k navýšení počtu nukleotidových transverzí G:C > T:A v tumor supresorových genech. Mezi geny postižené transverzními mutacemi patří jak *APC*, tak *KRAS*. Asociace TSA se syndromy je nejméně častá, vzácně jsou TSA popsány u SPS, v některých studiích jsou ale přiznány limitace stran histologických kritérií. [38]

4.2.1.5 Pilovité změny v konvenčních adenomech

Konvenční adenomy představují premaligní léze střevní sliznice charakterizované tubulárním, tubulovilózním nebo vilózním růstem a s low-grade nebo high-grade dysplastickými změnami v epitelu. Podle množství tubulárních a vilózních struktur se pak konvenční adenomy dělí na tubulární adenom (> 75 % tubulů, TA), tubulovilózní adenom (25–75 % tubulárních a vilózních struktur ve směsi, TVA) nebo vilózní adenom (> 75 % vilózních struktur, VA). Tyto adenomy představují prekurzorovou lézi pro kolorektální karcinom s tzv. konvenční molekulární dráhou vzniku karcinomu (viz níže) a jsou nejčastěji spojeny s mutacemi v genech *APC*, *DCC*, *DPC4* či *KRAS* (viz níže). Hlavními znaky, kterými se odlišují od pilovitých polypů je okrouhlý tvar žlázek případně rovné vilózní formace. Hvězdovitý tvar žlázek, dilatace krypt při bazi nebo nápadná eozinofilie cytoplazmy v konvenčních adenomech obvykle chybí. [29, 35]

Léze, které obsahovaly jak pilovité formace, tak konvenční dysplastické změny v části žlázek se starší literatuře včetně WHO klasifikace z roku 2000 označovaly jako smíšené (mixed) polypy. [30] Část z těchto lézí nicméně představovala slizniční prekurzory, které bylo možné po reklasifikaci zařadit do skupiny plochého pilovitého adenomu/polypu s konvenční dysplázií (SSA-D) nebo mezi tradiční pilovité adenomy (TSA). Terminologie používající pojem smíšená léze není dle recentní WHO doporučována. [29]

Nicméně stále se vyskytují případy adenomů, ve kterých převažuje morfologie konvenčního adenomu (nejčastěji tubulovilózního), ve kterých se současně mohou vyskytovat minoritní pilovité změny. Tyto léze, pojmenované autory Bettington et al. [39] jako tubulovilózní

adenom s pilovitými formacemi, resp. pilovitý tubulovilózní adenom (sTVA), jsou charakterizovány vilózními výběžky, výrazným větvením, undulujícím povrchem proliferujícího epitelu a tvorbou ektopických formací. Zároveň v nich však chybí cytologické znaky typické pro TSA s hypereozinofilní cytoplazmou, štěrbinovité pilovité proliferace a jemná protáhlá jádra. Tyto léze vykazovaly vyšší výskyt mutací v genu *KRAS* oproti konvenčním TVA a častější aberantní nukleární expresi beta-cateninu a vyšší výskyt mutací genu *MGMT* oproti TSA. [39]

4.3. KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

4.3.1. Základní klinické a morfologické charakteristiky KRK

Kolorektální karcinom je jednou z nejčastějších onkologických diagnóz v České republice (ČR) a celosvětově je ČR na 6. místě v incidenci tohoto onemocnění. Ročně je v ČR téměř 8000 nových případů. [40]

Morfologie patří mezi základní definující parametr diagnózy karcinomu. Jednotlivé histologické podtypy karcinomu jsou hodnoceny podle dosud platné Klasifikace nádorů gastrointestinálního traktu Světové zdravotnické organizace vydané v roce 2010 (WHO 2010). [29] Nejčastějším histologickým typem je adenokarcinom, blíže nespecifikovaný (NOS), s charakteristickým glandulárním, resp. tubulárním růstem. Důležité je odlišení dalších podtypů adenokarcinomu, kam patří mucinózní karcinom, karcinom z prstěncitých buněk (signet ring cell carcinoma), medulární karcinom, pilovitý karcinom, kribriformní karcinom komedonového typu a mikropapilární karcinom. Mezi méně časté typy patří adenoskvamózní karcinom, dlaždicobuněčný karcinom, vřetenobuněčný karcinom a nediferencovaný karcinom.

Podkladem gradingu adenokarcinomů tlustého střeva je zhodnocení podílu žlázových (resp. tubulárních) formací v karcinomu. Morfologický grading se týká pouze karcinomů ze skupiny adenokarcinom, NOS. Grading rozdělujeme na numerický (1–4) nebo deskriptivní (low-grade, high-grade). Histologický grade 1 je tvořen z více než 95 % žlázovými formacemi, pokud je žlázové komponenty 50–95 %, jedná se o grade 2. Grade 1 a 2 spadají do low-grade deskriptivní kategorie. Karcinomy grade 3 (high-grade) jsou tvořeny méně než 49 % žlázových struktur. Samostatnou kategorií grade 4 představuje nediferencovaný karcinom bez tvorby žlázek, s produkcí hlenu, nebo neuroendokrinní, sarkomatoidní či dlaždicobuněčnou diferenciací. Do deskriptivní kategorie low-grade pak spadají adenokarcinomy s prokázanou vysokou mikrosatelitní nestabilitou (MSI-H). [29]

Na některé z výše uvedených podtypů nelze vždy jednoznačně aplikovat klasický grading, který nemusí korelovat s biologickým chováním. Některé morfologické varianty mají svůj vlastní prognostický význam, který může být případně vázaný i na molekulární vlastnosti nádoru. Příkladem morfologické a biologické diverzity je mucinózní karcinom, který patrně představuje dvě heterogenní jednotky s odlišným biologickým chováním dle MSI statusu nebo medulární karcinom, který morfologicky splňuje kritéria grade 3 léze, ale má paradoxně příznivější biologické chování, či mikropapilární karcinom, který vykazuje horší pětileté

přežití bez ohledu na MSI status. [41]

I přes aktivní screeningový program a sledování rizikových pacientů je diagnostikováno přes 60 % pacientů s KRK ve vyšších klinických stádiích (II–IV, data Systém pro vizualizaci onkologických dat SVOD) s relativním kumulativním pětiletým přežitím dosahujícím 56 %. [40] Pětileté přežití pacientů je nejhorší pro stadium IV (11,5 %), pro stadium III je 53,5 %, pro stadium II je 73,2 % a nejlepší je pro stadium I – 86,5 %. [42] Nicméně téměř pětina pacientů je diagnostikována ve stadiu II, které představuje heterogenní skupinu s odlišným terapeutickým přístupem od sledování až po indikaci chemoterapie a s odlišným přežitím i v jednotlivých podstádiích (IIA–IIC) a paradoxně s horším přežitím stadia IIB/C oproti stadiu IIIA. [43–44] Právě pro stadium II je nutné identifikovat rizikové faktory (pozitivní nebo neurčený stav resekcčních okrajů, obstrukce, perforace střeva nádorem, nízká diference nádoru, mucinózní složka, nedostatečný počet vyšetřených lymfatických uzlin (méně než 12), lymfatická a/nebo vaskulární a/nebo perineurální invaze), na jejichž základě je pacient zařazen do high-risk skupiny s indikovanou adjuvantní terapií. [45]

Identifikace faktorů, které ovlivňují riziko uzlinových nebo vzdálených metastáz, riziko relapsu, případně jinak ovlivňují prognózu, anebo mající vliv na terapeutickou odpověď, je důležitá ve všech stádiích. Tyto faktory se mohou kombinovat a mohou pomoci lépe stratifikovat pacienty i v rámci jednotlivých stadií s modifikací terapeutické strategie.

4.3.2 Molekulární vlastnosti KRK a dráhy kancerogeneze

V rámci molekulárních alterací, které jsou i podkladem drah vedoucích ke vzniku kolorektálního karcinomu, lze odlišit tři hlavní změny dle úrovně, na které vznikají. Jedná se o **1. chromozomální instabilitu** s mutacemi v genech jako *APC*, *PTEN*, *DPC4*, *KRAS/NRAS* nebo *BRAF*; o **2. mikrosatelitní nestabilitu** s mutacemi v mikrosatelitních nukleotidových repetitivních sekvencích různých genů a s nefunkčním systémem zodpovědným za opravu drobných mutací v DNA, tzv. mutation mismatch-repair genech (MMR), z nichž hlavní geny (a přidružené funkční proteiny) jsou *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* a *MSH6* a o **3. hypermetylace CpG ostrůvků** (CIMP) nejčastěji tumor supresorových genů, která vede ke snížení transkripce genu a ztrátě funkce daného genu resp. jeho proteinu. Metylace CpG ostrůvků může být také příčinou ztráty funkce genu *MLH1*. [35, 46]

Podrobné studium molekulárních změn u familiárních i sporadických konvenčních a pilovitých prekurzorových lézí a přidružených karcinomů umožnilo postulovat několik drah vedoucích ke vzniku KRK. V rámci daných drah obvykle převažuje jeden typ genetických změn, které se ale vzájemně nevylučují a kombinace změn, tedy chromozomální či mikrosatelitová nestabilita anebo genové hypermetylace je možná. [35, 46–47]

Následující podkapitoly stručně popisují jednotlivé dráhy kancerogeneze, podrobnější charakteristika markerů vyšetřovaných v rámci této práce je uvedena v kapitole 4.5.

4.3.2.1. Konvenční dráha kancerogeneze – dráha chromozomální instability

Tzv. konvenční dráha kancerogeneze KRK sleduje sekvenci konvenční adenom – karcinom a je nejčastější dráhou s výskytem u cca 60 % karcinomů. [47–48] Touto dráhou vznikají sporadické i familiární adenomy (FAP) a karcinomy se změnami převážně na úrovni chromozomální instability v genech jako *APC*, *KRAS*, *DCC* a *TP53*. V rámci této dráhy je kombinována inaktivace tumor supresorových genů a aktivace onkogenů. Prvním krokem je inaktivace genu *APC*, která vede k rozvoji adenomů. U FAP je tato mutace germinální a adenomů vzniká velký počet v řádech stovek lézí, a to již v dětském věku. V další fázi pak mutace v genu *KRAS* indukuje růst adenomu. Progrese adenomu s rozvojem high-grade dysplázie vzniká na podkladě ztráty heterozygoty (LOH) v oblasti dlouhého raménka chromozómu 18 (18q), kde se nacházejí geny *DCC* a *SMAD4*. Mutace v genu *TP53* jsou pak považovány za jednu z posledních molekulárních změn v konvenčních adenomech před progresí do invazivního KRK. Karcinomy vznikající konvenční cestou jsou pak většinou

mikrosatelitně stabilní (MSS) a nevykazují žádné nebo minimální známky hypermetylace CpG ostrůvků (CIMP-negativní nebo CIMP-L). [35, 46, 48]

4.3.2.2. Mikrosatelitní nestabilita a KRK

Mikrosatelity jsou oblasti DNA bohaté na krátké tandemové repetitivní sekvence (short tandem repeats, STR) tvořené 1–6 bp (base pair, páry bází), které jsou rozmístěny v celém genomu a vyskytují se jak v kódujících, tak v nekódujících oblastech. Repetitivní sekvence jsou výrazně náchylné na mutace, které jsou za fyziologického stavu opraveny pomocí DNA mismatch-repair systému. [46, 49] Defekt v MMR systému vedoucí k nestabilitě oblastí s DNA mikrosatelity se vyskytuje asi u 15 % sporadických kolorektálních karcinomů a ve více než 95 % případech Lynchova syndromu (LS). [46, 48, 50] U karcinomů v rámci LS je přítomna germinální mutace obvykle v *MLH1* nebo *MSH2*, jsou obvykle CIMP-negativní a nevykazují mutace genu *BRAF*. Progrese adenomu s rozvojem dysplázie je spojena se ztrátou funkce zbývající alely MMR genu či mutací v genu *TP53*. [35] Mutace v genu *KRAS* se u karcinomů vzniklých v rámci Lynchova syndromu vyskytují v cca 35–40 % případů. [51–52] U sporadických karcinomů je podkladem nefunkčního systému ztráta funkce genu *MLH1* epigenetickou cestou metylace jeho promotoru. Více než 80 % MSI-H KRK pak vykazuje mutace v genu pro TGF- β receptor II (TGF- β RII). Tato mutace je přítomna již v adenomech s high-grade dysplazií a progresí do KRK. [46] U sporadických MSI-H karcinomů může být dále přítomna mutace V600E mutace v genu *BRAF* nebo mohou vykazovat vysoký stupeň metylací CpG ostrůvků (CIMP-H). [46, 48]

4.3.2.3. CIMP, pilovité polypy a pilovitá dráha kancerogeneze

CpG ostrůvky jsou dinukleotidové sekvence lokalizované v oblasti promotorů genů zapojených do regulace buněčného cyklu, apoptózy, angiogeneze či oprav DNA. Aberantní hypermetylace CpG ostrůvků je spojena se ztrátou genové exprese vedoucí ke ztrátě funkce přidruženého proteinu. Tzv. metylátorový fenotyp (CpG island methylator phenotype, CIMP) je prokazatelný v cca 20–30 % kolorektálních karcinomů a je často ve vazbě na prekurzorové pilovité polypy (SSA/P, TSA). [35, 36, 53] Dráha s vysokým stupněm metylace CpG ostrůvků (CIMP-H) může být u sporadických karcinomů spojena s mutacemi v genech *KRAS* nebo *BRAF*. [53]

Jedná se de facto o dvě dráhy. První je spojena s mutací v genu *BRAF*, která se vyskytuje u SSA/P a u mikrovesikulárních HP. V rámci progrese SSA/P do dysplastické, resp.

prekancerózní léze jsou pak popisovány především CpG metylace v genu pro *MLH1*, *p16* a *MGMT*. V případě hypermetylace genu *MLH1* se pak jedná o mikrosatelitně nestabilní karcinomy. [48, 54]

Druhá dráha sleduje progresi tradičního pilovitého adenomu, který vykazuje mutace v genu *KRAS* a při progresi dysplázie je u pokročilých lézí zastižen převážně nízký stupeň hypermetylací CpG ostrůvků (např. v genu *MGMT*). [35, 46, 53] Jiné studie prokázaly u TSA i mutace v genu *BRAF* a ztrátu funkce genu *TP53* u pokročilých lézí. [55–56]

4.3.3.4. Molekulární charakteristiky KRK asociovaného s IBD

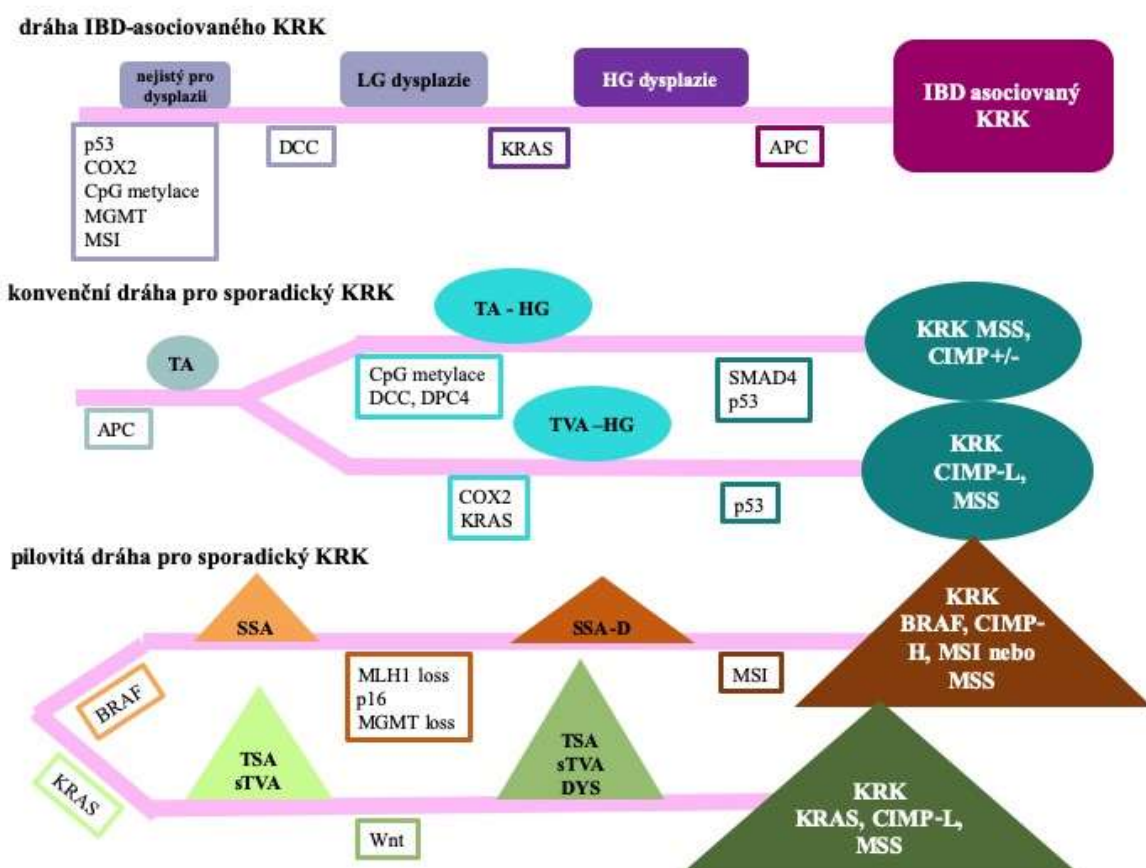
Sliznice pacientů s idiopatickým střevním zánětem je z dlouhodobého hlediska vystavena vysokému oxidačnímu stresu z důvodu trvající zánětlivé aktivace. Dlouhodobá aktivace signálních drah jako dráha cyclooxygenázy-2 (COX2) nebo nukleárního faktoru kappaB (NF-κB) vede k zesílení produkce prozánětlivých faktorů a vyššímu oxidativnímu stresu a zároveň aktivaci anti-apoptotické signalizace. Oxidativní poškození DNA a DNA metylace může vést k inhibici tumor supresorových proteinů jako je např. p53. Dalšími prokarcinogenními faktory jsou aneuploidie nebo rozvoj mikrosatelitní nestability. [57] Mikrosatelitní nestabilita i chromozomální nestabilita mohou být navíc prokázány již ve sliznici bez dysplastických změn, a to především u pacientů s UC. [57–58] Rozvoj mikrosatelitní nestability navíc u pacientů s IBD opět vzniká na základě vyššího oxidativního stresu a poškozením reaktivními kyslíkovými radikály. Dalším faktorem je hypermetylace genů, resp. jejich promotorů, která u IBD pacientů postihuje jednak gen *MLH1* (a představuje tedy jednu z cest k mikrosatelitní nestabilitě) a dále geny jako *MGMT*, *RUNX3* atd. Stejně jako u sporadických adenomů a karcinomů jsou pak u IBD-asociovaného karcinomu přítomny změny v genech jako *APC*, *TP53*, *bcl2* nebo *KRAS*, ale v rozdílné míře a často s jiným načasováním výskytu v rámci kancerogeneze.

Kancerogeneze u IBD probíhá tedy v morfoloické sekvenci chronický zánět – IBD dysplázie – karcinom. Mezi první genetické změny ve sliznici patří hypermetylace *MGMT* [59] a mutace v *TP53* vedoucí k aberantní expresi proteinu p53. [60–61] Mutace v *TP53* se vyskytují u 33–67 % případů dysplázie a až u 83–95 % případů IBD-asociovaného KRK. [57] Ztráta heterozygoty a mutace v genu *APC* je v rámci IBD-kancerogeneze pozorována méně často a vyskytuje se až u IBD-asociovaného karcinomu. Naopak u sporadických adenomů je mutace v genu *APC* jednou z prvních genetických změn a germinální mutace je podkladem familiární

adenomatózní polypózy. U IBD pacientů nejsou mutace v genu *APC* zastíženy ani v zánětlivém epitelu ani v low-grade dysplázii.

Molekulární dráhy pro rozvoj kolorektálního karcinomu u pacientů s IBD a rozdíly oproti drahám sledujícím progresi sporadického adenomu a pilovitých polypů jsou znázorněny na schématu na Obrázku 7.

Obr. 7: Zjednodušené schéma molekulárních drah vzniku sporadického kolorektálního karcinomu (konvenční a pilovitá cesta) a IBD-asociovaného KRK. Upraveno dle Bettington et al. [35] a Beaugerie et al. [58]



Zkratky: DYS – dysplázie; HG – high-grade; KRK – kolorektální karcinom; LG – low-grade; SSA/P – sesilní pilovitý adenoma/polyp; SSA-D – sesilní pilovitý adenoma s dysplázií; sTVA – tubulovilózní adenom s pilovitými formacemi, TA – tubulární adenom; TSA – tradiční pilovitý adenom; TVA – tubulovilózní adenom

4.4. PILOVITÉ LÉZE U PACIENTŮ S IDIOPATICKÝM STŘEVNÍM ZÁNĚTEM

Výskyt pilovitých lézí u IBD pacientů je často součástí studií zaměřených na širokou kategorii všech pilovitých změn spojenou obvykle se studiem pilovité dráhy karcinogeneze a rozvojem KRK. V těchto studiích se objevují jak pravé pilovité polypy popsané výše, tak léze s pilovitou nebo vilózní morfologií a měnlivou terminologií, z níž využíváme pojmenování SEC a vilózní hypermucinózní změna. Některé studie jsou zaměřeny pouze na pravé pilovité polypy (viz níže), v některých jsou popisovány léze z obou kategorií.

4.4.1. Pravé pilovité polypy a IBD

Vzhledem k tomu, že popis pilovité dráhy i přesné rozdělení pilovitých polypů včetně reklasifikace a nové terminologie je tématem výzkumu v posledních 15–20 letech, jsou vlastní pravé pilovité polypy (PPP) v některých studiích hůře identifikovatelné. Dosud publikované studie popisovaly obvykle léze ze skupiny HP nebo SSA/P a méně často TSA, včetně synchronního i metachronního výskytu vícečetných lézí. Přehled výsledků studií diskutujících problematiku výskytu pravých pilovitých polypů u IBD pacientů je shrnut v Tabulce 2.

Ve studiích, kde byla doplněna molekulární vyšetření, nebyl prokázán rozdíl mezi nálezy u IBD a non-IBD pacientů v případě dostupné kontrolní skupiny. [62–65] Asociace s KRK byla zastižena zcela minoritně pouze u jednotlivých pacientů a pouze v některých studiích. [62–64, 66] Větší pozornost byla případně věnována výskytu dysplastických změn v PPP nebo asociaci se synchronní nebo metachronní IBD dysplázií. [64, 66–67]

Tab. 2: Studie zabývající se výskytem pilovitých lézí u IBD se zaměřením na pravé pilovité polypy

| Studie autor, rok | Počet pacientů | HP (počet) | IHC nebo molekulární změny | SSA (počet) | IHC a molekulární změny | TSA (počet) | IHC a molekulární změny | dysplázie nebo S/M léze | komentář | |
|-----------------------------|----------------|--|----------------------------|-----------------|-------------------------------------|--------------|------------------------------------|--|---|--|
| Bossard et al. 2007 [62] | 36 | 1 | BRAF V600E MSS | 0 | – | 1 | BRAF V600E MSS | 0 | – | |
| Srivastava et al. 2008 [63] | 3 | 3 (desítky až stovky) | MGMT ztráta | 3 (desítky) | MGMT ztráta KRAS | 2 (jednotky) | MGMT ztráta | konvenční adenom, LG | 3x pilovitá polypóza SSA (KRAS) + KRK TSA + KRK (KRAS/BRAF) (mucinózní) | |
| Iacucci et al. 2014 [68] | 87 | 30 | ND | 14 | ND | 0 | – | 11x LG adenom, 1x DALM | endoskopická studie | |
| Johnson et al. 2014 [69] | 4208 | studie zaměřená na SEC (79 ks), identifikováno 10 případů SSP – dále nestudovány | | | | | | | | |
| Feuerstein et al. 2014 [70] | 4 | nad 10/pac | ND | 0–3 na pacienta | ND | 0 | – | LG sporadický adenom | syndrom pilovité polypózy | |
| Shen et al. 2015 [67] | 115 | 112 | ND | 7 | ND | 0 | – | S/M – HP, SSA, TSA, DALM, plochá IBD-dysplázie | 0 IBD-KRK | |
| Ko et al. 2015 [64] | 6602 | 28 | ND | 35 | 23 testováno 15x BRAF 4x KRAS | 25 | 11 testováno 5x KRAS 2x BRAF | LG/HG dysplázie v 21/8 % | +18 nezařazených lézí 5x asociace s KRK (6 %) – SSA, TSA, smíšené léze | |

Zkratky: DALM – s dysplázií asociovaná léze a masa; HG – high-grade dysplázie; HP – hyperplastický polyp; IBD – idiopatický střevní zánět; IHC – imunohistochemie; KRK – kolorektální karcinom; LG – low-grade; MVHP – mikrovesikulární hyperplastický polyp; ND – not done, neprovedeno; S/M – synchronní a metachronní léze; SSA/P – sesilní pilovitý adenom/polyp; SSA-D – sesilní pilovitý adenom s dysplázií; SP-U – serrated polyp, neklasifikovaný; TSA – tradiční pilovitý adenom

Tabulka 2: Studie zabývající se výskytem pilovitých lézí u IBD se zaměřením na pravé pilovité polypy - pokračování

| Studie autor, rok | Počet pacientů | HP (počet) | IHC a molekulární změny | SSA (počet) | IHC a molekulární změny | TSA (počet) | IHC a molekulární změny | dysplázie nebo S/M léze | komentář |
|--------------------------|----------------|------------|-------------------------|-------------|-------------------------|-------------|-------------------------|---------------------------------------|--|
| Jackson et al. 2016 [66] | 144 | 97 | ND | 25 | ND | – | – | viditelná neviditelná dysplázie | 25 SP-U (neklasifikovatelné) 1x asociace s KRK |
| Lee et al. 2017 [71] | 83 | – | – | 25 | ND | 4 | ND | 96 LG adenomů | pilovité léze více proximálně |
| Yang et al. 2018 [65] | 28 | 25 | 13x BRAF | 11 | 5x BRAF | 0 | – | – | KRAS netestován korelováno s kontrolní skupinou – podobné vlastnosti jako u non- IBD SSA + KRK ve follow- up |

Zkratky: DALM – s dysplázií asociovaná léze a masa; HG – high-grade dysplázie; HP – hyperplastický polyp; IBD – idiopatický střevní zánět; IHC – imunohistochemie; KRK – kolorektální karcinom; LG – low-grade; MVHP – mikrovesikulární hyperplastický polyp; ND – not done, neprovedeno; S/M – synchronní a metachronní léze; SSA/P – sesilní pilovitý adenom/polyp; SSA-D – sesilní pilovitý adenom s dysplázií; SP-U – serrated polyp, neklasifikovaný; TSA – tradiční pilovitý adenom

4.4.2. Nekonvenční slizniční léze a IBD

Nekonvenční léze u pacientů s IBD představují heterogenní skupinu lézí, které se vyskytují ve sliznici postižené zánětem, ale nespňují kritéria IBD dysplázie a nespádají ani do kategorie konvenčních adenomů ani nesplní kritéria pro pravé pilovité polypy. Nekonvenční slizniční léze jsou u pacientů s IBD popisovány již od 80 a 90. let. Z dosud publikovaných studií lze identifikovat dvě hlavní léze, a to je vilózní hypermucinózní léze a pilovitá epiteliální přeměna (serrated epithelial change, SEC). Do této skupiny pak spadají léze kombinované, ve kterých lze zachytit kombinaci vilózní a pilovité stavby a léze podobné hyperplastickému polypu (HP-like léze). Shrnutí typů a morfologických znaků nekonvenčních lézí je uvedeno v Tabulce 3.

