

Univerzita Karlova

**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

Doktorský studijní program

**Patologie**

**Stanovení optimálního vyšetřovacího algoritmu pro  
efektivní vyhledávání nemalobuněčných karcinomů  
plic s přestavbou genu *ALK***

**Setting of optimal algorithm for effective diagnostics  
of non-small cell lung carcinoma with *ALK* gene  
rearrangement**

**MUDr. Tomáš Rozkoš**

Školitel: prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.

Školitel konzultant: doc. MUDr. Jan Laco, Ph.D.

Hradec Králové, 2017

Obhajoba dne:

**Prohlášení:**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty UK 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, ..... 2017**

**podpis autora**

---

## Obsah

1. Seznam použitých zkratk.....	5
2. Teoretický úvod .....	11
2.1. Epidemiologie zhoubných nádorů plic .....	12
2.2. Klasifikace nádorů plic.....	15
2.3. Charakteristika zhoubných nádorů plic.....	19
2.3.1. Adenokarcinomy .....	19
2.3.1.1. Obecná charakteristika adenokarcinomů plic .....	19
2.3.1.2. Histologická klasifikace adenokarcinomů plic .....	20
2.3.1.3. Preinvazivní léze adenokarcinomu plic.....	24
2.3.1.4. Diferenciální diagnostika adenokarcinomu plic a preinvazivních lézí .....	25
2.3.1.5. Prognóza adenokarcinomu plic a preinvazivních lézí .....	29
2.3.2. Ostatní maligní epiteliální nádory plic .....	33
2.4. Problematika diagnostiky a limitace tzv. malých biopsií a cytobloků.....	37
2.5. Prognostické a prediktivní markery karcinomu plic.....	39
2.6. Další možnosti cílené léčby karcinomu plic .....	48
2.7. Charakteristika genu <i>ALK</i> a problematika jeho detekce u karcinomu plic ...	51
3. Cíle disertační práce.....	59
4. Materiál a metodika .....	60
4.1. Retrospektivní část studie .....	60
4.1.1. Charakteristika souboru .....	60
4.1.2. Tissue microarray.....	60
4.1.3. Imunohistochemické vyšetření.....	61
4.1.4. FISH vyšetření .....	63

4.2.	Prospektivní část studie.....	67
4.3.	Statistické zpracování dat.....	67
5.	Výsledky .....	68
5.1.	Retrospektivní část studie .....	68
5.1.1.	Deskriptivní charakteristiky souboru .....	68
5.1.2.	Expresse ALK IHC a výsledky FISH vyšetření v retrospektivní části .....	68
5.1.3.	Porovnání výsledků IHC exprese jednotlivých variant .....	75
5.1.4.	Statistické zhodnocení výsledků retrospektivní části .....	75
5.2.	Prospektivní část studie.....	78
5.2.1.	Deskriptivní charakteristiky souboru .....	78
5.2.2.	Expresse ALK IHC a výsledky FISH vyšetření v prospektivní části .....	78
5.2.3.	Statistické zhodnocení výsledků prospektivní části.....	82
6.	Diskuze.....	84
7.	Závěry práce .....	98
8.	Literatura .....	100
9.	Seznam tabulek, grafů a schémat .....	137
10.	Fotodokumentace .....	139
11.	Poděkování.....	146

## 1. Seznam použitých zkratk

A	alanin
AAH	atypická adenomatoidní hyperplázie
AC	adenokarcinom (adenocarcinoma)
AIS	adenokarcinom in situ
ALCL	anaplastický velkobuněčný lymfom (anaplastic large cell lymphoma)
ALK	anaplastická lymfomová kináza
ATIC	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
ATP	adenosintrifosfát (adenosine triphosphate)
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homologe B1
C	cystein
CCDC6	coiled-coil domain containing 6
CDHR2	cadherin-related family member 2
CDX2	caudal type homeobox 2
CD5	cluster of differentiation 5
CD30	cluster of differentiation 30
CD56	cluster of differentiation 56 (neural cell adhesion molecule (NCAM))
CD74	cluster of differentiation 74
CD117	cluster of differentiation 117
CK	cytokeratiny
CK7	cytokeratin 7
CK20	cytokeratin 20

CLTC	těžký řetězec klatrinu (clathrin heavy chain)
C-MET	cellular-mesenchymal to epithelial transition factor
CRC	kolorektální adenokarcinom (colorectal adenocarcinoma)
CREB1	CAMP (cyclic adenosine monophosphate) responsive element binding protein 1
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DAB	diaminobenzidin
DCTN1	podjednotka 1 dynactinu (dynactin subunit 1)
DDR2	discoidin domain-containing receptor 2
DFS	celkové bezpříznakové přežití (disease-free survival)
e14sm	mutace vedoucí k vynechání exonu 14 genu <i>C-MET</i> (exon 14 skipping mutation)
EGFR	receptor pro epidermální růstový faktor (epidermal growth factor receptor)
EGFR TKI	tyrosinkinázové inhibitory EGFR
EML4	echinoderm microtubule associated protein like 4
EQA	externí posouzení kvality (external quality assessment)
ER	estrogenový receptor
ERBB2	gen kódující tyrosin kinázový receptor HER2 (Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2; Human epidermal growth factor receptor 2)
ESP	Evropská společnost patologie (European Society of Pathology)
EWSR1	EWS (Ewing sarcoma) RNA binding protein 1
EZR	ezrin
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1

FIG	fused in glioblastoma
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FÚP	Fingerlandův ústav patologie
G	glycin
Gab1	GRB2-associated-binding protein 1
GAP	GTPase activating protein
GATA3	GATA vázající protein 3 (GATA binding protein 3)
GCDFP15	gross cystic disease fluid protein 15
GDP	guanosindifosfát (guanosine diphosphate)
GEF	guanine nucleotide-exchange factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
Grb-2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	guanosintrifosfát (guanosine triphosphate)
hCG	lidský choriový gonadotropin (human chorionic gonadotropin)
HE	hematoxylin-eosin
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HGFR	hepatocyte growth factor receptor
HGF/SF	hepatocyte growth factor / scatter factor
HIP1	huntingtin interacting protein 1
HMB45	human melanoma black 45
HNF4 $\alpha$	hepatocytární nukleární faktor 4 alfa (hepatocyte nuclear factor 4 alpha)
HPV	lidský papilomavirus (human papillomavirus)
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc

IHC	imunohistochemie
IL-10	interleukin-10
INF- $\gamma$	interferon-gamma
KIF5B	kinesin family member 5
KRAS	kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
L	leucin
LCLC	velkobuněčný karcinom plic (large cell lung carcinoma)
LCNELC	velkobuněčný neuroendokrinní karcinom plic (large cell neuroendocrine lung carcinoma)
LRIG3	leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3
M	methionin
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza (mitogen-activated protein kinase)
MIA	minimálně invazivní adenokarcinom
MSN	moesin
MUC2	mucin 2
NCOA4	nuclear receptor coactivator 4
NGS	next-generation sequencing
NOS	blíže nespécifikovaný/nezařazený (not otherwise specified)
NPM1	nucleophosmin 1
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (non-small cell lung carcinoma)
NUT	nuclear protein in testis
PAX8	paired box gene 8
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)



PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PEC	perivaskulární epiteloidní buňky (perivascular epithelioid cells)
PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PLAP	placentární alkalická fosfatáza (placental alkaline phosphatase)
PR	progesteronové receptory
PSA	prostatický specifický antigen
PSAP	prostatická specifická kyselá fosfatáza (prostate specific acid phosphatase)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
R	arginin
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
RANBP2	RAN binding protein 2
RET	rearranged during transfection
ROS1	c-ros oncogene 1
RT-PCR	polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (reverse transcription polymerase chain reaction)
S	serin
SALL4	spalt-like transcription factor 4
SCLC	malobuněčný karcinom plic (small cell lung carcinoma)
SDC4	syndecan 4
SHC	src homology 2 domain-containing
SHP-2	src homology region 2 domain-containing phosphatase-2

SLC34AC	solute carrier family 34, member 2
SqCLC	dlaždicobuněčný karcinom plic (squamous cell lung carcinoma)
SQSTM1	sequestosome 1
T	threonin
TFG	TRK-fused gene
TIL	tumor infiltruující lymfocyty (tumor infiltrating lymphocytes)
TMA	tissue microarray
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor-alpha
TPM3	tropomyosin 3
TPM4	tropomyosin 4
TPR	translocated promoter region
TRIM33	tripartite motif containing 33
TTF1	thyroidální transkripční faktor 1
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

## 2. Teoretický úvod

Nádory plic a průdušek patří celosvětově mezi nejčastější novotvary, a to i přesto, že jejich incidence vlivem poklesu počtu nových případů karcinomu plic v posledních 20 letech klesá. Vyskytují se v každém věku, včetně dětského, a jedná se o širokou škálu biologických jednotek od zcela benigních nádorů, např. plicního hamartomu, až po vysoce agresivní maligní tumory zastoupené např. malobuněčným karcinomem. I přes poměrně dobře známé etiologické faktory nejčastějších zhoubných nádorů plic a průdušek, tj. karcinomů, se nedařilo ještě donedávna léčbou výrazněji ovlivnit délku přežití pacientů. V poslední době byl však učiněn značný pokrok na poli diagnostiky i léčby těchto nádorů, a to zejména v důsledku detailnějšího poznání molekulární etiopatogeneze, což následně vedlo k objevu celé řady nových léků pro tzv. cílenou terapii zaměřenou proti konkrétním genetickým poškozením buněčné DNA. V mikroskopické diagnostice se tak kromě morfologické klasifikace nádoru založené na klasickém barvení hematoxylinem – eozinem, které je pro přesnější zařazení tumoru ve většině případů nutné doplnit imunohistochemickým vyšetřením, objevují nové výzvy v podobě prospektivního skrínigového vyšetřování tumorů za účelem záchytu případů s prognosticky a prediktivně významnými změnami DNA. Současně s rozvojem této tzv. personalizované medicíny, resp. terapie „šité na míru“, se však v diagnostice nádorů plic objevují nové problémy, jakými jsou např. volba vhodných skrínigových vyšetření, dostupnost dostatečného množství materiálu pro stále narůstající počet vyšetření a také ekonomická efektivita vyšetřovacích postupů.

## 2.1. *Epidemiologie zhoubných nádorů plic*

Incidence maligních nádorů plic celosvětově narostla z 38,4 (na 100 000 obyvatel) v letech 1977 – 1981 až na 43,5 v letech 1987 – 1991 a poté opět poklesla na 33,6 v letech 2006 – 2010. Jednotlivé varianty karcinomu plic pak dosáhly svých vrcholů incidence v odlišných obdobích. Nejprve kulminovala incidence dlaždicobuněčného karcinomu, a to v letech 1982 – 1986, poté malobuněčného a velkobuněčného karcinomu v letech 1987 – 1991 a nejpozději dosáhla vrcholu incidence adenokarcinomu, a to v letech 1992 – 1996. Po přechodném období poklesu je nicméně v posledních letech pozorován opětovný nárůst incidence adenokarcinomu. Tento trend je teoreticky vysvětlován změnami technologických postupů výroby cigaret tak, aby bylo množství vdechovaného dehtu a nikotinu co nejmenší, což ale současně umožňuje vdechování většího objemu kouře, a tím dochází k přesunu ukládání chemických látek v něm obsažených z centrálních do periferních částí plic, kde často adenokarcinom vzniká. Dalším důsledkem úprav výroby cigaret je zvýšení obsahu nitrosaminů specifických pro tabák v cigaretovém kouři, které vyvolávají vznik právě adenokarcinomu na zvířecích modelech (1).

Proporcionální zastoupení nejčastějších histologických typů karcinomu plic se ve sledovaných obdobích (1977 – 1981 oproti 2006 – 2010) poměrně výrazně změnilo. Zastoupení dlaždicobuněčného karcinomu pokleslo z 32 % na 20 %, zatímco u adenokarcinomu došlo k nárůstu z méně než 30 % na více než 40 %. Podíl malobuněčného karcinomu poklesl ze 17 % na 13 % a velkobuněčného karcinomu z 8 % na 2 %. Změny ve vývoji proporcionálního zastoupení jednotlivých histologických typů zčásti souvisí také se zlepšením diagnostiky a zavedením imunohistochemie do diagnostického algoritmu, což vysvětluje výrazný pokles proporcionálního výskytu velkobuněčného karcinomu (1).

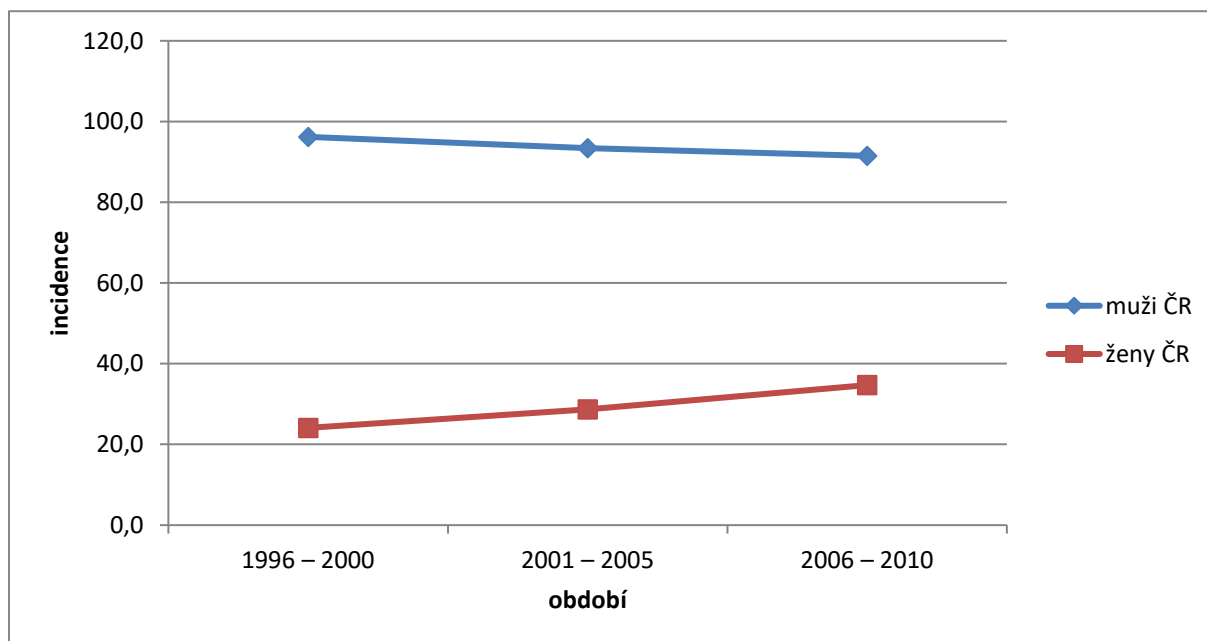
Trendy vývoje incidence maligních nádorů plic se navíc liší také v závislosti na pohlaví. U mužů dochází od poloviny osmdesátých let 20. století k jejímu poklesu, zatímco u žen je naopak od devadesátých let pozorován její nárůst. Vrcholy incidence jednotlivých variant nastaly u žen později než u mužů. Poměr incidence maligních nádorů plic mezi muži a ženami pak za období 1977 – 2010 poklesl z 2,8 na 1,3. Tento pokles je patrný ve všech variantách karcinomu plic, nejvíce pak u dlaždicobuněčného karcinomu, a to z 5,0 na 2,1 (1).

V České republice činila incidence (na 100 000 obyvatel) u zhoubného nádoru průdušky a plíce (C34) u mužů v letech 1996 – 2000 96,2, v letech 2001 – 2005 93,4 a v letech 2006 – 2010 91,5. U žen byla incidence výrazně nižší a činila ve stejných časových obdobích 24,1 (1996 – 2000), 28,7 (2001 – 2005) a 34,7 (2006 – 2010) ( Dušek L., Mužík J., Kubásek M., Kopítková J., Žaloudík J., Vyzula R. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2016-6-29]. Dostupný z URL: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861 (www1)). Incidenci zhoubných nádorů průdušky a plíce v České republice přehledně (na 100 000 obyvatel) znázorňují *tab. 1* a *graf 1*.

**Tab. 1:** Incidence zhoubných nádorů průdušky a plíce v České republice (na 100 000 obyvatel) ve vybraných obdobích

	1996 – 2000	2001 – 2005	2006 – 2010
muži ČR	96,2	93,4	91,5
ženy ČR	24,1	28,7	34,7

**Graf 1:** Incidence zhoubných nádorů průdušky a plíce v České republice (na 100 000 obyvatel) ve vybraných obdobích



V roce 2013 činil záchyt zhoubných nádorů průdušky a plíce v České republice celkem 6367 případů, z toho 4351 u mužů a 2016 u žen, což představuje incidenci 84,3 u mužů a 37,7 u žen. V Královehradeckém kraji bylo ve stejném roce nahlášeno celkem 388 případů, z toho 269 u mužů a 119 u žen, což představuje incidenci 99,2 resp. 42,4 (www1).

U mužů byl v České republice v roce 2013 nejvyšší záchyt zhoubných nádorů průdušky a plíce (1030 případů) ve věkové skupině 65 – 69 let, což představuje incidenci 348,4; u žen byl největší záchyt (415 případů) ve stejné věkové skupině, což představuje incidenci 118,3 (www1).

Úmrtí v důsledku zhoubných nádorů průdušky a plíce bylo v roce 2013 v České republice hlášeno u 3688 mužů, což představuje úmrtnost (na 100 000 obyvatel) 71,5 a 1592 u žen, což představuje úmrtnost 29,8. U obou pohlaví byla úmrtnost (870 mužů a 353 žen) nejvyšší ve věkové kategorii 65 – 69 let (www1).

V roce 2011 představovaly zhoubné nádory průdušky a plíce z celkového počtu malignit v České republice (včetně karcinomů in situ) 10,6 % u mužů a 5,0 % u žen (www1).

## 2.2. Klasifikace nádorů plic

V současné době platí klasifikace nádorů plic v podobě, která byla schválena na Consensus and Editorial Meeting v Lyonu ve Francii (24. – 26. dubna 2014) (1). Její graficky zpracovanou podobu podává *tab. 2*.