Na první z těchto lézí upozornil již v roce 1984 Rubio et al. v sérii pacientů s dlouhotrvající ulcerózní kolitidou a lézi pojmenoval jako vilózní adenomatózní léze, resp. vilózní dysplázie.[72] Podobnou změnu následně popsali Chaubert et al. jako vilózní regenerativní změnu ve studii z roku 1994 [73], Andersen et al. následně v roce 1999 [74] a Kilgore et al. v roce 2000 u pacientů s Crohnovou chorobou. [75] V této studii byla léze pojmenována jako “hyperplastic-like” sliznice a byla zastižena jak v těsné blízkosti KRK, tak ve vzorcích mimo karcinom. [75] Ve všech těchto studiích se ale jednalo o léze s obdobnou morfologií s protáhlými vilózními výběžky s nápadně hyperplastickým světlým epitelem a obvykle blandními jádry anebo přidruženou dysplázií. Vilózní i pilovitá epiteliální změna byly následně popsány Rubiem et al. v roce 2007. [3]

Pilovitá epiteliální změna (SEC) byla popsána v roce 2007 Rubiem spolu s vilózními lézemi. [3] SEC je popisována jako superficiální pilovitá změna, která nespĺňuje kritéria pro pravý pilovitý polyp. [3, 76–78] Pilovité formace jsou zastiženy v horní třetině až polovině léze. Žlásky jsou deformované nebo dilatované, ale změny nedosahují baze, resp. k muscularis mucosae, a chybí krypty ve tvaru obráceného písmene T nebo písmene L. Recentní studie pak zdůrazňují zvýšené riziko konkomitantní dysplázie u pacientů se SEC a zvažují možnost, že SEC představuje možný předstupeň či rizikový znak rozvoje dysplázie u IBD v budoucnosti. [4, 69]

Tab. 3: Typy a morfologické znaky nekonvenčních lézí u pacientů s IBD.

| Typ léze | Synonyma | Morfologické znaky/dysplázie | IBD | IHC/ molekulární změny | Reference |
|----------------------------------|--|--|----------|---|---|
| vilózní hypermucinózní léze | vilózní dysplázie, vilózní adenomatózní léze, vilózní regenerace | jemné vilózní formace, hypermucinózní epitelie, blandní jádra nebo dysplázie | UC CD | aberantní p53 exprese, mutace <i>KRAS</i> | 1984 Rubio, 1994 Chaubert, 1999 Andersen, 2000 Kilgore, Rubio 2007, Harpaz 2013 |
| pilovitá epiteliální změna (SEC) | pilovitá adenomatózní léze | deformované žlásky, pilovité vzhled v horní třetině/polovině, dilatace – nedosahuje baze | UC CD | NA | Rubio 2007, Parian 2013, 16, Johnson 2014 |
| smíšená léze | – | kombinace pilovitých a vilózních změn bez splnění kritérií pro PPP | UC | NA | Rubio 2007 |
| HP-like léze | léze podobná hyperplastickému polypu | pilovité změny, zasazení v terénu zánětu | CD | NA | Kilgore 2000 [75] |

Zkratky: CD – Crohnova choroba; HP – hyperplastický polyp; IBD – idiopatický střevní zánět; IHC – imunohistochemie

4.5. CHARAKTERISTIKA VYŠETŘOVANÝCH IMUNOHISTOCHEMICKÝCH A MOLEKULÁRNÍCH MARKERŮ

4.5.1. Charakteristika a funkce genu *TP53* a proteinu p53 a význam v nádorových lézích GIT

Gen *TP53* patří mezi tumor supresorové geny a je lokalizován na chromozómu 17 (17p13 lokus). Za normálních okolností funguje p53 jako stresogenní transkripční faktor a ovlivňuje transkripci svých cílových genů, které pocházejí z celé řady buněčně funkčních skupin od kontroly apoptózy a stárnutí buňky (senescence) přes indukci zástavy buněčného cyklu až po anti-oxidační aktivitu. Hlavní funkce v nádorové supresi jsou právě indukce apoptózy cestou transkripční aktivace dalších efektorových proteinů nebo přímou aktivací mitochondriální apoptotické cesty, zástavou buněčného cyklu a regulací senescence buňky. Ztráta těchto funkcí při mutaci *TP53* je pak jedním z podkladů možné nádorové transformace buňky. [79–81]

Gen *TP53* je nejčastěji mutovaným genem téměř ve všech typech nádorů s největším výskytem mutací u karcinomů plic, kolorekta, jícnu nebo ovaria. V některých typech nádorů je ztráta funkce genu *TP53* způsobena jiným mechanismem jako je např. inaktivace p53 proteinem E6 lidského papilomaviru u karcinomu děložního hrdla nebo zvýšená degradace proteinu p53 v sarkomech měkkých tkání při amplifikaci nebo overexpresi *MDM2* (mouse double minute 2 homolog), který je silným negativním regulátorem funkce p53. Germinální mutace *TP53* je spojena s familiárním syndromem mnohočetné nádorové predispozice Li-Fraumeni. [79–81]

Většina mutací v genu *TP53* jsou v kategorii tzv. missense mutací, které vedou obvykle k produkci mutantního proteinu v plné délce, na rozdíl od rozsáhlých delecí nebo trunkačních mutací, které postihují například geny jako *APC*, *RB* (retinoblatom-asociovaný protein) a *VHL* (von Hippel-Lindau) a jejichž výsledkem je kompletní ztráta exprese a funkce efektorového proteinu. Přestože mutace v genu *TP53* byly nalezeny ve všech kódujících exonech, většina mutací se vyskytuje v exonech 4–9 do oblasti DNA-vazebné domény a výsledkem je neschopnost vazby mutovaného p53 proteinu na DNA. Pokud je gen *TP53* mutován jen na jedné alele (heterozygotní stav), mutovaný protein pak blokuje funkci wild-type proteinu. Wild-type protein je navíc funkcí proteazomu udržován na relativně nízké hladině. Navazující událostí je obvykle ztráta heterozygoty a mutace i v druhé, původně wild-type alele. Mutovaný protein se pak ve vysoké míře akumuluje v nádorové buňce, tento mechanismus

není zcela jasně objasněn. [80–81] Mutovaný protein díky omezené vazbě na DNA ztrácí svoji tumor supresorovou funkci.

Ke ztrátě jaderné funkce genu *TP53* pak může dojít ještě mechanismem tzv. cytoplazmatické sekvestrace, při které je protein p53 vázán na nadměrně produkováný heat-shock protein (HSPA9, mortalin). p53/mortalinový komplex brání jak přesunu p53 do jádra, vazbě na bcl2 v mitochondriích a aktivaci apoptózy, a tak i blokuje transkripční funkci p53. Tento princip ztráty funkce p53 je popsán např. u neuroblastomů, v buněčných liniích KRK. [83] Jiným mechanismem cytoplazmatické sekvestrace p53 pak může být mutace v doméně určující jadernou lokalizaci proteinu p53, jak bylo prokázáno v některých případech high-grade serózního karcinomu ovaria. [84]

Kromě ztráty funkce bylo zjištěno, že mutovaný protein p53 může získat i nové vlastnosti, tzv. gain-of-function, které vedou k různým buněčným procesům, mezi kterými je anti-apoptotická aktivita a stimulace buněčné proliferace, migrace, invaze, angiogeneze etc.[85] Princip některých z těchto procesů je již objasněn a zahrnuje obvykle interakci mutovaného proteinu s geny dalších transkripčních faktorů s vlivem na jejich expresi a funkci, přímou interakci s proteiny a jejich funkcemi nebo vliv na expresi a funkci miRNA.

Mutační stav genu *TP53* může být detekován několika způsoby. Přesný typ a lokalizaci mutace lze vyšetřit pomocí molekulárních metod (PCR a sekvenace produktu). V rámci histopatologické diagnostiky je však často využívána detekce exprese proteinu p53 pomocí imunohistochemického vyšetření. V případě normálního nemutovaného, tzv. wild-type stavu se předpokládá variabilní, obvykle slabá nebo středně silná exprese proteinu v méně než 10 % nádorových buněk odrážející zachycení proteinu v různé fázi akumulace nebo degradace. V případě mutace genu *TP53* pak může nastat několik stavů výsledku IHC barvení. Prvním a častějším výsledkem je silná 3+ jaderná exprese (overexprese) proteinu p53, hodnocena jako pozitivní v případě exprese ve více než 50–60 % nádorových buněk. [86–87] Druhou možností je kompletní ztráta exprese při mutaci, která vede k úplné ztrátě funkce genu (delece, nonsense mutace) bez transkripce cílového proteinu (null exprese, 0 % buněk) nebo při zvýšené degradaci proteinu mutovaným (upregulovaným) *MDM2*, jako je tomu např. u měkkotkáňových sarkomů. [88–89] Existuje ještě třetí cytoplazmatický typ imunohistochemické exprese p53, a to buď čistě cytoplazmatický nebo spojený s overexpresí v jádře. [90–91] V případě izolované cytoplazmatické exprese pak může být gen *TP53*

mutovaný anebo wild-type bez přítomné mutace a akumulace proteinu p53 v cytoplasmě vzniká patrně na podkladě vazby na heat-shock protein. [92–93]

Pro imunohistochemické vyšetření je v současné době dostupné větší množství komerčně vyráběných protilátek, které se odlišují vazbou na různé epitopy proteinu p53. Mezi nejčastěji používané protilátky patří tzv. skupina BP53 protilátek, jejíž podtyp BP53-11 byl použit i v rámci naší studie. Tato protilátka rozeznává epitop na amino konci (N-konci) proteinu (20–25) a detekuje jak nemutovaný wild-type produkt, tak mutovaný protein. [94–95]

V biotické praxi se imunohistochemická detekce aberantní exprese proteinu p53 využívá v rámci diferenciální diagnostiky premaligních lézí nebo jako prognostický faktor u různých typů malignit. [96] V gastrointestinálním traktu je mutace genu *TP53* považována za jednu z posledních genetických změn v rámci progresu konvenčního adenomu do adenokarcinomu v rámci konvenční dráhy vzniku KRK. [35, 97–98] V rámci diferenciální diagnostiky může být vyšetření exprese p53 součástí diagnostického algoritmu u hodnocení dysplázie u Barretova jícnu nebo IBD dysplázie. [96, 99] V rámci kancerogeneze u IBD pacientů jsou pak mutace genu *TP53* spojené s aberantní expresí proteinu p53 jednou z prvních genetických změn v chronicky zánětlivě změněné sliznici. [60–61, 100] Přestože se míra exprese p53 zvyšuje s progresí IBD dysplázie, zůstává použití imunohistochemického vyšetření p53 v diagnostice IBD dysplázie kontroverzní, a ne zcela spolehlivé, a to vzhledem k možnosti aberantní exprese i v reaktivním epitelu nebo lézích hodnocených jako neurčité pro dysplázii. [10, 60]

U kolorektálního karcinomu se pak mutace v genu *TP53* vyskytují průměrně u 50 % případů. [97, 101] Přítomnost mutace genu *TP53* je častější ve skupině karcinomů z konvenční dráhy vzniku KRK a je sdružena s mikrosatelitní stabilitou (MSS) a *BRAF* mutací. [102] Aberantní exprese p53 je pak spojena s kratší dobou bez recidivy, s větší velikostí nádoru, vyšší proliferací a horším přežitím pacientů, a to především pro klinická stadia II a III. [103–105]

4.5.2. Charakteristika a funkce MLH1 a MMR proteinů a význam v nádorových lézích GIT

K identifikaci mutací v krátkých tandemových repetitivních sekvencích (mikrosatelitech) v hereditárních nepolypózních karcinomech kolorekta (HNPCC, nyní Lynchův syndrom) a v části sporadických karcinomů došlo na počátku 90. let minulého století. [106–108] Další výzkum vedl k propojení mikrosatelitních změn s dráhou mismatch repair systému, včetně identifikace čtveřice genů *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2* a jejich funkčních proteinů, které jsou inaktivovány a nejsou schopny plnit funkci oprav chybně zařazených bazí. První z takto identifikovaných MMR genů byl *MSH2*, u kterého se vyskytuje nestabilita v dinukleotidové repetitivní sekvenci D2S123. [106, 109] V rámci MMR systému se pak ještě opravných reakcí účastní protein MLH3, MSH3 a Exo1. Vlastní mutace v MMR genech jsou pak typově missense, s posunem čtecího rámce (frameshift) nebo nonsense typu.

MMR systém představuje koordinovanou spolupráci 4 proteinů ve formě heterodimerů MSH2/MSH6 (MutS α) a MLH1/PMS2 (MutL α). Heterodimer MutS α slouží k rozpoznání chybně zařazených bazí v DNA (mismatch) a aktivuje druhý heterodimer MutL α , který se s MutS α spojí v proteinový komplex se schopností oddělení dvou vláken DNA za pomoci Exo1 s následným odstraněním poškozené DNA a syntézou nového vlákna DNA. [110]

Testování mikrosatelitní nestability je možné buď na imunohistochemické úrovni s průkazem porušené funkce MMR systému se ztrátou exprese v některém z MMR proteinů, nebo na molekulární úrovni metodou PCR nebo sekvenováním nové generace (NGS, Next Generation Sequencing). Metodiky mají podobnou analytickou sensitivitu a ke stanovení MMR deficitu lze použít různé algoritmy. [111] Při imunohistochemickém vyšetření se předpokládá ztráta exprese některého z proteinů na základě deaktivace genu mutací nebo hypermetylací promotoru (viz níže). Použit lze buď testování všech 4 hlavních proteinů monoklonálními protilátkami nebo tzv. dvouprotilátkový model s testováním pouze MSH6 a PMS2, jejichž sekundární ztráta exprese odráží poruchu vytvoření heterodimeru z důvodu molekulární změny na úrovni MLH1 a MSH2. [112]

Molekulární vyšetření MSI stavu je založeno na detekci alterované délky mikrosatelitních repetitivních sekvencí v různých genech v porovnání se zdravou tkání stejného pacienta. Současné komerčně dostupné panely pro PCR i NGS vyšetření obsahují obvykle kombinaci 5 mikrosatelitních mononukleotidových repetitivních sekvencí (BAT25, BAT26, MONO-27, NR-21 a NR-24). Tyto mononukleotidové sekvence pak mohou být kombinovány ještě s delší dinukleotidovou sekvencí (D18S55) nebo pentanukleotidovou sekvencí (Penta C, Penta D).

Nestabilita a změna délky produktu ve 2 a více lokusech se hodnotí jako MSI-high (MSI-H) kategorie, nestabilita v 1 lokusu jako MSI-low (MSI-L). Ostatní léze se hodnotí jako mikrosatelitně stabilní (MSS). [113–115]

Obě metody (IHC i molekulární) mají určité limitace a ani jedna není schopná identifikovat všechny MMR deficientní nádory. Například izolovaná germinální mutace MSH6 nemusí být spojena s PCR potvrzeným MSI-H stavem. Naopak, například prokázaná missense mutace (PCR metodou) může vést k vytvoření proteinového produktu detekovatelného v IHC s falešně normálním výsledkem. [113, 116] Na základě imunohistochemicky prokázané ztráty exprese MLH1 nelze pak stanovit příčinu na genetické úrovni a odlišit mutovaný gen od hypermetylovaného promotoru.

Mikrosatelitní instabilita (MSI) a s ní sdružená porucha MMR systému se vyskytuje u zhruba 15 % sporadických kolorektálních karcinomů a je nejčastější příčinou karcinomů hereditárních (3 % ze všech KRK) v rámci Lynchova syndromu. V případě Lynchova syndromu je ztráta funkce MMR systému na podkladě germinálních mutací, které zahrnují bodové mutace i rozsáhlé delece a přestavby se ztrátou exprese proteinu na úrovni IHC. Malé procento případů s missense mutací v *MLH1* vede k vytvoření mutovaného proteinu, který může být na IHC úrovni detekován. Nejčastější příčinou ztráty funkce *MLH1* ve sporadických karcinomech je hypermetylace promotoru v rámci CIMP a ztráta exprese proteinu na imunohistochemické úrovni. Tyto karcinomy jsou pak často spojeny s mutací genu *BRAF*. [114] Expese proteinu MLH1 je kromě detekce MSI stavu v karcinomech studována v také samostatně dalších lézích GIT, jako jsou pilovité polypy typu SSA s dysplázií (SSA-D), ve kterých je prokázaná ztráta exprese MLH1 až v 73 %, a to i v lézích s minimálními dysplastickými změnami, kde tento nálezn může podpořit diagnózu SSA-D. [117]

Detekce MSI v KRK je důležitá z několika hledisek; jednak může vést k identifikaci případů sdružených s Lynchovým syndromem, u sporadických karcinomů má pak prognostický i terapeutický význam. MSI karcinomy jsou častěji spojeny s imunitní aktivací v nádoru a častěji s lepším přežitím. [35, 53, 118] MSI-H status má vliv především na indikaci adjuvantní terapie, jelikož MSI-H karcinomy reagují méně na konvenční terapii 5-fluorouracilem (5-FU). U MSI-H karcinomu s nefunkčním MMR systémem dochází totiž k toleranci inkorporovaného terapeutického nukleotidu v DNA, případně k toleranci proběhlých genotoxických změn a nedochází tedy k aktivaci apoptózy takové buňky. [119–120] Pacienti s MSI-H karcinomy tedy neprofitují z podané terapie, která obsahuje 5-FU a MSI status je

pak prediktivním faktorem ovlivňujícím indikaci adjuvantní terapie u pacientů ve II. a případně i ve III. klinickém stadiu. Benefit podání této adjuvantní terapie u pacientů s MMR deficitním karcinomem je v onkologii stále diskutovanou otázkou. [121]

4.5.3. Charakteristika a funkce MGMT a význam v nádorových lézích GIT

O⁶-methylguanin DNA metyltransferáza (*MGMT*) je nádorový supresor a reparační protein/enzym, jehož hlavní funkcí je oprava přirozeně se vyskytující mutagenní léze DNA, kterou je O⁶-methylguanin, zpět na guanin a prevence špatně zařazených bazí (mismatch) v průběhu transkripce a replikace DNA. *MGMT* je po přijetí metyl-skupiny inaktivována a degradována. Expres *MGMT* je zachována ve všech normálních tkáních, ale míra exprese je odlišná v různých orgánech (nejvíce v játrech, střevě a plicích). [122]

Ztráta funkce *MGMT* vzniká nejčastěji na podkladě hypermetylace promotoru genu *MGMT*, která vede k umlčení funkce genu a kterou lze detekovat molekulárními metodami jako je pyrosekvenace nebo metylačně specifická PCR. [59, 123] Imunohistochemické protilátky pro detekci exprese *MGMT* byly poprvé použity na začátku 90. let [124] a jsou používány k detekci zachované nebo ztracené exprese proteinu *MGMT* s předpokladem korelace mezi metylovaným stavem genu *MGMT* a negativním výsledkem imunohistochemie. [59]

V případě porušené funkce *MGMT*, je O⁶-methylguanin rozpoznán jako adenin a spárován s thyminem v rámci DNA replikace za vzniku mismatch páru A : T. Tyto záměny mohou postihnout i geny asociované s kancerogenezí, jako je *TP53* a *KRAS*, ale chyby by měly být rozpoznány MMR proteiny a vést k aktivaci apoptózy. Pokud je porušen i tento systém, kancerogenní mutace nemusí být rozpoznána. [59] S porušenou funkcí *MGMT* se pojí i tzv. plošný defekt (field defect), při kterém je hypermetylace v genu *MGMT* zachycena i v nenádorové tkáni vzdálené od samotného karcinomu nebo je zastižena v nenádorové zánětlivě změněné sliznici, například u pacientů s IBD [59, 125] kde by mohla IHC detekovaná ztráta exprese *MGMT* představovat metodu časně detekce IBD dysplázie. [123] U KRK je metylace genu *MGMT* pozorována až v 40–90 % případů a spojená s field defektem v okolní tkáni v 10–30 % případech. [123, 125] Pokud je ale hodnocení zaměřeno na karcinomy s MSI, je pak výskyt metylace i field defekt vyšší (60–70 %), patrně z důvodu tzv. metylační tolerance vedoucí k přednostní selekci buněk s MMR deficitem. [59]

4.5.4. Charakteristika genů *KRAS/NRAS* a *BRAF* a význam mutací v nádorových lézích GIT

Geny *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* patří mezi tzv. onkogeny. Onkogeny představují geny kódující proteiny schopné v případě mutace transformovat buňku a indukovat kancerogenezi. Proteiny těchto genů vykazují obvykle kinázovou nebo hydrolázovou (GTPázovou) aktivitu nebo vlastnosti transkripčních a růstových faktorů.

Geny *KRAS* a *NRAS* (a *HRAS*) patří do funkčně i strukturně homologní super-rodiny Ras genů a jejich proteinů, které jsou schopné vázat guanosin-trifosfát (GTP) a guanosin-difosfát (GDP) a vykazují tedy GTPázovou aktivitu. K aktivaci proteinu dochází po navázání volného GTP a po konverzi na GDP dochází k inaktivaci. [126] Gen *KRAS* je lokalizován v oblasti 12p12.1 chromozómu 12 a kóduje dvě sestříhové izoformy (A a B), z nichž obvykle převažuje sestříhová varianta *KRASB*. Gen *KRAS* se skládá z 6 exonů, přičemž neměnné a kódující jsou exony 2–4 obsahující oblasti kódující funkční místa proteinu jako je místo vazby GTP, místo vazby efektorů, oblast switch I (pro interakci efektorů a GAP (GTPase activating protein)) a oblast switch II pro interakci s GEF (guanine nucleotide exchange factor). Vazba GTP na K-ras protein vede k jeho aktivaci a ta je regulována rychlostí hydrolýzy GTP na GDP pomocí GAP vedoucí k inaktivaci proteinu. Do aktivní formy se protein K-ras dostává působením proteinů GEF, které navozují disociaci GDP z K-ras a uvolnění vazebného místa pro navázání dalšího volného GTP. Aktivační mutace genu *KRAS* se obvykle vyskytují v oblastech ovlivňujících hydrolýzu GTP. Pokud nedochází k hydrolýze GTP, je znemožněn přechod aktivní formy proteinu ras na neaktivní. [127–128]

Gen *BRAF* se nachází na chromozomu 7 v oblasti 7q34 a kóduje protein s aktivitou proteinové serin/threonin kinázy přenášející signály do buněčného jádra. Patří do rodiny kináz spolu s *ARAF* a *CRAF* (*RAF1*), které jsou aktivovány GTPázovou aktivitou Ras. Gen *BRAF* se skládá z několika kódujících oblastí včetně domény pro vazbu Ras, aktivační kinázové domény, P-smyčky pro kotvení ATP a katalytické smyčky. Protein B-raf po aktivaci plní funkci kinázy přenášející fosfátovou skupinu z ATP na cílový protein (např. na další kinázu MEK) za vzniku ADP a nového fosfoproteinu. [129] Většina onkogenních mutací genu *BRAF* se vyskytuje v oblasti P-smyčky a aktivační domény. Více než 90 % mutací vzniká na podkladě záměny thyminu v pozici 1799 za adenin a výsledkem je záměna valinu (V) za kyselinu glutamovou (E) v kodonu 600 (mutace V600E). [130–132] Mutace v *BRAF* vede k vytvoření proteinu s mnohonásobně vyšší kinázovou aktivitou než má nemutovaná wild-type forma. [130]

Proteiny K-ras, N-ras i B-raf se účastní tzv. RAS/MAPK (MEK/ERK kinázy, mitogen activated protein kinase, extracellular-signal regulated kinase) signalizační kaskády, která je obvykle aktivována receptorovými tyrozin-kinázami na povrchu buňky jako je např. receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR). Právě vazba na povrchové receptory vede k intracelulární aktivaci faktorů GEF, které uvolňují vazbu GDP z neaktivního proteinu K-ras, který je pak dostupný pro pasivní vazbu GTP a aktivaci. Aktivní protein K-ras reaguje s více než 20 efektorů, mezi které patří protein B-raf, fosfoinositol 3-kináza (PI3K) aj. Vlastní dráha RAS/MAPK pak reguluje buněčné dělení a proliferaci, migraci a diferenciaci buněk nebo apoptózu. Jednotlivé kinázy jako ERK (MEK1, MEK2) jsou např. schopné fosforylovat množství intracelulárních i jaderných substrátů (JUN, ELK1) s aktivací transkripčních faktorů vedoucí k expresi proteinů regulujících buněčný cyklus (cyklin D apod). [127] Aktivace PI3K vede k jejímu přesunu na membránu a k fosforylaci substrátu jako je 3-fosfoinositid dependentní kináza 1 (PDK1) nebo Akt kináza, která podporuje přežití buňky inaktivací pro-apoptotických proteinů.

Při onkogenních somatických mutacích pak buňka obsahuje buď konstitutivně aktivní protein (K-ras) nebo aktivní enzym se zvýšenou fosforylační aktivitou bez ohledu na signalizaci z membránových receptorů postavených v signalizační dráze nad daným proteinem, kam pro K-ras patří např. receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR). Konstitutivní aktivace funkce proteinu vede k propagaci signalizace pro buněčnou proliferaci a přežití, která může být jedním z hlavních kroků vedoucích ke vzniku nádoru.

Zhruba 35–45 % KRK a konvenčních adenomů střeva nese aktivující missense mutaci v genu *KRAS*. Ve skupině pravých pilovitých polypů je mutace *KRAS* přítomna v části tradičních pilovitých adenomů (TSA). [35, 53, 133–134] U adenomů se jedná především o asociaci s vilózní morfologií a vyšším stupněm dysplázie (high-grade). [135] Mutace nejčastěji postihuje kodony 12 a 13 exonu 2, kodony 59 a 61 exonu 3 a kodony 117 a 146 exonu 4. Mutované pozice jsou důležité pro GTPázovou funkci K-ras včetně aktivace RAF kináz a mutace vede ke konstitutivní aktivaci. Přítomnost *KRAS* mutace v KRK souvisí s lepším stupněm diferenciaci karcinomu (častější u karcinomů s nižším grade) a u *KRAS* mutovaných KRK je častěji zastižen reziduální prekurzorový polyp/adenom. *KRAS* mutace se pak častěji vyskytují u karcinomů s mikrosatelitní stabilitou (častější u MSS a MSI-low karcinomů).

Mutace v genu *BRAF* se vyskytuje zhruba u 10–12 % KRK, u většiny hyperplastických polypů a sesilních pilovitých adenomů (SSA) a v části TSA. [35, 53] Mutace genu *BRAF* jsou

častěji zachyceny u karcinomů pravostranného kolon. Dále jsou *BRAF* mutované KKK spojeny s vyšším grade, resp. s hůře diferencovanou nebo mucinózní morfologií a vykazují vyšší výskyt peritoneálních metastáz a vykazují častěji vysokou mikrosatelitní nestabilitu (MSI-H). [135–136]

4.5.4.1. Prediktivní a prognostický význam mutací genů *KRAS/NRAS* a *BRAF* u KKK

Znalost mutačního stavu genů *KRAS/NRAS* a *BRAF* v kolorektálním karcinomu je extrémně užitečná jak pro výběr systémové chemoterapie, tak pro stratifikaci pacientů do rizikových skupin, a to především ve vyšších klinických stádiích s metastatickým KKK nebo v případě rekurence.

Pro výběr terapie představuje mutační stav těchto genů prediktivní marker odpovědi na terapii inhibitory signalizace přes membránový receptor EGFR (anti-EGFR terapie). Principem účinku této léčby je ovlivnění signalizace přes EGFR a inhibice signalizace přes RAS/RAF a PI3K dráhu. Předpokladem je ale nemutovaná (wild-type) forma proteinů K-ras/N-ras a B-raf bez konstitutivní aktivace, která je navozena v případě mutací. Mutované onkogeny *KRAS/NRAS/BRAF* tedy představují negativní prediktivní marker pro použití cílené anti-EGFR léčby. [45] Prognosticky mimořádně nepříznivou podskupinou jsou nádory s prokázanou *BRAF* mutací a MSS stavem, u kterých je účinnost léčby inhibitory EGFR velice nízká. [45, 137]

Z prognostického hlediska je význam přítomnosti mutace v genu *KRAS* stále kontroverzní, přesto pacienti ve stadiu III s mutovaným *KRAS* vykazují kratší dobu přežití bez choroby (disease-free survival, DFS). [138] Vliv na prognózu má pak i dle některých studií i typ mutace v genu *KRAS*. Pacienti s mutací v kodónu 61 a 146 mají kratší přežití bez progresu (progression-free survival, PFS) i celkové přežití (overall survival, OS). [136, 138] Pro pacienty s resekalizací jaterní metastázou má mutace genu *KRAS* negativní prognostický vliv na celkové přežití i na přežití bez progresu. [136]

Mutace genu *BRAF* jsou prognosticky spojeny s vyšším rizikem úmrtí v souvislosti s vlastním nádorovým onemocněním, a to u pacientů napříč všemi klinickými stadii a snižují celkové přežití (OS) především u karcinomů, které jsou mikrosatelitně stabilní (MSS) nebo s nízkým stupněm mikrosatelitní nestability (MSI-L). [135] Mutace genu *BRAF* nemají prognostický význam na přežití bez relapsu, jsou však silným negativním faktorem pro celkové přežití u pacientů s relabujícím KKK. [135, 139]

5. Cíle disertační práce

1. Detekce slizničních prekurzorových lézí v zánětlivě změněné sliznici v resekátech a endobiopsiích pacientů s idiopatickým střevním zánětem se zaměřením na detekci nekonvenčních lézí s pilovitou a vilózní morfologií.

2. Podrobné studium nalezených lézí, jejich morfologická, imunohistochemická a molekulární charakteristika a posouzení jejich vztahu k rozvoji dysplázie a případné progresi do invazivního adenokarcinomu.

6. Materiál a metodika

6.1. CHARAKTERISTIKA STUDOVANÉHO SOUBORU

Projekt byl koncipován jako retrospektivní. Základní soubor tvořil materiál od pacientů s diagnózou IBD, jejichž vzorky byly vyšetřeny na Fingerlandově ústavu patologie Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK) v desetiletém období od ledna 2006 do prosince 2016. Vzhledem k faktu, že nekonvenční slizniční léze nejsou v biopsiích od IBD pacientů rutinně popisovány, nemohly být termíny jako „pilovitá epiteliální přeměna“, „vilózní hypermucinózní léze/přeměna“ apod. použity jako klíčová slova ve fulltextovém vyhledávání. Protože součástí projektu byla i identifikace IBD-asociovaných karcinomů, byly primárně vyhledávány případy disponující chirurgickým resekatem. Pro vyhledání případů byla využita kombinace klíčových slov, diagnostických kódů a vnitroustavního číselného diagnostického kódovacího systému (Vortelova kartotéka). Tímto způsobem byl sestaven základní soubor pacientů, u kterých byly následně v laboratorním informačním systému vyhledány i přidružené endoskopické biotické vzorky získané v rámci dlouhodobého sledování. Veškerý takto získaný materiál byl mikroskopicky revidován včetně ověření diagnózy IBD. Diagnóza IBD byla stanovena dle platných histopatologických kritérií u všech pacientů buď na základě předchozí endoskopické biopsie, nebo ve vlastním chirurgickém resekatu. [5–6, 10, 14] U každého pacienta byl zaznamenán věk, pohlaví, věk v době diagnózy IBD, délka trvání onemocnění a typ IBD (ulcerózní kolitida, Crohnova choroba nebo indeterminovaná kolitida).

U pacientů s IBD-asociovaným kolorektálním karcinomem (KRK) byl zaznamenán i věk v době diagnózy karcinomu, obvykle shodný s věkem v době resekce. Diagnóza, morfologický typ adenokarcinomu a grade nádoru byly stanoveny podle platné WHO klasifikace nádorů gastrointestinálního traktu (GIT) z roku 2010. [29]

U všech karcinomů byla dále zaznamenána lokalizace nádoru a patologický staging dle v době studie v České republice používaného, tedy 7. vydání TNM Klasifikace zhoubných novotvarů. [140] Mezi další morfologické charakteristiky hodnocené ve skupině pacientů s KRK byly zahrnuty uznávané i potenciální prognostické faktory jako invaze do krevních a lymfatických cév, perineurální šíření, typ nádorové hranice (tumor border configuration) a nádorový budding. Nádorový budding byl hodnocen podle doporučení mezinárodní konsenzuální konference (International Tumor Budding Consensus Conference, ITBCC) kromě jednoho případu pacienta po neoadjuvantní terapii s regresivními změnami, ve kterých

není doporučeno budding hodnotit. [141] Při použití tohoto doporučení je nejprve vybrán blok, resp. řez, ve kterém je na invazivním okraji karcinomu nejvýraznější infiltrativní růst v podobě jednotlivých buněk nebo skupinek do 4 buněk (budding). V tomto řezu je při zvětšení 100x (objektiv 10x) revidováno minimálně 10 zorných polí a identifikováno místo s nejvýraznějším buddingem (tzv. hot-spot), ve kterém jsou následně při zvětšení 200x (objektiv 20x) počítány nádorové skupinky a jednotlivé buňky (buds). Vzhledem k různému průměru okulárů u mikroskopů od různých výrobců, je nutné výsledný počet „buds“ vydělit tzv. normalizačním faktorem, aby bylo dosaženo hodnocené plochy 0,785 mm², která byla použita při tvorbě těchto doporučení. Podle počtu „buds“ po normalizaci je výsledek zařazen do kategorie Bd1 (0–4), Bd2 (5–9) nebo Bd3 (nad 10). [141]

Všechna histologická skla z resekátů i z přidružených endoskopických biopsií byla pečlivě revidována a případně znovu prokrájena. V každém řezu bylo pátráno jak po uznávaných prekurzorových lézích (IBD dysplázie), tak po jakýchkoli dalších signifikantních slizničních změnách s mimořádným zaměřením na pilovitou epiteliální přeměnu (SEC) a vilózní hypermucinózní přeměnu. Z důvodu převahy chirurgických resekátů a charakteru přikrojení materiálu bez označení bloků místem odběru, nebylo možné u větší části lézí zaznamenat lokalizaci zastižené léze. Pro další imunohistochemické a molekulární vyšetření byly vybrány případy, ve kterých byla zastižena konvenční slizniční léze nebo adenokarcinom, tak nekonvenční slizniční změny. Parafinové bloky pro další vyšetření byly dostupné ve všech případech.

6.2. IMUNOHISTOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ A JEHO HODNOCENÍ

6.2.1. Princip imunohistochemického vyšetření

Ve všech studovaných vzorcích bylo provedeno imunohistochemické vyšetření markerů MLH1, p53 a MGMT. Pro slizniční léze byla vybrána detekce MLH1 především z důvodu podpory detekce případné progresse nebo dysplázie v těchto lézích dle studie Liu et al. v pravých pilovitých polypech. [117] Ve vzorcích s adenokarcinomem bylo doplněno vyšetření dalších markerů ze skupiny mismatch repair proteinů (MMR), jmenovitě MSH2, PMS2 a MSH6. Seznam protilátek, výrobců a ředění je uveden v Tabulce 4.

Tab. 4: Seznam použitých protilátek a výrobců

| Primární protilátka | Výrobce | druh/typ | Ředění | Klon |
|---------------------|---------------------------------|----------------------|--------|-----------|
| MLH1 | Zytomed, Berlín, Německo | myší/monoklonální | RTU | G168-15 |
| PMS2 | Roche/Ventana, Tuscon, AZ, USA | králičí/monoklonální | RTU | EPR 3947 |
| MSH2 | Cell Marque, Rocklin, CA, USA | myší/monoklonální | 1:100 | G219-1129 |
| MSH6 | Cell Marque, Rocklin, CA, USA | králičí/monoklonální | 1:100 | SP93 |
| p53 | Roche/Ventana, Tuscon, AZ, USA | myší/monoklonální | RTU | Bp53-11 |
| MGMT | ThermoFischer, Waltham, MA, USA | myší/monoklonální | 1:50 | MT3.1 |

Zkratky: AZ – Arizona; CA – Kalifornie; MA – Massachusetts; RTU – ready-to-use, protilátka předředený výrobcem a připravená k okamžitému použití; USA – United States of America, Spojené státy americké

Imunohistochemické vyšetření bylo provedeno v řezech z reprezentativních tkáňových bloků vzorků fixovaných ve formalinu a zalitých v parafínu (FFPE). Pro imunohistochemické barvení byly použity parafinové řezy o tloušťce 2 μ m. Po demaskování antigenu byly řezy inkubovány s primární protilátkou (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, p53) v barvicím automatu

(BenchMark Ultra, Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA) za použití vizualizačního systému OptiView (OptiView DAB IHC detekční kit, Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA). Podrobný postup imunohistochemického barvení je v Příloze 1.

K detekci MGMT bylo použito ruční barvení. Cílené demaskování antigenu proběhlo ve vodní lázni při teplotě 97 °C po dobu 40 min za použití pufru s pH 9.0 (pufr K8007; DAKO Denmark, Glostrup, Dánsko). Případná endogenní peroxidázová aktivita byla inhibována ponořením řezů do blokujícího reagensia Envision FLEX (RTU, K8010, DAKO-Denmark, Glostrup, Denmark). Řezy byly nejprve inkubovány s primární protilátkou (MGMT, ředění 1:50) po dobu 32 minut a následně v roztoku EnVision FLEX/HRP (RTU, Dako Denmark, Glostrup, Dánsko). Pro vizualizaci byl použit diaminobenzidin EnVision FLEX DAB (diaminobenzidin, Dako-Denmark, Glostrup, Dánsko). Preparáty byly dobarveny hematoxylinem. Výsledky barvení byly porovnány s barvením v externí kontrolní tkáni na skle, případně v rámci vlastního řezu s vnitřní kontrolou v okolní nenádorové tkáni.

6.2.2. Princip vyhodnocení výsledků imunohistochemického vyšetření

6.2.2.1. *MLH1 a jaderné proteiny*

Jaderná exprese MLH1 byla hodnocena jako pozitivní. Ztráta exprese v jádrech nádorových buněk byla hodnocena jako negativní. V případě hodnocení exprese všech MMR proteinů v karcinomu, byl nádor buď vyhodnocen tzv. jako MMR proficientní (MMRp) v případě zachované jaderné exprese všech čtyř MMR markerů (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6). Nádor byl vyhodnocen jako MMR deficientní (MMRd) při ztrátě jaderné exprese v nádorových buňkách kteréhokoliv ze čtyř MMR markerů.

6.2.2.2. *Hodnocení exprese p53*

Expres p53 byla hodnocena jako normální (korespondující s wild-type stavem genu), pokud byla patrná slabá (1+) nebo středně (2+) intenzivní nepravidelně rozložená pozitivita. V případě silné difúzní 3+ exprese anebo při kompletní ztrátě barvení byl výsledek hodnocen jako aberantní resp. tzv. mutační typ.

6.2.2.3. *Hodnocení exprese MGMT*

Hodnocena byla pouze jaderná exprese MGMT o různé intenzitě a přiděleným skóre 0 – žádné barvení, 1 – slabé barvení, 2 – středně intenzivní barvení a 3 – silné barvení. Výsledek barvení MGMT byl hodnocen jako přítomný (pozitivní) při skóre 2 nebo 3 nebo jako nepřítomný (negativní) při skóre 0 nebo 1. Hodnocení bylo provedeno podle metodiky autorů

Svrcek et al. [59] Ztráta exprese MGMT byla stanovena, pokud více než 50 % buněk vykazovalo skóre 0/1.

6.3 MOLEKULÁRNÍ VYŠETŘENÍ

6.3.1. Příprava vzorků a izolace DNA

Vyšetření mutačního stavu genů *KRAS*, *NRAS* a *BRAF* bylo provedeno ve vzorcích obsahujících slizniční dysplastickou nebo nekonvenční PPL lézi a kolorektální karcinom. Vyšetření bylo provedeno z reprezentativních parafinových bloků. Pro molekulární vyšetření byly zhotoveny histologické nebarvené řezy o tloušťce 5 µm. U endoskopických vzorků byly použity celé řezy obsahující vyšetřovanou lézi. U části vzorků z chirurgických resektátů byla v případně menší léze provedena makrodisekce v parafinovém řezu dle označení na barveném skle k docílení vyššího poměru studované tkáně ve studovaném vzorku vůči zdravé tkáni. Pro izolaci DNA byl použit isolační kit MagCore Genomic DNA FFPE One-Step Isolation kit (Rbc Bioscience, New Taipei, Taiwan) a automatický extraktor nukleových kyselin MagCore HF 16. Množství extrahované DNA bylo změřeno za pomoci kitu dsDNA Broad Range Assay Kit (Invitrogen Qubit, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Ve všech případech bylo postupováno dle návodu výrobce. Postupy izolace jsou shrnuty v Příloze 2.

6.3.2. Vyšetření mutačního stavu genů *KRAS* a *NRAS*

Pro vyšetření mutačního stavu genů *KRAS* a *NRAS* byl použit detekční kit AmoyDx[®] *KRAS* and *NRAS* Mutation Detection Kit (Amoy Diagnostics) a vzorky DNA byly analyzovány metodou real-time polymerázové řetězové reakce (PCR) na systému Cobas Z 480 (Cobas/Roche Molecular Diagnostics). Použití těchto kitů umožňuje detekci mutací v exonu 2 (G12D, G12A, G12V, G12S, G12R, G12C, G13D, G13C), exonu 3 (A59T, Q61K, Q61L, Q61R, Q61H) a exonu 4 (K177N, K177A, A146T, A146V a A146P) genu *KRAS* a mutací v exonu 2 (G12D, G12S, G12C, G12V, G12A, G13D, G13R, G13V), exonu 3 (A59D, Q61R, Q61K, Q61L, Q61H) a exonu 4 (K117N(G>C/T), A146T) genu *NRAS*. Analytická sensitivita *RAS* testů je detekce 2 % mutovaných alel na wild-type nemutovaném pozadí. Postup vyšetření je shrnut v Příloze 3.

6.3.3. Vyšetření mutačního stavu genu *BRAF*

Pro detekci *BRAF* mutací byla použita PCR amplifikační metoda *BRAF* StripAssay (ViennaLab Diagnostics, Vienna, Austria) s reverzní hybridizací produktu. Odečet výsledku hybridizace na proužku (strip) byl hodnocen prostým okem dle protokolu výrobce. Tento test pokrývá mutace genu *BRAF* V600A, V600D, V600E (c.1799T>A), V600E (c.1799_1800TG>AA), V600G, V600K, V600M, V600R a K601E. Analytická sensitivita

testu je detekce 1 % mutovaných alel na wild-type nemutovaném pozadí. Postup vyšetření je shrnut v Příloze 4

6.4 STATISTICKÁ ANALÝZA

Statistická analýza pomocí chí-kvadrát (χ^2 , MS Excel) testu byla použita pro porovnání distribuce lézí mezi typy IBD (UC versus Crohnova choroba) a pro zhodnocení četnosti výskytu *KRAS* a *BRAF* mutace v nekonvenčních lézích.

7. Výsledky

7.1. DESKRIPTIVNÍ CHARAKTERISTIKY CELÉHO SOUBORU

V rámci primární rešerše laboratorního informačního systému bylo nalezeno 309 pacientů s diagnózou IBD a chirurgickým resekatem. Celkem u 153 pacientů z této primární skupiny byly v archivu nalezeny další kontrolní endoskopické vzorky. Celkově jsme tedy byli schopni pro účely studie zrevidovat 547 bioptických případů s dostupným chirurgickým nebo endoskopickým histologickým materiálem. V primárním souboru bylo 156 (50,5 %) mužů a 153 (49,5 %) žen. Celkem byl u 263 pacientů (85,1 %) diagnostikována Crohnova choroba a u 45 (14,6 %) pacientů ulcerózní kolitida. Pouze jeden pacient byl po zhodnocení chirurgického resekatu zařazen do kategorie indeterminované kolitidy (0,3 %). Průměrný věk v době diagnózy IBD v rámci celého souboru byl 38 ± 16 let (rozmezí 7–79 let, medián 36 let). Průměrná doba trvání onemocnění pro celý soubor byla $4,5 \pm 5,9$ roku (rozmezí 0–45 let, medián 2 roky). U 91 pacientů byl vlastní chirurgický resekat diagnostický i pro vlastní onemocnění IBD, především u případů komplikovaných píštělí nebo stenózou. Celkem u 59 pacientů se nepodařilo dohledat některá klinická data, především o době trvání nemoci.

7.1.1. Charakteristiky souboru pacientů se slizničními lézemi

Celkem u 51 pacientů z celého revidovaného souboru (16,5 %) jsme zastihli některou z hledaných slizničních lézí. Tato skupina pacientů byla tvořena 26 muži a 25 ženami. Ulcerózní kolitida byla diagnostikována ve 27 případech a Crohnova choroba ve 24 případech. Průměrný věk v době diagnózy IBD pro tuto skupinu byl 39 ± 15 let (rozmezí 7–79 let, medián 38 let) a průměrná doba trvání onemocnění byla $10,3 \pm 10,3$ let (rozmezí 0–45 let, medián 7 let). Základní charakteristiky celého revidovaného souboru i souboru se slizničními lézemi jsou shrnuty v Tabulce 5.

Tab. 5: Deskriptivní charakteristiky pacientů v souboru

| | Všechny revidované případy N = 309 (100 %) | Podskupina pacientů se slizničními lézemi N = 51 (100 %, § 16,5 %) |
|---|---|--|
| Muži | 156 (50,5 %) | 26 (51,0 %) |
| Ženy | 153 (49,5 %) | 25 (49,0 %) |
| Typ IBD | | |
| CD | 263 (85,1 %) | 27 (52,9 %) |
| UC | 45 (14,6 %) | 24 (47 %) |
| Neurčená (indeterminovaná kolitida) | 1 (0,3 %) | 0 |
| Věk a trvání nemoci v letech | | |
| Věk v době diagnózy IBD | medián 36 let (rozmezí 7–79 let) | medián 38 let (rozmezí 7–79 let) |
| | průměr 38 ± 16 let | průměr 39 ± 15 let |
| Trvání IBD v letech – dostupná data u 250 resp. 39 pacientů | medián 2 roky (rozmezí 0–45 let) | medián 7 let (rozmezí 0–45 let) |
| | průměr 4,5 let ± 5,9 let | průměr 10,3 ± 10,3 let |

Pozn.: § – procento pacientů se slizniční lézí z celého souboru revidovaných případů

Zkratky: CD – Crohnova choroba; IBD – idiopatický střevní zánět; UC – ulcerózní kolitida; N – počet

7.1.2. Charakteristiky samostatné skupiny pacientů s IBD-asociovaným karcinomem

V celém revidovaném souboru pacientů jsme identifikovali 11 případů IBD-asociovaného KRK. Pro deskriptivní účely byly jednotlivé případy KRK označeny čísly 1–11. Základní diagnóza ulcerózní kolitidy byla diagnostikována u 8 pacientů a Crohnovy choroby u 3 pacientů. Jednalo se o 6 žen a 5 mužů s věkovým rozmezím 26–79 (medián 42 let; průměr 45 ± 15 let). Nejmladší pacient s adenokarcinomem byl diagnostikovaný ve 26 letech a dalších 6 pacientů bylo mladších 45 let. Průměrný věk pacientů v době stanovení diagnózy IBD byl 33 ± 16 let (rozmezí 7–79 let, medián 24 let). Z celé skupiny byla u 4 pacientů diagnóza IBD stanovena v dětském věku (do 18. roku věku) a celkově u 7 pacientů byla IBD stanovena ve věku nižším než 40 let (dle Montrealské klasifikace A2). [7] Doba trvání IBD do rozvinutí KRK byla v rozmezí 0–31 let (medián 15 let; průměr 15 ± 10 let). U většiny pacientů byl karcinom diagnostikován po delší době od stanovení základní diagnózy IBD. U dvou pacientů (případ 4 a 11) byla diagnóza IBD i KRK stanovena ze stejného resekcčního materiálu a u dvou pacientů (případy 1 a 10) byla IBD diagnostikována pouze 10 resp. 13 měsíců před stanovením diagnózy KRK.

Deskriptivní charakteristiky pro skupinu pacientů s KRK jsou uvedeny samostatně v Tabulce 6

Tab. 6: Věk pacientů v době diagnózy IBD a kolorektálního karcinomu a doba trvání IBD do doby diagnózy malignity pro podskupinu IBD-asociovaných KRK.

| Věk | Medián a rozmezí | Průměr |
|---------------------------------|--------------------|-----------------|
| v době diagnózy IBD | 24 let (7–79 let) | 33 ± 16 let |
| v době diagnózy KRK | 42 let (26–79 let) | 45 ± 15 let |
| Trvání IBD do doby diagnózy KRK | 15 let (0–31 let) | 13 ± 10 let |

Zkratky: IBD – idiopatický střevní zánět; KRK – kolorektální karcinom

7.2. Typy a četnost slizničních lézí a jejich vztah k typu IBD

Celkově jsme u 51 pacientů zachytili 88 slizničních lézí, které byly nalezeny v 78 vzorcích, resp. řezech. Celkem 55 lézí (62,5 %) bylo zachyceno v resekátech a 33 lézí (37,5 %) v endoskopickém vzorku. Studované slizniční léze bylo následně možné rozdělit do 3 kategorií:

1. nekonvenční slizniční léze (předpokládané prekurzorové léze, PPL, celkem 56 z 88 lézí u 42 pacientů) jako pilovitá epiteliální změna (serrated epithelial change, SEC) a vilózní hypermucinózní změna;

2. pravé pilovité polypy (15 z 88 lézí, u 11 pacientů), mezi které se řadí hyperplastický polyp (HP), sesilní pilovitý adenom/polyp (sessile serrated adenoma, SSA) a tradiční pilovitý adenom (traditional serrated adenoma, TSA) a které splňují platná histologická kritéria dle WHO klasifikace nádorů gastrointestinálního traktu [29];

3. konvenční IBD dysplázie a IBD-asociovaný adenokarcinom (17 z 88 lézí, u 13 pacientů). Více než jedna slizniční léze byla zachycena celkem u 19 pacientů, a to nejčastěji (12 pacientů) ve smyslu více typů i počtu lézí ve stejném chirurgickém resekátu (v různých blocích) nebo v časově stejném endoskopickém vzorku (ve více etážích) anebo v kombinaci více lézí v resekátu a dále v dodatečném endoskopickém kontrolním materiálu stejného pacienta (6 pacientů). Viz. Tab. 9 na straně 76.

Nejčastěji zastiženými změnami byly léze ze **skupiny nekonvenčních lézí (skupina 1)**, z nichž se nejvíce vyskytovala pilovitá epiteliální přeměna (41 lézí, 46,6 %). Z této skupiny PPL byla dále zastižena vilózní hypermucinózní přeměna (6 lézí, 6,9 %) a obtížně zařaditelné změny s kombinovanou pilovitou i hypermucinózní morfologií (5 lézí, 5,8 %). Nejméně častou lézí ze skupiny PPL byla pilovitá změna podobná hyperplastickému polypu (HP-like serrated change, 4 léze, 4,6 %). Celkově pak nekonvenční slizniční změny ze skupiny 1 představovaly 56 lézí (64,4 %). Ve skupině 1 (PPL) byla ze všech 56 lézí více než polovina zastižena u pacientů s UC (30 z 56 resp. 53,6 %). Zbýlých 26 lézí bylo zastiženo u pacientů s Crohnovou chorobou (46,4 %). Nicméně pokud zvážíme distribuci podtypů IBD v celém revidovaném souboru 309 pacientů, pak byly PPL léze zastiženy mnohem častěji u ulcerózní kolitidy, a to 30 lézí ve 45 případech UC (66,6 %), na rozdíl od Crohnovy choroby, kde bylo zachyceno 26 lézí v celkově 263 revidovaných případech (9,9 %). Většina těchto lézí byla

také zastižena v terénu chronického (42,9 %) nebo aktivního zánětu (46,4 %) a pouze 6 případů (10,7 %) bylo zachyceno v části střeva, která nebyla postižena zánětem.

Skupinu 2 tvořilo 15 lézí (17,2 %) s nejčastěji zastoupeným sesilným pilovitým adenomem (SSA, 7 případů, 8 %) a druhým nejčastějším hyperplastickým polypem (6 případů, 6,9 %). TSA byl zastižen pouze ve dvou případech (2,3 %). Ve skupině 2 bylo 10 lézí zastiženo u UC, z čehož se nejčastěji jednalo o SSA (6 případů). Zbýlých 5 lézí bylo zastiženo u Crohnovy choroby, a to nejvíce v podobě HP (4 případy). Distribuce pravých pilovitých polypů v závislosti na zánětlivém pozadí byla relativně rovnoměrná s celkem osmi lézemi zastiženými v zánětlivém terénu (aktivním nebo chronickým) a 7 lézemi v terénu nezápětlivém.

Ve skupině 3 jsme pak zaznamenali 6 případů konvenční IBD dysplázie a 11 případů IBD-asociovaného kolorektálního karcinomu. Ve skupině 3 byla opět většina případů zastižena u ulcerózní kolitidy, a to především u případů s KKK (8 případů). Všechny dysplázie i karcinomy byly zastiženy v části střeva postižené zánětem.

Typy lézí a jejich četnost jsou shrnuty v **Tabulce 7**. Zastoupení jednotlivých lézí dle typu IBD, zánětlivého pozadí a vztahu ke KKK je podrobně uvedeno v **Tabulce 8**.

Tab. 7: Rozdělení 88 slizničních lézí do morfologických typů a skupin.

| Typ léze | N | Procentuální zastopení ze všech lézí N = 88 (100 %) |
|--|----|--|
| Skupina 1 – PPL <i>N = 56 (u 42 pacientů); 63,6 %</i> | | |
| Pilovitá epiteliální změna – SEC | 41 | 46,5 % |
| Vilózní hypermucinózní změna | 6 | 6,8 % |
| Kombinovaná pilovitá a vilózní léze | 5 | 5,7 % |
| HP-like léze | 4 | 4,5 % |
| Skupina 2 – Pravé pilovité polypy <i>N = 15 (u 11 pacientů); 17,1 %</i> | | |
| HP | 6 | 6,8 % |
| SSA | 7 | 8 % |
| TSA | 2 | 2,3 % |
| Skupina 3 – IBD–asociované neoplázie <i>N = 17 (u 13 pacientů); 19,3 %</i> | | |
| IBD dysplázie | 6 | 6,8 % |
| IBD-asociovaný KRK | 11 | 12,5 % |

Zkratky: HP – hyperplastický polyp; HP-like léze – hyperplastickému polypu podobná léze; IBD – idiopatický střevní zánět; KRK – kolorektální karcinom; N – počet; PPL – potenciální prekursorová léze; SEC – pilovitá epiteliální změna; SSA – sesilní pilovitý adenom; TSA – tradiční pilovitý adenom

Tab. 8: Vztah různých typů lézí k typu IBD, zánětlivému pozadí a KRK.

| | Skupina 1 PPL N = 56 | Skupina 2 Pravé pilovité polypy N = 15 | Skupina 3 IBD– asociovaná neoplázie N = 17 | Všechny léze N = 88 |
|-------------------------------|----------------------------|---|---|----------------------------|
| Typ IBD | | | | |
| UC | 30 (53,6 %, § 66,6 %) * | 10 (66,7 %) | 12 (70,6 %) | 52 (59,1 %) # |
| CD | 26 (46,4 %, § 9,9 %) * | 5 (33,3 %) | 5 (29,4 %) | 36 (40,9 %) # |
| Typ buněčného pozadí ‡ | | | | |
| | | | IBD dysplázie N = 6 | Hodnocené léze N = 77 ‡ |
| Aktivní zánět | 26 (46,4 %) | 4 (26,6 %) | 1 (16,7 %) | 31 (40,3 %) |
| Chronický zánět | 24 (42,9 %) | 4 (26,6 %) | 5 (83,3 %) | 33 (42,8 %) |
| Nezánětlivé | 6 (10,7 %) | 7 (46,8 %) | 0 | 13 (16,9 %) |
| Asociace s KRK † ‡ | | | | |
| Přilehlé ke KRK | 6 (11 %, † 60 %) | 1 (6,7 %) | 4 (66,7 %) | 11 (14,2 %) |
| Vzdálené od KRK | 8 (14,2 %, † 80 %) | 1 (6,7 %) | 0 | 9 (11,7 %) |
| V kontrolní biopsii | 3 (5,4 %, † 30 %) | 0 | 0 | 3 (3,9 %) |

Poznámka:

§ – procento případů z celého souboru 309 případů dle distribuce UC a CD

† – procento případů v rámci skupiny IBD–asociovaného KRK

‡ – procento z hodnotitelných lézí, bez KRK

* $p = 2,2 \times 10^{-27}$ porovnávací výskyt PPL v rámci UC a CD v rámci celého souboru

$p = 0,04$ pro častější výskyt jakékoliv slizniční léze v IBD typu UC než CD

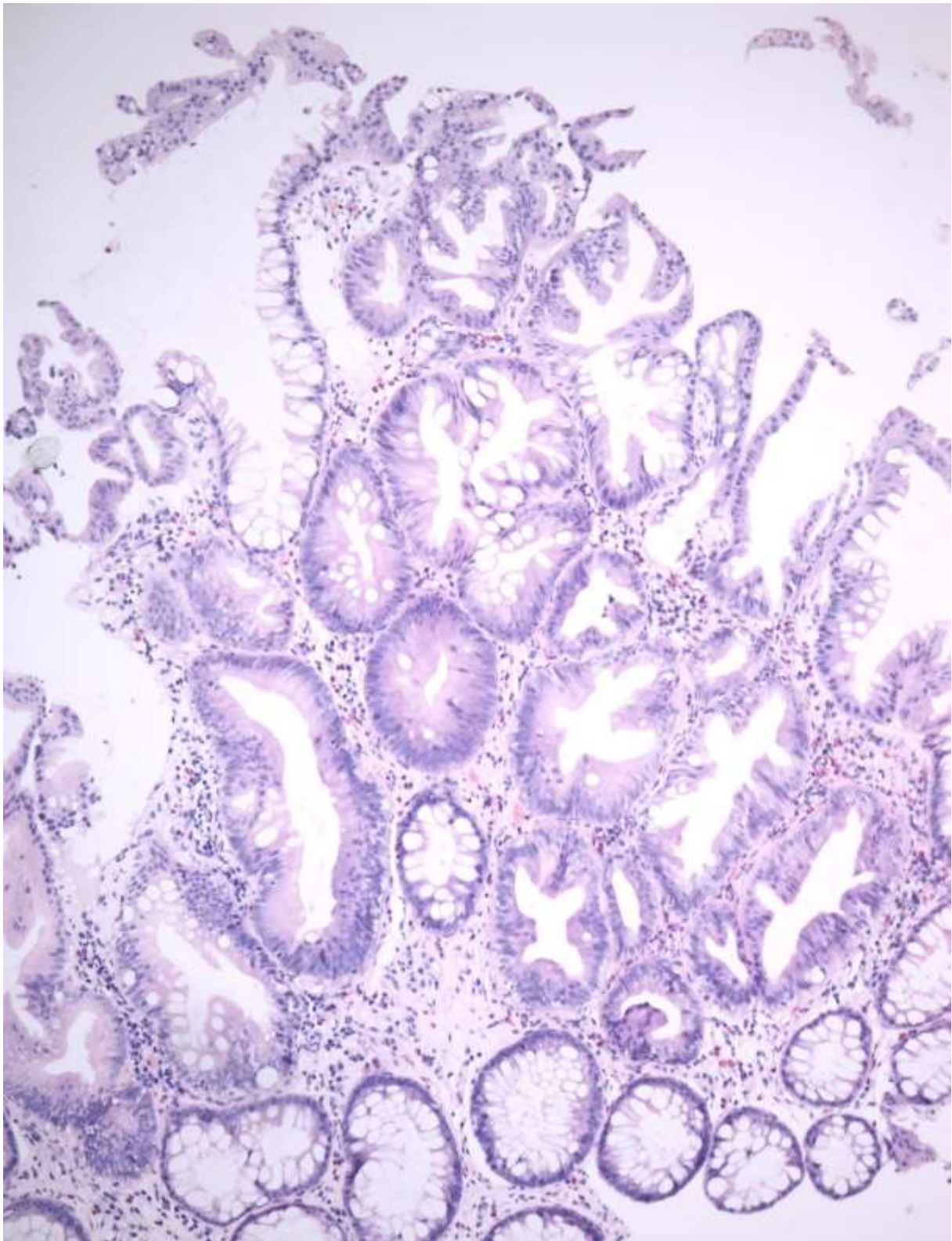
Zkratky: CD – Crohnova choroba; IBD – idiopatický střevní zánět; KRK – kolorektální karcinom; N – počet; PPL – potenciální prekursorová léze; UC – ulcerózní kolitida

7.2.1. Morfologické charakteristiky nekonvenčních slizničních lézí ve skupině 1 a jejich vztah ke kolorektálnímu karcinomu

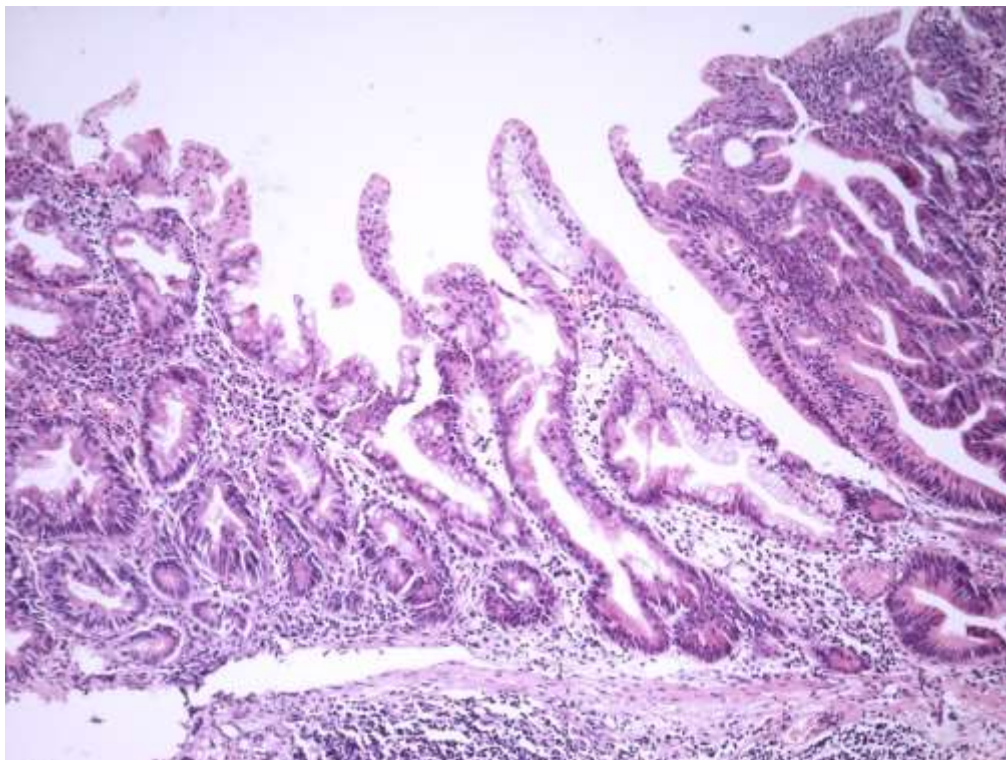
Pilovitá epiteliální změna (SEC) byla charakterizována variabilně vyjádřenou pilovitou přeměnou povrchové sliznice a žlázek. (Obr. 8) Léze byly obvykle ploché a přisedlé nebo lehce elevované a v některých případech tvořily drobné povrchové papilární výběžky. Většina lézí byla ostře ohraničena od okolní sliznice, nicméně větší plošné až kobercovité léze byly také zastiženy, a to v některých vzorcích z chirurgických resektátů. Pilovité změny byly zachyceny především v horní nebo střední třetině sliznice bez nápadnější dilatace žlázek při bazi, čímž se lišily od pravého polypu typu SSA. V části lézí byla patrná ztráta hlenotvorby v epitelu, která dodávala lézím hypereozinofilní vzhled. Jádra epitelíí byla obvykle lehce zvětšená, oválná a vezikulární, někdy s patrnými jádérky.