Tab. 2: WHO klasifikace nádorů plic 2015

<b>EPITELIÁLNÍ TUMORY</b>	
<b>Adenokarcinomy</b>	8140/3
Lepidický adenokarcinom	8250/3
Acinární adenokarcinom	8551/3
Papilární adenokarcinom	8260/3
Mikropapilární adenokarcinom	8265/3
Solidní adenokarcinom	8230/3
Invazivní mucinózní adenokarcinom	8253/3
Smíšený invazivní mucinózní a nemucinózní adenokarcinom	8254/3
Koloidní adenokarcinom	8480/3
Fetální adenokarcinom	8333/3
Enterický adenokarcinom	8144/3
Minimálně invazivní adenokarcinom	
Nemucinózní	8250/2
Mucinózní	8257/3
Preinvazivní léze	
Atypická adenomatoidní hyperplázie	8250/0
Adenokarcinom in situ	8140/2
Nemucinózní	8410/2
Mucinózní	8253/2
<b>Dlaždicobuněčné karcinomy</b>	8070/3
Rohovějící dlaždicobuněčný karcinom	8071/3
Nerohovějící dlaždicobuněčný karcinom	8072/3
Bazaloidní dlaždicobuněčný karcinom	8083/3
Preinvazivní léze	
Dlaždicobuněčný karcinom in situ	8070/2

Tab. 2: WHO klasifikace nádorů plic 2015 (pokračování)

<b>Neuroendokrinní tumory</b>	
Malobuněčný karcinom	8041/3
Kombinovaný malobuněčný karcinom	8045/3
Velkobuněčný neuroendokrinní karcinom	8013/3
Kombinovaný velkobuněčný karcinom	8013/3
Karcinoidy	
Typický karcinoid	8240/3
Atypický karcinoid	8249/3
Preinvazivní léze	
Difuzní idiopatická hyperplázie plicních neuroendokrinních buněk	8040/0
<b>Velkobuněčný karcinom</b>	8012/3
<b>Adenoskvamózní karcinom</b>	8560/3
<b>Pleomorfní karcinom</b>	8022/3
<b>Vřetenobuněčný karcinom</b>	8032/3
<b>Obrovskobuněčný karcinom</b>	8031/3
<b>Karcinosarkom</b>	8980/3
<b>Plicní blastom</b>	8972/3
<b>Jiné a nezařazené karcinomy</b>	
Karcinom podobný lymfoepiteliomu	8082/3
NUT karcinom	8023/3
<b>Tumory salivárního typu</b>	
Mukoepidermoidní karcinom	8430/3
Adenoidně cystický karcinom	8200/3
Epiteliální-myoepiteliální karcinom	8562/3
Pleomorfní adenom	8940/0
<b>Papilomy</b>	
Dlaždicobuněčný papilom	8052/0
Exofytický	8052/0
Invertovaný	8053/0
Žlázový papilom	8260/0
Smíšený dlaždicobuněčný a žlázový papilom	8560/0



Tab. 2: WHO klasifikace nádorů plic 2015 (pokračování)

<b>Adenomy</b>	
Sklerózující pneumocytom	8832/0
Alveolární adenom	8251/0
Papilární adenom	8260/0
Mucinózní cystadenom	8470/0
Adenom ze slizničních žlázek	8480/0
<b>MEZENCHYMÁLNÍ TUMORY</b>	
Plicní hamartom	8992/0
Chondrom	9220/0
PEComatózní tumory	
Lymfangioleiomyomatóza	9174/1
PECom, benigní	8714/0
Světlobuněčný tumor	8005/0
PECom, maligní	8714/3
Kongenitální peribronchiální myofibroblastický tumor	8827/1
Difuzní plicní lymfangiomatóza	
Inflamatorní myofibroblastický tumor	8825/1
Epiteloidní hemangioendoteliom	9133/3
Pleuropulmonální blastom	8973/3
Synoviální sarkom	9040/3
Intimální sarkom plicní arterie	9137/3
Plicní myxoidní sarkom s <i>EWSR1-CREB1</i> translokací	8842/3
Myoepiteliální tumory	
Myoepiteliom	8982/0
Myoepiteliální karcinom	8982/3

Tab. 2: WHO klasifikace nádorů plic 2015 (pokračování)

<b>LYMFOHISTIOCYTÁRNÍ TUMORY</b>	
Extranodální lymfom z marginální zóny asociovaný se sliznicí (MALT lymfom)	9699/3
Difúzní velkobuněčný B lymfom	9680/3
Lymfomatoidní granulomatóza	9766/1
Intravaskulární velkobuněčný B lymfom	9712/3
Plicní histiocytóza z Langerhansových buněk	9751/1
Erdheimova-Chesterova nemoc	9750/1
<b>TUMORY EKTOPICKÉHO PŮVODU</b>	
Tumory ze zárodečných buněk	
Teratom, zralý	9080/0
Teratom, nezralý	9080/1
Intrapulmonální thymom	8580/3
Melanom	8720/3
Meningeom, blíže nespecifikovaný	9530/0
<b>METASTATICKÉ TUMORY</b>	

CREB1 = CAMP (cyclic adenosine monophosphate) responsive element binding protein 1; EWSR1 = EWS (Ewing sarcoma) RNA binding protein 1; NUT = nuclear protein in testis; PEC = perivascular epithelioid cells; WHO = World Health Organization

## 2.3. Charakteristika zhoubných nádorů plic

Vzhledem k rozsahu a rozmanitosti nádorů, které se mohou v plicích vyskytnout, představuje popis všech typů příliš rozsáhlý výčet, který svou velikostí daleko přesahuje záměr této disertační práce. V následujícím textu bude proto blíže charakterizována pouze skupina invazivních maligních epiteliálních nádorů dle současně platné WHO klasifikace z roku 2015 (1), s důrazem na skupinu adenokarcinomů, která je hlavní skupinou vyšetřovaných případů v našem souboru.

### 2.3.1. Adenokarcinomy

#### 2.3.1.1. Obecná charakteristika adenokarcinomů plic

Invazivní adenokarcinom (AC) je definován jako maligní epiteliální tumor se žlázovou diferenciací, tvorbou hlenu nebo expresí pneumocytárních markerů. Na základě převažujícího typu růstu jsou pak nádory členěny do dalších subtypů (1). Hlavním rizikovým faktorem všech maligních epiteliálních nádorů plic je kouření cigaret. AC se však může vyskytovat také u nekuřáků, u kterých představuje nejčastější typ karcinomu plic. Kromě kouření jsou jako rizikové faktory pro vznik AC plic dále uváděny expozice jiným toxickým látkám (např. radonu, ionizujícímu záření, azbestu či cigaretovému kouři při pasivním kouření) a přítomnost chronického plicního onemocnění (např. plicní fibrózy, chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN) či deficitu  $\alpha$ -1 antitrypsinu) (1). Vzácně jsou pak popsány sestavy rodin s vrozenou predispozicí ke vzniku AC plic na podkladě zárodečné mutace receptoru pro epidermální růstový faktor (*EGFR*) (2-5) a genu kódujícího tyrosin kinázový receptor HER2 (*ERBB2*) (6). Všechny podtypy invazivního AC jsou nejčastěji lokalizovány na periférii plíce (7). Pokud se AC vyskytne centrálně, jedná se nejčastěji o subtypy solidní (33 %), mikropapilární (25 %) či acinární (20 %) (8, 9). Makroskopicky mají invazivní AC nejčastěji vzhled šedobílého uzlu s centrálním vazivovým jizvením, často s antrakotickou pigmentací a vtažením pleury (10). Pokud je na periférii nádoru přítomna lepidická složka, může být ohraničení tumoru od okolního plicního parenchymu neostré a v čerstvém nefixovaném materiálu může být lepidická složka mikroskopicky obtížně rozpoznatelná (1).

### 2.3.1.2. Histologická klasifikace adenokarcinomů plic

Mikroskopicky rozlišuje současná WHO klasifikace na základě převažujícího typu růstu pět hlavních, resp. nejčastěji se vyskytujících podtypů invazivního AC plic.

#### Lepidický AC (ICD-O 8250/3)

Tento podtyp je definován růstem blandně vyhlížejících nádorových pneumocytů (pneumocytů II. typu nebo Clarových buněk) na povrchu původních alveolárních sept za současné přítomnosti ložiska jednoznačné invaze většího než 5 mm v největším rozměru. Invaze je zde definována jako nález alespoň jednoho z následujících znaků: 1) přítomnost jiného růstového vzoru než lepidického (tj. acinárního, papilárního, mikropapilárního či solidního); 2) přítomnost myofibroblastického stromatu obsahujícího buňky invazivního nádoru; 3) invaze nádoru na pleuru či do cév (lymfatických a/nebo krevních); a 4) šíření nádoru alveolárními prostory (1).

#### Acinární AC (ICD-O 8551/3)

Hlavní složkou tohoto typu AC jsou kulaté či oválné žlázky s centrálním lumenem obklopeným nádorovými buňkami (11-13). Žlázové struktury však mohou být tvořeny i kulatými solidními skupinami nádorových buněk s centrální cytoplazmou a s periferně uloženými jádry, bez patrného lumen. V některých případech je pak možná záměna acinárního typu růstu s lepidickým v kolabovaných alveolech. Pokud je však alveolární architektura vymizelá a/nebo je v septech přítomno myofibroblastické stroma, je tento růst považován za acinární. Kribriformní uspořádání je hodnoceno pouze jako variantní růstový vzor vyskytující se v rámci acinárního AC i přesto, že je spojován s horší prognózou (14).

### Papilární AC (ICD-O 8260/3)

Tento podtyp AC je definován růstem nádorových buněk radiálně v okolí centrálního fibrovaskulárního jádra (11-13). Je však potřeba odlišit tento typ růstu od tangenciálně zachycené alveolární stěny s lepidicky rostoucím AC. Pokud jsou alveolární prostory či nádorové aciny vyplněny papilárními strukturami, je tumor klasifikován jako papilární AC, bez ohledu na přítomnost či nepřítomnost myofibroblastického stromatu (1).

### Mikropapilární AC (ICD-O 8265/3)

Převažujícím růstovým vzorem tohoto typu AC jsou nádorové buňky tvořící radiální shluky bez centrálního fibrovaskulárního jádra, tzv. „florety“, které mohou být přítomny volně v alveolárních prostorech nebo mohou být připojeny k alveolárním septům (11-13). Nádor může také růst v podobě prstenčitých žlázových útvarů, které tzv. „plavou“ v alveolárních prostorech. Častá je vaskulární a stromální invaze nádorových buněk a také mohou být přítomna psamomatózní tělíska (1).

### Solidní AC (ICD-O 8230/3)

Hlavní složkou takto definovaného AC jsou většinou výrazně atypické polygonální nádorové buňky, které tvoří souvislé solidní shluky, postrádající uspořádání dle jiných růstových vzorů AC, tj. lepidického, acinárního, papilárního či mikropapilárního (11-13). Solidní AC musí být odlišen od dlaždicobuněčného a velkobuněčného karcinomu na základě průkazu alespoň ložiskové tvorby hlenu nebo na základě alespoň ložiskové exprese pneumocytárních markerů, tj. thyroidálního transkripčního faktoru 1 (TTF1) a/nebo napsinu A (1). Tento subtyp je také nejčastějším, u kterého je zjišťována přestavba genu anaplastické lymfomové kinázy (*ALK*) (15). Kromě výše zmíněných hlavních podtypů AC, uznává současná WHO klasifikace tumorů plic ještě čtyři další vzácné varianty invazivního AC.

### Invazivní mucinózní AC (ICD-O 8253/3)

Tato varianta byla dříve klasifikována jako mucinózní bronchioloalveolární karcinom, ale vzhledem k odlišným klinickým, zobrazovacím, patologickým a genetickým nálezům byla nyní vyčleněna samostatně. Tato varianta má silnou tendenci k multicentrickému, multilobárnímu a oboustrannému výskytu, což může reflektovat snadné šíření dýchacími cestami. Makroskopicky je nádor špatně ohraničený, měkký, bez centrálního jizvení a antrakotické pigmentace, někdy se dokonce může projevovat disperzními vícečetnými uzlíky, které mohou splývat a připomínat lobární pneumonii. Mikroskopicky je invazivní mucinózní AC tvořen nejčastěji buňkami cylindrickými a/nebo pohárkovými s výraznou intracelulární hlenotvorbou a s minimálními cytologickými atypii. Nádor roste nejčastěji lepidicky, ale mohou být přítomny i ostatní růstové vzory, tj. acinární, papilární, mikropapilární i solidní. Pokud je v nádoru přítomno více než 10 % nemucinózní složky, je tento klasifikován jako smíšený invazivní mucinózní a nemucinózní AC (1). Také IHC profil této varianty AC je odlišný od klasického AC. Nádor je typicky pozitivní při průkazu cytokeratinu 7 (CK7) a cytokeratinu 20 (CK20) a negativní v TTF1 a napsin A (16-18). Dále také často exprimuje hepatocytární nukleární faktor alfa (HNF4 $\alpha$ ) (19).

### Koloidní AC (ICD-O 8480/3)

Jedná se o nádor s výraznou extracelulární tvorbou hleny, která je reprezentována vznikem hlenových „jezírek“, jež nahrazují prostory původně vyplněné vzduchem. Nádor je měkký, dobře ohraničený a může být cysticky změněný. Nádorové buňky jsou typicky zastiženy pouze v malém množství v podobě vysokých cylindrických či pohárkových buněk rostoucích lepidickým způsobem. Dalším typickým znakem buněk koloidního AC je jejich velmi dobrá diferenciací, což může činit diagnostické obtíže při hodnocení malých biopsií (1). V IHC vyšetření je tento typ AC pozitivní v průkazu střevních markerů jako caudal type homeobox 2 (CDX2), mucin 2 (MUC2) a CK20 (18).

### Fetální AC (ICD-O 8333/3)

Jedná se o vzácný typ AC připomínající fetální plíci. Nádorové buňky obsahují subnukleární vakuoly bohaté na glykogen a luminálně/apikálně lokalizovaná jádra a jsou uspořádány v komplexních žlázových strukturách (1). U dobře diferencovaného (low-grade) fetálního AC je patrná tvorba morul a jsou přítomny pouze lehké jaderné atypie, zatímco u níže diferencovaného (high-grade) fetálního AC se netvoří moruly, jaderné atypie jsou nápadnější a často je nalezen přechod do běžného AC s ložisky nekroz (20). IHC low-grade fetální AC exprimuje TTF1, estrogenový receptor (ER)  $\beta$  a aberantně nukleárně  $\beta$ -catenin (21-23). Více než 90 % low-grade tumorů pak dále exprimuje neuroendokrinní markery chromogranin A a/nebo synaptofyzin, na rozdíl od high-grade tumorů, u kterých je tato exprese pozorována pouze u 50 % případů. High grade fetální AC také často vykazují expresi  $\alpha$ -fetoproteinu, glypicanu 3 a spalt-like transkripčního faktoru 4 (SALL4) (20, 24).

### Enterický AC (ICD-O 8144/3)

Dle definice se jedná o AC, který morfologicky připomíná AC vznikající v tlustém střevě. Někdy je též označován jako plicní AC intestinálního typu (1). Při stanovení této diagnózy je nutná pečlivá korelace s klinickým nálezem se zaměřením na vyloučení primárního karcinomu tlustého střeva, protože histologické i IHC rysy mohou být u obou těchto nádorů zcela totožné (25). Tato varianta AC se vyskytuje nejčastěji v podobě dobře ohraničeného periferně rostoucího tumoru (26-28). Mikroskopicky musí alespoň 50 % tumoru vykazovat růstový vzor podobný kolorektálnímu karcinomu (acinární a/nebo kribriformní a tubulo-papilární). IHC exprese je variabilní a v diferenciální diagnostice často nepřínosná, jelikož některé tumory mohou vykazovat kompletní enterický profil (pozitivita CK20 a CDX2 a negativita CK7) (1). Dále se mohou v primárním AC plic vyskytnout světlé buňky („clear cells“) nebo buňky tvaru pečetního prstene („signet ring cells“), které jsou však v současné době považovány za cytologické rysy a nikoliv za histologické subtypy (12, 13). Tyto buňky se nejčastěji nacházejí v solidní složce AC, ale mohou se vyskytnout i u všech ostatních subtypů AC, a proto by neměly být zahrnuty do určování převažujícího subtypu (1). U nádorů, ve kterých se vyskytují buňky tvaru pečetního prstene, je literárně popisován častější výskyt přestavby genu *ALK* (15, 29).

Do úplného výčtu klasifikace invazivního AC plic je nutné doplnit ještě jednotku minimálně invazivního adenokarcinomu (MIA), který je definován jako malý ( $\leq 3$  cm) solitární AC s převážně lepidickým typem růstu a invazí, která nepřesahuje 5 mm v největším zastiženém rozměru (1). MIA je častěji nemucinózní (ICD-O 8250/2), vzácněji může být i mucinózní (ICD-O 8257/3) nebo smíšený (30-33). Tento tumor se nachází nejčastěji na periférii plíce (34) a v případě, že je kompletně resekován, by neměl recidivovat (10, 12, 30-32, 35). Invazivní složka je definována jako růstový typ jiný než lepidický (tj. solidní, acinární, papilární a/nebo mikropapilární) nebo jako infiltrace nádorových buněk do myofibroblastického stromatu. V případě, že je přítomna invaze lymfatických a/nebo krevních cév a pleury, tumor obsahuje ložiska nekrózy, nebo je patrné šíření tumoru dýchacími cestami je diagnóza MIA již vyloučena a jedná se o „klasický“ invazivní AC (1). Vzhledem k tomu, že MIA představuje časnou formu invazivního AC, mohou genetické alterace u něj zjištěné odhalit časné změny sdružené s invazí. Na přeměně adenokarcinomu in situ (AIS) do MIA se podílí snížení exprese genu *TGFBR2* a naopak amplifikace genů *PDCD6* a *TERT* (36, 37), společně s amplifikací a mutacemi genu *EGFR* (38-40).