Nicméně nápadnější atypie a jaderná hyperchromázie suspektní z dysplázie byly nalezeny pouze ve 3 případech (Obr. 9). Jedna z těchto lézí typu SEC s dysplázií byla zastižena u jednoho pacienta ve stejném resektátu jako karcinom, ale v bloku vzdáleném od vlastního KRK. Další tři léze typu SEC byly asociovány s KRK ve stejném bloku a byly v těsném vztahu ke karcinomu (Obr. 10). Osm dalších SEC lézí bylo zachyceno v jiném bloku vzdáleném od KRK a 2 SEC léze byly nalezeny v dodatečném endoskopickém bioptickém vzorku.

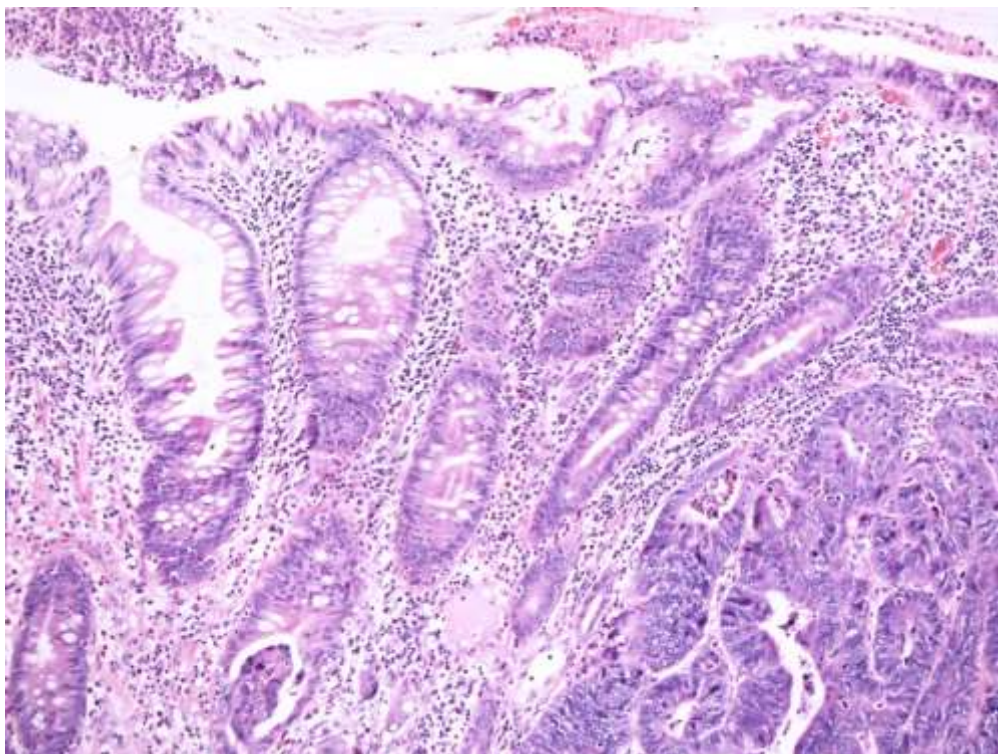
Obr. 8: Příklady pilovité epiteliální změny (SEC) bez dysplázie v endoskopickém vzorku.
Barvení HE, zvětšení 100x.



Obr. 9: SEC s dysplázií ve vzorku z resektátu, léze nespĺňuje kritéria pro SSA/P. *Barvení HE, zvětšení 100x.*

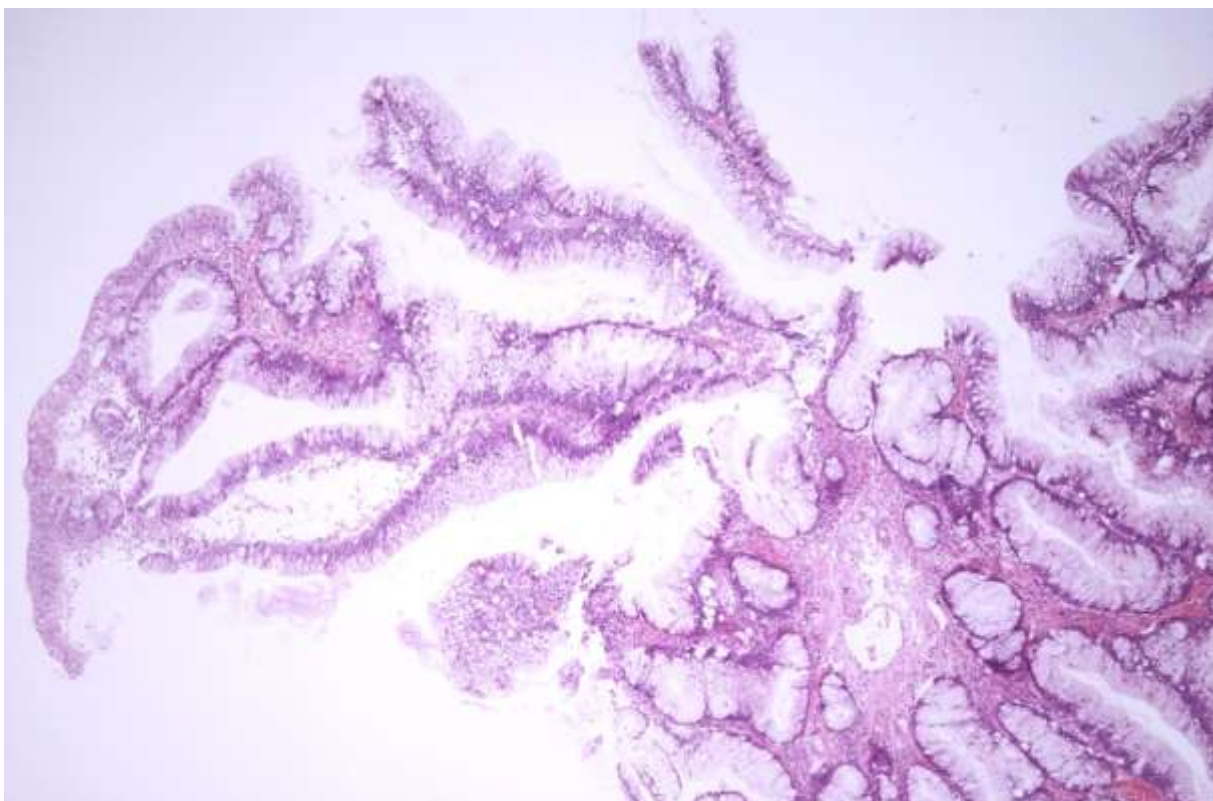


Obr. 10: SEC s přímým přechodem do invazivního adenokarcinomu. *Barvení HE, zvětšení 100x.*

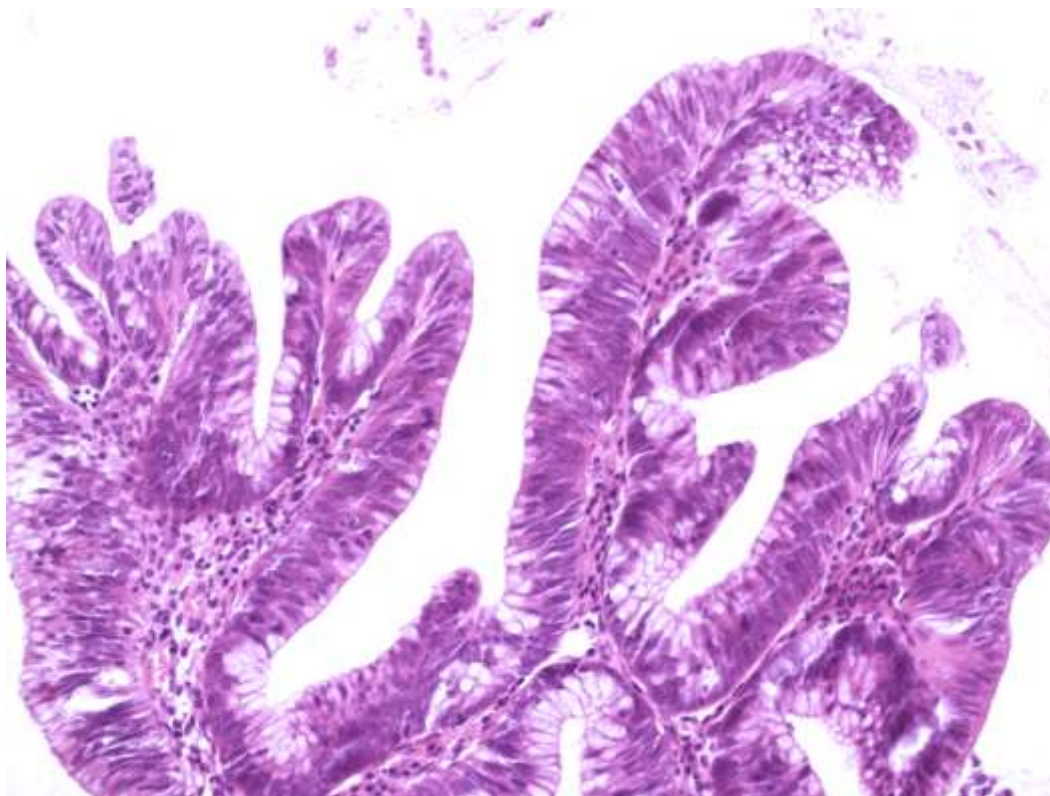


Vilózní hypermucinózní změna byla zastižena v 6 vzorcích a byla tvořena tenkými jemnými papilárními, resp. vilózními výběžky v jinak ploché sliznici. Papily byly lemovány cylindrickým epitelem s nápadně světlou cytoplazmou. (Obr. 11) Jádra epitelu byla obvykle menší, okrouhlá s kondenzovaným chromatinem nebo vezikulární a obvykle bazálně lokalizovaná. Nápadná hyperchromazie, změna nukleocytoplazmatického poměru a přechod do dysplázie byly zastiženy v jedné vilózní lézi z kontrolní endoskopické biopsie u pacienta s ulcerózní kolitidou (Obr. 12) a u jednoho pacienta přímo v sousedství KRK. (Obr. 13) Ve dvou dalších případech vilózní změny asociované s přilehlým KRK nebyla zastižena dysplázie, ale přechod vilózní léze do karcinomu byl plynulý a nádorové buňky karcinomu si zachovávaly obdobný světlý až mucinózní vzhled. Tyto dva případy budou podrobněji popsány v rámci morfológických charakteristik IBD-asociovaného karcinomu v kapitole 7.2.4. na str. 77.

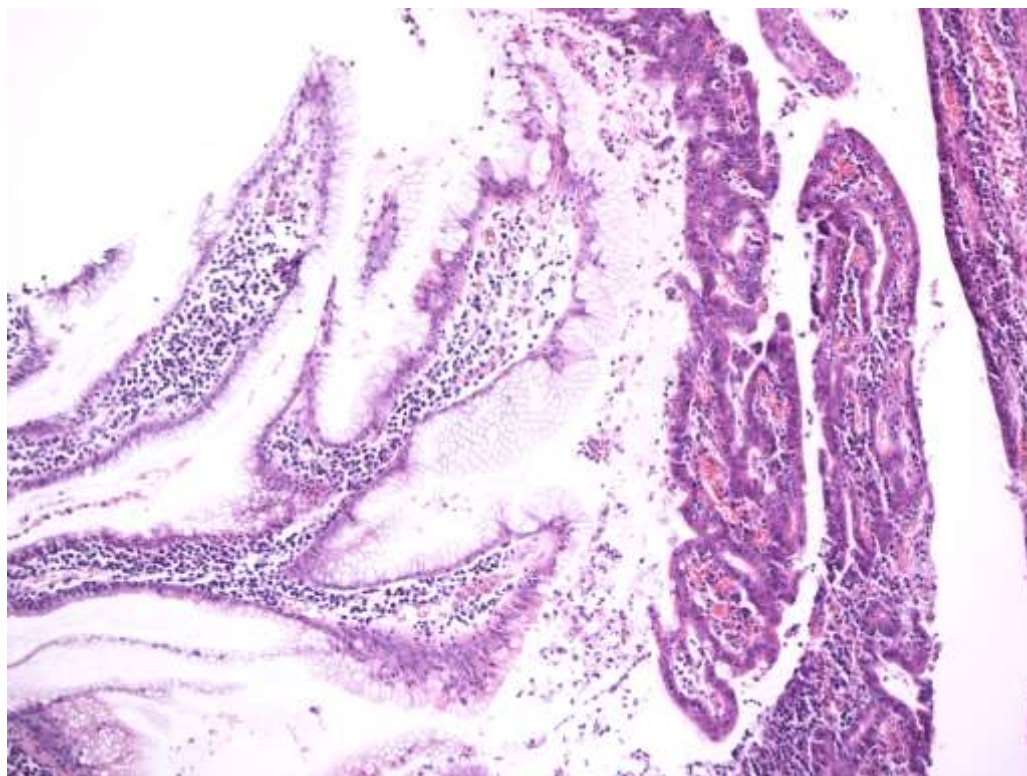
Obr. 11: Vilózní hypermucinózní změna bez dysplázie v endoskopickém vzorku. *Barvení HE, zvětšení 40x.*



Obr. 12: Vilózní hypermucinózní změna s dysplázií. *Barvení HE, zvětšení 200x.*

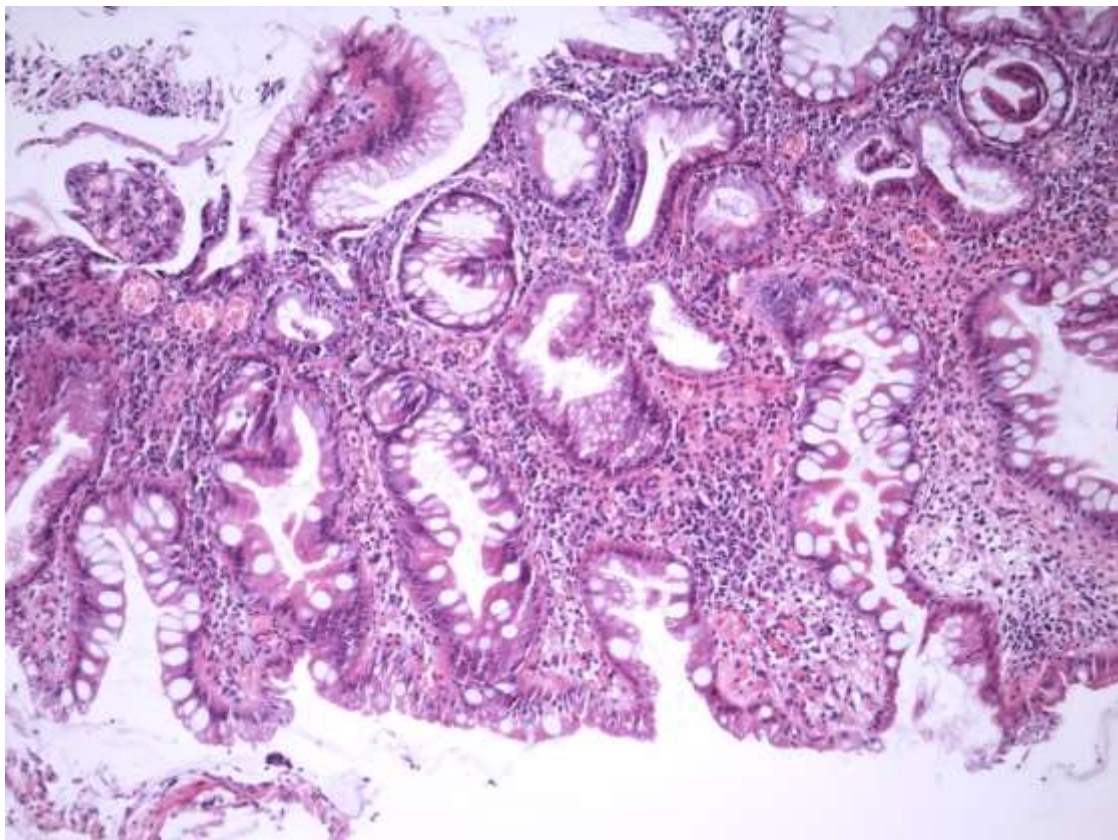


Obr. 13: Vilózní hypermucinózní změna v přímém přechodu do invazivního adenokarcinomu. *Barvení HE, zvětšení 100x.*

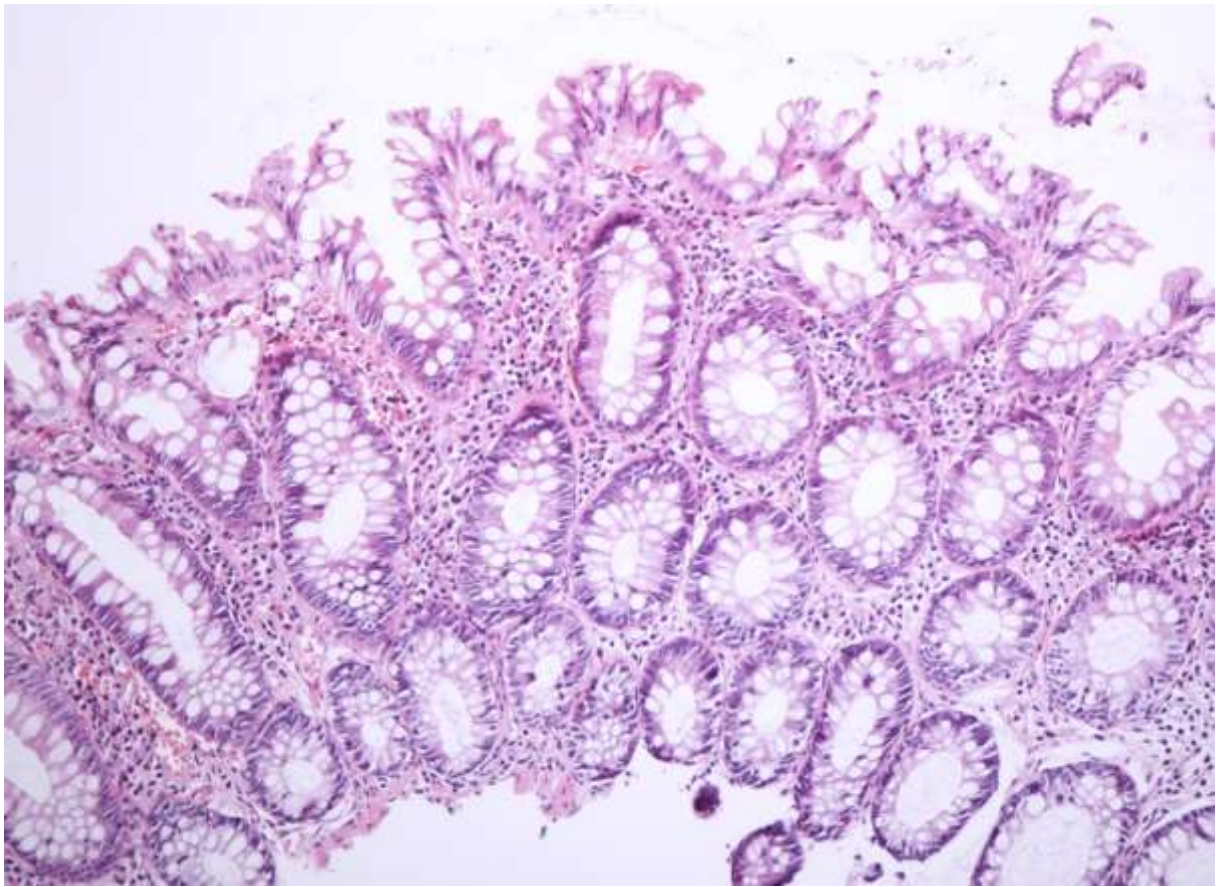


Pět studovaných slizničních lézí pak v morfológii kombinovalo oba růstové a buněčné vzory s fokusy pilovité přeměny podobně jako v SEC, ale epitelié vykazovaly ložiskově hypermucinózní přeměnu anebo tvorbu vilózních formací. (Obr. 14) Přesné zařazení lézí bylo obtížné a hodnoceny tedy byly samostatně jako **smíšené pilovité/hypermucinózní léze** stejně jako 4 případy lézí **podobných hyperplastickému polypu (HP-like léze)** z důvodu podobnosti s hyperplastickým polypem, ale bez splnění všech kritérií pro HP. (Obr. 15). Žádná z těchto lézí nebyla asociována s kolorektálním karcinómem.

Obr. 14: Morfologie smíšené léze s pilovitými rysy (dolní část) a vilózní hypermucinózní komponentou (vlevo nahoře). *Barvení HE, zvětšení 40x.*



Obr. 15: Léze podobná hyperplastickému polypu (HP-like léze). Barvení HE, zvětšení 40x.



7.2.2. Pravé pilovité polypy a IBD dysplázie a jejich vztah ke KRK

V rámci vyšetřovaného souboru byly zastiženy všechny typy **pilovitých polypů**.

Hyperplastické polypy (6 případů) byly nejčastěji přítomny v dodatečných endoskopických vzorcích a v nezápětlivém pozadí (4 ze 6). Sesilní pilovitý adenom (SSA, 7 případů) byl zastižen jak v zánětlivém (aktivním i chronickém) pozadí (4 ze 7) tak v nezápětlivé sliznici (3 ze 7). Žádný ze SSA polypů nevykazoval dysplastické změny, nicméně jeden případ SSA byl zastižen u pacienta s IBD-asociovaným KRK, ale v bloku mimo vlastní karcinom. Oba zachycené TSA byly sdruženy s dysplázií, jeden případ s low-grade dysplastickými změnami, druhý s high-grade dysplázií. High-grade TSA byl zastižen u pacienta s KRK ve stejném resekátu jako léze přilehlá ke karcinomu.

IBD dysplázie byla celkově zastižena v 6 případech. Morfologicky byla u všech lézí splněna kritéria adenomatózní dysplázie se zvětšenými hyperchromními jádry, zvýšeným nukleocytoplazmatickým poměrem a atypii. Tři případy byly hodnoceny jako low-grade stupeň dysplastických změn. High-grade dysplázie byla popsána v dalších třech lézích, které vykazovaly i komplexní architektonické změny, atypie vyššího stupně, ale bez známek invazivního růstu. Čtyři z případů IBD dysplázie byly zastiženy v přímém přechodu do invazivního karcinomu, a to včetně dvou případů low-grade dysplázie.

7.2.3. Výskyt více typů lézí u jednoho pacienta

Léze z jednotlivých skupin byly zastiženy v různých kombinacích celkem u 19 pacientů. Zachyceny byly jak kombinace lézí ze skupiny PPL a pravých pilovitých polypů (SEC a PPP, 5 případů), tak kombinace PPL a IBD-dysplázie (SEC a IBD-dysplázie ve 3 případech, vilózní hypermucinózní změna a IBD-dysplázie v 1 případě). U 8 pacientů s KRK pak byly zastiženy v různých kombinacích léze ze skupiny PPL, pravých pilovitých polypů i prekurzorové dysplázie. Výskyt jednotlivých kombinací lézí včetně pacientů s IBD-asociovaným KRK je v Tab. 9. Pro pacienty s KRK je pak ještě doplněno schématické zobrazení na Obr. 16.

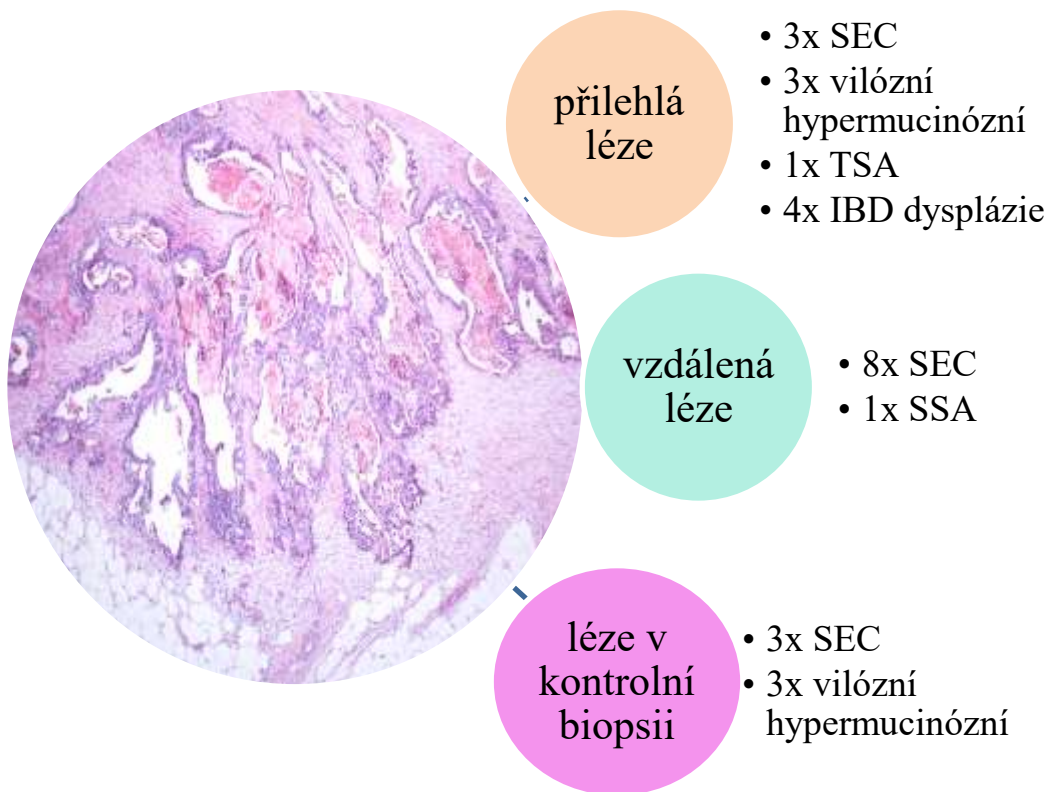
Tab. 9: Kombinace různých typů lézí v případě nálezu u jednoho pacienta.

| Typy lézí v kombinaci | Počet pacientů s danou kombinací* | Typ materiálu |
|--|-----------------------------------|--|
| SEC + SSA | 4 | různé biopsie |
| SEC + HP | 1 | různé biopsie |
| SEC + KRK | 8 | 3x přilehlá léze, 8x vzdálená léze, 3x v dodatečné biopsii |
| vilózní hypermucinózní + TSA | 1 | různé biopsie |
| vilózní hypermucinózní + IBD-dysplazie | 1 | různé biopsie |
| vilózní hypermucinózní + KRK | 3 | 3x přilehlá léze, 3x v dodatečné biopsii |
| SEC + vilózní hypermucinózní + KRK | 2* | 1x přilehlá léze, 1x v dodatečné biopsii |
| SEC + IBD-dysplázie + KRK | 3* | SEC jako léze v dodatečné biopsii |

* pacienti s trojkombinací jsou zahrnuti i v součtu dvojkombinace (SEC + KRK, vilózní hypermucinózní + KRK)

Zkratky: HP – hyperplastický polyp; IBD – idiopatický střevní zánět; KRK – kolorektální karcinom; N – počet; PPL – potenciální prekursorová léze; SEC – pilovitá epitelální změna; SSA – sesilní pilovitý adenom; TSA – tradiční pilovitý adenom

Obr. 16: Zjednodušené schéma vztahu různých slizničních lézí ke KKK popsaných u pacientů s IBD–asociovaným karcinomem.



Zkratky: IBD – idiopatický střevní zánět; SEC – pilovitá epiteliální změna; SSA – sesilní pilovitý adenom; TSA – tradiční pilovitý adenom

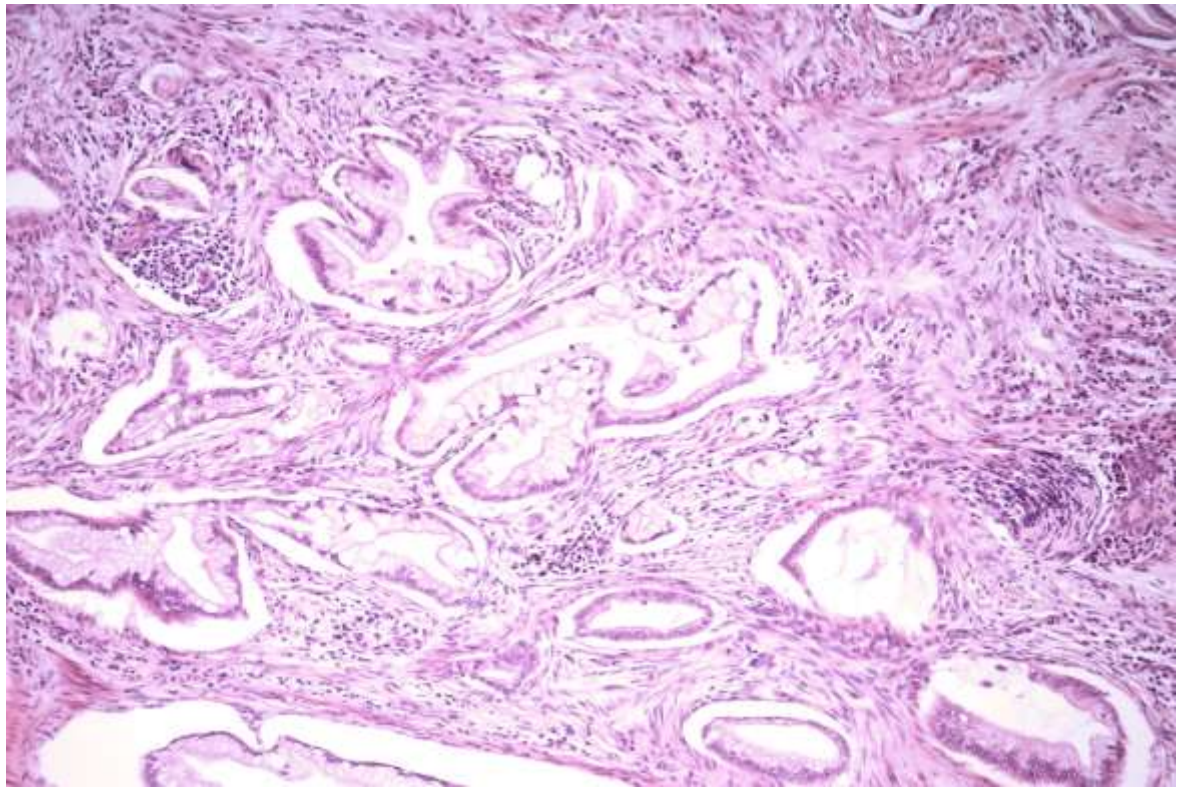
7.2.4. Morfologické charakteristiky studovaných IBD-asociovaných kolorektálních karcinomů

V rámci samostatného hodnocení byly karcinomy podrobně definovány, klinické charakteristiky jsou popsány v Tabulce 10. Přestože všechny případy spadaly do morfologické kategorie blíže neurčeného adenokarcinomu tlustého střeva (adenocarcinoma, NOS - not otherwise specified), vykazovaly jednotlivé případy výraznou vnitronádorovou heterogenitu. Podrobné histomorfologické charakteristiky jsou uvedeny pro každý případ v Tabulce 11. Nádorový grade stanovený dle kritérií platné WHO Klasifikace nádorů bylo možné stanovit v deseti z jedenácti případů. [29] Grade nemohl být stanoven u jednoho případu po předchozí neoadjuvantní chemoradioterapii (případ 11), u kterého zároveň nebyl dostupný diagnostický vzorek před terapií. Větší část karcinomů byla hodnocena jako grade 2 (6 z 10) s různým podílem tubulárních a kribriformních formací. Dva karcinomy byly hodnoceny jako dobře diferencované a další dva jako high-grade (grade 3) karcinomy. Oba dobře diferencované (grade 1) karcinomy (případ 1 a 5) sdílely podobné morfologické rysy. Oba byly tvořeny dobře diferencovanými žlázkami s kuboidními nebo cylindrickými nádorovými buňkami se světlou cytoplazmou připomínající gastrickou foveolární diferenciaci. (Obr. 17) Gastrická diferenciacie byla následně potvrzena částečnou imunohistochemickou expresí antigenů MUC5AC a MUC6 v nádorových buňkách (vyšetřeno pro účely publikace na jiném pracovišti, není uvedeno v metodách). Ve 3 případech KRK byla zastižena minoritní (cca 20–30 %) komponenta vzhledu mucinózního karcinomu. V jednom případně pak tvořila převažující součást nádoru (přes 60 %). Jeden případ (případ 3) vykazoval kombinaci komponenty tvořené špatně kohezivními elementy s morfologií pečetního prstenu a komponenty mucinózní a kribriformní s nektrózami komedo typu.

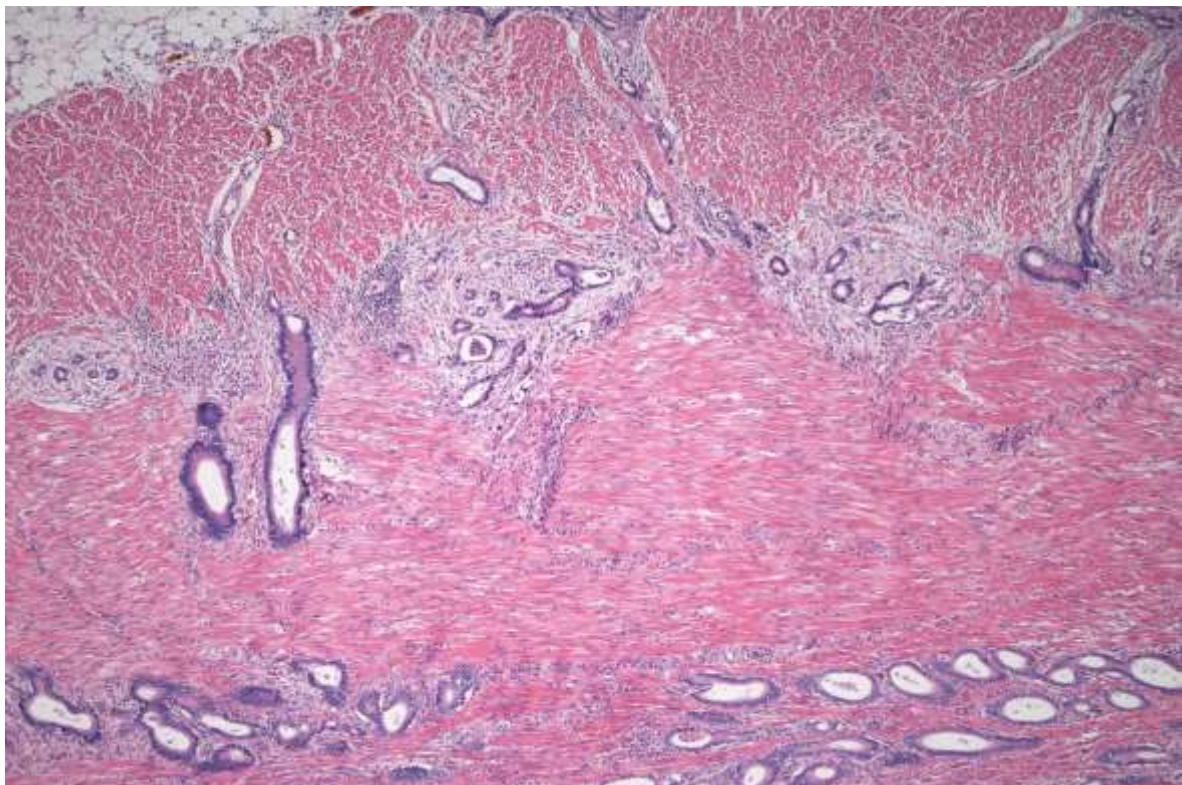
Osm případů KRK vykazovalo invazi do lymfatických cév. U všech se jednalo o tzv. extramurální typ lymfangioinvaze; u čtyř byla zároveň zastižena i intramurální lymfangioinvaze. Invaze do krevních cév byla prokázána u 3 karcinomů. U tří případů KRK (případy 6, 8 a 9) bylo zjištěno výrazné perineurální šíření. U všech se jednalo o prominentní infiltraci myenterického plexu s výrazným horizontálním charakterem propagace nádorových buněk. (Obr. 18).

Osm karcinomů spadalo do kategorie Bd1 nádorového buddingu (0 nebo lehký stupeň) i přes infiltrativní charakter nádorové hranice. Dva případy byly hodnoceny jako střední intenzita buddingu (Bd2) a další dva případy jako vysoký stupeň buddingu (Bd3). (Obr. 19)

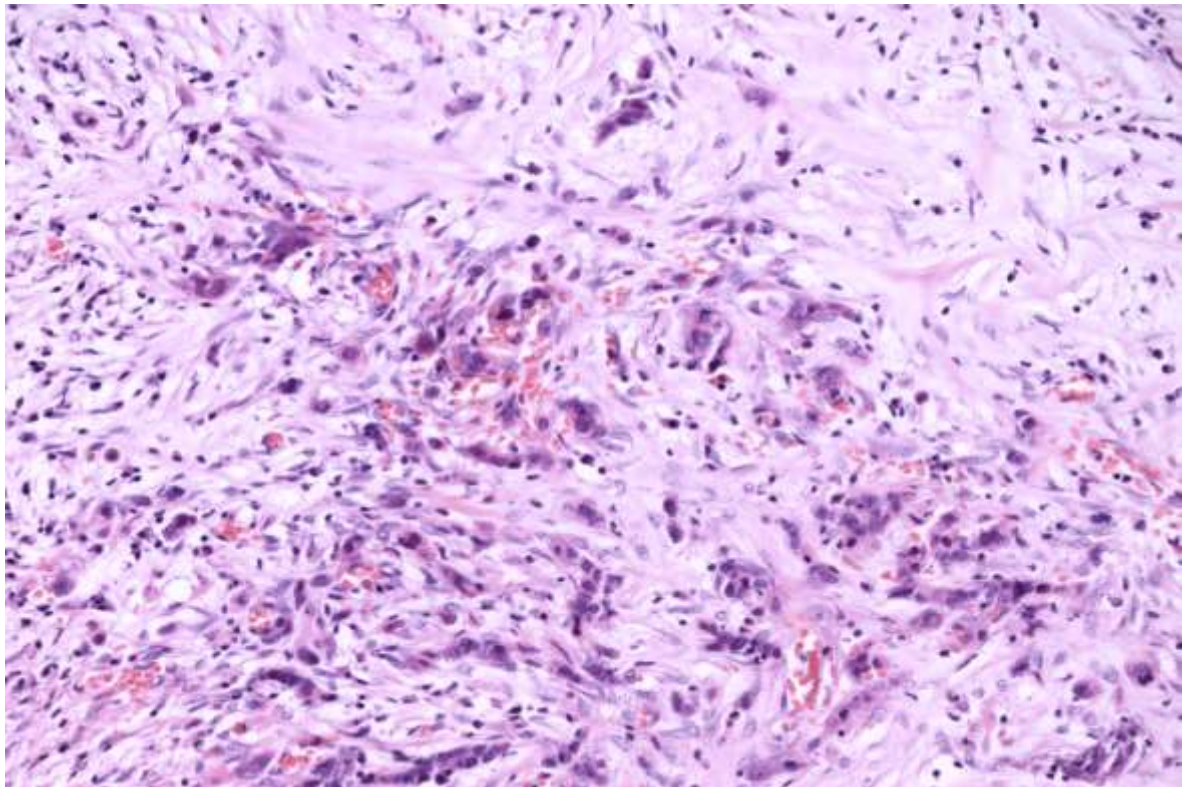
Obr. 17: Dobře diferencovaný karcinom s gastrickou diferenciací a blandním vzhledem. Barvení HE, zvětšení 100x.



Obr. 18: Perineurální invaze v myenterickém plexu. Barvení HE, zvětšení 40x.



Obr. 19: Hotspot nádorového buddingu s 20 „buds“ v ploše 0,785 mm² spadající do kategorie Bd3. Barvení HE, zvětšení 200x.



Většina karcinomů byla lokalizována v levém kolon a rektu (7 z 11), zbylé případy byly zastiženy v příčném tračníku (2 případy), céku a vzestupném tračníku. Podle typu IBD byl pak u 5 pacientů s UC zastižen karcinom v oblasti rektosigmatu, zbylé KRK u UC pacientů pak byly zastiženy v příčném tračníku, céku a vzestupném tračníku. Dva případy KRK asociovaného s CD byly zastiženy v oblasti slezinného ohbí a jeden případ KRK v příčném tračníku. Po rozdělení dle klinického stadia byly dva případy hodnoceny jako stadium I, 4 případy jako stadium II a pět případů jako klinické stadium III. Čtyři případy vykazovaly extenzivně infiltrativní růst hodnocený jako pT4 a celkem u 5 případů KRK byly zastiženy uzlinové metastázy.

Tab. 10: Klinické charakteristiky pacientů s IBD-asociovaným KRK.

| Případ č. | Pohlaví | Typ IBD | Věk (v době KRK, v letech) | Lokalizace KRK | Staging KRK – pTNM a klinické stadium |
|-----------|---------|---------|----------------------------|-------------------|---------------------------------------|
| 1 | Ž | CD | 29 | slezinné ohbí | pT3 pN1b IIIB |
| 2 | Ž | UC | 26 | sestupný tračník | pT3 pN0 IIA |
| 3 | M | UC | 36 | rektum | pT4a pN2b IIIC |
| 4 | Ž | UC | 57 | příční tračník | pT4 pN1b IIIB |
| 5 | Ž | UC | 42 | vzestupný tračník | pT2 pN0 I |
| 6 | Ž | UC | 48 | rektum | pT2 pN0 I |
| 7 | M | UC | 42 | cékum | pT1 N1 IIIA |
| 8 | Ž | CD | 31 | příčný tračník | pT3 pN0 II |
| 9 | M | CD | 55 | slezinné ohbí | pT4a N2b IIIC |
| 10 | M | UC | 52 | rektum | pT3 pN0 IIA |
| 11 | M | UC | 79 | rektum | ypT4a ypN0 IIB |

Zkratky: CD – Crohnova choroba; IBD – idiopatický střevní zánět; KRK – kolorektální karcinom; M – muž; pTNM – patologický staging tumor – node – metastasis; UC – ulcerózní kolitida; Ž – žena

Tab. 11: Histomorfologické charakteristiky IBD-asociovaných KRK.

| Případ č. | Grade | Histomorfologie KRK | Cytologické vlastnosti – cytoplazma, jádra, jádérka | Morfologické markery – konfigurace nádorové hranice, Bd, LyAI, AI, Pn |
|-----------|---------|---|--|---|
| 1 | grade 1 | větší nepravidelné žlázy, světlé, gastrická diferenciace | světlá cytoplazma, oválná a okrouhlá jádra, nenápadná jádérka | infiltrativní hranice, Bd0, LyAI ext, AI 0, Pn 0 |
| 2 | grade 2 | velké kribriformní žlázy | tmavě eosinofilní cytoplazma, apikální výběžky, velká jádra, nápadná jádérka | infiltrativní hranice, Bd2 (5), LyAI ext, Ai 0, Pn 0 |
| | | mucinózní komponenta (30 %) | světlá cytoplazma, menší jádra | |
| 3 | grade 3 | solidně kribriformní růst, komedo nekrózy | tmavě eosinofilní cytoplazma, neuroendokrinní rysy, velká jádra s jádérky | infiltrativní hranice, Bd3 (20), LyAI int/ext, AI int/ext, Pn ext |
| | | mucinózní komponenta (30 %) | světlá cytoplazma, malá jádra | |
| | | špatně kohezivní (difúzní) komponenta (30 %) | světlá cytoplazma, vakuoly s hlenem, malá jádra | |
| 4 | grade 2 | kribriformní růst, komedo nekrózy | cylindrické elementy s hojnou cytoplazmou, velká jádra, hrubý chromatin, misty jádérka | infiltrativní hranice, Bd2 (6), LyAI ext, Ai 0, Pn 0 |
| 5 | grade 1 | tubulární růst, gastrická diferenciace (foveolární) | tmavší cytoplazma v tubulárních oblastech, světlá cytoplazma s hlenem, vesikulární jádra s jádérky | expanzivní hranice, Bd0, LyAI 0, AI 0, Pn 0 |
| | | mucinózní komponenta (20 %) | světlá cytoplazma | |
| 6 | grade 2 | pilovitý a tubulopapilární růst, splývající kribriformní struktury, horizontální myenterické šíření | hojná tmavá eosinofilní cytoplazma, velká jádra s jádérky | infiltrativní hranice, Bd 0, LyAI 0, AI 0, Pn int ext myenterické |

Zkratky: Ai – angioinvaze; Bd – budding; ext – extramurální; IBD – idiopatický střevní zánět;

int – intramurální; KRK – kolorektální karcinom;

LyA – lymfangioinvaze; Pn – perineurální šíření; RT – radioterapie

Tab. 11: Histomorfologické charakteristiky IBD-asociovaných KRK - pokračování

| Případ č. | Grade | Histomorfologie KRK | Cytologické vlastnosti – cytoplazma, jádra, jadérka | Morfologické markery – konfigurace nádorové hranice, Bd, LyAI, AI, Pn |
|-----------|-----------------|--|---|--|
| 7 | grade 2 | mucinózní karcinom (nad 60 %) | světlá cytoplazma, malá jádra | expanzivní hranice, Bd0, LyAI ext, přímé LU šíření, Ai ext, Pn 0 |
| | | tubulární komponenta | tmavší cytoplazma, malá jádra | |
| 8 | grade 2 | malá kribriformní fomace, tubulární růst, horizontální myenterické šíření | světlá eosinofilní cytoplazma, menší tmavá jádra bez jadérek | infiltrativní hranice, Bd0, LyAI int/ext, AI 0, Pn int/ext, myenterické |
| 9 | grade 2 | tmavší a světlejší kribriformní struktury, světlé solidní úseky, horizontální myenterické šíření | eosinofilní cytoplazma, vesikulární jádra s jadérky v kribriformních oblastech, světlá cytoplazma v solidních úsecích, histiocytoidní vzhled, vesikulární jádra | infiltrativní hranice, Bd1 (2), LyAI int/ext, AI ext, Pn int/ext – myenterické |
| | grade 3 solidní | | | |
| 10 | grade 2 | tubulární a kribriformní růst, komedo nekrózy | tmavá cytoplazma, tmavá jádra, nenápadná jadérka | infiltrativní hranice, Bd0, LyAI int/ext, AI 0, Pn0 |
| 11 | grade nelze | malé kribriformní formace, jednotlivé buňky, skóre regrese dle Dworaka 2 | hojná eosinofilní cytoplazma, velká jádra s jadérky | infiltrativní hranice, Bdx (postRT), LyAI 0, AI 0, Pn 0 |

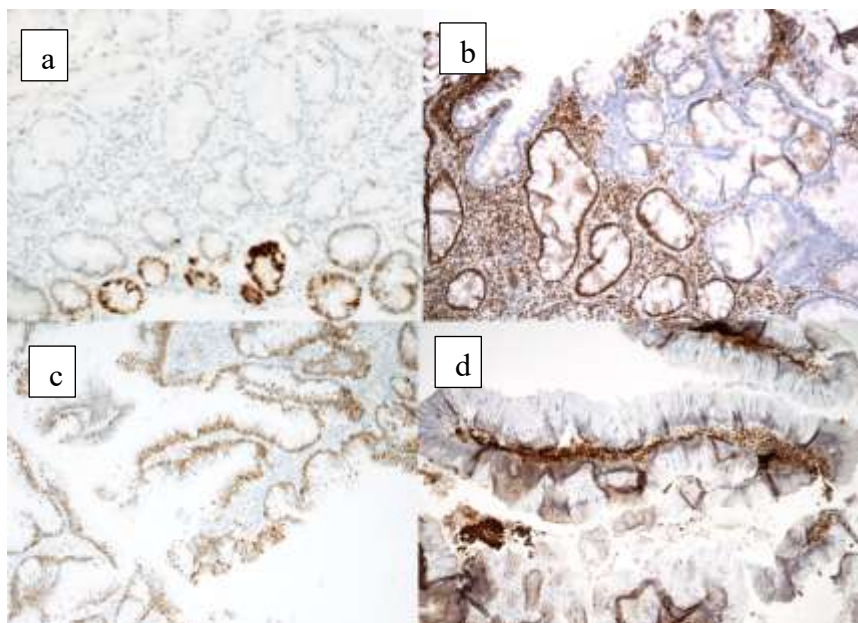
Zkratky: AI – angioinvasze; Bd – budding; ext – extramurální; IBD – idiopatický střevní zánět; int – intramurální; KRK – kolorektální karcinom; LyAI – lymfangioinvasze; Pn – perineurální šíření; RT – radioterapie

7.3. VÝSLEDKY IMUNOHISTOCHEMICKÉHO VYŠETŘENÍ DLE MORFOLOGICKÝCH SKUPIN

7.3.1. Výsledky imunohistochemického vyšetření v nekonvenčních lézích (PPL) skupiny 1

Expres MLH1 byla zachována ve většině vyšetřených PPL lézích. Aberantní ztráta exprese byla zastižena pouze v jednom případě vilózní hypermucinózní změny přidružené k MMR proficientnímu KRK. V jedné vilózní hypermucinózní lézi byla dále zastižena ztráta exprese MSH6, a to v případě vyšetřovaném v rámci asociace s KRK. Komplexní aberantní exprese p53 v rámci nekonvenčních lézí byla zastižena ve 3 případech SEC a v jedné vilózní hypermucinózní změně spojené s HGD. Mimo tyto případy jsme u 13 dalších PPL pozorovali silnou expresi (3+) antigenu p53 pouze v bazální části léze, a to jmenovitě v 11 případech SEC a vždy po jednom případě vilózní hypermucinózní změny, HP-like léze a kombinované léze. Ztráta exprese MGMT byla zastižena v 17 případech SEC, 4 případech vilózní hypermucinózní změny a po dvou případech HP-like změny a kombinovaných lézí. Výsledky IHC pro skupinu 1 jsou součástí Tabulky 12. Vybrané výsledky barvení jsou zobrazeny na Obr. 20.

Obr. 20: Výsledky imunohistochemického barvení p53 a MGMT v SEC a vilózní hypermucinózní změně: a) silná bazální pozitivita p53 v SEC. *Barvení HE, zvětšení 200x*, b) ztráta MGMT exprese v SEC. *Barvení HE, zvětšení 100x*, c) silná p53 exprese v dysplastické části vilózní hypermucinózní změny. *Barvení HE, zvětšení 100x*, d) Ztráta exprese MGMT ve vilózní hypermucinózní změně, zachovaná expres ve stromálních lymfocytech. *Barvení HE, zvětšení 100x*



Tab. 12: Výsledky imunohistochemického a molekulárního vyšetření pro nekonvenční slizniční léze (skupina 1).

| | Pilovitá epiteliální změna N = 41 (100 %, \$) | Vilózní hypermucinózní změna N = 6 (100 %, \$) | Kombinovaná pilovitá a vilózní léze N = 5 (100 %, \$) | HP-like léze N = 4 (100%, \$) | Všechny PPL N = 56 (\$ 100 %) |
|---|--|---|--|-----------------------------------|-------------------------------------|
| IHC výsledky | | | | | |
| MGMT ztráta exprese | 17 (41 %, \$ 30 %) | 4 (67 %, \$ 7,1 %) | 2 (40 %, \$ 3,6 %) | 2 (50 %, \$ 3,5 %) | 25 (\$ 44,6 %) |
| p53 aberantní exprese (komplexní a baze) | 14 (26,9 %, \$ 19,7 %) | 2 (33,3 %, \$ 3,6 %) | 1 (20 %, \$ 1,8 %) | 1 (25 %, \$ 1,8 %) | 17 (\$ 30,4 %) |
| MLH1 ztráta | 0 | 1 (16,6 %, \$ 1,8 %) | 0 | 0 | 1 |
| Molekulární výsledky | | | | | |
| <i>KRAS/NRAS</i> mutace* | 17 (41,5 %, \$ 30,6 %) | 2 (33,3 %, \$ 3,6 %) | 4 (80 %, \$ 7,1 %) | 1 (25 %, \$ 1,8 %) | 24 (\$ 42,9 %) * |
| <i>BRAF</i> mutace* | 6 (15 %, \$ 10,7 %) | 2 (33,3 %, \$ 3,6 %) | 0 | 1 (25 %, \$ 1,8 %) | 9 (16,4 %, \$16,1 %) * |
| Souběžná <i>KRAS(NRAS)</i> a <i>BRAF</i> mutace | 3 (7,3 %, \$ 5,3 %) | 0 | 0 | 0 | 3 (\$ 5,3 %) |

Poznámka:

\$ – procento ze všech lézí typu PPLs

* p = 0,017 pro rozdílný výskyt mutace v genu *KRAS* a *BRAF* ve skupině PPL

Zkratky: HP-like – hyperplastickému polypu podobný; IHC –; N – počet; PPL – potenciální prekursorová léze

7.3.2. Výsledky imunohistochemického vyšetření v pravých pilovitých polypech

Ve skupině pravých pilovitých polypů byla patrná zachovaná exprese MLH1 především v bazální zóně léze. V apikálních částech polypu byla pozorována slabší exprese nebo negativita MLH1. Tento typ barvení je nicméně u pilovitých polypů častým nálezem a není hodnocen jako aberantní ztráta exprese proteinu. [54] Aberantní exprese v p53 byla zastižena pouze v jednom případě TSA. Ztráta exprese MGMT byla zastižena ve všech 7 případech SSA, obou TSA a u dvou případů hyperplastického polypu, což z celé skupiny PPP představuje 73,3 %.

7.3.3. Výsledky imunohistochemického vyšetření v IBD dysplázii a KRK

7.3.3.1. IHC výsledky v IBD dysplázii

Expres MLH1 byla v IBD dysplázii zachovaná. Ve třech případech byla zastižena aberantní exprese p53 a ve dvou případech ztráta exprese MGMT.

7.3.3.2. IHC výsledky v KRK

V případech KRK bylo provedeno imunohistochemické vyšetření všech 4 MMR proteinů. Ve dvou karcinomech byl prokázán MMR deficientní status. Jeden pacient (případ 1) vykazoval izolovanou ztrátu exprese MSH6, která byla zastižena i v přilehlé vilózní hypermucinózní změně. Druhý pacient (případ 2) vykazoval ztrátu ve dvojici MMR proteinů MLH1 a PMS2.

Celkově u 6 případů KRK byla zastižena kompletní ztráta exprese p53 (případ 3 a 4) nebo silná aberantní overexpres (případy 7–9 a 11). Zbylých 5 karcinomů vykazovalo zachovanou slabou resp wild-type expresi p53. Ztráta exprese MGMT byla patrná v 6 případech KRK (případy 1, 2, 5, 6, 7, 9), zbylé případy vykazovaly zachovanou silnou expresi. Výsledky pro skupinu 2 a 3 jsou v Tabulce 13.

Tab. 13: Výsledky imunohistochemického a molekulárního vyšetření v pravých pilovitých polypech (skupina 2) a IBD-asociovaných neopláziích (skupina 3).

| | HP N= 6 (100 %) | SSA N = 7 (100 %) | TSA N = 2 (100 %) | | IBD dysplázie N = 6 (100 %) | IBD–asociovaný KRK N = 11 (100 %) |
|--|--------------------|----------------------|----------------------|--|--------------------------------|--------------------------------------|
| IHC výsledky | | | | | | |
| MGMT ztráta | 2 (33,3 %) | 7 (100 %) | 2 (100 %) | | 2 (33,3 %) | 6 (54,5 %) |
| p53 aberantní exprese (komplexní a baze) | 1 (16,6 %) | 1 (14,2 %) | 2 (100 %) | | 3 (50 %) | 6 (54,5 %) |
| MLH1 ztráta | 0 | 0 | 0 | | 0 | 0 |
| Molekulární výsledky | | | | | | |
| <i>KRAS/NRAS</i> mutace | 3 (50 %) | 4 (57,1 %) | 2 (100 %) | | 4 (66,6 %) | 8 (72,7 %) |
| <i>BRAF</i> mutace | 4 (66,6 %) | 4 (57,1 %) | 0 | | 0 | 1 (9,1 %) |
| <i>Souběžná KRAS(NRAS) a BRAF</i> mutace | 2 (33,3 %) | 2 (28,6 %) | 0 | | 0 | 0 |

Zkratky: HP – hyperplastický polyp; IBD – idiopatický střevní zánět; IHC – imunohistochemie; KRK – kolorektální karcinom; N – počet; SSA – sesilní pilovitý adenom; TSA – tradiční pilovitý adenom

7.4. MOLEKULÁRNÍ VÝSLEDKY

V celém studovaném souboru jsme zastihli mutace ve všech třech testovaných genech. Nejčastěji mutovaným genem byl gen *KRAS*, ve skupině PPL pak signifikantně častěji v porovnání s ostatními skupinami ($p = 0,017$). Mutace v genu *KRAS* byly nejčastěji zastiženy v exonu 2 s 16 mutacemi v lokusu G12D, 12 mutacemi v lokusu G13D, 7 v G12V, dvěma v G12C a jednou v G12S. Další dvě mutace byly zastiženy v exonu 3 v lokusu Q61 a jedna mutace v exonu 4 (kombinující oblast K117N a A146T). Mutace v genu *NRAS* byly zastiženy u dvou pacientů v exonu 2 a to v kombinaci dvou mutovaných oblastí G12D/G12S, resp. G12D/G13D. Jeden případ vykazoval mutaci v exonu 4 v oblasti K117N. Většina mutací v genu *BRAF* byla v oblasti V600E (15 případů) a V600A (4 případy) včetně dvou případů kombinujících V600E spolu s V600A v jednom vzorku. Výsledky jsou shrnuty v **Tabulce 14**.