### 2.3.1.3. Preinvazivní léze adenokarcinomu plic

#### Atypická adenomatoidní hyperplázie (ICD-O 8250/0)

Atypická adenomatoidní hyperplázie (AAH) je malá (obvykle  $\leq 0,5$  cm) lokalizovaná proliferace lehce až středně atypických pneumocytů typu II a/nebo Clarových buněk, které vystylají plicní sklípky a někdy také respirační bronchioly. Vzácně mohou být přítomny i nenápadné pseudopapily (12, 13, 41). Mezi buňkami AAH naléhajícími na bazální membránu jsou patrné mezery (1). Buňky AAH imunohistochemicky exprimují TTF1 (42). Přechod od AAH k AIS představuje souvislou řadu morfologických změn (12, 13, 43, 44). V terminologii preinvazivních lézí je AAH protipólem dlaždicobuněčné dysplázie (1). V případě AAH není doporučeno určovat stupeň diferenciaci (grading) (13). Jedná se většinou o náhodný nález v resekátech plic, s nejčastější lokalizací na periférii plíce a subpleurálně (45, 46), který se dle autoptických studií nachází u 2 – 4 % pacientů bez průkazu karcinomu plic (47, 48). Výskyt AAH je však vyšší v resekátech od pacientů s karcinomem plic (až 19 % u žen a 9,3 % u mužů), zejména pak s AC plic (až 30,2 % u žen a 18,8 % u mužů)



(49). V případě, že je tato léze kompletně odstraněna, by neměla recidivovat (35, 50). AAH je obtížné odlišit od reaktivní hyperplázie pneumocytů; na genetické úrovni je však prokázán klonální/neoplastický původ této léze (51, 52). Mutace genu Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (*KRAS*) u 33 % a genu *EGFR* u 35 % případů AAH naznačuje, že se jedná o časnou změnu předcházející vzniku periferního AC plic (39, 53-55).

#### Adenokarcinom in situ

AIS je lokalizovaný malý ( $\leq 3$  cm) AC s růstem, který je striktně omezen na nádorové buňky rostoucí podél preexistujících struktur plicního sklípku (tj. lepidický růst), bez invaze krevních a/nebo lymfatických cév, pleury a vnitřního prostoru plicního sklípku a bez souvislosti s jeho stěnou. Nesmí být přítomny ani struktury papilární či mikropapilární, ani šíření nádorových buněk dýchacími prostory. AIS je dále rozdělován na mucinózní a nemucinózní podtyp, přičemž druhý z uvedených je extrémně vzácný (1). Buňky AIS imunohistochemicky exprimují TTF1 a napsin A (42). Nejčastější lokalizací AIS je plicní periferie, a to subpleurálně (45, 46). V případě, že je tato léze úplně odstraněna, neměla by recidivovat (35, 50). AIS představuje mezistupeň mezi prekurzorovou AAH a invazivním MIA. Vzhledem k relativně nedávnému zavedení diagnostických kritérií pro tuto jednotku jsou data ohledně molekulárních změn jen omezená a ukazují na přítomnost mutace genu *EGFR* u 40 – 86 % případů, zatímco mutace genu *KRAS* byla zastižena pouze u 0 – 4 % případů AIS (10, 56).

#### 2.3.1.4. Diferenciální diagnostika adenokarcinomu plic a preinvazivních lézí

V diferenciální diagnostice AC plic se velmi často uplatňuje imunohistochemické (IHC) vyšetření, v jehož rámci se v diagnostice AC plic nejčastěji používají markery TTF1 a napsin A. TTF1 je pozitivní přibližně v 75 % invazivních AC plic (57, 58), přičemž pozitivita je častější v lepidických a papilárních oblastech, na rozdíl od převážně solidně rostoucího AC (59). Byla také pozorována korelace mezi TTF1 pozitivitou a přítomností mutace *EGFR* (60). Senzitivity TTF1 a napsinu A pro diagnostiku AC jsou srovnatelné, ačkoliv v některých studiích je popisována lepší senzitivita TTF1 pro odlišení AC od dlaždicobuněčného karcinomu plic (SqCLC) (61).

TTF1 může být však také exprimován v jiných plicních nádorech, např. v malobuněčném karcinomu plic (SCLC) a ve velkobuněčném neuroendokrinním karcinomu plic (LCNELC). Dále je tento marker exprimován v nádorech štítné žlázy a v některých karcinoidech vyskytujících se v nejrůznějších anatomických lokalizacích. Napsin A může být také exprimován i v mimoplicních tumorech, např. v karcinomu z renálních buněk (1) nebo ve světlobuněčném karcinomu ovaria, příp. endometria (62-65). K odlišení AC plic a SqCLC se také používají markery dlaždicobuněčné diferenciace – proteiny p63 a p40, přičemž v poslední době je upřednostňován zejména marker p40 vzhledem k vyšší specifitě pro dlaždicobuněčnou diferenciaci. Expres p63 je totiž v různých studiích popisována až u 30 % plicních AC (57, 66, 67).

Diferenciální diagnostika zahrnuje čtyři podoblasti: 1) odlišení AC od ostatních primárních plicních nádorů plic, 2) odlišení vícečetných primárních synchronních nebo metachronních karcinomů od intrapulmonálních metastáz, 3) odlišení primárního AC plic od metastázy AC z jiného primárního ložiska a 4) odlišení reaktivních změn od prekursorových, minimálně invazivních a invazivních forem AC (1).

ad 1) Největší a nejčastější problém činí odlišení AC od SqCLC a LCNELC. Solidní AC totiž mohou mít denzní eozinofilní cytoplazmu podobnou buňkám SqCLC. Nízce diferencované karcinomy, které mohou budít dojem dlaždicové morfolgie ale postrádají jednoznačné diagnostické rysy této diferenciace (rohovění, rohové „perly“, dobře patrné mezibuněčné spoje), mohou být správně diagnostikovány za pomoci IHC s použitím TTF1 a některého z markerů dlaždicobuněčné diferenciace jako například proteinu p63 nebo jeho izoformy proteinu p40 (někdy též označovaného jako deltaNp63) (66). Odlišení solidního AC od LCNELC je většinou možné na základě kombinace morfolgických znaků neuroendokrinní diferenciace (organoidní „hnízda“ buněk s periferním palisádováním, tvorba rozetovitých formací, rozsáhlá nekrotizace, nápadná mitotická aktivita) v kombinaci s IHC průkazem neuroendokrinních markerů (nejčastěji synaptofyzinu, chromograninu a neural cell adhesion molecule (CD56)) (1).

ad 2) V diferenciální diagnostice vícečetných primárních synchronních nebo metachronních AC od intrapulmonálních metastáz napomáhá podrobná histologická subtypizace a také popis dalších morfolgických znaků, jako některých cytologických charakteristik (např. přítomnosti světlobuněčných změn a stupně atypií) a vzhledu

nádorového stromatu (např. desmoplázie, zánět) (1, 68). Role molekulárního testování v této problematice je nadějná, avšak vyžaduje ještě další podrobnější studie (68-71).

ad 3) Plíce jsou jedním z orgánů nejčastěji postižených metastázami (72-76). V rozsáhlé pitevnické studii zemřelých s primárním maligním tumorem byly prokázány plicní metastázy u 10,7 % případů, což z plic činilo čtvrté nejčastější místo výskytu metastáz, hned po regionálních a vzdálených mízních uzlinách a játrech (72). Metastázy se nejčastěji prezentují ve formě mnohočetných uzlů, často postihujících obě plíce, vzácněji pak ve formě solitárního ložiska s nejčastější lokalizací na periférii dolních a středních plicních polí (77-79). Nejčastěji je postižen parenchym a pleura, ačkoliv karcinomy prsu, ledviny, tlustého střeva, endometria i další tumory se mohou vyskytnout ve formě izolované endobronchiální masy (73, 74, 76). K odlišení primárního AC plic od metastazujícího AC z jiné lokality pomáhá především pečlivá klinicko-patologická korelace a IHC vyšetření, jelikož histologický vzhled obou těchto jednotek je obdobný (1). Většina primárních plicních AC (s výjimkou mucinózních karcinomů) je pozitivní v průkazu TTF1, napsinu A a CK7, zatímco většina „mimoplicních“ AC je TTF1 a napsin A negativní, s variabilní expresí CK7 (18, 80-82). Karcinom tlustého střeva je pozitivní v průkazu CK20 a CDX2, ale obvykle je negativní v průkazu CK7, TTF1 a napsin A (80, 83). Karcinom prsu často exprimuje estrogenové a progesteronové receptory, gross cystic disease fluid protein 15 (GCDFFP15), GATA vázající protein 3 (GATA3) a mammaglobin, ale ne TTF1 (81, 84, 85). AC prostaty pozitivně reaguje s prostatickým specifickým antigenem (PSA), s prostatickou specifickou kyselou fosfatázou (PSAP) a/nebo exprimuje androgenní receptory (86-88). Melanom je pozitivní v průkazu S100 proteinu, SOX10, human melanoma black 45 (HMB45) a melanu A, zatímco neexprimuje CK ani TTF1 (81). Buňky thymického karcinomu vykazují pozitivitu cluster of differentiation 5 (CD5), paired box gene 8 (PAX8) a cluster of differentiation 117 (CD117), ale jsou negativní v reakci s TTF1 (81, 89-91). Metastázy uroteliálního karcinomu mohou být pozitivní s CK7, ale na rozdíl od AC plic navíc vykazují expresi GATA3 a/nebo uroplakinu 2 a uroplakinu 3 (92-95). Metastázy tumorů ze zárodečných buněk vykazují variabilní IHC pozitivitu s cluster of differentiation 30 (CD30),  $\alpha$ -fetoproteinem, CK, SALL4, placentární alkalickou fosfatázou (PLAP) a  $\beta$  podjednotkou lidského choriového gonadotropinu (hCG) (81, 96-98). Samostatnou problematiku pak představuje odlišení vzácných variant AC plic od metastáz, přičemž v této situaci ještě více platí, že nenahraditelnou úlohu mají

anamnéza a korelace s klinickým obrazem a nálezem na zobrazovacích metodách. Invazivní mucinózní AC plic je nutné odlišit od metastatického mucinózního AC pankreatu či ovária, nebo nejlépe na základě korelace s klinickým a zobrazovacím nálezem. Pankreatické mucinózní AC častěji exprimují CK20 a MUC2 (99). Metastatický kolorektální AC (CRC) často exprimuje CDX2 a CK20, zatímco postrádá expresi CK7, ale vzácně může také vykazovat pozitivitu v reakci s TTF1 (100). Fetální AC je nutné odlišit od vzácně se v plicích vyskytující endometriózy na základě maligních cytologických rysů, časté TTF1 exprese a chybění charakteristického endometriálního stromatu, jehož buňky exprimují ER a progesteronové receptory (PR) (1). Dále je nutné tento tumor odlišit od metastáz endometroidního endometriálního AC, jednak korelací s klinickým nálezem a také na základě chybění exprese ER/PR a PAX8 v buňkách fetálního AC (1). Enterický AC lze považovat za primárně plicní pouze v případě klinického vyloučení primárního tumoru gastrointestinálního traktu, jelikož IHC profil obou tumorů může být shodný, včetně velmi vzácné exprese TTF1 buňkami CRC (100).

ad 4) AAH nesmí být zaměněna s reaktivní pneumocytární hyperplázií v důsledku zánětu či fibrózy plicního parenchymu, u které nejsou převažujícím rysem změny alveolární výstelky a buňky jsou rozptýleny více difúzně. Pro AAH je navíc její výskyt v terénu intersticiální plicní fibrózy a zánětu poměrně netypický (1). Odlišení AAH od nemucinózního AIS je obtížné. AIS je obvykle větší (> 5 mm), s početnější nahloučenou homogenní, kubickou či cylindrickou buněčnou populací. Ložisko AIS vykazuje ostrý a náhlý přechod do okolního parenchymu, zatímco u AAH je patrný pozvolný přechod (1). Odlišení AIS (mucinózního i nemucinózního) od MIA je možné na základě nálezu případného ložiska počínající invaze. MIA se pak od invazivního AC odlišuje velikostí invazivního ložiska ( $\leq$  5 mm) a přítomností jednoznačného ostrého ohraničení. Jelikož většina literatury týkající se problematiky AIS a MIA popisuje případy s velikostí tumoru menší než 2 – 3 cm, jsou zatím data o 100% celkovém bezpříznakovém přežití (disease-free survival, DFS) u těchto tumorů, které jsou menší než 3 cm, nedostatečná, a proto je při této velikosti doporučováno takové tumory klasifikovat jako „lepidicky predominantní AC, suspektní AIS/MIA“ (1).

### 2.3.1.5. Prognóza adenokarcinomu plic a preinvazivních lézí

Stejně jako u ostatních typů plicního karcinomu Tumor Node Metastasis (TNM) klasifikace (*tab. 3*) s následným rozdělením do klinických stádií podle rozsahu nádoru (stage grouping) (*tab. 4*) a kvalita života (performance status) významně ovlivňují volbu léčby a jsou silným ukazatelem přežití. Celoživotní nekuřáctví a ženské pohlaví jsou, nezávisle na stádiu onemocnění, pozitivními prognostickými faktory (1). Velikost tumoru větší než 2,5 cm, solidní a mikropapilární typ růstu (9, 33, 56, 101, 102) a hodnota maximálního standardizovaného vychytávání více než 7 jsou prediktory kratšího DFS (1). Přítomnost mikropapilárního typu růstu je negativním prognostickým znakem celkového přežití (overall survival) (101) a recidivy nádoru u pacientů s omezenou resekci tumoru (103). Prognóza pro stádium I u AC s převažujícím lepidickým typem růstu je výborná (9, 10, 33, 102) a většina tumorů, u kterých dojde k recidivě, má některé z rizikových faktorů, jako např. blízký vztah k okraji u limitovaných resekcí tumoru, přítomnost mikropapilární složky nebo invazi do krevních cév a/nebo na pleuru (35). V některých studiích je tento prognostický vztah zachován i v pokročilejších stádiích (102). Relativně dobrá prognóza AC zastižených při skrínigovém CT zobrazení je dána záchytem časných stádií AC s příznivými histologickými rysy (104). Ačkoliv byly v jednotlivých studiích vyšetřovány mnohé další klinické, biologické, radiologické a molekulární faktory vztahující se k tumorům, pouze malé množství z nich se ukázalo být významnými v predikci odpovědi na zvolenou léčbu. AC s převažujícím solidním a mikropapilárním typem růstu lépe odpovídají na léčbu cisplatinou (105). Další prognostické a prediktivní markery karcinomu plic budou podrobněji zmíněny v kapitolách 2.5. a 2.7.

Tab. 3: TNM klasifikace karcinomů plic dle WHO klasifikace 2015

<b>T – PRIMÁRNÍ TUMOR</b>	
TX	Primární tumor nelze posoudit, nebo tumor prokázaný přítomností maligních buněk ve sputu nebo bronchiálním výplachu, ale nezachycen zobrazovacími metodami nebo bronchoskopicky
T0	Neprokázaný primární tumor
Tis	Karcinom in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm v největším rozměru, ohraničený plící nebo viscerální pleurou, bez evidentní bronchoskopické invaze proximálněji než do lobárního bronchu, tzn. ne do hlavního bronchu <sup>a</sup>
T1a	Tumor ≤ 2 cm v největším rozměru
T1b	Tumor > 2 cm, ale ≤ 3 cm v největším rozměru
T2	Tumor > 3 cm, ale ≤ 7 cm, nebo tumor s některou z následujících vlastností (T2 tumory s těmito vlastnostmi jsou klasifikovány jako T2a jestliže je jejich velikost ≤ 5 cm nebo pokud nemůže být stanovena a T2b jestliže je jejich velikost > 5 cm, ale ≤ 7 cm): <ul style="list-style-type: none"> <li>• Zahrnující hlavní bronchus, ≥ 2 cm distálně od kariny</li> <li>• Invaduje do viscerální pleury</li> <li>• Spojený s atelektázou nebo obstrukční pneumonií zasahující hilus, ale nepostihující celou plíc</li> </ul>
T2a	Tumor > 3 cm, ale ≤ 5 cm v největším rozměru
T2b	Tumor > 5cm, ale ≤ 7 cm v největším rozměru
T3	Tumor > 7 cm nebo s invazí do následujících struktur: hrudní stěna (zahrnuje tumory plicního hrotu), bránice, brániční nerv, mediastinální pleura, parietální perikard; nebo tumory hlavního bronchu < 2 cm distálně od kariny, ale nezahrnující karinu; nebo spojené s atelektázou nebo obstrukční pneumonií celé plíce; nebo ohraničený uzel/uzly tumoru ve stejném laloku jako primární tumor
T4	Tumor jakékoliv velikosti, který invaduje do některé z následujících struktur: mediastinum, srdce, velké cévy, průdušnice, zvrtný laryngeální nerv, jícen, tělo obratle, karina; samostatný uzel/uzly tumoru v jiném stejnostranném laloku než primární tumor

Tab. 3: TNM klasifikace karcinomů plic dle WHO klasifikace 2015 (pokračování)

<b>N – REGIONÁLNÍ LYMFATICKÉ UZLINY</b>	
NX	Nelze posoudit postižení regionálních lymfatických uzlin
N0	Nenalezena metastáza v regionálních lymfatických uzlinách
N1	Metastáza ve stejnostranných peribronchiálních a/nebo stejnostranných hilových uzlinách, včetně přímého prorůstání
N2	Metastáza ve stejnostranných mediastinálních a/nebo subkarinálních lymfatických uzlinách
N3	Metastáza v druhostranné mediastinální, druhostranné hilární, stejnostranné nebo kontralaterální skalenické nebo supraklavikulární lymfatické uzlině/uzlinách.
<b>M – VZDÁLENÉ METASTÁZY</b>	
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastázy
M1a	Samostatný tumorózní uzel/uzly v kontralaterálním laloku; tumor s pleurálním uzlem nebo maligním pleurálním nebo perikardiálním výpotkem <sup>b</sup>
M1b	Vzdálené metastázy

Poznámky:

a) Neobvyklé povrchové šíření tumoru jakékoliv velikosti s invazivní složkou omezenou na stěnu bronchu, který může zasahovat proximálně do hlavního bronchu, je klasifikován jako T1a.

b) Většina pleurálních (a perikardiálních) výpotků u pacientů s karcinomem plic je způsobena tumorem. Nicméně u malé části pacientů se opakovaným cytologickým vyšetřením pleurální (perikardiální) tekutiny nepodaří prokázat přítomnost nádorových buněk a tekutina není krvavá ani se nejedná o zánětlivý exsudát. Pokud je po korelaci s klinickým nálezem rozhodnuto, že výpotek není spojen s nádorem, měl by být výpotek vyloučen ze stagingu a případ by měl být klasifikován jako M0.