Tab. 14: Typy detekovaných mutací v genech *KRAS*, *NRAS* a *BRAF*.

| Gen | exon 2 | | | | | exon 3 | exon 4 |
|-----------------|---------|-------|---------------|------|------|--------|-------------|
| Mutace | G12D | G13D | G12V | G12C | G12S | Q61 | K117N/A146T |
| <i>KRAS</i> (N) | 16* | 12* | 7 | 2 | 1 | 2 | 1 |
| <i>NRAS</i> (N) | 2 # \$ | 1\$ | – | – | 1# | – | 1 |
| | exon 15 | | | | | | |
| | V600E | V600A | V600E i V600A | | | | |
| <i>BRAF</i> (N) | 13 | 2 | 2 | | | | |

* u jednoho případu zastižena kombinace mutací G12D a G13D v genu *KRAS*

mutace G12D a G12S v genu *NRAS* byla zastižena u stejného případu

\$ mutace G12D a G13D v genu *NRAS* byla zastižena u stejného případu

Zkratky: N – počet

7.4.1. Výsledky molekulárního vyšetření v nekonvenčních lézích (PPL) skupiny 1

Ve skupině PPL byly zastiženy mutace ve všech třech testovaných genech, a to nejčastěji v genu *KRAS*. Podle jednotlivých typů PPL byla mutace v genu *KRAS* zastižena celkem v 16 případech SEC, 4 kombinovaných lézích a 2 vilózních hypermucinózních změnách a jedné HP-like lézi. Mutace v genu *NRAS* byla prokázána v jedné SEC v kombinaci s mutací v genu *KRAS*. Mutace v genu *BRAF* byla zastižena celkem v 9 případech PPL, opět nejvíce v případech SEC (6x), navíc v neobvyklé kombinaci se současnou mutací v genu *KRAS* (2 případy) anebo *NRAS* (1 případ). Zbylé 3 případy mutovaného genu *BRAF* byly prokázány

ve dvou vilózních hypermucinózních změnách a 1 HP-like lézi. Výsledky molekulárního vyšetření pro skupinu 1 jsou součástí **Tabulky 12 – viz výše**.

7.4.2. Výsledky molekulárního vyšetření v pravých pilovitých polypech

Ve skupině pravých pilovitých polypů byly opět zastiženy mutace ve všech třech vyšetřovaných genech. Mutace v genu *KRAS* byla zastižena v 8 lézích, a to jmenovitě v obou TSA, polovině HP (3x) a ve 3 ze 7 případů SSA, z nichž jeden vykazoval současně i mutaci genu *NRAS*. *BRAF* byl mutován ve 4 případech hyperplastického polypu a 4 SSA, v obou skupinách lézí navíc vždy se dvěma případy (2x HP, 2 SSA) se souběžnou mutací *KRAS* a *BRAF* (3 případy) nebo *NRAS* a *BRAF* (1 případ).

7.4.3. Výsledky molekulárního vyšetření v IBD dysplázii a KRK

7.4.3.1. Výsledky v IBD dysplázii

Čtyři ze šesti případů IBD dysplázie vykazovaly mutaci v genu *KRAS*. Mutace v genech *NRAS* a *BRAF* nebyly v této skupině detekovány.

7.4.3.2. Výsledky v KRK

Celkem 8 případů KRK z 11 vyšetřených vykazovalo mutaci v některém z vyšetřovaných genů. Mutace v genu *KRAS* byla zastižena nejčastěji, a to v 6 případech (případy 1, 2, 4, 8, 10, 11). Jeden případ nesl mutaci jak v genu *KRAS*, tak v genu *NRAS* (případ 6). Jeden případ vykazoval mutaci v genu *BRAF* (případ 7). Tři zbývající případy KRK vykazovaly wild-type status ve všech třech genech (případy 3, 5, 9). Výsledky molekulárního vyšetření pro skupinu 2 a 3 jsou součástí Tabulky 13 – viz výše.

7.5. VZTAH IMUNOHISTOCHEMICKÝCH A MOLEKULÁRNÍCH VÝSLEDKŮ V JEDNOTLIVÝCH SKUPINÁCH K VÝSLEDKŮM V IBD-ASOCIOVANÝCH KRK

Jediný případ ztráty exprese **MLH1** v PPL skupině morfoloicky odpovídal vilózní hypermucinózní lézi zastižené v těsné blízkosti invazivního KRK s MMR proficientním profilem. Vilózní léze ale s přilehlým KRK sdílala stejnou mutaci genu *BRAF*. Ztráta exprese MLH1 (a PMS2) v případě KRK byla zastižena u pacientky s geneticky prokázaným Lynchovým syndromem, nicméně žádná další léze nebyla u tohoto případu nalezena.

Aberantní exprese **p53** byla ve dvou případech SEC zastižena v lézích v těsné asociaci s kolorektálním karcinomem. V jednom případě se jednalo o wild-type karcinom, v druhém případě o *KRAS* mutovaný karcinom, se kterým SEC léze tuto mutaci sdílela. Aberantní exprese p53 ve třetím případě SEC byla prokázána v kontrolní endoskopické biopsii od pacienta s *BRAF* mutovaným KRK. Vlastní SEC léze v tomto případě nevykazovala žádnou mutaci. Tři případy IBD dysplázie s aberantní expresí p53 byly spojeny s přilehlým karcinomem, ve dvou případech s mutací genu *KRAS*.

Tři případy KRK se ztrátou exprese **MGMT** vykazovaly mutaci genu *KRAS* (případy 1, 2, 6) a jeden případ mutaci v *BRAF* genu (případ 7). Ztráta exprese MGMT pak byla zastižena i v případě dvou SEC lézí zastižených v blízkosti KRK, které navíc s karcinomem sdílely mutaci v genu *BRAF* (případ 7) resp. mutaci v genu *KRAS* (případ 6).

Tři případy mutovaných karcinomů s mutací genu *KRAS* (případ 6, 11) a *BRAF* (případ 9) sdílely stejnou mutaci s dalšími lézemi nalezenými ve stejném resekčním materiálu, ale v řezech vzdálených od vlastního KRK (případy 6, 9, 11). Morfoloicky tyto léze spadaly do kategorie SEC (případ 6, 9) a TSA s high-grade dysplázií (případ 11). Ve dvou případech (7, 11) byly dále zastiženy další SEC léze bez mutací (wild-type). Tři pacienti s KRK vykazovali mutaci pouze v karcinomu (vždy *KRAS*) bez mutací v lézích získaných ze stejného resektátu (případy 1, 4, 8). Přesněji se jednalo o dvě SEC léze (4, 8) a jednu vilózní hypermucinózní změnu v případě 1. U jednoho z wild-type karcinomů (případ 5) byla zastižena léze typu SEC s mutací *BRAF* V600E. Porovnání mutačního stavu případů KRK a přidružených PPL nebo dysplázií je shrnuto v Tabulce 15

Tab. 15: Molekulární výsledky IBD-asociovaných KRK ve vztahu k dalším lézím zastiženým u daného pacienta.

| | Karcinom | | | SEC | | | Vilózní hypermucinózní změna | | | IBD dysplázie | | | SSA | | | TSA | | |
|-----|----------|-------|---------|--------|------|-------|------------------------------|------|-------|---------------|------|------|--------|------|------|--------|------|------|
| | KRAS | NRAS | BRAF | KRAS | NRAS | BRAF | KRAS | NRAS | BRAF | KRAS | NRAS | BRAF | KRAS | NRAS | BRAF | KRAS | NRAS | BRAF |
| 1* | p.G12D | WT | WT | x | x | x | WT | WT | WT | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 2 | p.G13D | WT | WT | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 3 | WT | WT | WT | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 4 | p.G12D | WT | WT | WT | WT | WT | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 5* | WT | WT | WT | WT | WT | V600E | WT | WT | WT | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 6# | p.G12D | 12/13 | WT | p.G12D | WT | WT | x | x | x | p.G12D | WT | WT | p.G12D | WT | WT | x | x | x |
| 7\$ | WT | WT | V600A/E | WT | WT | V600A | WT | WT | V600A | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 8# | p.G12D | WT | WT | WT | WT | WT | x | x | x | p.G12D | WT | WT | x | x | x | x | x | x |
| 9# | WT | WT | WT | WT | WT | WT | x | x | x | WT | WT | WT | x | x | x | x | x | x |
| 10 | p.G12D | WT | WT | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 11 | p.G13D | WT | WT | x | x | x | x | x | x | p.G13D | WT | WT | x | x | x | p.G13D | WT | WT |

x léze v daném případě KRK nepřítomna

* případy se dvěma vilózními hypermucinózními změnami

případy se dvěma SEC, reportován případ s mutací

\$ případ se třemi SEC lézemi

Zkratky: IBD – idiopatický střevní zánět; KRK – kolorektální karcinom; SEC – pilovitá epitelální změna; SSA – sesilní pilovitý adenom; TSA – tradiční pilovitý adenom; WT – wild-type

8. Diskuze

Úvodem je nutné zdůraznit, že v rámci rešerše tématu idiopatických střevních zánětů a pilovitých lézí/změn jsme zjistili, že tato kombinace klíčových slov vede v prohledávané literatuře k heterogenní skupině směsných výsledků, které zahrnují studie zacílené pouze na pravé pilovité polypy a IBD, studie popisující spíše léze typu PPL s různorodou, měnlivou anebo vyvíjející se terminologií a morfologicky heterogenní charakteristikou, a dále studie kombinující IBD a pravé polypy i léze typu PPL. Z tohoto důvodu budeme diskutovat jednotlivé podskupiny samostatně s navazující diskuzí ohledně vztahu těchto lézí k IBD-asociovanému KRK.

8.1. Pilovité léze u IBD pacientů

Diskuze o výskytu pilovitých i vilózních změn ve sliznici IBD pacientů představuje rozvíjející se problematiku, o které bylo publikováno několik prací zahrnující i hodnocení jejich vztahu k IBD-asociované neoplázii včetně KRK.

8.1.1. Pilovité léze typu SEC, vilózní hypermucinózní změna aj. a IBD

Rubio et al. upozornili na lézi pojmenovanou jako „vilózní adenomatózní léze“, resp. „vilózní dysplázie“ v sérii 40 pacientů s dlouhotrvající ulcerózní kolitidou již v roce 1984. Tuto lézi popsali u 85 % pacientů s invazivním karcinomem v terénu UC a byla detekována také v 70 % dostupných předoperačních endoskopických biopsiích těchto pacientů. Plochou dysplázií zastihli naopak v resekátech nebo v endoskopických biopsiích pacientů bez karcinomu. [72] Podobnou změnu následně popsali Chaubert et al. jako „vilózní regenerativní změnu“ a „vilózní dysplázií“ ve studii z roku 1994 u 9 pacientů s UC. V této studii vyšetřili celkem 39 nádorových a nenádorových vzorků a prokázali častý výskyt mutace v genu *KRAS* a aberantní overexpresi proteinu p53 jak ve vzorcích z karcinomů, tak ve vilózní i v nenádorové zánětlivé sliznici. [73] Andersen et al. následně v roce 1999 popsali obdobné výsledky s častější přítomností mutace v genu *KRAS* u vilózní hypermucinózní změny v sérii 13 pacientů s UC, u kterých celkově vyšetřili 161 mikrodisekovaných vzorků. Vilózní změna byla zastižena ve 13 vzorcích (8 %) se záchytem mutace genu *KRAS* v 8 (61 %). [74] Podobná léze byla pak v roce 2000 popsána autory Kilgore et al. také u 60 pacientů s Crohnovou chorobou s nebo bez karcinomu a byla pojmenována jako „hyperplastic-like“ slizniční změna. V této studii byla tato léze zastižena v resekátech v těsné blízkosti KRK (17 %), ve vzorcích mimo karcinom (10 %) a zároveň byla zachycena i v 10 % resekátů pacientů s CD bez karcinomu. [75] Oba typy lézí – pilovité i vilózní změny byly následně popsány znovu Rubiem v roce 2000 [142]

v sérii 50 pacientů s IBD a zachyceny u pacientů s IBD-asociovaným KRK. Vilózní změna byla popsána až u 52 % případů a pilovitá dysplázie u 29 % případů. Znovu byly tyto léze společně s dalšími adenomatózními změnami u IBD studovány stejnou skupinou v roce 2007. [3]

Imunohistochemické vyšetření bylo součástí pouze některých studií. Expres proteinu p53 byla studována autory Kilgore et al. v hyperplastic-like lézích, které vykazovaly silnou expresi p53 v části popsaných lézí, a to především v epitelu bazálních částí krypt. [75] Obdobný charakter barvení se silnou bazální p53 pozitivitou jsme zaznamenali i některých našich lézích, jmenovitě u jedné vilózní hypermucinózní změny, jedné HP-like léze a jedné kombinované léze. Recentní studie autorů Hirsch et al. dále prokázala zvýšený výskyt *TP53* mutací v KRK asociovaném s Crohnovou chorobou se shodnou mutací přítomnou i prekurzorových lézích stejně jako v nedysplastické okolní sliznici. Navíc mutace v *TP53* byly mnohem častěji přítomny v CD-asociovaných KRK ve srovnání se sporadickými KRK. [100]

Charakter barvení MLH1 nevykazoval ve většině lézí ze skupiny PPL známky aberance kromě jedné vilózní hypermucinózní změny s kompletní ztrátou exprese. Ve skupině PPL tedy MLH1 expresní profil nepomohl k identifikaci lézí, které by mohly vykazovat případné časné dysplastické znaky na IHC úrovni, jak je tomu u pravých pilovitých polypů. [117]

Dále jsme zastihli 25 z 56 (44,6 %) lézí typu PPL, které vykazovaly ztrátu exprese MGMT. Imunohistochemická ztráta exprese MGMT vyazuje trend k asociaci s metylací promotoru genu pro *MGMT* a může být tedy známkou porušené funkce genu *MGMT* s plošným defektem ve slizničních změnách spojených s dlouhodobým zánětem a s vyšším rizikem rozvoje mutací v genech jako *KRAS* a *TP53*. [59] Mezi MGMT negativními případy v našem souboru jich 40 % vykazovalo mutaci v genu *KRAS* a 28 % mutaci v genu *BRAF*, včetně dvou případů se současnou mutací *KRAS/BRAF*. Ostatní MGMT-negativní léze vykazovaly wild-type stav studovaných genů. Naše nálezy sice vykazovaly nižší četnost ztráty exprese MGMT než například léze ve studii skupiny Svrcek et al. (až 70 % z testovaných vzorků), nicméně zmíněná studie byla zaměřena především na případy sporadických, hereditární a IBD-asociovaných KRK a na přiléhající nenádorovou sliznici. [59] Bohužel, z důvodu charakteru naší studie bez kontrolní skupiny jsme nebyli schopni výsledky porovnat s normální nebo zánětlivou změněnou sliznicí bez pilovité léze.

Vzhledem k celkově nízkému počtu předchozích studií, které byly převážně morfologicky deskriptivní, jsme limitováni možnostmi diskuze molekulárních vlastností PPL.

Jak již bylo zmíněno výše, mutace v genu *KRAS* byly popsány ve vilózních regenerativních i dysplastických změnách u dlouhotrvající UC autory Chaubert et al. [73] a Andersen et al., a to až v 61 % studovaných lézí. [74] Mutační stav genu *BRAF* však nebyl v těchto lézích studován. Studie zahrnující pilovitou dráhu IBD onkogeneze popisovaly častěji pravé pilovité polypy (viz níže) jako HP nebo SSA s průkazem očekávané mutace v genu *BRAF*. [62, 64] Nicméně některé studie prokázaly i výskyt mutace v genu *KRAS* u pilovitých lézí. Například Srivastava et al. prokázali mutace v genu *KRAS* ve více než polovině všech studovaných lézí, které byly zastiženy u dvou IBD pacientů s mnohočetnými polypy splňujícími kritéria pro syndrom pilovité polypózy (u které by byla spíše očekávatelná mutace v genu *BRAF*). [63] Ko et al. pak zastihli *KRAS* mutace v části případů z morfologické skupiny nazvané pilovité polypy s low-grade dysplázií (morfologicky ale připomínající TSA) a ve skupině pilovitých polypů s nálezem neurčitým pro dysplázií (tzv. skupina smíšených lézí) a navrhli tak paralelu a srovnání s mírou detekce mutací, která je reportována u sporadických TSA. [64] V naší studii byla mutace genu *KRAS* prokázána ve velké části (42,9 %) nekonvenčních a neoplastických lézí. Naše výsledky mohou být ovlivněny malým počtem lézí v neoplastické skupině 3 a dále chybějící kontrolní skupinou sporadických lézí pro skupinu 1 (PPLs).

Zajímavým nálezem v naší studii byla přítomnost současné mutace v genech *KRAS/BRAF* (6 případů) nebo *NRAS/BRAF* (1 případ). Obecně jsou mutace v genech *KRAS/NRAS* a *BRAF* považovány za tzv. vzájemně se vylučující, nicméně několik publikací tuto mutační koexistenci u KKK popisuje, obvykle s odkazem na nádorovou heterogenitu. [143–146] V naší studii nicméně nebyly současné mutace zastiženy u případů karcinomů, ale u 3 případů SEC, dvou HP a dvou případů SSA, a to v 5 endoskopických vzorcích a ve 2 dísekovaných vzorcích z chirurgických resektátů. Všechny léze s koexistencí obou mutací byly bez známek dysplázie. Kontaminace materiálu byla vyloučena, ale opakované vyšetření mutačního stavu nebylo provedeno. Vysvětlení tohoto nálezu zůstává problematické, protože oba markery jsou zřídka testovány najednou. Zůstává spekulací, zda tyto nálezy rozšiřují spektrum molekulární heterogenity i na prekursorové léze.

8.1.1.1. Endoskopická detekce nekonvenčních léz u IBD

Samostatným tématem jsou možnosti endoskopické detekce nekonvenčních lézí. Léze typu PPL byly popsány v rámci několika menších endoskopických serií.

Studie autorů Hamamoto et al. popsala endoskopické nepatrné vilózní změny (subtle villous change, SVC) u 18 pacientů ze screeningového programu 250 pacientů. Endoskopicky

připomínaly tyto změny svým vzhledem sliznici tenkého střeva a byly zachyceny v zánětlivě postižené části tlustého střeva s porušenou cévní kresbou, a to u 12 pacientů s UC a u 6 pacientů s CD. Histologicky pak byla u 7 případů SVC popsána vilózní léze s LG dysplázií a u 2 případů s HG dysplázií. U šesti pacientů pak byly dysplastické změny zachyceny i mimo vilózní změny. [147]

Otázka detekce, záchytu a asociace s dysplázií a karcinomem u pilovité epitelální změny (SEC) je stále problematická. Recentně byly publikovány práce kolektivů Johnson et al. a Parian et al. dokládající, že detekce nekonvenčních lézí může být ještě více problematická. V první studii bylo pouze 38 % lézí typu SEC viditelných nebo diagnostikovaných z cílené biopsie. Z této studie však byli vyloučeni pacienti bez morfoloicky popsané SEC a pacienti s resekci pro kolorektální karcinom.[69] V druhé, retrospektivní, studii bylo pouze 22 % SEC zastiženo v cíleném biopsickém odběru. [4] Nicméně obě tyto studie zdůraznily zvýšené riziko konkomitantní dysplázie u pacientů se SEC, která by tak mohla představovat možný předstupeň či rizikový znak rozvoje dysplázie v budoucnosti. [4, 69] V rámci naší práce jsme nebyli schopni hodnotit nebo komentovat otázku endoskopické viditelnosti studovaných lézí, jelikož větší část lézí byla detekována v resekátu. Nicméně dle dostupných údajů nebyla větší část lézí v kontrolních biopsiích endoskopujícím lékařem detekována, jelikož většina vzorků byla zaslána jako necílené odběry v rámci kontrolní etážové biopsie bez popisu viditelných slizničních změn.

8.1.2. Pravé pilovité polypy a IBD

Studie zaměřující se na pravé pilovité polypy, jejich výskyt u IBD a účast pilovité dráhy v karcinogenezi IBD-asociovaného karcinomu jsou spíše recentního data, a to především z důvodu relativně nové definice a terminologie pilovitých polypů i pilovité dráhy. [62, 64, 67, 68, 71, 148] Bossard et al. revidovali celkem 36 pacientů, u kterých identifikovali léze morfoloicky odpovídající hyperplastickému polypu a tradičnímu pilovitému adenomu (TSA) a u obou prokázali *BRAF* V600E mutaci. [62] Některé studie popisují dokonce případy nebo menší série pacientů s vícečetnými lézemi, které jsou porovnávány s kritérii pro pilovité polypózy. [63, 70] Srivastava et al. v práci publikované v roce 2008 popsali soubor 3 pacientů a jejich rodin s vícečetnými pilovitými lézemi na pozadí IBD a porovnávali je s nálezy od pacientů se syndromem pilovité (hyperplastické) polypózy. [63]

V naší studii tvořily pravé pilovité polypy pouze 17 % ze všech zastižených slizničních lézí. Zachyceny byly všechny typy PPP. V rámci provedených vyšetření je zajímavým výsledkem

relativně vysoká přítomnost aberantní exprese MGMT (73 %) v rámci celé skupiny PPP. V rámci molekulárních změn pak pravé pilovité polypy obvykle vykazovaly očekávanou mutaci v genu *BRAF* (SSA a HP) nebo v genu *KRAS* (TSA).

Naše výsledky i závěry některých výše uvedených studií dokládají výskyt pravých pilovitých polypů u IBD pacientů a potvrzují podobnost pilovitých polypů u IBD se sporadickými pilovitými lézemi u non-IBD pacientů ve smyslu molekulárních a imunohistochemických vlastností. [137] Je tedy možné, že v budoucnosti bude nutné pravé pilovité polypy u IBD histologicky přesně odlišovat do nekonvenčních lézí typu SEC a vilózní hypermucinózní změny, stejně jako je nutné již nyní odlišovat sporadické konvenční adenomy od IBD dysplázie z důvodu odlišné prognózy a nutnosti sledování.

8.2. IBD-asociované KRK – diskuze morfologických, fenotypových a molekulárních charakteristik.

V celé revidované skupině 309 resekovaných IBD případů za desetileté období jsme identifikovali 11 pacientů s IBD-asociovaným KRK. V rámci skupiny případů IBD-asociovaného KRK jsme pozorovali značnou morfologickou heterogenitu jednotlivých případů od klamně blandní morfologie dvou případů s gastrickou diferenciací (případy 1 a 5), různě vyjádřenou mucinózní diferenciací v 4 případech až po neobvyklé perineurální šíření karcinomu cestou myenterického plexu. Nicméně právě heterogenita morfologie, minimum nádorové nekrotizace, mucinózní nebo prsténčitá diferenciace anebo naopak dobře diferencovaná morfologie jsou znaky, které jsou popisovány ve větších souborech IBD-asociovaných karcinomů. [149]

Další, často diskutovaný parametr u IBD-KRK, je stav mismatch repair proteinů (MMR) se zaměřením na MMR deficit anebo MSI-H status, který je detekován až u 10 % případů [149, 150] V naší sérii jsme zaznamenali celkem dva MMR deficientní případy KRK (1 %, případ 1 a 2). Defekt v MMR proteinech u jednoho z našich případů (případ 2) byl prokázán na germinální úrovni včetně splnění kritérii Lynchova syndromu dle Amsterdamských kritérií i revidovaných Bethesda kritérií a molekulárního vyšetření u dalších členů rodiny. [151–152] U druhého pacienta jsme prokázali ztrátu exprese MSH6 na imunohistochemické úrovni. Molekulární vyšetření MSI nebylo provedeno. V rámci studií, které porovnávají morfologii a molekulární vlastnosti IBD-asociovaných KRK se sporadickými a hereditárními karcinomy a stavem MMR systému se zdá, že mechanismus vzniku MMR deficitu u IBD-asociovaných karcinomů je spíše podobný mechanismům popsaným u hereditárních MSI-H karcinomů, ale

jsou na rozdíl od nich spojeny spíše s mutacemi v genu *BRAF*. Cílové geny, ve kterých dochází v rámci mikrosatelitní nestability k mutacím v tandemových repeatech, jsou nicméně u IBD karcinomů podobné jako ve sporadických a hereditárních MSI-H KRK. [59, 149, 153]

Výsledky vyšetření imunohistochemické exprese **MGMT** vykazovaly aberantní ztrátu exprese v 6 případech IBD-asociovaného KRK a také v 16 přidružených slizničních lézích především ze skupiny PPL. Jak bylo prokázáno některými autory. [59, 63], ztráta funkce a exprese MGMT bývá přítomna jak u sporadických, tak u IBD-asociovaných a hereditárních KRK a může být zastížena také v přiléhající nenádorové anebo zánětlivě změněné sliznici. Tyto nálezy podporují hypotézu, že metylace MGMT se ztrátou funkce může předcházet další molekulární změny a maligní transformaci epitelu. U IBD-karcinomů je dále možná asociace mezi ztrátou MGMT a MSI stavem, ale dle některých autorů bez vazby na mutovaný stav genů *KRAS* nebo *BRAF*. [59] V rámci naší studie jsme nicméně ve skupině MGMT-negativních karcinomů prokázali mutaci v genu *KRAS* ve třech případech KRK (1, 2 a 6) a mutaci genu *BRAF* v jednom případě KRK (7). Naše výsledky jsou spíše v souladu se studií, ve které byla metylace v promotoru *MGMT* spojena s výskytem mutací v genu *KRAS*. [154] Novější studie zabývající se molekulárními vlastnostmi KRK vznikajícího u IBD nicméně upozorňují na poměrně nižší výskyt mutací v genu *KRAS* a vyšší podíl mutací v *TP53* v porovnání se sporadickými karcinomy. [100, 155–158] S těmito recentními studiemi se naše výsledky rozcházejí, ale důvodem může být limitní počet vyšetřovaných karcinomů v rámci studovaného souboru a větší podíl slizničních lézí a nemožnost porovnat výsledky s kontrolní skupinou.

8.3 Diskuze vztahu IBD-asociovaného KRK k jednotlivým typům slizničních lézí

8.3.1. IBD-asociovaný KRK a dysplázie

Přestože je **IBD dysplázie** (intraepiteliální neoplázie) považována za hlavní prekurzorovou lézi pro KRK u IBD pacientů a je tedy také hlavním znakem pro sledování případné progresse [2, 5, 10, 159], identifikovali jsme v naší skupině KRK pouze 3 ploché IBD-dysplázie a 1 elevovanou IBD-dysplastickou lézi. Žádná z těchto lézí navíc nebyla identifikována v rámci kontrolní sledovací endoskopie a byly odhaleny až v době diagnózy KRK ve stejném resekčním materiálu. Nicméně u těchto pacientů nemáme k dispozici přesná data týkající se četnosti kontrolních endoskopií, resp. dodržování kontrol ze strany pacienta.

8.3.2. IBD-asociovaný KRK a pravé pilovité polypy

Ze skupiny pravých pilovitých polypů jsme zastihli kolorektální karcinom u 1 případu TSA, a to v blízkosti KRK a u jednoho případu SSA, nalezeného ve vzorku vzdáleném od KRK. U žádného z pacientů s hyperplastickým polypem karcinom zastižen nebyl. V rámci studií zabývajících se přítomností pravých pilovitých polypů u IBD pacientů byly obdobně zastiženy spíše jednotlivé případy KRK buď jako synchronní léze, [62–64] nebo jako metachronní karcinomy zastižené v rámci sledování pacientů. [64–65] Ve dvou případech se jednalo o TSA asociovaný s karcinomem s mucinózní morfologií; v jednom případě se sdílenou mutací genu *BRAF* (REF Bossard 2007), v druhém případě byla u KRK zastižena mutace *KRAS* i *BRAF*, ale u přidruženého TSA nebylo molekulární vyšetření provedeno. Další KRK byly zastiženy také u SSA nebo TSA, ale bez dalšího molekulárního vyšetření. Vzhledem k malému množství popsaných případů nelze jednoznačně posoudit případné rozdíly mezi asociací KRK s pravými pilovitými polypy u IBD a non-IBD pacientů.