Tab. 4: Rozdělení karcinomů plic do klinických stádií dle WHO klasifikace 2015

Okultní karcinom	TX	N0	M0
Stádium 0	Tis	N0	M0
Stádium IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
Stádium IB	T2a	N0	M0
Stádium IIA	T1a	N1	M0
	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0	M0
Stádium IIB	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
Stádium IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
Stádium IIIB	T4	N2	M0
	Jakékoli T	N3	M0
Stádium IV	Jakékoli T	Jakékoli N	M1a
	Jakékoli T	Jakékoli N	M1b



### 2.3.2. Ostatní maligní epiteliální nádory plic

Vzhledem k zamýšlenému rozsahu kapitoly a pouze vzdálenému vztahu k tématu této disertační práce budou v krátkosti zmíněny pouze tři další nejčastější typy karcinomu plic.

#### Dlaždicobuněčný karcinom plic (ICD-O 8070/3)

SqCLC je maligní epiteliální tumor, který vykazuje rohovění a/nebo mezibuněčné můstky, nebo se jedná o morfologicky nediferencovaný NSCLC, který exprimuje IHC markery dlaždicobuněčné diference. Na základě této definice jej lze dále rozdělit na tři podskupiny: rohovějící dlaždicobuněčný karcinom (ICD-O 8071/3), nerohovějící dlaždicobuněčný karcinom (ICD-O 8072/3) a bazaloidní dlaždicobuněčný karcinom (ICD-O 8083/3) (1). SqCLC je velmi silně spojen s kouřením cigaret (mnohem více než AC plic) a vývoj jeho incidence úzce kopíruje změny v kuřáckých zvycích (106). Stejně jako u ostatních typů karcinomu plic může být vznik SqCLC sdružen i s profesionálním vystavením působení škodlivých látek, přičemž největší vztah je pozorován k expozici arzenu a jeho sloučeninám (107-110). Některé práce se také zabývají vztahem karcinomu plic k infekci lidskými papilomaviry (HPV) (111, 112), ale zůstává kontroverzní, zda jde skutečně o významný etiologický faktor, neboť řada dalších studií s důsledně kontrolovanými postupy HPV detekce a s vyloučením metastáz krčních a orofaryngeálních karcinomů zpochybňuje tento vztah, přinejmenším v západoevropské a severoamerické populaci (113-116). SqCLC je agresivní tumor s obdobným šířením jako ostatní NSCLC a s častým zakládáním vzdálených metastáz (1). SqCLC nejčastěji vzniká v oblasti hlavního a lobárního bronchu. Zhruba dvě třetiny případů vznikají v centrální části plíce a jedna třetina na periférii (1). Diferenciální diagnostika je širší u případů, u kterých není zachyceno rohovění (tzv. „malé biopsie“, nerohovějící a bazaloidní SqCLC). V těchto případech je nutné vyloučit zejména AC, dlaždicobuněčný papilom, metastázu uroteliálního karcinomu a prorůstání thymického dlaždicobuněčného karcinomu. U bazaloidního SqCLC je nutné vyloučit ještě LCNELC, adenoidně cystický karcinom a NUT karcinom. U všech SqCLC, včetně rohovějících, je vždy nutné vyloučit metastázu dlaždicobuněčného karcinomu jiného primárního původu a také dlaždicobuněčnou metaplázií s cytologickými atypii při difúzním alveolárním poškození (1).

## Neuroendokrinní tumory

### Malobuněčný karcinom plic (ICD-O 8041/3)

SCLC je maligní epiteliální tumor, který je tvořen malými buňkami s minimálním množstvím cytoplazmy, nezřetelnými mezibuněčnými hranicemi, jemně rozptýleným zrnitým jaderným chromatinem, s nenápadnými jádérky nebo jejich úplným chyběním. Buňky jsou kulaté, oválné nebo vřetenité. Nápadným znakem je tzv. modelování jader. Nekrózy jsou typicky rozsáhlé a mitotická aktivita vysoká. Většina SCLC exprimuje neuroendokrinní markery. Jako kombinovaný SCLC (ICD-O 8045/3) je označován tumor, který má kromě SCLC ještě další histologickou složku, která je nejčastěji tvořena AC, SqCLC, velkobuněčným karcinomem (LCLC), LCNELC a méně často vřetenobuněčným anebo obrovskobuněčným karcinomem (1). SCLC představuje celosvětově 13 % nově diagnostikovaných případů plicního karcinomu a téměř všichni pacienti s SCLC jsou silnými kuřáky (117). Ze všech hlavních typů karcinomu plic má SCLC nejsilnější vztah ke kouření cigaret; kuřáci, kteří kouří ekvivalent jedné krabičky cigaret denně po dobu více než 30 let, mají 111násobně vyšší riziko vzniku SCLC v porovnání s nekuřáky (118). Nejsilnějšími karcinogeny tabákového kouře, které vyvolávají vznik SCLC, jsou polycyklické aromatické uhlovodíky jako benzoapyren a tabák specifický nitrosamin, známý jako z nikotinu odvozený (nicotine-derived) nitrosaminoketon (119). Další rizikové faktory zahrnují CHOPN (120) nebo astma bronchiale (riziko 1,71x vyšší) (121). Vzácně se také SCLC může vyvinout jako sekundární tumor u pacientů s AC plic s mutací *EGFR* (122). Naopak za ochranný faktor je považována hormonální substituční léčba (123). SCLC vzniká nejčastěji centrálně v hlavních dýchacích cestách, ale v 5 % se může objevit i na periférii plíce (124). Paraneoplastické příznaky se u tohoto karcinomu vyskytují častěji než u ostatních histologických typů karcinomu plic. Mezi nejčastější patří hyponatrémie, Cushingův syndrom, Lambertův-Eatonův myastenický syndrom, periferní neuropatie nebo limbická encefalopatie (1). SCLC má velmi špatnou prognózu, s pouze 10% dvouletým přežitím u případů s metastatickým onemocněním a s 25% pětiletým přežitím u pacientů bez metastáz v době diagnózy (125, 126). Medián celkového přežití je pouze 12,7 měsíce (127), přičemž nebyl pozorován žádný rozdíl v délce přežívání mezi SCLC a LCNELC (128-130). Diferenciální diagnostika SCLC zahrnuje především LCNELC, typický a atypický karcinoid (obtížné zejména v malých biopsiích s odběrovými artefakty), zánětlivý/lymfoidní infiltrát, nádory z rodiny Ewingova

sarkomu, primární NSCLC a metastatické karcinomy (1, 131).

#### Velkobuněčný neuroendokrinní karcinom (ICD-O 8013/3)

LCNELC je NSCLC, který vykazuje histologické rysy neuroendokrinní morfologie (včetně tvorby rozet a periferního palisádování) a který IHC exprimuje neuroendokrinní markery. Jako kombinovaný LCNELC (ICD-O 8013/3) je označován LCNELC s komponentou AC, SqCC a/nebo vřetenobuněčného, příp. obrovskobuněčného karcinomu. Stejně jako u SCLC, je hlavním etiologickým faktorem LCNELC kouření; více než 90 % případů se vyskytuje u silných kuřáků (1). Tento tumor má také obdobnou molekulární charakteristiku jako SCLC a pravděpodobně vzniká i ze stejné progenitorové buňky, za kterou je na základě zvířecích modelů považována pluripotentní Claraova buňka (132, 133). Na rozdíl od SCLC se však vyskytuje častěji na periférii plic (84 %) a v horním laloku (63 %) (1). Tumor často invaduje do pleury, hrudní stěny a přilehlých struktur (134). Také výskyt paraneoplastických příznaků je v porovnání s SCLC nižší. Kromě neuroendokrinní morfologie (organoidní uspřádání, trabekulární růst, rozetovité formace, periferní palisádování, vysoká mitotická aktivita (v průměru 75 mitóz na 2 mm<sup>2</sup>) a rozsáhlé mapovité nekrózy) je pro diagnózu LCNELC vyžadováno také potvrzení neuroendokrinní diferenciace IHC markery jako jsou synaptofyzin, chromogranin a CD56 (NCAM), přičemž stačí jednoznačná pozitivita jednoho ze zmíněných markerů ve více než 10 % nádorových buněk (1). Diferenciální diagnostika LCNELC zahrnuje SqCLC, atypický karcinoid, bazaloidní SqCLC, AC a ostatní velkobuněčné karcinomy s neuroendokrinní morfologií či IHC profilem (1).

#### Velkobuněčný karcinom (ICD-O 8012/3)

LCLC je nediferencovaný NSCLC, který postrádá cytologické, architektonické a IHC znaky SCLC, AC nebo SqCLC. Pro stanovení této diagnózy je nutné rozsáhlé a důkladné vyšetření tumoru z resekátu a nelze ji stanovit z „malých biopsií“ nebo cytologií (1). Řada tumorů v minulosti diagnostikovaných jako LCLC podle dřívější WHO klasifikace z roku 2004 je nyní klasifikována jako solidní AC nebo jako nerohovějící SqCLC na základě IHC vyšetření a průkazu hlenotvorby. Dále byly z této kategorie vyjmuty některé další jednotky jako např. bazaloidní karcinom (nyní zařazen pod SqCLC) nebo LCNELC (nyní řazen mezi neuroendokrinní tumory) (1). Popsané změny se také odrazily v epidemiologii tohoto nádoru. V devadesátých letech představoval LCLC 10 % ze všech karcinomů plic (135). Nicméně recentní údaje

z onkologického registru USA ukazují, že relativní počet nově diagnostikovaných případů stažený k věku poklesl za poslední tři dekády z 9,4 % na 2,3 %, což právě odráží změny v diagnostickém postupu díky zavedení IHC detekce žláзовých a dlaždicových markerů. V současné době se jedná o diagnózu „per exclusionem“, po vyloučení přítomnosti složky některého z ostatních karcinomů plic (AC, SqCLC, SCLC, LCNELC) (136-138). Průměrný věk pacientů v době diagnózy je okolo 60 let a jedná se častěji o muže. LCLC se vyskytuje typicky na periférii plíce. Diferenciální diagnostika je poměrně široká, na prvním místě zahrnuje solidní AC, nerohovějící SqCLC a adenoskvamózní karcinom, příp. karcinosarkom (1). V současné době je ověřována hypotéza, že LCLC s nulovým imunofenotypem (negativní TTF1, napsin A, proteiny p63 a p40) představuje TTF1 (a napsin A) negativní AC, protože u 15 – 20 % morfologických AC je pozorována nepřítomnost těchto markerů, zatímco kompletní chybění proteinu p40 je u SqCLC velmi vzácné. Proto je TTF1/p40-negativní tumor s největší pravděpodobností solidním AC spíše než nerohovějícím SqCLC. Toto konstatování je podpořeno studii mikroRNA, které navrhuji překlasifikování TTF1/p40-negativních LCLC na AC (139). Dalším podpůrným argumentem je fakt, že LCLC s nulovým imunofenotypem mají podobné molekulární rysy jako solidní AC, např. vysokou frekvenci výskytu *KRAS* mutace (137, 140).

Ostatní vzácné typy karcinomu plic jsou uvedeny v tabulce 2 v kapitole 2.2 a nebudou zde již dále podrobněji popisovány.

## 2.4. *Problematika diagnostiky a limitace tzv. malých biopsií a cytobloků*

Za poslední dekádu byla objevena celá řada léčebných cílů, díky nimž již klasifikace karcinomu plic na SCLC a „ostatní“ - NSCLC není dostačující. To vedlo k naléhavé potřebě vytvoření klasifikačního systému pro tzv. malé biopsie (endobronchiální a transtorakální) a cytobloky (141). Takový systém byl proto hlavní novou součástí IASLC/ATS/ERS klasifikace plicního AC 2011 (13). Jelikož jsou však stále více nalézány terapeutické cíle i mimo skupinu AC, je co nejpřesnější diagnostika z malých vzorků stále důležitější. Ve světle nového vývoje nejsou vzorky použity pouze pro mikroskopickou diagnostiku, ale také pro IHC a molekulární testování se vztahem k potenciální cílené léčbě. Tento přístup je obzvláště důležitý u malých biopsií, protože okolo 70 % plicních karcinomů je v době diagnózy již neoperovatelných (1). Ačkoliv přístup k diagnostice z malých vzorků se výrazně liší mezi jednotlivými laboratořemi, byla na základě mezioborového konsenzu publikována doporučení pro běžnou praxi (12, 13), která jsou souhrnně popsána v následujícím odstavci.

NSCLC by v malých biopsiích a v cytologii měly být blíže klasifikovány jako AC nebo SqCLC, kdykoliv je to možné. Označení NSCLC - blíže nespecifikovaný (not otherwise specified – NOS) by mělo být užíváno v co nejmenší míře a pouze pokud nelze stanovit konkrétnější diagnózu. Mělo by být také v popisu vzorku zmíněno, zda byla diagnóza stanovena již na základě základního barvení (HE) či až za pomoci IHC. Termín nedlaždicobuněčný karcinom by neměl být pathology vůbec používán. Pokud jsou k dispozici další bioptické a/nebo cytologické vzorky z daného tumoru, měly by být vyšetřovány společně, aby bylo možné dosáhnout maximálně možné specifické a konkordantní diagnózy. Termíny AIS a MIA pro léze v malých biopsiích a cytologiích by se neměly používat. Pokud je neinvazivní růstový vzor přítomen v malém vzorku, měl by být hodnocen jako lepidický způsob růstu a obdobně, pokud cytologický materiál má atributy AIS, měl by být diagnostikován jako AC s doprovodným komentářem, že tento obraz může odpovídat AIS, MIA nebo invazivnímu AC s lepidickým typem růstu. Pojem LCLC by neměl být užíván v kontextu malých vzorků/cytologií a měl by být vyhrazen pouze pro resekáty, kde je možné provést podrobné vyšetření celého tumoru a vyloučit tak přítomnost diferencované složky. Nádory, které mají fokálně sarkomatoidní rysy (výrazný jaderný pleomorfismus, atypické obrovské mnohjaderné buňky nebo vřetenité buňky), by měly být hodnoceny jako 1) AC, 2) NSCLC spíše AC, 3) SqCLC nebo 4) NSCLC spíše SqCLC. Vždy by měla být zmíněna přítomnost

sarkomatoidní složky a její bližší popis. Exprese IHC markerů neuroendokrinní diferenciace, např. synaptofyzinu a chromograninu, by měla být v diagnostice nádorů z malých vzorků testována pouze na základě morfologického podezření na neuroendokrinní diferenciaci nádorových buněk v klasickém barvení hematoxylinem-eozinem (1).

## 2.5. Prognostické a prediktivní markery karcinomu plic

Mezi nejvýznamnější prognostické faktory karcinomu plic patří parametry hodnocené v rámci TNM klasifikace (viz tab. 3, kapitola 2.3.1.5) a dále molekulárně biologické změny posuzované na úrovni genů a/nebo proteinů. Ačkoli byly v literatuře do současné doby publikovány výsledky studia více než 100 prognostických markerů (142, 143), které dílem přispěly k bližšímu porozumění biologie tohoto nádorového onemocnění, většinu z nich nelze zatím využít v rutinní terapeutické praxi (144).

Nezbytnou podmínkou pro základní výběr léčby karcinomu plic je správná morfologická diagnostika nádoru. V minulosti bylo u karcinomu plic postačující vzhledem k odlišné léčbě diagnostikovat daný nádor pouze jako nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC) nebo SCLC, přičemž SCLC je léčen nejčastěji platinovými deriváty, cisplatinou nebo karboplatinou, v kombinaci s inhibítorem topoizomerázy etoposidem (145). Dnes je však nutné NSCLC ještě dále subklasifikovat (zjednodušeně) na SqCC, který je léčen platinovými deriváty v kombinaci s tzv. cytostatiky III. generace (např. paklitaxelem, docetaxelem, vinorelbinem, případně gemcitabinem) a na AC, léčený platinovými deriváty kombinovanými s antifolátovým cytostatikem pemetrexedem (146, 147).

V současné době jsou jedinými „povinně“ vyšetřovanými prediktivními markery u vybrané skupiny NSCLC mutace *EGFR* a přestavba *ALK* (144). U SCLC zatím nejsou rutinně vyšetřovány žádné prognostické ani prediktivní markery (148).

*EGFR* (epidermal growth factor receptor)

Gen *EGFR* je lokalizován na chromozomu 7p11.2-p12 a kóduje transmembránový tyrosinkinázový receptor velikosti 170 kDa označovaný také jako HER1 (149). Po navázání ligandu, kterými jsou např. epidermální růstový faktor (EGF), transformující růstový faktor-alfa (TGF-alfa), amfiregulin nebo epiregulin, dochází k homodimerizaci nebo heterodimerizaci (např. s HER2) receptoru, autofosforylaci tyrosinových zbytků a aktivaci dvou hlavních signálních cest – RAS/MAPK a PI3K/AKT, které vedou mj. ke zvýšené proliferaci buňky (150). Aktivace *EGFR* je způsobena buď amplifikací a/nebo zvýšenou expresí, nebo jeho mutací, případně oběma genetickými alteracemi (149).

Zvýšená exprese EGFR byla prokázána u 60 % NSCLC, zejména u SqCLC, kde dosahovala až 80 % (151). Amplifikace *EGFR* byla prokázána až u 60 % NSCLC, přičemž obě změny se často vyskytují současně (151-154). Ačkoliv byla zvýšená exprese EGFR původně uváděna jako negativní prognostický faktor (151, 155), v metaanalýze 18 studií zahrnující celkem 2972 pacientů nebyl prognostický význam této alterace prokázán (156). Přítomnost zvýšené exprese EGFR u SqCLC je naopak prediktivním markerem léčebné odpovědi na necitumumab (157). Prognostický a prediktivní význam amplifikace a/nebo zvýšeného počtu kopií *EGFR* je zatím sporný. Zatímco v několika studiích byla zjištěna souvislost mezi amplifikací *EGFR* a léčebnou odpovědí na tyrosinkinázové inhibitory EGFR (EGFR TKI) (158-161), v dalších pracích, např. Brugger et al. (162) a Hirsch et al. (163), již tyto výsledky prokázány nebyly. Naproti tomu byla v metaanalýze zahrnující 22 studií a 1821 pacientů léčených EGFR TKI zjištěna souvislost mezi amplifikací *EGFR* a celkovým přežitím ( $p = 0,001$ ), dobou přežití bez progresu ( $p < 0,001$ ) a dobou do progresu ( $p = 0,020$ ) (164).

Hodnocení prognostické a prediktivní úlohy samotné amplifikace *EGFR* je však metodicky velmi obtížné, neboť přibližně u poloviny případů karcinomů plic s mutací *EGFR* je také současně prokazatelná amplifikace tohoto genu a výsledky tedy mohou být výrazně zkreslené (153, 159, 165). V současné době není testování amplifikace *EGFR* u karcinomu plic doporučeno (149).

Objev aktivující mutace *EGFR* jako pozitivního prediktivního faktoru odpovědi na léčbu EGFR TKI, resp. gefitinibem, byl publikován v roce 2004 dvěma výzkumnými skupinami – Lynch et al. (166) a Paez et al. (167). Aktivující mutace *EGFR*, tj. takové mutace, které vedou k aktivaci receptoru nezávisle na vazbě ligandu, se vyskytují v exonech 18, 19, 20 a 21, kódujících intracelulární tyrosinkinázovou doménu, kde je vazebné místo pro adenosintrifosfát (ATP). Do současné doby bylo popsáno více než 3000 těchto somatických mutací. Nejčastěji se jedná o delece v exonu 19 (del19E746-A750) a o bodovou mutaci L858R v exonu 21, která vede k náhradě leucinu (L) na pozici 858 argininem (R). Tyto dvě genetické alterace představují dohromady přibližně 80-90 % všech mutací *EGFR*, přičemž každá z nich se vyskytuje u 40-45% EGFR-mutovaných nádorů (153, 154, 168). Mezi méně často se vyskytující aktivující mutace patří např. bodové mutace L861Q a L861R v exonu 21, substituce G719X v exonu 18, při kterých je na pozici 719 glycin (G) nahrazen serinem (S), alaninem (A) nebo cysteinem (C), a duplikace či inserce v exonu 20 (154).



Kromě aktivujících mutací EGFR, které jsou spojeny až se 70% mírou léčebné odpovědi na terapii EGFR TKI (169), se mohou vyskytnout také mutace vedoucí k rezistenci na tuto terapii, k níž bohužel dochází u většiny pacientů již v průběhu prvních 12 měsíců po zahájení léčby (170). Mezi nejčastější a nejlépe popsané rezistentní mutace patří bodová mutace T790M v exonu 20, která vede k náhradě threoninu (T) na pozici 790 methioninem (M) (171, 172). Tato mutace byla prokázána jak u širokého rozmezí 3-40 % pacientů ještě neléčených TKI (tzv. de novo rezistence) (173-175), tak až u poloviny pacientů původně s aktivujícími mutacemi *EGFR*, u kterých došlo k progresi onemocnění při léčbě EGFR TKI v důsledku objevení se této sekundární mutace (tzv. získaná rezistence) (176-178). Mutace T790M vede ke zvýšené afinitě ATP k vazebnému místu v tyrosinkinázové doméně, což má za následek, že se EGFR TKI první generace, jejichž mechanismem účinku je reverzibilní kompetitivní inhibice ATP, poté nemohou na toto vazebné místo navázat (179). Pro léčbu karcinomu plic s mutací T790M je v současné době možné využít EGFR TKI třetí generace osimertinib, který se ireverzibilně váže na EGFR s přítomností nejen aktivačních mutací, ale také právě mutace T790M.

Karcinomy s mutací EGFR se většinou vyskytují u žen, u nekuřáků a u Asiatů a často se histologicky jedná o adenokarcinom, resp. jeho varianty – zejména papilární a mikropapilární. Prevalence mutovaných karcinomů je rasově, resp. geograficky rozdílná; zatímco v Evropě je přibližně 10 % (180), tak ve východní Asii dosahuje až 30-50 % (181). Tyto epidemiologické charakteristiky však nelze použít jako spolehlivé parametry pro výběr konkrétních případů karcinomů plic k testování mutačního statusu *EGFR* (144). Je zajímavé, že pacienti s EGFR-mutovanými nádory mají lepší prognózu v porovnání s nemocnými s karcinomy s nemutovanou formou tohoto genu, a to bez ohledu na indikovaný typ léčby (169). V současné době je u každého karcinomu plic, který je diagnostikován jako „AC“, „NSCLC, spíše AC“ a „NSCLC - NOS“ indikováno vyšetření mutačního statusu *EGFR* jako (nejlepšího) prediktivního markeru léčby EGFR TKI, např. gefitinibem, erlotinibem a afatinibem (149). K tomuto účelu se používají různé modifikace polymerázové řetězové reakce (PCR), včetně kvantitativní PCR v reálném čase (qPCR). Komerčně dostupné protilátky proti mutované formě EGFR rozpoznávají pouze varianty s delecí délky 15 kb v exonu 19, resp. s bodovou mutací L858R v exonu 21 zatím nejsou kvůli nízké senzitivitě, zejména pro zjišťování delecí v exonu 19, obecně doporučovány (182-184).

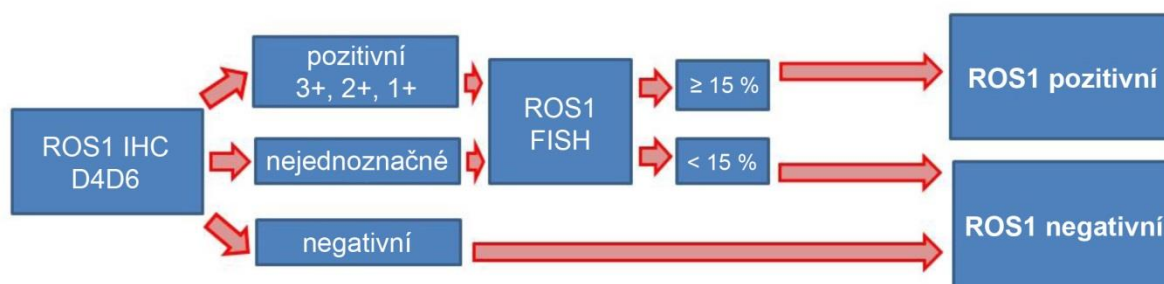
*ALK* (anaplastic lymphoma kinase)

Viz kapitola 2.7.

*ROS1* (c-ros oncogene 1)

Gen *ROS1* je lokalizován na chromozomu 6q21-q22 a kóduje transmembránový tyrosinkinázový receptor (zatím bez známého ligandu) z insulinové rodiny, který má jednu z největších extracelulárních domén v rámci všech dosud známých tyrosinkinázových receptorů, tvořenou více než 1800 aminokyselinami. Aktivace *ROS1* je způsobena fúzí tohoto genu s různými translokačními partnery, což vede k aktivaci signálních cest PIK3/AKT a STAT (144). Translokace *ROS1* se vyskytuje – kromě např. glioblastomu a cholangiocelulárního karcinomu (185) – také přibližně u 1-3,5% NSCLC (186, 187), častěji u adenokarcinomů, a většinou se jedná o mladší nemocné a nekuřáky (188, 189). Rozdíl v zastoupení pohlaví zjištěn nebyl (190). Nejčastějšími translokačními partnery *ROS1* jsou *FIG* (fused in glioblastoma) (191), *CD74* (cluster of differentiation 74), *SLC34AC* (solute carrier family 34, member 2) (192), *EZR* (ezrin), *LRIG3* (leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 3), *SDC4* (syndecan 4) a *TPM3* (tropomyosin 3) (186, 193). Nejčastěji se vyskytuje translokace CD74-*ROS1*. K detekci translokace *ROS1* lze použít fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) nebo metody založené na PCR. V současné době se do běžné praxe zavádí dvoustupňový detekční postup s uplatněním IHC detekce exprese *ROS1* proteinu jako první skrínigové vyšetření k selekci případů vhodných pro další molekulárně genetické testování (194), obdobně jako tomu je u testování amplifikace genu *ERBB2* u karcinomu plic a žaludku, nebo přestavby genu *ALK* u NSCLC a jak ukazuje schéma č.1 (Černovská M., Dundr P., Fínek J., Kolek V., Koubková L., Matěj R., Melichar B., Petruželka L., Ryška A., Skříčková J., Tichá I., Zemanová M. Interdisciplinární konsenzus prediktivního molekulárně genetického vyšetřování u NSCLC 2016 [online], [2016], [cit. 2016-19-12]. Dostupný z URL: <http://www.patologie.info/soubor/zpravy/480-Konsenzus+presentation.pdf> (www2))

Schéma 1: Vyšetřovací postup k záchytu případů NSCLC s translokací zahrnující gen *ROS1* (upraveno a převzato z [www2](#))



U pacientů s *ROS1* translokovaným karcinomem bylo zaznamenáno prodloužení doby přežití bez progresu při léčbě pemetrexedem (187, 195) a rovněž byla pozorována odpověď na léčbu crizotinibem, ačkoliv na něj vzniká v průběhu terapie rezistence (196). Naopak, terapie EGFR TKI vedla u pacientů s *ROS1* translokovaným nádorem ke zkrácení doby přežití bez progresu (187).

#### *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog)

Gen *KRAS* je lokalizován na chromozomu 12p12 a kóduje protein s GTPázovou aktivitou, který má – podobně jako další členové této rodiny NRAS a HRAS – významnou úlohu v přenosu signálu v rámci aktivované dráhy EGFR, jejímž výsledkem je mj. proliferace a diferenciace buňky. EGFR aktivuje *KRAS* pomocí proteinů Grb-2 (growth factor receptor-bound protein 2) a GEF (guanine nucleotide-exchange factor), které metabolizují GDP (guanosindifosfát) na GTP (guanosintrifosfát). Komplex GTP-*KRAS* následně aktivuje další proteiny v signální cestě, např. RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma), a posléze je inaktivován hydrolyzou pomocí GAP (GTPase activating protein) (149).

Mutace *KRAS* jsou přítomny v několika typech lidských nádorů, např. u karcinomu tlustého střeva a přibližně u 15-25 % NSCLC (197). Ve většině případů se jedná o bodové mutace v exonu 2 (kodóny 12 a 13) a v exonu 3 (kodón 61), které vedou k rezistenci *KRAS* na hydrolyzu pomocí GAP, což způsobuje trvalou aktivitu komplexu GTP-*KRAS* (149). Mutace *KRAS* se častěji vyskytují u příslušníků kavkazské rasy, mužů a kuřáků (197, 198). Např. v nedávné metaanalýze bylo zjištěno, že mutace *KRAS* byly přítomny u 26 % kuřáků, ale pouze u 6 % nekuřáků (199). Mutace *KRAS* a mutace *EGFR* se vzájemně vylučují. K detekci mutací *KRAS*

se používají různé modifikace PCR (198, 200).

Prognostický význam mutací *KRAS* u karcinomu plic je zatím nejasný. Ačkoliv ve studii Mascaux et al. (201) byl prokázán negativní prognostický význam mutace *KRAS*, zejména u adenokarcinomu, v dalších studiích tento výsledek již potvrzen nebyl (200, 202). Klinický význam mutací *KRAS* u NSCLC je ovšem v tom, že se jedná o negativní prediktivní faktor odpovědi na léčbu EGFR TKI. Např. ve studii Mao et al. (199) byla léčebná odpověď na EGFR TKI pozorována pouze u 3 % pacientů s *KRAS*-mutovaným nádorem v porovnání s 26 % pacientů s nemutovanou formou tohoto genu. Vzhledem ke skutečnosti, že mutace *EGFR* a *KRAS* se nevyskytují současně, je však případný přínos vyšetřování mutačního statusu *KRAS* u NSCLC nízký, protože terapie EGFR TKI je indikována pouze u nemocných s mutovanou formou *EGFR* (149).

*BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1)

Gen *BRAF* je lokalizován na chromozomu 7q34 a kóduje serinovou/threoninovou proteinkinázu, která se účastní přenosu signálu v cestě RAS-RAF-ERK-MAPK. Mutace *BRAF* vedou k trvalé aktivaci této signální cesty a vzájemně se vylučují s mutacemi *EGFR* a *RAS*. U NSCLC byly mutace *BRAF* zjištěny u 1-3 % případů, častěji u adenokarcinomů. Na rozdíl od mutací *EGFR* se mutace *BRAF* vyskytují častěji u kuřáků než nekuřáků (203) a přibližně v polovině případů se jedná o mutace jiného typu než V600E, např. L596V nebo G468A (204-205). K detekci mutací *BRAF* jsou používány metody využívající PCR. Vzhledem k častému výskytu non-V600E mutací je případné využití imunohistochemické detekce specifickou protilátkou rozpoznávající pouze mutovanou formu V600E limitované (206). U *BRAF*-mutovaných NSCLC byla pozorována dobrá léčebná odpověď na vemurafenib (207).

*C-MET* (cellular-mesenchymal to epithelial transition factor)

Gen *C-MET* je lokalizován na chromozomu 7q31 (208) a kóduje transmembránový tyrosinkinázový receptor HGFR (hepatocyte growth factor receptor), jehož jediným doposud známým ligandem je HGF/SF (hepatocyte growth factor / scatter factor). Po navázání ligandu dochází k transfosforylaci tyrosinových zbytků intracelulární části receptoru (209) a k aktivaci proteinů Grb-2, Gab1 (GRB2-associated-binding protein 1) a SHC (Src homology 2 domain-containing) s následným přenosem signálu dráhami MAPK, PI3K/AKT a STAT (210, 211). Aktivace *C-MET* může být způsobena amplifikací, zvýšenou expresí nebo bodovou mutací a vede k trvalé aktivitě HGFR nezávislé na vazbě ligandu (212-214).

Amplifikace *C-MET* byla prokázána u 3-21 % pacientů s NSCLC neléčených EGFR TKI a byla spojena s horší prognózou (215, 216). Spíše než o amplifikaci vlastního genu se však ve většině případů jedná o polysomii chromozomu 7; není tedy překvapením, že u některých případů byla současně pozorována také amplifikace *EGFR*, jehož lokus se nachází na téže chromozomu (149, 216, 217). K detekci amplifikace *C-MET* lze použít in situ hybridizaci.

Klinický význam amplifikace *C-MET* spočívá v tom, že se jedná o jeden z hlavních mechanismů získané rezistence NSCLC léčených EGFR TKI, který je prokazatelný až u 20 % pacientů (212, 218, 219). V některých případech byla současně nalezena také rezistentní mutace T790M v exonu 20 *EGFR* (212). V poslední době se objevuje řada prací, které se týkají významu mutací vedoucích k vynechání přepisu exonu 14 (tzv. exon 14 skipping mutations – e14sm), které se vyskytují současně s amplifikací *C-MET* nebo bez ní (220-222). Již bylo popsáno přes 100 různých typů e14sm (221). Vynechání přepisu exonu 14 má za následek delecii juxtamembránové domény proteinu MET, což vede ke zvýšenému přenosu signálu prostřednictvím MET receptorové dráhy (223). Blokáda *C-MET* se tedy jeví jako nadějný způsob léčby rezistentních nádorů. Za tímto účelem jsou v klinických studiích testovány *C-MET* TKI, např. cabozantinib (224, 225), capmatinib (221) tivantinib (226) a crizotinib (220, 225, 222), nebo monoklonální protilátky proti *C-MET*, např. onartuzumab (227).

## *HER2* (human epidermal growth factor receptor 2)

Gen *HER2*, také známý jako *ERBB2* nebo *HER2/neu*, je lokalizován na chromozomu 17q11.2-q12 a kóduje transmembránový tyrosinkinázový receptor s doposud neznámým ligandem, který vytváří heterodimery s dalšími členy rodiny HER proteinů, např. HER1 (EGFR), HER3 a HER4 (144). Amplifikace *HER2* je přítomna přibližně u 20-25 % NSCLC (228) a na rozdíl od negativního prognostického významu zvýšené exprese HER2 zjištěné u adenokarcinomu, případný prognostický význam amplifikace tohoto genu prokázán nebyl (229). U 1-2 % NSCLC, většinou adenokarcinomů vznikajících u žen nekuřáček, byly zjištěny inzerce v exonu 20 (230, 231). Prediktivní význam amplifikace a/nebo mutace *HER2* u karcinomu plic pro léčbu trastuzumabem nebo duálními EGFR/HER2 TKI afatinibem a neratinibem zatím zůstává nejasný (232, 233).

## *RET* (rearranged during transfection)

Gen *RET* je lokalizován na chromozomu 10q11.2 a kóduje transmembránový tyrosinkinázový receptor z rodiny gliálních neurotrofních receptorů (144). Translokace *RET* byla zjištěna u 0,6-2 % NSCLC (186, 234, 235); většinou se jedná o mladší nemocné a nekuřáky (234-236). Rozdíl v zastoupení pohlaví zjištěn nebyl (237). Mikroskopicky se často jedná o adenokarcinomy nebo o adenoskvamózní karcinomy, zejména solidně a kribriformně rostoucí a s mucinózní složkou (186, 237). Translokačními partnery *RET* jsou zejména *KIF5B* (kinesin family member 5) (234), *CCDC6* (coiled-coil domain containing 6) (186), *NCOA4* (nuclear receptor coactivator 4) (237) a *TRIM33* (tripartite motif containing 33) (236). Nejčastější změnou je fúze KIF5B-RET, která představuje přibližně 90 % všech translokací (236, 238). K průkazu translokace *RET* lze využít in situ hybridizaci. Ve studiích in vitro a na myších byla zjištěna senzitivita RET-translokovaných nádorů na sunitinib, sorafenib a vandetanib (186, 234, 239). Využití translokace *RET* jako prediktivního markeru u NSCLC je v současné době předmětem klinických studií (144).

## Další prognostické a prediktivní markery

Mezi další studované prognostické a prediktivní markery u NSCLC patří zejména *FGFR1* (fibroblast growth factor receptor 1) (240), *DDR2* (discoidin domain-containing receptor 2) (241) a *PIK3CA* (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) (242). Alterace všech těchto genů se častěji vyskytují u SqCLC než u AC. Amplifikace *FGFR1* je popisována u 10-22 % SqCLC (240, 243-245), mutace *DDR2* u 0,4-1 % SqCLC (241, 246) a mutace *PIK3CA* u 2-4 % SqCLC (242, 246). V současné době probíhají klinické studie testující terapeutický účinek ponatinibu (v závislosti na amplifikaci *FGFR1*) (247), dasatinibu (v závislosti na mutaci *DDR2*) (248) a PI3K inhibitorů (v závislosti na mutaci *PIK3CA*) (249).