8.3.3. IBD-asociovaný KRK a PPL

Nejzajímavějším nálezem ve skupině IBD-asociovaných KRK byl právě průkaz přímého vztahu karcinomu nejen s očekávanou konvenční IBD-dysplázií, ale také s jiným typem PPL, a to celkově u 7 pacientů. Z dalších slizničních lézí jsme v přímé asociaci s KRK zaznamenali 3 případy **vilózní hypermucinózní změny** (případy 1, 5 a 7). Dva z těchto případů KRK sdílely určité morfologické znaky v podobě gastrické diferenciaci, resp. vzhledu foveolární části žaludeční sliznice. Karcinom v případě 1 sdílel s přiléhající PPL ztrátu exprese MGMT. U karcinomu v případě 5 nebyla prokázána mutace v žádném ze sledovaných genů *KRAS*, *NRAS* a *BRAF*, ale asociovaná vilózní hypermucinózní léze vykazovala mutaci *BRAF* V600E. Třetí karcinom sdružený s vilózní hypermucinózní lézí sdílel s touto PPL stejnou mutaci genu *BRAF*. Možná asociace vilózní hypermucinózní změny a ulcerózní kolitidy byla zmíněna v publikaci autorů Andersen et al. [74] Autoři v této práci hodnotili 161 mikrodisekovaných vzorků od 13 UC pacientů, kteří podstoupili proktokolektomii pro přetrvávající dysplázií nebo diagnózu KRK. V rámci této studie zastihli 13 lézí s vilózním hypermucinózním vzhledem a 61 % z těchto lézí se vyznačovalo mutací v genu *KRAS* a byly tak hodnoceny jako potenciálně rizikové slizniční léze v terénu ulcerózní kolitidy. [74] Morfologicky podobné léze pak byly popsány i autory Kilgore et al. [75] v roce 2000 u pacientů s Crohnovou chorobou.

Další lézí ze skupiny PPL, kterou jsme zastihli v přímé asociaci s KRK, byla **pilovitá epiteliální změna (SEC)**, a to opět ve třech případech (6, 8 a 9). Dvě ze SEC lézí sdílely s asociovaným KRK stejnou mutaci v genu *KRAS*, resp. *BRAF*. Jedna z lézí pak sdílela s

přidruženým KRK aberantní overexpresi proteinu p53. Pilovité změny a pilovitá dysplázie byly popsány u IBD-asociovaného KRK u pacientů s UC Rubiem (REF 2007 Rubio). Rubio zastihl v sérii 96 kolektomií pilovitý růstový vzorec u 12 % lézí popsaných v základu jako UC-adenomatózní růst (UC adenomatous growth, UCAG) a v 29 % lézí pojmenovaných jako UC-adenomy (UC-adenoma, UCAD).

Jeden MMR deficientní karcinom (případ 1) z naší studie sdílel MMR defekt s přidruženou PPL, která morfologicky odpovídala vilózní hypermucinózní lézi.

8.4. Endoskopické sledování pacientů s IBD a endoskopická prevence rozvoje kolorektální neoplázie a vztah k nekonvenčním lézím

Pacienti s dlouhotrvající IBD jsou ve zvýšeném riziku rozvoje kolorektální neoplázie při onemocnění trvajícím déle než 8–10 let a podstupují pravidelné endoskopické kontroly. [17] Četnost kontrol závisí na míře rizik a pacienty dále rozdělit na vysoce rizikové (rodinná anamnéza KRK, trvající aktivita onemocnění, asociace s primární sklerózující cholangitidou), kteří podstupují kontrolní endoskopii 1x ročně. Pacienti s nízkým rizikem (relapsy onemocnění s dlouhými remisemi, negativní rodinná anamnéze) jsou sledováni 1x za pět let. Programy pravidelného sledování pátrají primárně po slizničních lézích endoskopicky suspektních z konvenční dysplázie. Jedná-li se o polypoidní viditelnou lézi s dysplázií, je možné její endoskopické odstranění a další sledování s posunem k častějším kontrolám (1x za 3–6 měsíců). [5–6, 17] Záchyt HG dysplázie a dále neresekovatelné ploché nebo tzv. neviditelné léze detekované až z histologicky z náhodného necíleného odběru jsou pak indikací ke kolektomii. [5–6]

Jak ukazují recentní studie, detekce nekonvenčních lézí spadá do problematické kategorie tzv. neviditelné léze a cílená detekce s odběrem je možná jen u menší části lézí, [4, 69] Postavení a význam těchto lézí v rámci dlouhodobé depistáže by měl být tématem dalšího výzkumu.

8.5. Limitace studie

Považujeme za nutné zmínit limitace naší studie. Hlavní limitací je retrospektivní nekontrolované nastavení celé studie a primární rešerše archivu zaměřená na chirurgické resekáty, která vedla k obohacení celého souboru o případy Crohnovy choroby, jelikož pacienti s CD častěji podstupují chirurgickou terapii z důvodu komplikovaného onemocnění se stenózou nebo píštělemi. Přes tyto limitace jsme přesvědčeni, že naše studie přispívá k dalším znalostem o nekonvenčních slizničních lézích u IBD pacientů a že jsme byli schopni prokázat a podpořit výskyt těchto lézí.

Pro skupinu IBD-asociovaných KRK je pak obdobnou limitací retrospektivní hodnocení malého množství archivního materiálu s limitujícím počtem parafinových bloků bez možnosti dodatečného zpracování dalšího materiálu. Menší počet bloků k revizi je největší limitací především v rámci resekátů KRK, protože tyto vzorky byly makroskopicky zpracovány se zaměřením na vlastní karcinom a jeho staging a dozajista tak došlo k nedostatečnému přikrojení dalších částí nenádorového kolon, ve kterém tak mohly být přehlédnuty další potenciální prekurzorové léze včetně PPL.

9. Závěry práce

V rámci provedené studie jsme potvrdili přítomnosti různých typů slizničních lézí vznikajících ve sliznici pacientů s idiopatickým střevním zánětem. Kromě očekávané IBD dysplázie, která je obecně považována za hlavní prekurzor pro vznik KRK v terénu IBD, a tedy hlavním důvodem pro program preventivních kontrolních endoskopií, jsme potvrdili také přítomnost pravých pilovitých polypů i dalších nekonvenčních lézí jako je pilovitá epiteliální přeměna (SEC) a vilózní hypermucinózní změna ve sliznici IBD pacientů. Jednotlivé typy slizničních změn nebo polypů se mohou vyskytovat u jednoho pacienta multifokálně nebo jako kombinace různých typů lézí v různých odběrech. Kromě toho jsme zjistili, že nekonvenční PPL léze mohou vykazovat dysplastickou morfolonii a mohou být nalezeny v bezprostřední blízkosti invazivního karcinomu. PPL léze navíc mohou vykazovat mutace v genech *KRAS/NRAS* nebo *BRAF* a navíc, pokud jsou v blízkosti invazivního KRK, mohou s tímto karcinomem stejný typ mutace sdílet. V rámci naší studie tyto nekonvenční PPL léze představovaly největší skupinu ze všech popsaných lézí (celkově 63 %) a byly nalezeny častěji, než očekávaná a sledovaná IBD dysplázie (7 %).

Námi studované IBD-asociované karcinomy se vyznačovaly morfologickou, imunohistochemickou (fenotypovou) a molekulární heterogenitou obdobně jako případy sporadických KRK. V souboru karcinomů jsme kromě vazby na konvenční prekurzorovou lézi, kterou je IBD dysplázie, popsali také přímý vztah karcinomu s jinými nekonvenčními lézemi jako je vilózní hypermucinózní změna a pilovitá epiteliální změna. V rámci malé podskupiny samostatně hodnocených IBD-asociovaných karcinomů tvořily PPL více než 80 % zachycených slizničních změn a jejich výskyt byl tedy častější než konvenční IBD-dysplázie. Navíc 6 z 22 lézí, (27 %) bylo zastiženo ve sliznici, která buď těsně přiléhala k zastiženému invazivnímu karcinomu, anebo byl zachycen přímý přechod PPL léze do invazivního KRK.

Jsme přesvědčeni, že naše výsledky podporují v literatuře již recentně vyslovené podezření, že léze typu pilovitá epiteliální změna (SEC) a vilózní hypermucinózní změna mohou představovat další podtyp prekurzorové léze při rozvoji IBD-asociovaného KRK a že dále rozšiřují poznatky o jejich imunohistochemických a molekulárních vlastnostech i vztahu ke karcinomu. Dále naše práce potvrzuje výskyt pravých pilovitých polypů u pacientů s IBD a popisuje jejich vztah k dalším lézím i KRK.

Vzhledem k tomu, že všechny léze byly zastiženy retrospektivně v rámci cíleného pátrání, je pravděpodobné, že jsou léze typu PPL v rámci rutinního histologického vyšetření často přehlédnuty a nejsou tak tedy popsány v bioptické zprávě, což má za následek jejich celkové podhodnocení. Povědomí o výskytu a suspektní prekurzorové roli těchto nekonvenčních lézí je nutné. Jejich rozpoznání patologem je zásadní včetně zahrnutí jejich popisu do bioptických výsledků v rámci endoskopických kontrol. Pro potvrzení jednoznačné prekurzorové role těchto lézí jsou nicméně nutné další rozsáhlejší prospektivní studie.

9.1. Témata a doporučení pro běžnou bioptickou praxi vyplývající z provedené studie

I přes retrospektivní ráz studie věřím, že z výsledků vplývá několik faktů, které mohou mít dopad i na běžnou bioptickou praxi. V rámci sledování pacientů s dlouhotrvající IBD bychom v kontrolních biopsiích měli kromě konvenční IBD dysplázie pátrat i po diskretních histologických změnách pilovitého nebo vilózního vzhledu. Vzhledem k obtížné detekci těchto lézí v endoskopii se bude jednat obvykle o necílené odběry bez jasného endoskopického korelátu (např. pro pilovitou epitelální změnu - SEC) nebo s možným endoskopickým popisem charakteru nepatrných vilózních změn (subtle villous changes, SVC). Histologická detekce vilózní hypermucinózní změny s dysplázií se zdá být i dle studií snažší vzhledem k charakteru růstu a také morfologická kritéria jsou vcelku jednoznačná. [72] Stále problematickou lézí zůstává pilovitá epitelální změna (SEC) a HP-like léze, které je nutné odlišit od pravých pilovitých polypů. Zde by mělo pomoci přesné dodržování histologických kritérií pro PPP dle platné WHO klasifikace. [29] Otázkou zůstává, zda ke zlepšení detekce těchto lézí může pomoci použití imunohistochemických metod jako např. exprese MGMT.

Sjednocení terminologie, přesná endoskopická i histomorfologická kritéria a další studium asociace pilovité epitelální změny k dysplázii a IBD-asociovanému karcinomu jsou pak tématem pro budoucí výzkum.

9.2. Osobní přínos doktoranda:

V rámci této studie jsem osobně provedla revizi veškerého histologického materiálu od 309 pacientů, a to včetně všech dostupných dodatečných endoskopických vzorků, celkem 547 bioptických případů, resp. více než 5000 histologických skl. U každého případů jsem revidovala základní diagnózu IBD a jeho podtyp a dále pátrala po slizničních změnách, které obvykle nebyly popsány v základní histologické zprávě. U případů s invazivním karcinomem jsem revidovala morfologická a stagingová data a doplňovala hodnocení dalších prognostických parametrů jako je nádorový budding atd.

Ve spolupráci s MUDr. Helenou Hornychovou, Ph.D., jsme zavedli do provozu imunohistochemické vyšetření MGMT, které jsem následně hodnotila ve všech vyšetřovaných řezech stejně jako další, již technicky zavedená imunohistochemická vyšetření (p53, MLH1 a MMR proteiny u KRK).

Pro účely molekulárního vyšetření jsem vybírala bloky a označovala vzorky určené pro makrodisekci. Molekulární vyšetření provedla a hodnotila RNDr. Hana Vošmiková.

Osobně jsem následně hodnotila výsledky IHC a molekulárního vyšetření v jednotlivých kategoriích slizničních lézí, včetně asociace s KRK, a hodnocení vzájemných vztahů různých lézí mezi sebou, včetně základního statistického hodnocení, které bylo provedeno pouze u některých parametrů z důvodu limitací uvedených v bodě 8.5.

10. Seznam použité literatury

1. K. Geboes et al. (eds.), *Colitis: A Practical Approach to Colon Biopsy Interpretation*, Springer International Publishing Switzerland 2014
2. **Laine L, Kaltenbach T, Barkun A et al.** SCENIC international consensus statement on surveillance and management of dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2015; 81: 489-501.
3. **Rubio CA.** Serrated neoplasias and de novo carcinomas in ulcerative colitis: a histological study in colectomy specimens. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1024-1031.
4. **Parian A, Koh J, Limketkai BN et al.** Association between serrated epithelial changes and colorectal dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastrointest Endosc* 2016; 84: 87-95
5. **Magro F, Gionchetti P, Eliakim R et al.** Third European Evidence-based [5] Consensus on Diagnosis and Management of Ulcerative Colitis. Part 1: Definitions, Diagnosis, Extra-intestinal Manifestations, Pregnancy, Cancer Surveillance, Surgery, and Ileo-anal Pouch Disorders. *J Crohns Colitis* 2017; 11(6): 649-670.
6. **Gomollón F, Dignass A, Annese V et al.** 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *J Crohns Colitis* 2017; 11(1): 3-25.
7. **Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T et al.** Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol.* 2005; 19 SupplA:5A-36A.
8. **Uhlig HH, Schwerd T, Koletzko S et al.** The diagnostic approach to monogenic very early onset inflammatory bowel disease. *Gastroenterology.* 2014; 147(5): 990-1007.
9. **Levine A, Griffiths A, Markowitz J et al.** Pediatric modification of the Montreal classification for inflammatory bowel disease: the Paris classification. *Inflamm Bowel Dis.* 2011; 17(6): 1314-1321.
10. **Magro F, Langner C, Driessen A et al.** European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013; 7: 827-851.
11. **Langner C, Magro F, Driessen A et al.** The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *Virchows Arch.* 2014; 464(5): 511-527.

12. **Feakins RM.** Ulcerative colitis or Crohn's disease? Pitfalls and problems. *Histopathology*. 2014; 64(3): 317-35.
13. **Kornbluth A, Sachar DB** Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College Of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol*. 2010; 105(3): 501-523.
14. **Rubin DT, Ananthakrishnan AN, Siegel CA et al.** ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults. *Am J Gastroenterol*. 2019; 114(3): 384-413.
15. **Robert ME, Tang L, Hao LM et al.** Patterns of inflammation in mucosal biopsies of ulcerative colitis: perceived differences in pediatric populations are limited to children younger than 10 years. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28(2): 183-189.
16. **Dyson JK, Rutter MD.** Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: what is the real magnitude of the risk? *World J Gastroenterol*. 2012; 18(29): 3839-3848.
17. **Lukas M.** Inflammatory bowel disease as a risk factor for colorectal cancer. *Dig Dis* 2010; 28: 619-624.
18. **Munkholm P.** Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18: 1-5.
19. **Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JR.** The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut* 2001; 48: 526–535.
20. **Lutgens MW, van Oijen MG, van der Heijden GJ et al.** Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. *Inflamm Bowel Dis*. 2013; 19(4): 789-799.
21. **Sebastian S, Hernández V, Myreliid P et al.** Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: results of the 3rd ECCO pathogenesis scientific workshop (I). *J Crohns Colitis* 2014; 8; 5-18.
22. **Stidham RW, Higgins PDR.** Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg* 2018; 31(3): 168-178.
23. **Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF et al.** Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications *Hum Pathol* 1983; 14(11): 931-968.
24. **Ullman T, Odze R, Farraye FA.** Diagnosis and Management of Dysplasia in Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease of the Colon. *Inflamm Bowel Dis* 2009;15: 630–638.
25. **Neumann H, Vieth M, Langner C et al.** Cancer risk in IBD: How to diagnose and how to manage DALM and ALM. *World J Gastroenterol* 2011; 17(27): 3184-3191

- 26. Šerclová Z, Ryska O, Bortlík M et al.** Doporučené postupy chirurgické léčby pacientů s idiopatickými střevními záněty – 3. část: ulcerózní kolitida, indikace k operaci. *Gastroent Hepatol* 2016; 70(3): 252–261.
- 27. Šerclová Z, Ryska O, Bortlík M et al.** Doporučené postupy chirurgické léčby pacientů s idiopatickými střevními záněty – 2. část: Crohnova choroba. *Gastroent Hepatol* 2016; 70(3): 252–261. *Gastroent Hepatol* 2015; 69(3): 223–238
- 28. Choi CH, Ignjatovic-Wilson A, Askari A et al.** Low-grade dysplasia in ulcerative colitis: risk factors for developing high-grade dysplasia or colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2015; 110(10): 1461-1471.
- 29. Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND (Eds).** WHO Classification of Tumours of the Digestive System, IARC Press: Lyon 2010
- 30. Hamilton S., Aaltonen LA (Eds.):** World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System. IARC Press: Lyon 2000
- 31. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA et al.** Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol.* 2012; 107(9): 1315-1329.
- 32. Torlakovic E, Snover DC.** Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology.* 1996; 110(3): 748-755.
- 33 Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC et al.** Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27(1): 65-81.
- 34. Snover DC, Batts KP.** Serrated Colorectal Neoplasia. *Surg Pathol Clin.* 2010; 3(2): 207-240.
- 35. Bettington M, Walker N, Clouston A et al.** The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges. *Histopathology.* 2013; 62(3): 367-386.
- 36. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM.** Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 1990; 14(6): 524-537.
- 37. Torlakovic E, Gomez JD, Driman DK et al.** Sessile serrated adenoma (SSA) vs. traditional serrated adenoma (TSA). *Am J Surg Pathol.* 2008; 32(1): 21-29.
- 38. Guarinos C, Sánchez-Fortún C, Rodríguez-Soler M et al.** Serrated polyposis syndrome: Molecular, pathological and clinical aspects. *World J Gastroenterol.* 2012; 18(20): 2452–2461.
- 39. Bettington M, Walker N, Rosty C et al.** Serrated tubulovillous adenoma of the large intestine. *Histopathology.* 2016; 68(4): 578-587.

- 40. Ústav zdravotních informací a statistiky ČR:** Novotvary 2015, Zdravotnická statistika
- 41. Jass JR.** Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113-130.
- 42. Pavlík T, Májek O, Büchler T et al.** Trends in stage-specific population-based survival of cancer patients in the Czech Republic in the period 2000-2008. *Cancer Epidemiol.* 2014; 38(1): 28-34.
- 43. Chu QD, Meijiao Z, Medieros KL:** Poor survival in stage IIB/C (T4N0) compared to stage IIIA (T1-2 N1, T1N2a) colon cancer persists even after adjusting for adequate lymph nodes retrieved and receipt of adjuvant chemotherapy: *BMC Can* 2016; 16: 460: 1-9.
- 44. Compton CC:** Key Issues in Reporting Common Cancer Specimens Problems in Pathologic Staging of Colon Cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:3 18–324.
- 45. Vyzula R. (eds.)** Modrá kniha České onkologické společnosti, 25. aktualizace. Masarykův onkologický ústav, ČR 2019
- 46. Colussi D, Brandi G, Bazzoli F et al.** Molecular Pathways Involved in Colorectal Cancer: Implications for Disease Behavior and Prevention. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 16365-16385
- 47. Pino MS, Chung DC.** The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(6): 2059-2072.
- 48. Szylberg Ł, Janiczek M, Popiel A et al.** Serrated polyps and their alternative pathway to the colorectal cancer: a systematic review. *Gastroenterol Res Pract.* 2015; 2015:573814.
- 49. Fan H, Chu JY.** A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2007; 5(1): 7-14.
- 50. Daum O, Beneš Z, Hadravský L et al.** Lynchův syndrom v rukách patologa. *Cesk Patol* 2014; 50(1): 18-24
- 51. Oliveira C1, Westra JL, Arango D et al.** Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Genet.* 2004; 13(19): 2303-2311.
- 52. Zlobec I, Kovac M, Erzberger P et al.** Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010; 127(11): 2569-2575
- 53. O'Brien MJ, Zhao Q, Yang S.** Colorectal serrated pathway cancers and precursors. *Histopathology.* 2015; 66(1): 49-65.
- 54. Sheridan TB, Fenton H, Lewin MR et al.** Sessile serrated adenomas with low- and high-

grade dysplasia and early carcinomas: an immunohistochemical study of serrated lesions "caught in the act". *Am J Clin Pathol.* 2006; 126(4): 564-571.

55. Shi Y, Li J, Wu SY et al. BRAF mutation is associated with the unique morphology of traditional serrated adenoma of the colorectum. *Int J Surg Pathol.* 2013; 21(5): 442-448.

56. Fu B, Yachida S, Morgan R et al. Clinicopathologic and genetic characterization of traditional serrated adenomas of the colon. *Am J Clin Pathol.* 2012; 138(3): 356-366.

57. Scarpa M, Castagliuolo I, Castoro C et al. Inflammatory colonic carcinogenesis: A review on pathogenesis and immunosurveillance mechanisms in ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20(22): 6774–6785.

58. Beaugerie L, Itzkowitz SH. Cancers complicating inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* 2015; 372(15): 1441-1452.

59. Svrcek M, Buhard O, Colas C et al. Methylation tolerance due to an O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) field defect in the colonic mucosa: an initiating step in the development of mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Gut* 2010; 59(11): 1516-1526.

60. Gerrits MM, Chen M, Theeuwes M et al. Biomarker-based prediction of inflammatory bowel disease-related colorectal cancer: a case-control study. *Cell Oncol (Dordr).* 2011; 34(2): 107-17.

61. van Schaik FD, Oldenburg B, Offerhaus GJ et al. Role of immunohistochemical markers in predicting progression of dysplasia to advanced neoplasia in patients with ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2012; 18(3): 480-488.

63. Bossard C, Denis MG, Bezieau S et al. Involvement of the serrated neoplasia pathway in inflammatory bowel disease-related colorectal oncogenesis. *Onco Rep* 2007;1 8: 1093-1097.

63. Srivastava A, Redston M, Farraye FA et al. Hyperplastic/serrated polyposis in inflammatory bowel disease: a case series of a previously undescribed entity. *Am J Surg Pathol* 2008; 32: 296-303.

64. Ko HM, Harpaz N, McBride RB et al. Serrated colorectal polyps in inflammatory bowel disease. *Mod Pathol* 2015; 28: 1584-1593.

65. Yang C, Tarabishy Y, Dassopoulos T et al. Clinical, Histologic, and Immunophenotypic Features of Serrated Polyps in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Res* 2018; 11: 355-360.

66. Jackson WE, Achkar JP, Macaron C et al. The Significance of Sessile Serrated Polyps in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2016; 22(9): 2213-2220.

- 67. Shen J, Gibson JA, Schulte S et al.** Clinical, pathologic, and outcome study of hyperplastic and sessile serrated polyps in inflammatory bowel disease. *Hum Pathol* 2015; 46: 1548-1556.
- 68. Iacucci M, Hassan C, Fort Gasia M et al.** Serrated adenoma prevalence in inflammatory bowel disease surveillance colonoscopy, and characteristics revealed by chromoendoscopy and virtual chromoendoscopy. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2014; 28: 589-594.
- 69. Johnson DH, Khanna S, Smyrk TC et al.** Detection rate and outcome of colonic serrated epithelial changes in patients with ulcerative colitis or Crohn's colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 39: 1408-1417.
- 70. Feuerstein JD, Flier SN, Yee EU.** A rare case series of concomitant inflammatory bowel disease, sporadic adenomas, and serrated polyposis syndrome. *J Crohns Colitis* 2014; 8: 1735-1739.
- 71. Lee LH, Iacucci M, Fort Gasia M et al.** Prevalence and Anatomic Distribution of Serrated and Adenomatous Lesions in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 2017; 2017: 5490803
- 72. Rubio CA, Johansson C, Slezak P et al.** Villous dysplasia: an ominous histologic sign in colitis patients. *Dis. Colon Rectum* 1984; 27: 283–287.
- 73. Chaubert P, Benhattar J, Saraga E et al.** K-ras mutations and p53 alterations in neoplastic and nonneoplastic lesions associated with longstanding ulcerative colitis. *Am J Pathol* 1994; 144(4): 767-775.
- 74. Andersen SN, Lovig T, Clausen OP et al.** Villous, hypermucinous mucosa in long standing ulcerative colitis shows high frequency of K-ras mutations. *Gut* 1999; 45: 686-692.
- 75. Kilgore SP, Sigel JE, Goldblum JR.** Hyperplastic-Like Mucosal Change in Crohn's Disease: An Unusual Form of Dysplasia? *Mod Pathol* 2000; 13: 797–801.
- 76. Odze RD, Maley CC.** Neoplasia without dysplasia: lessons from Barrett esophagus and other tubal gut neoplasms. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134(6): 896-906.
- 77. Harpaz N1, Ward SC, Mescoli C et al.** Precancerous lesions in inflammatory bowel disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2013; 27: 257-267.
- 78. Parian AM, Koh JM, Badamas J et al.** Serrated epithelial changes are associated with colorectal dysplasia in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2013; 144(5): S11 Abstract 42
- 79. Vousden KH, Lane DP.** p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007; 8(4): 275-283.
- 80. Muller PA Vousden KH.** p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol.* 2013; 15(1): 2-8.

- 81. Kim MP, Lozano G.** Mutant p53 partners in crime. *Cell Death Differ.* 2018; 25(1): 161-168.
- 82. Liu J, Zhang C, Feng Z.** Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2014; 46(3): 170-179.
- 83. Gestl EE, Anne Böttger S.** Cytoplasmic sequestration of the tumor suppressor p53 by a heat shock protein 70 family member, mortalin, in human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 423(2): 411-416.
- 84. Köbel M, Piskorz AM, Lee S et al.** Optimized p53 immunohistochemistry is an accurate predictor of TP53 mutation in ovarian carcinoma. *J Pathol Clin Res.* 2016; 2(4): 247-258.
- 85. Yue X, Zhao Y, Xu Y et al.** Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J Mol Biol.* 2017 ;429(11): 1595-1606.
- 86. Lee JS, Yoon A, Kalapurakal SK et al.** Expression of p53 oncoprotein in non-small-cell lung cancer: a favorable prognostic factor. *J Clin Oncol.* 1995; 13(8): 1893-1903.
- 87. Fléjou JF.** Barrett's oesophagus: from metaplasia to dysplasia and cancer. *Gut.* 2005; 54 Suppl 1: i6-12
- 88. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M et al.** Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol.* 2011; 24(9): 1248-1253.
- 89. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS et al.** Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature.* 1992; 358(6381): 80-83
- 90. Jansson A, Gentile M, Sun XF.** p53 Mutations are present in colorectal cancer with cytoplasmic p53 accumulation. *Int J Cancer.* 2001; 92(3): 338-341.
- 91. Köbel M, Ronnett BM, Singh N et al.** Interpretation of P53 Immunohistochemistry in Endometrial Carcinomas: Toward Increased Reproducibility. *Int J Gynecol Pathol.* 2018; 38 Suppl 1: S123-S131
- 92. Moll UM, Riou G, Levine AJ.** Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(15): 7262-7266.
- 93. Gestl EE, Anne Böttger S.** Cytoplasmic sequestration of the tumor suppressor p53 by a heat shock protein 70 family member, mortalin, in human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 423(2): 411-416.
- 94. Bartek J, Bartkova J, Lukas J et al.** Immunohistochemical analysis of the p53 oncoprotein on paraffin sections using a series of novel monoclonal antibodies. *J Pathol* 1993; 169: 27-34

- 95. Pillai G, Roberts H, Gatter K et al.** p53 expression in normal paraffin-embedded tissue using different antibodies and antigen retrieval buffer systems. *Histopathology*. 2003; 42(1): 83-87.
- 96. Ma C, Pai RK.** Predictive value of immunohistochemistry in pre-malignant lesions of the gastrointestinal tract. *Semin Diagn Pathol*. 2015; 32(5): 334-343
- 97. Iacopetta B.** TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat*. 2003; 21(3): 271-6.
- 98. Sepulveda A, Lynch JP (Eds.)** *Molecular Pathology of Neoplastic Gastrointestinal Diseases*, Springer, USA, 2013
- 99. Wong NA, Mayer NJ, MacKell S et al.** Immunohistochemical assessment of Ki67 and p53 expression assists the diagnosis and grading of ulcerative colitis-related dysplasia. *Histopathology*. 2000; 37(2): 108-114.
- 100. Hirsch D, Wangsa D, Zhu YJ et al.** Dynamics of genome alterations in Crohn's disease associated colorectal carcinogenesis *Clin. Cancer Res*; 2018; 24(20); 4997-5011
- 101. Li XL, Zhou J, Chen ZR et al.** P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation. *World J Gastroenterol*. 2015; 21(1): 84-93.
- 102. Bond CE, Umapathy A, Ramsnes I et al.** p53 mutation is common in microsatellite stable, BRAF mutant colorectal cancers. *Int J Cancer*. 2012; 130(7): 1567-1576.
- 103. Munro AJ, Lain S, Lane DP.** P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer*. 2005; 92(3): 434-444.
- 104. Wang P, Liang J, Wang Z et al.** The prognostic value of p53 positive in colorectal cancer: A retrospective cohort study. *Tumour Biol*. 2017; 39(5):1010428317703651.
- 105. Wang L, Liu Z, Fisher KW et al.** Prognostic value of programmed death ligand 1, p53, and Ki-67 in patients with advanced-stage colorectal cancer. *Hum Pathol*. 2018; 71: 20-29.
- 106. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P et al.** Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*. 1993; 260(5109): 810-812.
- 107. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS et al.** Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993; 260(5109): 812-816.
- 108. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S et al.** Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*. 1993; 363(6429): 558-561.
- 109. Parsons R1, Li GM, Longley MJ et al.** Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*. 1993; 75(6): 1227-1236.
- 110. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP et al.** Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology*. 2003; 193(1-2): 3-34.