## 2.6. Další možnosti cílené léčby karcinomu plic

Kromě mutací, které se podílejí na vzniku karcinomu plic a které mohou být potenciálním léčebným cílem, se objevují i další nové možnosti léčby. Jednou z nich je inhibice angiogeneze pomocí léků blokujících receptory pro angiogenní růstové faktory, jakým je např. nintedanib (250), nebo pomocí protilátek působících jako antagonisté receptorů růstových faktorů, jakým je např. bevacizumab nebo ramucirumab (251). Pro tuto léčbu však v současné době nejsou známy spolehlivé prediktivní markery. Další léčebnou metodou, která je v současné době v popředí zájmu, je imunoterapie. Jde o bouřlivě se rozvíjející léčebnou metodou, která u některých zhoubných nádorů, včetně karcinomu plic, zaznamenala velmi dobré terapeutické výsledky. Podmínkou dalšího rozvoje a rutinní indikace této léčby je však detailní porozumění vztahu mezi nádorem a imunitním systémem. Klíčovým poznatkem bylo rozpoznání důležitosti tzv. imunitních kontrolních bodů (immune checkpoints), což jsou receptory tlumící aktivitu cytotoxických T-lymfocytů. Pokud jsou tyto receptory exprimovány na povrchu nádorových buněk, mohou tyto buňky uniknout dohledu imunitního systému, který by je jinak rozpoznal a zničil. Jedním z principů imunoterapie je tedy inhibice těchto receptorů a obnovení protinádorové aktivity cytotoxických T-lymfocytů (252). Prvním receptorem exprimovaným T-lymfocyty, který se podařilo v rámci imunoterapie farmakologicky blokovat, např. ipilimumabem a tremelimumabem, byl CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) (253). V současné době je velká pozornost věnována dalším inhibičním receptorům, a to PD-1 a jeho ligandu PD-L1, jejichž problematika zde bude v krátkosti nastíněna i přesto, že přímo nesouvisí s tématem této práce. Vzhledem k prediktivnímu významu exprese PD-L1, která klade další požadavky na dostupnost nádorové tkáně a efektivitu diagnostického procesu, považujeme však za vhodné toto téma zde alespoň krátce zmínit.



PD-1 (Programmed cell death protein 1) a PD-L1 (Programmed death-ligand 1)

PD-1 (známý též jako CD279) je kódován genem *PDCD1*, který je lokalizován na chromozomu 2q37.3 (254). Jedná se o transmembránový receptor patřící strukturálně do imunoglobulinové rodiny, který je exprimován na povrchu T-lymfocytů, regulačních T-lymfocytů, B-lymfocytů, aktivovaných monocytů, dendritických buněk a přirozených zabíječů (natural killers) (255-257). Molekula PD-1 je tvořena extracelulární doménou IgV, transmembránovou doménou a intracelulární doménou, která obsahuje tzv. imunitní tyrosinový inhibiční motiv, jehož funkcí je – po navázání ligandu na PD-1 – utlumení aktivity buňky, resp. T-lymfocytu (258). Reakce je zprostředkována inhibiční fosfatázou SHP-2 (src homology region 2 domain-containing phosphatase-2) (259).

Dvěma ligandy PD-1 jsou PD-L1 (známý též jako CD 274 a B7-H1) a PD-L2 (známý též jako CD273 a B7-DC) (260), které sdílejí 37% sekvenční homologii (261). PD-L1 je kódován genem *CD274*, který je lokalizován na chromozomu 9p24.1 (262), zatímco PD-L2 je kódován genem *PDCD1LG2* lokalizovaným v těsné blízkosti na chromozomu 9p24.2. PD-L1 patří strukturálně do transmembránových proteinů typu I a jeho molekula sestává z extracelulární domény tvořené IgV, IgC a signální sekvencí, transmembránové domény a intracelulární domény. PD-L1 je za normálních podmínek exprimován buňkami srdečního svalu, plic, placenty a jater, kde se významně uplatňuje při navození imunitní tolerance (256). Exprese PD-L1 může být zvýšena různými prozánětlivými cytokiny, např. INF- $\gamma$  (interferon-gamma), TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha), VEGF (vascular endothelial growth factor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) a IL-10 (interleukin-10) (263). Kromě vazby s PD-1, je PD-L1 schopen také reagovat s CD80 na povrchu T-lymfocytu, a tak jiným způsobem zprostředkovat inhibiční účinek (264). Exprese PD-L1 byla zjištěna u mnoha různých typů zhoubných nádorů, např. u karcinomu plic (resp. NSCLC), prsu, ledviny, močového měchýře, žaludku a jater, u maligního melanomu, u glioblastomu a u hematologických malignit (265-272). Exprese PD-1 byla naopak zjištěna u tumor infiltrujících lymfocytů (tumor infiltrating lymphocytes (TIL)) (273, 274). Farmakologicky je možné kontrolní bod PD-1/PD-L1 blokovat buď na úrovni PD-1, např. nivolumabem, pembrolizumabem nebo pidilizumabem, nebo na úrovni PD-L1, např. atezolizumabem, avelumabem nebo durvalumabem (252).

V době psaní této dizertace (leden 2017) není ještě zcela dořešena problematika rutinního testování prediktivního markeru kontrolního bodu PD-1/PD-L1. Zatímco pro indikaci inhibitorů PD-1/PD-L1 u karcinomu ledviny a maligního melanomu není testování prediktivního markeru v nádorové tkáni vyžadováno, u karcinomu plic, resp. NSCLC, je tomu naopak (275). Zatím jediným obecně přijatým prediktivním markerem kontrolního bodu PD-1/PD-L1 je exprese PD-L1 v nádorové tkáni zjištěná pomocí imunohistochemie. Situaci však komplikuje skutečnost, že v klinických studiích testujících účinnost léčby inhibitory PD-1/PD-L1 u NSCLC byly jednak použity různé klony protilátky proti PD-L1 (např. 28-8, 22C3, SP142), a jednak byla různě definována pozitivita exprese PD-L1 nádorovými buňkami (např.  $\geq 1\%$ ,  $\geq 5\%$ ,  $\geq 10\%$ ,  $\geq 50\%$ ). V některých studiích byla hodnocena pouze membránová exprese, v jiných membránová i cytoplazmatická. Hodnocení exprese PD-L1 v praxi rovněž komplikuje skutečnost, že tento marker není exprimován pouze nádorovými buňkami, ale také nenádorovými elementy, např. alveolárními makrofágy (276). Na základě dosavadních zkušeností byl v současné době přijat pro testování PD-L1 konsenzus dohodnutý na konferenci Mutation Day konané 2.12.2016, ve kterém je stanoveno, že exprese PD-L1 se vyšetřuje u všech histologických typů NSCLC pouze na vyžádání klinického lékaře a že pro indikaci terapie léčivými přípravky dostupnými v současnosti (nivolumab, pembrolizumab) není nezbytně nutné používat klony protilátek dle původních studií. V obou případech lze tedy použít jak klon 22C3, tak klon 28-8. (www2).

## 2.7. Charakteristika genu *ALK* a problematika jeho detekce u karcinomu plic

Gen *ALK* je lokalizován na krátkém raménku 2. chromozomu (2p23.2-p23.1) a kóduje *ALK* protein (známý též jako *ALK* tyrozin kinázový receptor nebo CD246), který patří do rodiny inzulinových receptorů. Tento protein obsahuje extracelulární doménu, hydrofobní úsek odpovídající transmembránové oblasti a intracelulární kinázovou doménu. *ALK* je přechodně exprimován v určitých oblastech centrálního a periferního nervového systému a hraje důležitou roli při vzniku a diferenciaci nervového systému. Přenáší signály ligandu na buněčném povrchu prostřednictvím specifické aktivace protein kinázy aktivované mitogenem (MAPK), jejímž prostřednictvím podporuje proliferaci a uplatňuje antiapoptotický účinek na nervové buňky (Lancet D., Safran M., Rosen N. et al.: GeneCards [online]. Weizmann Institute of Science, [1996], [cit. 2016-19-12]. Dostupný z URL: [http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id\\_type=hgnc&id=427](http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id_type=hgnc&id=427). Verze 4.3.3 [2016] (www3)).

Nejčastější změnou genu *ALK* u různých druhů nádorů jsou chromozomální přestavby, což má za následek vytvoření více typů fúzních genů, např. *ALK* (chromozom 2) / *EML4* (echinoderm microtubule associated protein like 4) (chromozom 2), *ALK* / *RANBP2* (RAN binding protein 2) (chromozom 2), *ALK* / *ATIC* (5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase) (chromozom 2), *ALK* / *TFG* (TRK-fused gene) (chromozom 3), *ALK* / *NPM1* (nucleophosmin 1) (chromozom 5), *ALK* / *SQSTM1* (sequestosome 1) (chromozom 5), *ALK* / *KIF5B* (chromozom 10), *ALK* / *CLTC* (clathrin heavy chain) (chromozom 17), *ALK* / *TPM4* (tropomyosin 4) (chromozom 19), a *ALK* / *MSN* (moesin) (chromozom X)(www3). Další popsanou alterací genu *ALK* je amplifikace, která bývá pozorována např. u neuroblastomu (277) či karcinomu plic a jejíž prognostický a/nebo prediktivní význam zůstává zatím nejasný (278).

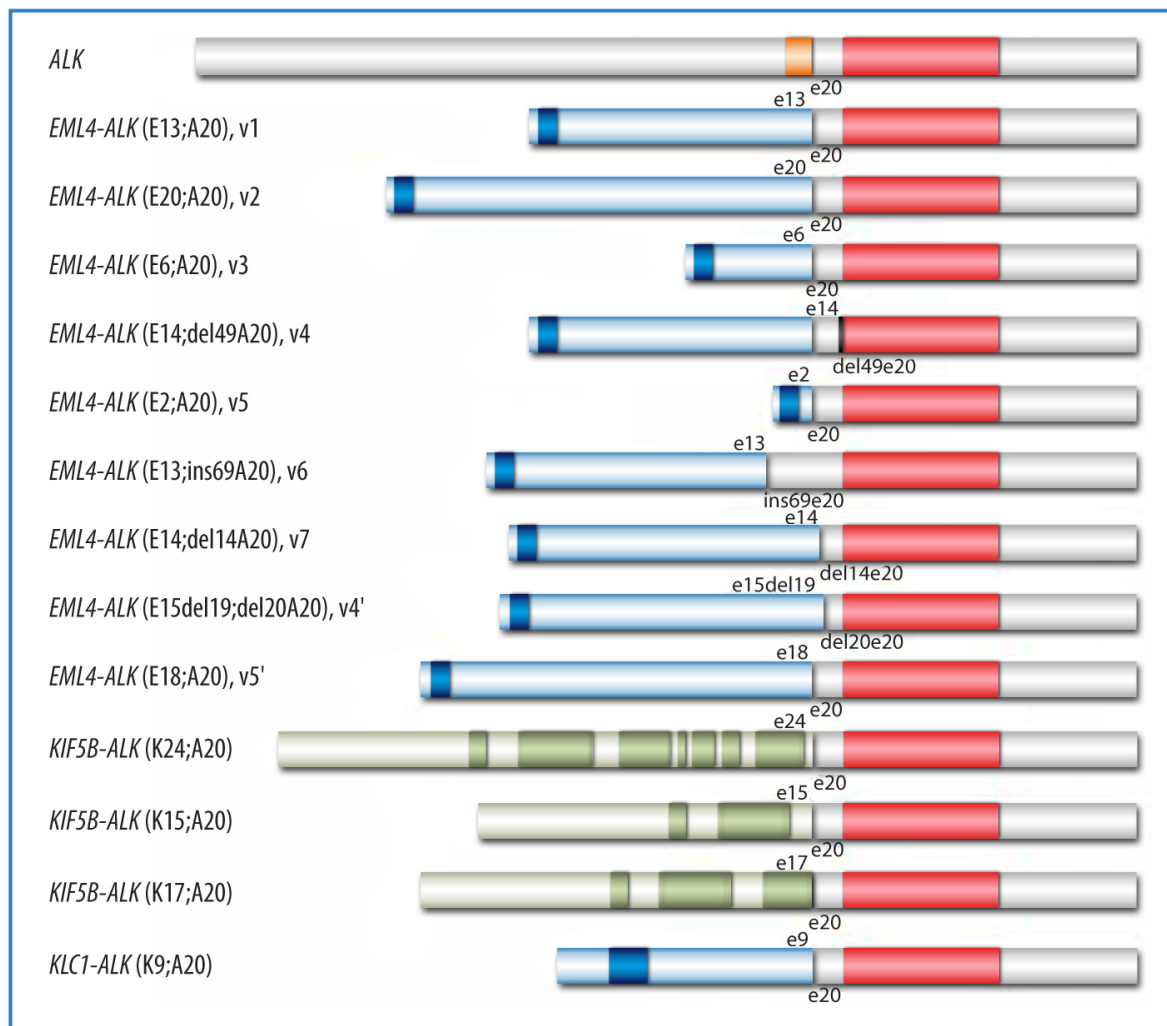
Patologický význam genu *ALK* byl vůbec poprvé rozpoznán u anaplastického velkobuněčného lymfomu (ALCL), který byl popsán roku 1985 (279) a u kterého byla čtyři roky poté zjištěna translokace t(2;5)(p23;q35), specifická právě pro tento tumor (280). V roce 1994 bylo následně prokázáno, že tato translokace má za následek spojení části genu *NPM1* z chromozómu 5 s částí genu *ALK* z 2. chromozómu za vzniku jedinečného chimérického NPM-*ALK* proteinu (281). V návaznosti na toto

zjištění byly vyvinuty protilátky specifické pro ALK kinázu (282, 283); nepřítomnost exprese této molekuly u normálních lymfoidních buněk v té době znamenala, že pozitivní reakce proti ALK proteinu je v podstatě specifická pro t(2;5)(p23;q35). Důležitou výjimku představoval vzácný velkobuněčný B-lymfom, ve kterém je ALK protein syntetizován v celé délce (284). Dalším výzkumem však bylo zjištěno, že přestavba nebo zvýšená exprese genu *ALK* se podílí na vzniku celé řady dalších tumorů, mezi něž patří např. familiární forma neuroblastomu (285), inflamatorní myofibroblastický tumor (286), glioblastoma multiforme (287), inflamatorní karcinom prsu (288), karcinomy ledviny (vznikající u dospělých (289) i u dětí (290)), dlaždicobuněčný karcinom jícnu (291), AC tlustého střeva (292) nebo anaplastický karcinom štítné žlázy (293). Také u malé podskupiny AC plic je jejich karcinogeneze navozena fúzí genu *ALK* s některým z dalších partnerů (nejčastěji *EML4*, méně často *KIF5B*, *CDHR2* (cadherin-related family member 2), *TFG*, *DCTN1* (podjednotka 1 dynactinu), *SQSTM1*, *TPR* (translocated promoter region), *HIP1* (huntingtin interacting protein 1)) (294-299). Přestavba zahrnující gen *ALK* u nádorů plic byla poprvé popsána v roce 2007 (294) a již za pouhé 3 roky poté byla zveřejněna první studie popisující úspěšnou léčbu těchto nádorů crizotinibem, což je inhibitor ALK, c-MET a ROS1 (300-303). Tento výsledek byl následně potvrzen několika dalšími rozsáhlými studiemi, které prokázaly, že pacienti s přestavbou genu *ALK*, kteří jsou léčeni crizotinibem, mají výrazně lepší prognózu (304-309). Ve studiích I/II fáze byl crizotinib spojen s mírou objektivní odpovědi 61 % a mediánem přežití bez progresu 9,7 měsíce (305). Ještě působivějších výsledků pak bylo dosaženo v randomizované studii fáze III (PROFILE 1007), ve které byl crizotinib porovnáván s chemoterapií u pacientů, u kterých došlo k progresi onemocnění v průběhu standardní chemoterapie. Léčba crizotinibem byla spojena s mírou objektivní odpovědi 65 % (ve srovnání s mírou 20 % u chemoterapie) a s mediánem přežití bez progresu 7,7 měsíce (ve srovnání s 3,0 měsíce u chemoterapie) (307). V současné době lze v léčbě karcinomu plic s přestavbou genu *ALK* kromě crizotinibu použít také novější ALK inhibitory, kterými jsou ceritinib, alectinib, brigatinib a lorlatinib (310).

Vzhledem k tomu, že přestavba genu *ALK* je popisována dle současně platné WHO klasifikace u 4 – 5 % NSCLC (1), je nezbytně nutné najít optimální způsob výběru pacientů vhodných pro tuto cílenou léčbu v rutinní diagnostické praxi. Jelikož genetické přestavby zahrnují velké chromozomální inverze a translokace (jak ukazuje

schéma 2), je FISH metodou volby pro zachycení všech přestaveb zahrnujících gen *ALK* a detekce pomocí zlomových sond se stala „zlatým standardem“ (311).

**Schéma 2:** Nemutovaný gen *ALK* a různé typy jeho fúze u plicních karcinomů. Tmavě modré oblasti u fúzních partnerů představují coiled-coil domény, oranžová u genu *ALK* transmembránovou doménu a červené kinázovou doménu (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of *ALK* Testing in Lung Cancer, 2013 (311) ).

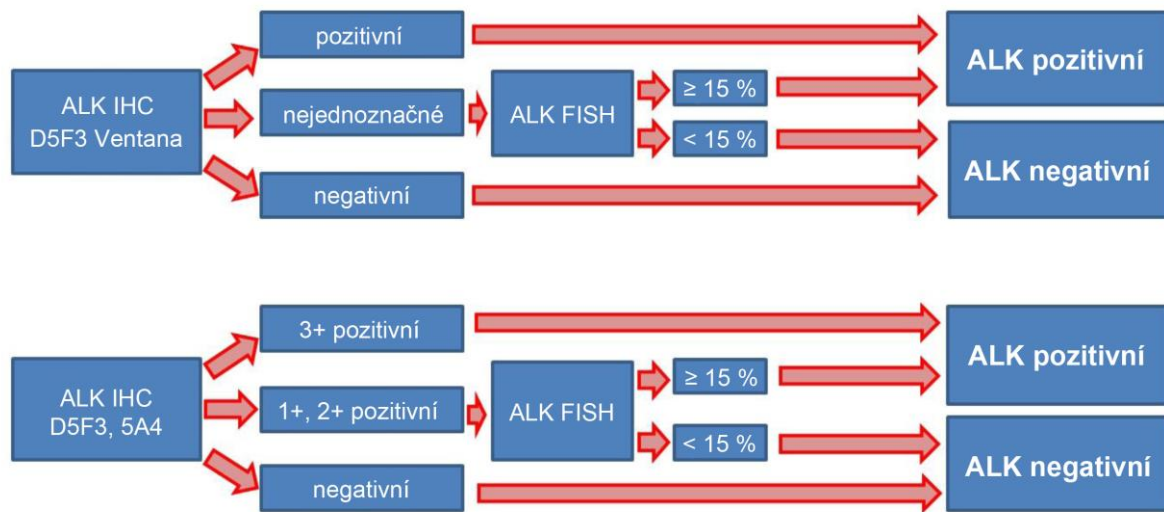


Ještě donedávna byla léčba crizotinibem indikována pouze u NSCLC s přestavbou genu *ALK* potvrzenou fluorescenční in situ hybridizací (FISH) (312). Toto vyšetření je však možné pouze ve specializovaných laboratořích a není široce dostupné a je také poměrně nákladné. Jeho výtěžnost je navíc velmi komplikována skutečností, že většina nádorů je diagnostikována v pozdním stádiu, kdy chirurgická léčba již není indikována, a tak jedinou tkání, která je použitelná k testování jsou endobronchiální a transtorakální biopsie a cytobloky s velmi omezeným množstvím nádorové tkáně. Tato

tkáň se navíc nepoužívá pouze pro mikroskopickou diagnostiku (založenou na rutinním barvení hematoxylinem-eozinem a na IHC vyšetření exprese markerů dlaždicobuněčné či žlázné diferenciace), ale také na další molekulární testování prediktivních markerů, zejména na detekci mutací genu *EGFR* (313, 314).

Výše zmíněné skutečnosti mohou potenciálně vést k omezení dostupnosti testování a následně k omezení léčby ALK inhibitory. K odstranění těchto problémů vede alternativní dvoustupňové testování se skrínigovým vyhledáváním potenciálně pozitivních nádorů pomocí IHC, následované potvrzením pozitivních případů metodou FISH. Tento přístup se již s úspěchem využívá v rutinní diagnostice prognostických a prediktivních genetických změn, např. amplifikace genu *HER2* u karcinomu prsu a žaludku (315, 316). Dvoustupňový způsob detekce vede ke zvýšené dostupnosti testování, jelikož IHC je standardně prováděna ve většině laboratoří patologie. Daný postup navíc výrazně snižuje náklady na testování, protože metodou FISH jsou ověřovány pouze případy „vytipované“ pomocí IHC. Vzhledem k poměrně nízkému výskytu přestavby genu *ALK* u NSCLC by byl dvoustupňový způsob detekce velmi vhodný i v tomto případě, a proto se tímto směrem vydala řada výzkumů (15, 317, 318), včetně naší práce, která byla v regionálních podmínkách prvním takovým badatelským počinem. Výsledky retrospektivní části naší studie, stejně jako řady jiných studií (tab. 16), potvrdily vhodnost IHC detekce jako skrínigové metody vyhledávání NSCLC s přestavbou genu *ALK* a vedly k zavedení dvoustupňového testování s definitivním potvrzením vybraných případů metodou FISH (311). V dalších studiích, které se věnovaly konkordanci IHC a FISH (319) byla pozorována prakticky ve všech případech 100 % senzitivita, stejně tak jako v naší studii, což vedlo k dalšímu posunu diagnostického algoritmu do současné podoby, která je v ČR platná od února 2016 a která stanovuje, že pro indikaci léčby ALK inhibitory stačí potvrzení ALK positivity pouze jednou z metod, tj. FISH nebo validovanou IHC, jak ukazuje schéma 3 (www2) (320).

**Schéma 3:** Vyšetřovací postup k záchytu případů NSCLC s translokací zahrnující gen *ALK* (převzato a upraveno z [www2](#))



Klíčovým aspektem celého diagnostického algoritmu nicméně zůstává volba vhodné protilátky, která bude v daných podmínkách (přístrojové vybavení laboratoře, používaný detekční systém) mít dostatečně vysokou senzitivitu a specifitu detekce ALK proteinu u NSCLC, což je nutno individuálně nastavit na každém pracovišti. V době zahájení našeho projektu (polovina roku 2013) bylo již z řady studií známo (viz tabulka 5), že široce rozšířený klon ALK1 (Dako, Dánsko), který je běžně využíván k detekci exprese ALK proteinu v hematopatologii (zejména u ALCL), není vhodný pro zjišťování exprese tohoto markeru u NSCLC, protože vykazuje nízkou senzitivitu (321) a že vhodnějšími kandidáty jsou klony 5A4 a D5F3, které vykazují spolehlivější výsledky i při použití různých detekčních systémů (311), (tab. 5).

**Tab. 5:** Porovnání klonů protilátek používaných při IHC detekci proteinu ALK u NSCLC (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2013 (311) ).

studie	počet vzorků (% ALK+)	klon protilátky	detekční/amplifikační systém	skóre	standard	IHC senzitivita vs. standard	IHC specifická vs. standard
Takeuchi et al., 2009	21 (52%)	5A4	IEP	0 vs. +	RT-PCR	100%	100%
		5A4	EnVision+			27%	100%
		ALK1	iAEP			100%	100%
		ALK1	EnVision+			9%	100%
		SP8	iAEP			20%	100%
		SP8	EnVision+			100%	18%
Rodig et al., 2010	239 (4%)	ALK1	EnVision+	0 vs. +	FISH	40%	100%
		ALK1	Amplifikace tyramidu			80%	100%
Mino-Kenudson et al., 2010	37 (59%)	ALK1	EnVision+	Pozitivní >2,7	FISH	67%	97%
		D5F3				100%	99%
Murakami et al., 2011	361 <sup>a</sup> (5%)	ALK1	ABC	0 vs. +	RT-PCR/ FISH	81%	100%
		5A4	EnVision FLEX+			100%	100%
Conklin et al., 2013	377 (3%)	5A4	iAEP	0, 1+, 2+ či 3+	FISH	100%	62,5%
		ALK1	EnVision FLEX+			66%	100%
		ALK1	ADVANCE			60%	87,5%
		5A4	ADVANCE			100%	87,5%
		D5F3	ADVANCE			100%	75%
Selinger et al., 2013	594 (11%)	ALK1	EnVision FLEX+	0, 1+, 2+ či 3+	FISH	100%	99%
		5A4	UltraView a UltraView amplifikace			100%	98%
		D5F3	OptiView a OptiView amplifikace			100%	99%

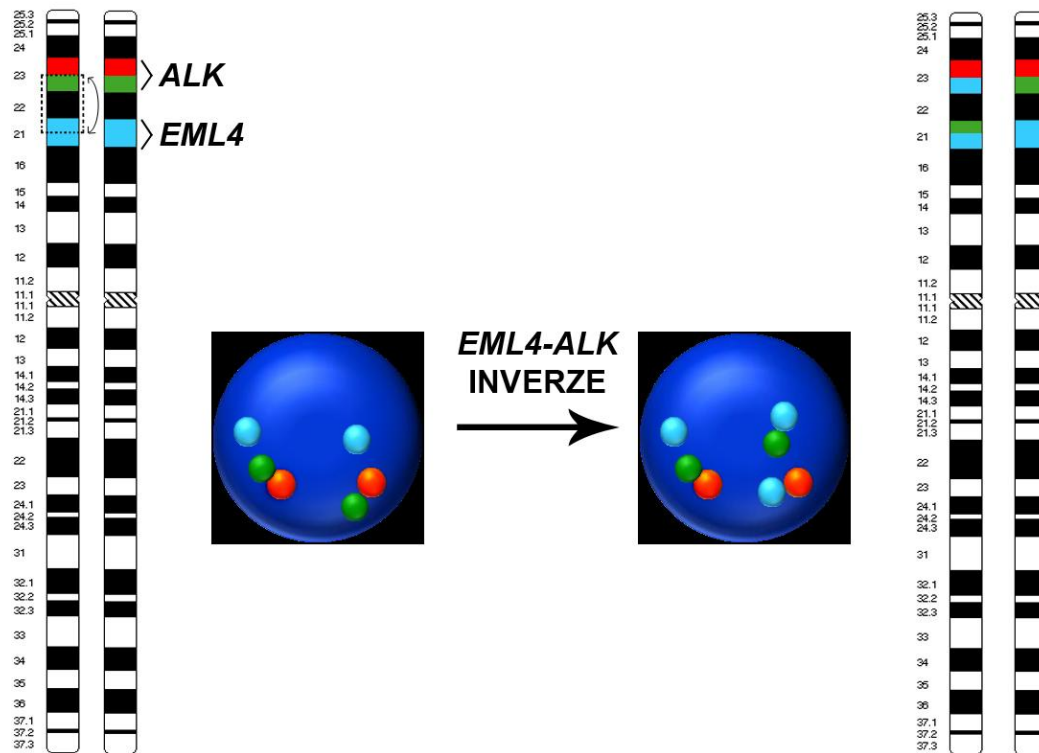
<sup>a</sup>Počet vzorků pro testování s klonem protilátky D5F3 byl 356. EnVision, EnVision FLEX+ a ADVANCE jsou produkty firmy Dako. UltraView (Universal DAB Detection Kit), OptiView (DAB IHC Detection Kit) amplifikační kity jsou produkty firmy Ventana Medical Systems, Inc. ABC = avidin biotin complex



Proto byly do naší studie vybrány klony 5A4 (Novocastra, Newcastle, UK) a D5F3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), které byly nejčastěji používány v tehdy publikovaných studiích. Dále byla do studie ještě zařazena polyklonální protilátka ZAL4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), která vyžaduje stejnou přípravu tkáně na IHC detekci jako námi zvolený klon D5F3 a umožňuje tak vytvoření „kombinované“ protilátky, která by teoreticky měla mít stejnou či ještě vyšší senzitivitu než samotný klon D5F3. Klon D5F3 od firmy Ventana (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) nebyl do studie zařazen i přesto, že detekce antigenu byla provedena na přístroji stejného výrobce a to z důvodu, že tento klon nebyl v dané době (2013) schválen pro použití na daném typu automatu (VENTANA BenchMark ULTRA).

K průkazu přestavby genu *ALK* lze využít metody FISH, PCR s reverzní transkripcí (RT-PCR) a/nebo masivně paralelní sekvenování (next-generation sequencing – NGS) (319). K potvrzení a definitivnímu určení *ALK* statusu metodou FISH byla na našem pracovišti zvolena sonda ZytoLight SPEC *ALK/EML4* TriCheck Probe (Zytovision, Bremerhaven, Německo) a detekční systém ZytoLight FISH-Tissue Implementation Kit (Zytovision) (bližší popis viz kapitola 4), jelikož v případě nejčastěji se vyskytující přestavby (inverze *EML4-ALK*), u které vzniká diagnostické úskalí v podobě malé vzdálenosti oddělených signálů, tato sonda umožňuje problém vyřešit současnou detekcí nadpočetného signálu, který vznikne zlomem genu *EML4* (viz schéma 4). To je výhoda oproti „klasickým“ zlomovým sondám, jakou je např. první komerční sonda vyvinutá k detekci přestavby genu *ALK* - Vysis *ALK* break-apart Probe (Abbott Molecular, Des Plaines, IL, USA), u kterých tato možnost chybí (322).

**Schéma 4:** Znázornění rozložení signálů genů *ALK* a *EML4* na 2. chromozomu a v jádře nádorové buňky bez přestavby (levá část) a s inverzí *EML4-ALK* (pravá část)



červený (oranžový) signál = telomerická část genu *ALK* s tyrozinkinázovou aktivitou,  
 zelený signál = intersticiální (centromerická) část genu *ALK* (neaktivní), modrý  
 signál/modré signály = gen *EML4* (respektive po inverzi dvě jeho rozlomené části)

### 3. Cíle disertační práce

1) V retrospektivní studii archivních případů AC plic:

- a) nalézt alespoň jeden IHC postup detekce proteinu ALK, který bude mít dostatečnou senzitivitu a specificitu, aby jej bylo možné použít jako skriningové metody při vyhledávání NSCLC pro následné testování přestavby genu *ALK* metodou FISH,
- b) analyzovat diagnostickou výtěžnost nádorové tkáně pro vyšetření přestavby genu *ALK* metodou FISH u „malých“ biopsií (endobronchiální a transtorakální biopsie, cytobloky),
- c) testovat homogenitu ALK statusu v nádorové tkáni a zjistit tak míru rizika chyby odběru při diagnostikování „malých“ biopsií.

2) V prospektivní studii případů NSCLC plic:

- a) provést IHC testování exprese proteinu ALK pomocí metodiky vybrané na základě výsledků retrospektivní studie v rámci rutinní diagnostiky NSCLC,
- b) korelovat výsledky ALK statusu karcinomu plic u české populace s údaji ze zahraničních studií.

## 4. Materiál a metodika

### 4.1. Retrospektivní část studie

#### 4.1.1. Charakteristika souboru

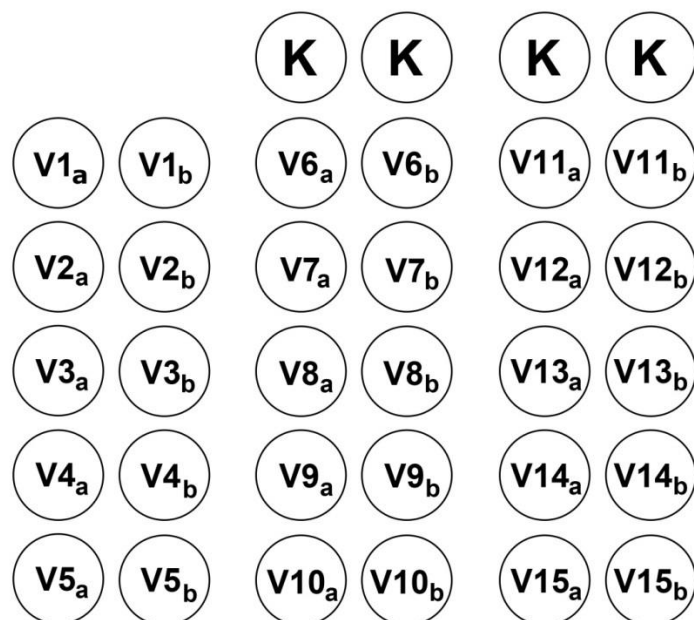
V retrospektivní části studie byl sestaven soubor 170 případů primárních AC plic (diagnóza potvrzena pozitivním IHC průkazem TTF1) konsekutivně diagnostikovaných v období 1. 1. 2009 - 31. 12. 2012 na Fingerlandově ústavu patologie (FÚP), Fakultní nemocnice Hradec Králové (119 případů) a na Oddělení patologie a molekulární medicíny Thomayerovy nemocnice v Praze (51 případů).

Z tohoto souboru byly vyřazeny případy, u kterých byla prokázána mutace genu *EGFR*, protože podle současných znalostí je současná přítomnost mutace *EGFR* a přestavby genu *ALK* u AC plic extrémně vzácná (323) a prakticky se vzájemně vylučují (tzv. exkluzivní mutace) (324). U každého případu byly zaznamenány pohlaví a věk pacienta, typ karcinomu / podtyp AC a případná nápadná hlenotvorba patrná již v základním HE barvení ve více než 10 % nádorové tkáni. Takto vybraný soubor nádorů byl zpracován metodou složeného tkáňového bloku (tissue microarray - TMA), která umožňuje spojením více vzorků tkáni odebraných z různých nádorů (tj. od více nemocných) do jednoho bloku vyšetřit více případů současně při použití primární protilátky a detekčních reagensů potřebných pouze pro jedno sklo, čímž se významně snižují náklady na vyšetření.

#### 4.1.2. Tissue microarray

Pomocí kovové jehly o vnitřním průměru 1,7 mm byly u každého případu vyvrtány z náhodných míst nádoru 2 válečky tkáni, které byly pomocí této jehly přeneseny a vsazeny do předpřipraveného (předvrtaného) parafinového bločku, jak názorně ukazuje schéma 5 a obr. 3 v kapitole 10. Jako negativní kontrola byly použity vzorky zdravé jaterní tkáni získané z běžného bioptického provozu. Dva vzorky z každého případu byly použity za účelem posouzení případné tkáňové heterogenity přestavby genu *ALK*, resp. exprese *ALK* proteinu.

Schéma 5: Rozložení tkáňových vzorků ve složeném bloku vyrobeném metodou TMA.



K = kontrolní tkáň (játra), VX<sub>a</sub>/VX<sub>b</sub> = vzorky ze dvou různých míst jednoho nádoru

#### 4.1.3. Imunohistochemické vyšetření

Z každého ze složených bloků byly ukrojeny 4 sériové řezy o tloušťce 2  $\mu$ m a usušeny v laboratoři při pokojové teplotě po dobu nejméně jedné hodiny. Následně byl vždy jeden z řezů obarven standardní HE technikou. Na zbylých třech řezech byla provedena detekce zvolených primárních protilátek proti ALK proteinu (podrobný postup rozepsán v tabulkách 6, 7 a 8) v přístroji VENTANA BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, USA) s použitím detekčního kitu OptiView DAB IHC Detection Kit (Ventana Medical Systems). Jako chromogen byl ve všech případech použit diaminobenzidin (DAB).