- 111. Zhang L.** Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn.* 2008; 10(4): 301-307.
- 112. Yuan L, Chi Y2, Chen W et al.** Immunohistochemistry and microsatellite instability analysis in molecular subtyping of colorectal carcinoma based on mismatch repair competency. *Int J Clin Exp Med.* 2015; 8(11): 20988-1000.
- 113. Geiersbach KB, Samowitz WS.** Microsatellite instability and colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2011; 135(10): 1269-1277.
- 114. Chen W, Swanson BJ, Frankel WL.** Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn Pathol.* 2017; 12(1): 24.
- 115. Nowak JA, Yurgelun MB, Bruce JL et al.** Detection of Mismatch Repair Deficiency and Microsatellite Instability in Colorectal Adenocarcinoma by Targeted Next-Generation Sequencing. *J Mol Diagn.* 2017; 19(1): 84-91.
- 116. McCarthy AJ, Capo-Chichi JM, Spence T et al.** Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: a challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation. *J Pathol Clin Res.* 2019; 5(2): 115–129.
- 117. Liu C, Walker NI, Leggett B et al.** Sessile serrated adenomas with dysplasia: morphological patterns and correlations with MLH1 immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2017; 30(12): 1728-1738.
- 118. Kim GP, Colangelo LH, Wieand HS et al.** Prognostic and predictive roles of high-degree microsatellite instability in colon cancer: A National Cancer Institute-National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Collaborative Study. *J. Clin. Oncol.* 2007; 25; 767–772.
- 119. Wyatt MD, Wilson DM 3rd.** Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(5): 788-799.
- 120. Adamsen BL, Kravik KL, De Angelis PM.** DNA damage signaling in response to 5-fluorouracil in three colorectal cancer cell lines with different mismatch repair and TP53 status. *Int J Oncol.* 2011; 39(3): 673-682.
- 121. Sargent DJ, Marsoni S, Monges G et al.** Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol.* 2010; 28(20): 3219-26.
- 122. Sharma S, Salehi F, Scheithauer BW et al.** Role of MGMT in tumor development, progression, diagnosis, treatment and prognosis. *Anticancer Res.* 2009; 29(10): 3759-3768.

- 123. Mokarram P, Kavousipour S, Sarabi MM et al.** MGMT-B gene promoter hypermethylation in patients with inflammatory bowel disease - a novel finding. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 1945-1952.
- 124 Brent TP1, von Wronski M, Pegram CN et al.** Immunoaffinity purification of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase using newly developed monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1990; 50(1): 58-61.
- 125. Shen L, Kondo Y, Rosner GL et al.** MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(18): 1330-1338.
- 126. Malumbres M1, Barbacid M.** RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6): 459-465.
- 127. Schubert S, Shannon K, Bollag G.** Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(4): 295-308.
- 128. Dubská L, Vyskočilová M, Nenutil R et al.** Vyšetření mutačního statusu genu KRAS jako součást algoritmu léčby metastatického kolorektálního karcinomu. *Čas Lék Čes* 2011; 150: 321–326
- 129. Hanks SK, Hunter T.** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 1995; 9(8): 576-596.
- 130. Davies H, Bignell GR, Cox C et al.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002; 417(6892): 949-954.
- 131. Nathalie Dhomen N, Marais R.** BRAF Signaling and Targeted Therapies in Melanoma *Hematol Oncol Clin N Am* 2009; 529–545
- 132. Hussain MR, Baig M, Mohamoud HS.** BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. *Saudi J Biol Sci.* 2015; 22(4): 359-373.
- 133. O'Brien MJ, Yang S, Mack C et al.** Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol.* 2006; 30(12): 1491-1501.
- 134. Yokota T.** Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers? *Anticancer Agents Med Chem.* 2012; 12(2): 163-171.
- 135. Zauber P, Marotta S, Sabbath-Solitare M.** KRAS gene mutations are more common in colorectal villous adenomas and in situ carcinomas than in carcinomas. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2013;4(1):1-10.
- 136. Cicenás J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K et al.** KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. *Med Oncol.* 2017; 34(2): 26.

- 137. Yang Y, Wang D, Jin L et al.** Prognostic value of the combination of microsatellite instability and BRAF mutation in colorectal cancer. *Cancer Manag Res.* 2018; 26;10: 3911-3929.
- 138. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N et al.** KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2011; 12(6): 594-603.
- 139. Foltran L, De Maglio G, Pella N et al.** Prognostic role of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in advanced colorectal cancer. *Future Oncol.* 2015; 11(4): 629-640.
- 140. Sobin LH, Gospodarowicz M, Wittekind C.** TNM classification of Malignant Tumours. Seventh Edition. UICC International Union Against Cancer. New York: Wiley-Blackwell 2009
- 141. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y et al.** Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Mod Pathol* 2017; 30:1299-1311.
- 142. Rubio CA, Befrits R, Jaramillo E, Nesi G, Amorosi A.** Villous and serrated adenomatous growth bordering carcinomas in inflammatory bowel disease. *Anticancer Res* 2000; 20(6C): 4761-4764.
- 143. Sahin IH, Kazmi SM, Yorio JT et al.** A Report of Three Cases of Concomitant KRAS and BRAF Mutation and a Review of the Literature. *J Cancer* 2013; 4: 320-322.
- 144. Larki P, Gharib E, Yaghoob Taleghani M et al.** Coexistence of KRAS and BRAF Mutations in Colorectal Cancer: A Case Report Supporting The Concept of Tumoral Heterogeneity. *Cell J* 2017; 19(Suppl 1): 113-117.
- 145. Van Cutsem E, Köhne CH, Láng I et al.** Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J Clin Oncol.* 2011; 29(15): 2011-2019.
- 146. Sameer AS, ul Rehman S, Pandith AA et al.** Molecular gate keepers succumb to gene aberrations in colorectal cancer in Kashmiri population, revealing a high incidence area. *Saudi J Gastroenterol.* 2009; 15(4): 244-252.
- 147. Hamamoto N, Rubio CA, Befrits R et al.** Subtle villous changes in IBD patients. *Digestive Endoscopy* 2005;17 (Suppl.): S34 – S39
- 148. Parian AM, Lazarev MG.** Serrated Colorectal Lesions in Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2018; 14(1): 19-25.

- 149. Liu X, Goldblum JR, Zhao Z et al.** Distinct clinicohistologic features of inflammatory bowel disease-associated colorectal adenocarcinoma: in comparison with sporadic microsatellite-stable and Lynch syndrome-related colorectal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2012; 36(8): 1228-1233.
- 150. Schulmann K, Mori Y, Croog V et al.** Molecular phenotype of inflammatory bowel disease-associated neoplasms with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2005; 129: 74-85.
- 151. Rodriguez-Bigas MA, Boland, DR Hamilton SR et al.** A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1758-1762.
- 152. Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al.** Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst* 2004; 96: 261–268.
- 153. Svrcek M, El-Bchiri J, Chalastanis A et al.** Specific clinical and biological features characterize inflammatory bowel disease associated colorectal cancers showing microsatellite instability. *J Clin Oncol* 2007; 25(27): 4231-4238.
- 154. de Vogel S, Weijenberg MP, Herman JG et al.** MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. *Ann Oncol* 2009; 20: 1216-1222.
- 155. Yashiro M.** Molecular Alterations of Colorectal Cancer with Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci.*2015; 60(8): 2251-2263.
- 156. Robles AI, Traverso G, Zhang M et al.** Whole-Exome Sequencing Analyses of Inflammatory Bowel Disease-Associated Colorectal Cancers. *Gastroenterology* 2016; 150(4): 931-943.
- 157. Saraggi D, Fassan M, Mescoli C et al.** The molecular landscape of colitis-associated carcinogenesis. *Dig Liver Dis.* 2017; 49(4): 326-330.
- 158. Du L, Kim JJ, Shen J et al.** KRAS and TP53 mutations in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017; 28;8(13): 22175-22186.
- 159. Bressenot A, Cahn V, Danese S et al.** Microscopic features of colorectal neoplasia in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2014; 20(12): 3164-3172.

11. Seznam popisků tabulek a obrazové dokumentace

11.1. Tabulky

| | |
|---|----------|
| Tab. 1: Typy pilovitých polypů a jejich molekulární vlastnosti a vztah ke KRK. | s. 20 |
| Tab. 2: Studie zabývající se výskytem pilovitých lézí u IBD se zaměřením na pravé pilovité polypy. | s. 37 |
| Tab. 3: Typy a morfologické znaky nekonvenčních lézí u pacientů s IBD. | s. 39 |
| Tab. 4: Seznam použitých protilátek a výrobců. | s. 53 |
| Tab. 5: Deskriptivní charakteristiky pacientů v souboru. | s. 59 |
| Tab. 6: Věk pacientů v době diagnózy IBD a KRK a doba trvání IBD do doby diagnózy malignity pro podskupinu IBD-asociovaných KRK. | s. 60 |
| Tab. 7: Rozdělení 88 slizničních lézí do morfologických typů a skupin. | s. 35 |
| Tab. 8: Vztah různých typů lézí k typu IBD, zánětlivému pozadí a KRK. | s. 64 |
| Tab. 9: Kombinace různých typů lézí v případě nálezu u jednoho pacienta. | s. 73 |
| Tab. 10: Klinické charakteristiky IBD-asociovaných KRK. | s. 78 |
| Tab. 11: Histomorfologické charakteristiky IBD-asociovaných KRK. | s. 79–80 |
| Tab. 12: Výsledky imunohistochemického a molekulárního vyšetření pro nekonvenční slizniční léze (skupina 1). | s. 82 |
| Tab. 13: Výsledky imunohistochemického a molekulárního vyšetření v pravých pilovitých polypech (skupina 2) a IBD-asociovaných neopláziích (skupina 3). | s. 84 |
| Tab. 14: Typy detekovaných mutací v genech <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> a <i>BRAF</i> | s. 85 |
| Tab. 15: Molekulární výsledky IBD-asociovaných KRK ve vztahu k dalším lézím zastiženým u daného pacienta. | s. 88 |

11.2. Obrázky

- Obr. 1: IBD dysplázie, high-grade. *Barvení HE, zvětšení 100x.* s. 16
- Obr. 2: Hyperplastický polyp. Pilovité změny jsou zastiženy pouze v horní polovině krypt, dysplastické změny zastiženy nejsou. *Hematoxylin-eosin (HE), zvětšení 40x.* s. 21
- Obr. 3. Sesilní pilovitý adenom/polyp bez dysplázie (SSA/P). *Hematoxylin-eosin (HE), zvětšení 40x.* s. 23
- Obr. 4: SSA/P s cytologickou dysplázií pilovitého typu, a – léze v přehledném zvětšení, b, c – detaily dysplastických změn. *Barvení HE, zvětšení 40x (a) a 200x (b, c).* s. 24
- Obr. 5: Tradiční pilovitý adenom (TSA), a – celá léze v přehledném zvětšení, b) s detailem na ektopickou tvorbu krypt (ECF) *Barvení HE, zvětšení 20x a 100x.* s. 26
- Obr. 6: Tradiční pilovitý adenom (TSA) s konvenční adenomatózní dysplázií (vpravo nahoře). *Barvení HE, zvětšení 100x.* s. 26
- Obr. 7: Zjednodušené schéma molekulárních drah vzniku sporadického kolorektálního karcinomu (konvenční a pilovitá cesta) a IBD-asociovaného KRK. Upraveno dle Bettington et al. [35] a Beaugerie et al. [58] s. 34
- Obr. 8: Příklady pilovité epiteliální změny (SEC) bez dysplázie v endoskopickém vzorku. *Barvení HE, zvětšení 100x.* s. 66
- Obr. 9: SEC s dysplázií ve vzorku z resektátu, léze nespĺňuje kritéria pro SSA/P. *Barvení HE, zvětšení 100x.* s. 67
- Obr. 10: SEC s přímým přechodem do invazivního adenokarcinomu. *Barvení HE, zvětšení 100x.* s. 67
- Obr. 11: Vilózní hypermucinózní změna bez dysplázie v endoskopickém vzorku. *Barvení HE, zvětšení 40x.* s. 68
- Obr. 12: Vilózní hypermucinózní změna s dysplázií. *Barvení HE, zvětšení 200x.* s. 69
- Obr. 13: Vilózní hypermucinózní změna v přímém přechodu do invazivního adenokarcinomu. *Barvení HE, zvětšení 100x.* s. 69

- Obr. 14: Morfolgie smíšené léze s pilovitými rysy (dolní část) a vilózní hypermucinózní komponentou (vlevo nahoře). *Barvení HE, zvětšení 40x.* s. 70
- Obr. 15: Léze podobná hyperplastickému polypu (HP-like). *Barvení HE, zvětšení 40x.*..... s. 71
- Obr. 16: Zjednodušené schéma vztahu různých slizničních lézí ke KRK popsaných u pacientů s IBD-asociovaným karcinomem. s. 74
- Obr. 17: Dobře diferencovaný karcinom s gastrickou diferenciací a blandním vzhledem. *Barvení HE, zvětšení 100x.* s. 76
- Obr. 18: Perineurální invaze v myenterickém plexu. *Barvení HE, zvětšení 40x.* s. 76
- Obr. 19: Hotspot nádorového buddingu s 20 „buds“ v ploše 0,785mm² spadající do kategorie Bd3. *Barvení HE, zvětšení 200x.* s. 77
- Obr. 20: Výsledky imunohistochemického barvení p53 a MGMT v SEC a vilózní hypermucinózní změně. s. 81
- a) silná bazální pozitivita p53 v SEC. *Barvení HE, zvětšení 200x.*
- b) ztráta MGMT exprese v SEC. *Barvení HE, zvětšení 100x.*
- c) silná p53 exprese v dysplastické části vilózní hypermucinózní změny. *Barvení HE, zvětšení 100x.*
- d) Ztráta exprese MGMT ve vilózní hypermucinózní změně, zachovaná exprese ve stromálních lymfocytech. *Barvení HE, zvětšení 100x.*

12. Přílohy

Příloha 1: Postup imunohistochemického vyšetření v barvicím automatu Ventana a postup ručního barvení.

Příloha 2: Příprava vzorků a izolace DNA z parafinových bločků.

Příloha 3: Detekce mutací genu *KRAS* a *NRAS* pomocí real-time PCR pomocí AmoyDx[®] KRAS Mutation Detection Kit – Amoy Dx, AmoyDx[®] NRAS Mutation Detection Kit – Amoy Dx - zkrácený stručný postup vyšetření

Příloha 4: Detekce mutací genu *BRAF* metodou PCR s reverzní hybridizací produktu – BRAF StripAssay ViennaLab – zkrácený stručný postup

Příloha 1. Postup imunohistochemického vyšetření v barvicím automatu Ventana a postup ručního barvení.

| Krok | Postup v barvicím automatu Ventana BenchMark Ultra | Postup pro ruční barvení |
|------|--|--|
| 1. | deparafinace řezů (EZ prep. pufr – deparafinační roztok) | deparafinace řezů – xylen 3x10 minut, 96 % alkohol 2x5 minut, 70 % alkohol 5 minut |
| 2. | oplach | oplach v destilované vodě |
| 3. | demaskování antigenů – SSC pufr (chlorid sodný, citrát sodný) | demaskování antigenů – MGMT – v demaskovacím pufru (pufr K8007; DAKO, Dánsko) po dobu 40 min. ve vodní lázni 97 °C |
| 4. | aplikace promývacího pufru | zakupání promývacím puftrem |
| 5. | oplach | oplach v destilované vodě |
| 6. | tlumení peroxidázové aktivity | tlumení peroxidázové aktivity – FLEX peroxidázový blok (RTU) 100 ml po dobu 5 minut |
| 7. | oplach | opláchnutí 3x promývacím puftrem |
| 8. | nakapání protilátky – automatické dle protokolu a ředění | nakapání primární protilátky, ředění 1:50, působení 32 minut |
| 9. | oplach | opláchnutí 3x promývacím puftrem |
| 10. | aplikace vizualizačního systému, OptiView DAB IHC detekční kit, Ventana | aplikace vizualizačního systému EnVision FLEX / HRP (RTU) pod dobu 20 minut |
| 11. | oplach | opláchnutí 3x promývacím puftrem |
| 12. | aplikace chromogenu | FLEX DAB+ FLEXChromogen (tekutý DAB) ředíme: 1 ml DAB pufru + 1 kapka DAB chromogenu po dobu 10 minut |
| 13. | oplach | opláchnutí destilovanou vodou 3x |
| 14. | dobarvení hematoxylinem | dobarvení Kod'ouskovým hematoxylinem po dobu 1 minuty |
| 15. | promytí preparátů pramenité vodě s několika kapkami jaru, oprání v pramenité vodě a zamontování do montovací folie (automat Tissue Tek Film) | odvodnění a zamontování preparátů |

Příloha 2: Příprava vzorků a izolace DNA z parafinových bločků

Parafinové bloky pro izolaci DNA byly vybrány na základě nálezů v histologických řezech.

Případy byly rozděleny do dvou skupiny podle způsobu přípravy vzorků pro izolaci DNA.

V případě izolace z celého řezu byly krájeny ruličky do mikrozkušavek (skupina A).

V případě makrodisekce byly řezy krájeny na sklo (skupina B).

Příprava a deparafinace – skupina A:

Tloušťka krájených řezů (ruliček) byla 5 μm . Nakrájené ruličky byly pomocí preparační jehly přemístěny do sterilní 1,5 ml Safe-Lock mikrozkušavky. Počet krájených ruliček byl určen podle velikosti tkáně tak, aby celková plocha tkáně byla v součtu minimálně 1 cm^2 .

Deparafinizace FFPE řezů v ruličkách v mikrozkušavce

1. Do mikrozkušavky Safe-Lock přidat 500 μl xylenu, inkubace 5 min při laboratorní teplotě
2. Přidat 500 μl absolutního ethanolu, inkubace 5 min při laboratorní teplotě
3. Centrifugovat při 20 000 x g (RCF) po dobu 2 minut. Odsát supernatant bez porušení pelety a přidat 1 ml absolutního ethanolu.
4. Centrifugovat při 20 000 x g (RCF) po dobu 2 minut. Odsát supernatant bez porušení pelety a vysušit tkáňovou peletu v suchém bloku 10 minut při 56 $^{\circ}\text{C}$ –s otevřenými zkumavkami.
5. K peletě přidat 180 μl DNA tkáňového lytického purfu, přidat 70 μl rozmražené proteinázy K

Příprava a deparafinace – skupina B:

Tloušťka krájených řezů byla 5 μm . Nakrájené řezy byly pomocí preparační jehly přemístěny na kladně nabitě podložní sklo s kapkou destilované vody. Počet krájených řezů byl určen podle velikosti tkáně tak, aby celková plocha preparátu byla v součtu minimálně 1 cm^2 .

Deparafinizace FFPE řezů na sklíčkách

1. Na sklíčko s řezem napipetovat 1 ml xylenu, inkubace 5 minut
2. Xylen slít ze sklíčka, naklonit a opláchnout 1 ml xylenu.
3. Opakovat body 1 a 2
4. Sklíčko opláchnout 1 ml absolutního ethanolu a dále napipetovat 1 ml abs. ethanolu, inkubace 5 minut, slít a znovu opláchnout 1 ml abs. ethanolu.

5. Sklíčko s řezem nechat zcela uschnout 5–10 min na vzduchu nebo na plotně při teplotě 56°C.
6. Seškrábnout tkáň ze skla pomocí sterilního skalpelu a provést makrodisekci dle určení patologem
7. Tkáň postupně přenést pomocí kapky směsi tkáňového lytického pufru a proteinázy K do označené Safe-Lock mikrozkušavky.

Izolace DNA – obě skupiny, zkrácený stručný postup pro izolační kit Cobas DNA

Sample Preparation Kit – Roche

1. Vortexovat 30 s mikrozkušavky, pro izolaci pro testy COBAS (KRAS) připravit navíc 1,5 ml zkumavku pro negativní kontrolu (označit NK)
2. Inkubace 60 min v termobloku při 56°C.
3. Inkubace 60 min v termobloku při 90°C. Vychladnutí a centrifugace.
4. Přidat do každé mikrozkušavky 200 µl DNA vazebného pufru, promísit pipetou a inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě.
5. Přidat 100 µl izopropanolu a 5x protáhnout pipetou.
6. Přenést lyzát do zkumavky s filtrem nasazené na odběrové zkumavce
7. Centrifugace a promývání v promývacím pufru (WB I a WB II), centrifugace.
8. Zkumavku s filtrem nasadit na novou odběrovou zkumavku. Kapalínu i starou odběrovou zkumavku vyhodit. Centrifugace 1 minuta.
9. Zkumavku s filtrem nasadit na označenou 1,5ml mikrozkušavku, použitou odběrovou zkumavku vyhodit
10. Přidat eluční pufr (DNA EB) - pro KRAS+NRAS+BRAF 75 µl, inkubace 5 min, centrifugace.
11. V 1,5 ml mikrozkušavce je eluát DNA.
12. Ihned po izolaci změřit pomocí Qubitu koncentraci DNA

Izolace DNA při použití automatického izolátoru MagCore16 s izolačním kitem

MagCore Genomic DNA FFPE One-Step Kit

Skupina A – celé řezy s dostatečným množstvím tkáně

1. Připravit odpovídající počet izolačních patron dle počtu vzorků
2. Do jamky „Heat block Well 1“ napipetovat **500 µl Sula Oil**.

3. Přípravené ruličky tkáně přemístit do jamky „Heat block Well 1“
4. Napipetovat **20 µl proteinasy K**.
5. Pokračovat krokem Automatická izolace DNA (viz níže)

Skupina B – příprava po makrodisekci (MD)

1. Ukrojit řezy a umístit na sklo
2. Připravit odpovídající počet izolačních patron dle počtu vzorků
3. Do jamky „Heat block Well 1“ napipetovat **500 µl Sula Oil** a **20 µl proteinasy K**.
4. Tkáň v parafínu lehce zakápnout směsí **sula oil/proteinasa K** a pomocí sterilního skalpelu provést makrodisekci.
5. Tkáň postupně přenést pomocí kapky směsi **sula oil/proteinasa K** do příslušné „Heat block Well 1“.
6. Jamku zavřít dodaným víčkem a pokračovat krokem Automatická izolace DNA.

Automatická izolace DNA

1. Do přístroje MagCore HF 16 vložit připravené izolační patrony
2. Předplněný stojánek se špičkami a zkumavkami – dbát na správné spárování patrony a elučních zkumavek.
3. Spustit vybraný program, doba lýzy **16 hodin**. Eluční objem nastavit dle velikosti tkáně a plánovým použitím DNA dle tabulky.

| Eluční objem pro různé účely | |
|-------------------------------------|--------|
| Standardně | 100 µl |
| Málo tkáně | 60 µl |

4. Přístroj provede izolaci DNA
5. V eluční zkumavce v pozici 1 je eluát DNA
6. Ihned po izolaci změřit pomocí Nanodropu koncentraci DNA, pro účely sekvenace změřit koncentraci DNA pomocí Qubitu

Příloha 3: Detekce mutací genu KRAS a NRAS pomocí real-time PCR pomocí AmoyDx® KRAS Mutation Detection Kit – Amoy Dx, AmoyDx® NRAS Mutation Detection Kit - Amoy Dx - zkrácený stručný postup vyšetření

1. Ředění DNA před analýzou

1. Před analýzou naředit vzorky na koncentraci **2 ng/μl DNA** ve vzorku.
2. **Rozmrazit PCR H₂O**
3. Připravit příslušný počet 1,5 ml zkumavek, označit identifikací vzorku.
4. **Napipetovat vypočtené objemy H₂O** do každé označené zkumavky.
5. **Přidat** vypočtený objem každé **zásobní DNA** do příslušně značené zkumavky obsahující H₂O.
6. Zkumavky uzavřít a **zvortexovat**

2. Rozpipetování Master Mixů (KRAS Reaction Mix 1–11 a KRAS External Control Reaction Mix) a Master Mixů (NRAS Reaction Mix 1–7 a NRAS External Control Reaction Mix)

1. Do PCR boxu připravit z kitu KRAS: Reaction Mixy 1–11 a KRAS External Control Reaction Mix (Reaction Mix 12), nechat vytemperovat na laboratorní teplotu, resp. připravit z kitu NRAS Reaction Mixy 1–7 a NRAS External Control Reaction Mix (Reaction Mix 8), nechat vytemperovat na laboratorní teplotu.
2. Před použitím každé činidlo promíchat a stočit.
3. Připravit MMX podle tabulek dle typu vyšetření (neuváděno)
4. Každý pracovní MMX důkladně protáhnout pipetou (5x a více)
5. Rozpipetovat **KRAS MMX 1–11 a External Control Reaction Mix (ECM)** a **NRAS MMX 1–7 a External Control Reaction Mix (ECM)** po **17,66 μl** podle příslušných tabulek s jednotlivými analyzovanými mutacemi.

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----------------|------------------|----------------------------|--------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|------------------|---------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----|
| MMX KRAS | MMX1 G12D | MMX 2 G12A | MMX3 G12V | MMX4 G12S | MMX5 G12R | MMX 6 G12C | MMX 7 G13D | MMX 8 G13C | MM9 A59T Q61K | MMX1 0 Q61L/R /H | MMX1 1 K177N A146T/ V/P | ECM |
| MMX NRAS | MMX1 G12/DS | MM X2 G13D | MMX3 G13R/V G12C/V/A | MMX4 A59D | MMX 5 Q61R/K /L Q61H | MM X6 K117N (G>C/ T) | MM X7 A146T | ECM | | | | |

6. Napipetovat **2,34 µl KRAS, resp. NRAS Positive Control** do jamek mikrotitrační destičky
7. Napipetovat **2,34 µl H₂O** do jamek
8. Do řádků pro patientské vzorky přidat do každé jamky **2,34 µl** naředěného **vzorku DNA** (zvortexovaného)
9. Zalepit mikrotitrační destičku zalepovací fólií pomocí aplikátoru.
10. Zalepenou destičku centrifugovat
11. Destičku vložit do analyzátoru Cobas a spustit PCR.

Interpretace výsledků

FAM signály mutačního detekčního systému indikují mutační status vzorku. HEX/VIC signály indikují status interní kontroly kvality.

1. Vybrat typ analýzy: **Abs Quant / FIT points** a potvrdit.
2. Nastavit **Filter Comb 533–580** (HEX/VIC) zkontrolovat amplifikaci příslušného signálu
3. Nastavit **Filter Comb 465–510** (FAM) zkontrolovat amplifikaci příslušného signálu
4. V kanále **FAM** klik na **Calculate** a odečíst hodnoty C_p pozitivní kontroly PC a vzorků a zapsat je do výsledkového formuláře.

V jamkách MMX ECM by mělo dojít k amplifikaci signálu a dosažení Ct hodnoty 15–21.

Cyklus je platný, jestliže jsou platné jamky s kontrolami mutace KRAS (KRAS Positive Control) resp. NRAS a jamky s negativními kontrolami (PCR H₂O), dochází k amplifikaci produktu ve všech testovaných jamkách MMX.

Příloha 4. Detekce mutací genu *BRAF* metodou PCR s reverzní hybridizací produktu – BRAF StripAssay ViennaLab – zkrácený stručný postup

1. Ředění DNA před analýzou

1. Množství DNA a PCR vody je automaticky vypočteno na koncentraci 5 ng/μl DNA ve vzorku. Vzorky, které mají koncentraci DNA nižší než 10 ng/μl, se neředí.
2. Připravit příslušný počet 1,5 ml zkumavek, označit identifikací vzorku.
3. Napipetovat vypočtené objemy **PCR vody** do každé označené zkumavky.
4. Vortexovat každou zásobní DNA po dobu 5 až 10 s.
5. **Přidat** vypočtený objem každé **zásobní DNA** do příslušně značené zkumavky obsahující PCR vodu.

2. Amplifikace DNA

1. Pro každý vzorek připravit PCR reakční mix:

15 μl Amplification Mix

5 μl naředěné Taq DNA Polymerase

2. Ke každému mixu přidat **5 μl** příslušné **DNA**, dle označení zkumavky
3. PCR zkumavky vložit do termocykleru, zvolit program **BRAF_VL**.
4. Po dokončení PCR pokračovat ihned krokem 8.3.4. Hybridizace nebo lze amplikony uložit do mrazáku –20 °C na max. 30 dní.

3. Hybridizace

1. Příprava laboratoře, vytemperování roztoků a pufrů (Hybridization Buffer a Wash Solution A na 45 °C)
2. Testovací proužky, DNAT, Conjugate Solution, Wash Solution B a Color Developer vytemperovat na laboratorní teplotu.

Postup hybridizace

1. Pro každý vzorek připravit jeden strip, označit číslem vzorku

2. Napipetovat do spodní části korýtky **10 µl DNAT** (modré víčko). Jeden sloupec pro každý vzorek.
3. Přidat **10 µl PCR produktu** vždy přímo do kapky DNAT, promíchat pipetou
4. Inkubace **5 min** při laboratorní teplotě.
5. Přidat do každého sloupce korýtky **1 ml Hybridization Buffer** (předehřátého na 45°C).
6. Vložit strip do příslušného sloupce korýtky s označením, lesklou stranou dolů. Úplně ponořit.
7. Inkubace **30 min** při **45 °C** v inkubované třepačce.
8. Nastavit takovou frekvenci třepání, aby se tekutina v korýtku pohybovala, ale nestříkala ven. Uzavřít třepačku víkem, aby byla teplota stabilní.
9. Po skončení inkubace odsát hybridizační roztok pipetou.

4. Promývání a barvení

1. Třikrát aplikace **1 ml Wash Solution A** (45°C) a inkubace **15 min** při **45 °C**
2. Přidat **1 ml Conjugate Solution**, inkubace **15 min** při laboratorní teplotě na třepačce, odsát.
3. Třikrát přidat **1 ml Wash Solution B** s oplachy a inkubací. Odsát. Přidat **1 ml Color Developer**, inkubace **15 min** při laboratorní teplotě ve tmě na třepačce.
4. Pozitivní reakce – purpurové proužky. Několikrát stripy opláchnout destilovanou vodou.
5. Stripy ve tmě usušit.
6. Suché stripy nalepit na výsledkový list (Collector, součást kitu), ihned zapsat pozice proužku.