**Tab. 6:** Popis IHC vyšetření zvolenou primární protilátkou (varianta 1)

<b>Primární protilátka:</b>	
<b>Klon D5F3 – ředění 1:100 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)</b>	
<b>Proces:</b>	<b>čas</b>
1. Zahřívání skel na 60°C + inkubace	4 min
2. Zahřívání skel na 72°C	
3. Zahřívání skel na 100°C, aplikace kondicionéru CC1 + inkubace	40 min
4. Ochlazení skel na 37°C	
5. Ruční přidání primární protilátky + inkubace	40 min
6. Zakrytí, jedna kapka OV HQ UNIV LINKR + inkubace	12 min
7. Zakrytí, jedna kapka OV HRP MULTIMER + inkubace	12 min
8. Aplikace jedné kapky HEMATOXYLIN II, zakrytí + inkubace	4 min
9. Aplikace jedné kapky BLUING REAGENT, zakrytí + inkubace	4 min

**Tab. 7:** Popis IHC vyšetření zvolenou primární protilátkou (varianta 2)

<b>Primární protilátka:</b>	
<b>„Kombinovaná“ protilátka vzniklá spojením klonu D5F3 - ředění 1:100 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a polyklonální protilátky ZAL4 - ředění 1:750 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)</b>	
<b>Proces:</b>	<b>čas</b>
1. Zahřívání skel na 60°C + inkubace	4 min
2. Zahřívání skel na 72°C	
3. Zahřívání skel na 100°C, aplikace kondicionéru CC1 + inkubace	32 min
4. Ochlazení skel na 37°C	
5. Ruční přidání primární protilátky + inkubace	32 min
6. Zakrytí, jedna kapka OV HQ UNIV LINKR + inkubace	12 min
7. Zakrytí, jedna kapka OV HRP MULTIMER + inkubace	12 min
8. Aplikace jedné kapky HEMATOXYLIN II, zakrytí + inkubace	4 min
9. Aplikace jedné kapky BLUING REAGENT, zakrytí + inkubace	4 min

**Tab. 8:** Popis IHC vyšetření zvolenou primární protilátkou (varianta 3)

<b>Primární protilátka:</b>	
<b>Klon 5A4 – ředění 1:20 (Novocastra, Newcastle, UK)</b>	
<b>Proces:</b>	<b>čas</b>
1. Zahřívání skel na 60°C + inkubace	4 min
2. Zahřívání skel na 72°C	
3. Zahřívání skel na 100°C, aplikace kondicionéru CC1 + inkubace	48 min
4. Ochlazení skel na 37°C	
5. Ruční přidání primární protilátky + inkubace	56 min
6. Zakrytí, jedna kapka OV HQ UNIV LINKR + inkubace	12 min
7. Zakrytí, jedna kapka OV HRP MULTIMER + inkubace	12 min
8. Aplikace jedné kapky HEMATOXYLIN II, zakrytí + inkubace	4 min
9. Aplikace jedné kapky BLUING REAGENT, zakrytí + inkubace	4 min

Výsledek imunohistochemické exprese proteinu ALK byl nezávisle a bez znalosti výsledku FISH vyšetření přestavby genu *ALK* posuzován dvěma hodnotiteli (TR, AR) semikvantitativní metodou následovně: 0 – negativní, 1 – slabá pozitivita patrná pouze při velkém zvětšení 400x, 1-2 – slabá pozitivita patrná při středním zvětšení 100x, 2 – slabá pozitivita patrná již při malém zvětšení 40x, 2-3 – středně silná pozitivita patrná již při malém zvětšení 40x, 3 – silná pozitivita patrná již při malém zvětšení 40x (obr. 4 až 10 v kapitole 10). Výsledky IHC vyšetření byly poté porovnány se „zlatým standardem“ FISH vyšetření a byla spočítána senzitivita a specifita u jednotlivých variant. Optimální IHC varianta byla následně aplikována v rutinním vyšetřování pacientů s NSCLC od 1. 1. 2014 v rámci prospektivní části studie.

#### 4.1.4. FISH vyšetření

Pro FISH vyšetření byly zhotoveny řezy podle následujícího postupu uvedeného v tabulce 9.

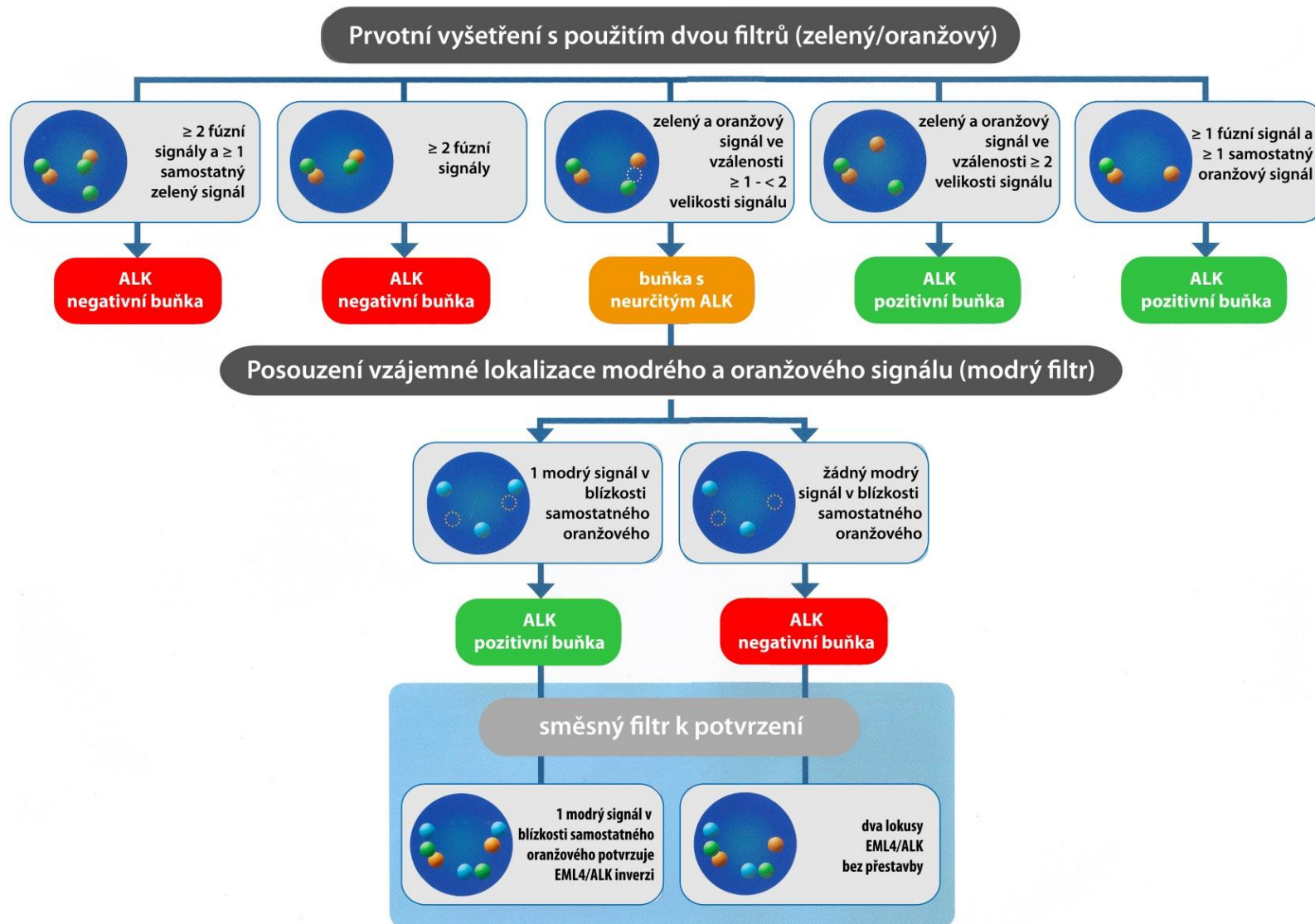
Tab. 9: Popis FISH vyšetření

FISH sonda:	
ZytoLight <sup>®</sup> SPEC ALK/EML4 TriCheck <sup>™</sup> Probe (Zytovision, Bremerhaven, Německo)	
Proces:	čas
<b>A. Zhotovení řezů</b>	
1. parafínové řezy o tloušťce 2μm připravené na pozitivně nabitém skle (skla dodávaná komerčně) - inkubace v termostatu při 60°C	2 h
<b>B. Odparafinování</b>	
2. zahřátí vzorků na vyhřívané plotně hybridizéru při 70°C	10 min
3. 2x xylén (vždy nový)	po 10 min
4. čistý alkohol 2x 100%, 90%, 70%	po 5 min
5. destilovaná H <sub>2</sub> O 2x	po 2 min
<b>C. Předpříprava preparátů</b>	
6. inkubace v citrátovém pufru (PT 1) při 98°C	15 min
7. destilovaná H <sub>2</sub> O 2x	2 min
8. vysušení na vzduchu	
9. aplikace pepsinu na preparáty ve vlhké komůrce při 37°C	5 min
10. promytí SSC pufrem (WB 1)	5 min
11. destilovaná H <sub>2</sub> O	1 min
12. dehydratace 70%, 90%, 100% čistým alkoholem	po 1 min
13. okapání a vysušení na vzduchu	
<b>D. Hybridizace (v zatemněné místnosti)</b>	
14. aplikace sondy 10 μl	
15. přiložení krycího skla	
16. oblepení (lepidlem Chemopren)	
17. denaturace při 75°C v hybridizéru	10 min
18. vychladnutí skel při pokojové teplotě	
19. hybridizace při 37°C	přes noc
20. vyjmutí skel z hybridizéru, mechanické odstranění lepidla, odstranění krycího skla namočením do pufru A (WB 2) předem zahřátého na 37°C	1-3 min
21. promytí v pufru A (WB 2) při 37°C 2x	po 5 min
22. dehydratace 70%, 90%, 100% čistým alkoholem	po 1 min
23. vysušení na vzduchu	
<b>E. Detekce</b>	
24. aplikace DAPI 30 μl	
25. přiložení krycího skla	
26. inkubace ve tmě	15 min
27. odsátí přebytečné DAPI kolem krycího skla filtračním papírem	



Každý preparát byl hodnocen na fluorescenčním mikroskopu Nikon Eclipse 80i s použitím 100x objektivu a směsného a samostatných filtrů (ZyBlue/ZyGreen/ZyOrange; ZyBlue; ZyGreen; ZyOrange). Pozitivně byly hodnoceny buňky s přestavbou genu *ALK* (nejčastěji inverze na 2. chromozomu s genem *EML4*, méně často translokace genu *ALK* s jiným fúzním partnerem z jiného chromozomu), která je dle doporučení výrobce pro hodnocení charakterizována jako oddělený červený a zelený signál, mezi nimiž je vzdálenost minimálně 2x větší než je průměr největšího signálu a/nebo oddělený červený a zelený signál s jakoukoliv vzdáleností a zároveň s přítomností nadpočetného modrého signálu (obr. 12 v kapitole 10). Druhým pozitivně hodnoceným nálezem byla delece intersticiální části genu *ALK*, která je charakterizována přítomností nadpočetného červeného signálu (chybění zeleného signálu), současně s přítomností nadpočetného modrého signálu (obr. 13 v kapitole 10). Obě výše zmíněné varianty jsou přehledně vyobrazeny na schématu č. 6. Ostatní početní a poziční varianty signálů byly hodnoceny jako negativní. U každého případu bylo nejprve zhodnoceno 50 nádorových buněk, a pokud bylo přítomno 20 a více pozitivně hodnocených buněk, byl případ celkově hodnocen jako *ALK* FISH pozitivní. V ostatních situacích bylo zhodnoceno dalších 50 buněk a případ byl považován za *ALK* FISH-pozitivní, pokud bylo  $\geq 15$  % nádorových buněk hodnoceno jako pozitivní.

Schéma 6: Výrobce doporučený postup interpretace signálu pro sondu ZytoLight® SPEC ALK/EML4 TriCheck™ Probe (Zytovision, Bremerhaven, Německo)



## 4.2. *Prospektivní část studie*

V prospektivní části studie byly primární plicní karcinomy bezvýběrově diagnostikovány v resekátech i „malých“ biopsiích v období 1. 1. 2014 – 31. 5. 2016 na FÚP jako AC, NSCLC - spíše AC a NSCLC - NOS, nejprve testovány IHC variantou 3 (klon 5A4) do 27. 11. 2015, kdy došlo ze strany výrobce k ukončení dodávek protilátky. Po tomto datu pokračovalo testování IHC variantou 1 (klon D5F3), která měla v retrospektivní části srovnatelnou senzitivitu a specifitu. K dalšímu vyšetřování metodou FISH (sonda ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe) pak byly vybrány případy, u kterých byla zjištěna jakákoli intenzita exprese ALK při IHC vyšetření (1+ a více) a také IHC negativní případy (0+), které dle epidemiologických a morfoloických charakteristik statisticky signifikantně častěji vykazují ALK přestavbu, tj. acinární a invazivní mucinózní typy a AC s prokázanou hlenotvorbou (obr. 1 a 2, kapitola 10), nádory u „mladších“ pacientů (do 50 let) a zároveň nekuřáků (1). U každého případu byly zaznamenány pohlaví a věk pacienta a podtyp AC, případně nápadná hlenotvorba patrná již v základním HE barvení ve více než 10 % nádorové tkáni. Následně byla opět stanovena senzitivita a specifita IHC vyšetření v porovnání s výsledkem FISH. Paralelně s vyšetřením stavu ALK byly prospektivní případy testovány na mutaci genu *EGFR* (včetně vyšetření cytologických případů, u kterých se testování ALK neprovádělo).

## 4.3. *Statistické zpracování dat*

Ke statistickému zhodnocení byl použit program NCSS 8 (NCSS, Keyville, Utah, USA). Pro základní statistický popis souboru byla použita deskriptivní statistika. K analýze distribuce dat byl použit omnibus test normality. Pro porovnání jednotlivých skupin byl použit Fischerův přesný test, nepárový dvouvýběrový T-test a chí-kvadrát test. Za statisticky významnou byla považována hladina významnosti  $p < 0,05$ .

## 5. Výsledky

### 5.1. Retrospektivní část studie

#### 5.1.1. Deskriptivní charakteristiky souboru

V retrospektivní části studie bylo celkem vyšetřeno 170 případů. V souboru bylo 123 resekátů a 47 „malých“ biopsií. IHC detekce variantou 1 nebyla provedena u souboru malých biopsií pro úbytek tkáně předchozími vyšetřeními.

#### 5.1.2. Expres ALK IHC a výsledky FISH vyšetření v retrospektivní části

**Tab. 10:** ALK-negativní případy - retrospektivní část (n = 162)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	intenzita IHC 1. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 2. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 3. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	% FISH pozit. buněk
1	M	64	R	S		0/0	0/0	1/1	0
2	Ž	62	R	S/L		0/0	1/1	0/0	3
3	Ž	71	R	L		0/0	0/0	0/0	4
4	M	62	R	S/L		0/0	0/0	0/0	0
5	Ž	71	R	L/MU	+	0/0	0/0	0/0	N
6	M	59	R	S/L		0/0	0/0	0/0	0
7	M	54	R	P		0/0	0/0	0/0	2
8	M	70	R	A		3/3	3/3	3/3	4 amplif.
9	M	61	R	P		0/0	0/0	0/0	0
10	M	64	R	S		0/0	0/0	0/0	N
11	Ž	70	R	L		0/0	0/0	0/0	7
12	Ž	73	R	AC+sark		0/0	0/0	0/0	8
13	M	60	R	S		0/0	0/0	0/0	2
14	Ž	53	R	S		1/1	0/0	0/0	0
15	M	53	R	L/P		0/0	0/0	0/0	3
16	M	54	R	L		0/0	0/0	0/0	0
17	Ž	73	R	S		0/0	0/0	0/0	N
18	M	61	R	L		0/0	0/0	0/0	2

**Tab. 10:** ALK-negativní případy - retrospektivní část (n = 162) (pokračování)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	intenzita IHC 1. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 2. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 3. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	% FISH pozit. buněk
19	M	70	R	S		0/0	0/0	0/0	4
20	Ž	64	R	L		1/1	1/1	0/0	3
21	M	69	R	S		0/0	0/0	0/0	8
22	M	60	R	S		0/0	0/0	0/0	0
23	M	69	R	S		0/0	0/0	0/0	1
24	Ž	56	R	S		0/0	0/0	0/0	2
25	M	68	R	L	+	0/0	0/0	0/0	4
26	Ž	51	R	S/P		0/0	0/0	0/0	0
27	M	77	R	S/A/P		0/0	1/1	0/0	1
28	Ž	63	R	S		0/0	0/0	0/0	4
29	Ž	74	R	S		0/0	0/0	0/0	6
30	M	59	R	S/P		0/0	0/0	0/0	0
31	M	56	R	S		0/0	0/0	0/0	2
32	M	57	R	S		0/0	0/0	0/0	4
33	M	62	R	A/P		0/0	0/0	0/0	5
34	M	78	R	S		0/0	0/0	0/0	4
35	Ž	69	R	A		0/0	0/0	0/0	7
36	M	70	R	S/A/L		0/0	0/0	0/0	8
37	Ž	67	R	A		0/0	0/0	0/0	0
38	M	65	R	S		0/0	0/0	0/0	N
39	M	63	E	N		X	0/0	0/0	1
40	M	74	E	N		X	0/0	0/0	0
41	M	81	E	N		X	0/0	0/0	2
42	Ž	62	R	A		0/0	0/0	0/0	2
43	Ž	74	E	N		X	N/N	N/N	N
44	Ž	67	R	L	+	0/0	0/0	0/0	1
45	M	60	R	S	+	0/0	1/1	1/0	5
46	M	69	E	N	+	X	0/0	0/0	5

**Tab. 10:** ALK-negativní případy - retrospektivní část (n = 162) (pokračování)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	intenzita IHC 1. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 2. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 3. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	% FISH pozit. buněk
47	M	65	E	N		X	0/0	0/0	2
48	M	72	E	N		X	0/0	0/0	7
49	M	56	R	L		1/1	2/1	2/0	4
50	Ž	59	R	L		0/0	0/1	0/0	3
51	M	71	R	MP		0/0	1/1	1/0	1
52	M	71	E	N	+	X	N/N	N/N	N
53	M	79	E	N		X	N/N	N/N	N
54	M	65	R	N		0/0	0/0	0/0	2
55	M	63	E	N		X	0/0	0/0	0
56	M	76	E	N		X	0/0	0/0	5
57	Ž	62	R	N		0/0	0/0	0/0	8
58	M	69	R	S/MP		1/1	2/1	2/1	2
59	Ž	65	R	P/MP		0/0	0/0	0/0	2
60	M	62	R	S		0/0	0/0	0/0	N
61	Ž	65	E	N		X	0/0	0/0	7
62	M	60	E	N	+	X	0/0	0/0	3
63	M	67	E	N	+	X	N/N	N/N	3
64	M	80	E	N		X	N/N	N/N	N
65	Ž	59	E	N		X	0/0	0/0	1
66	M	66	R	L		0/0	0/0	0/0	6
67	M	61	E	N	+	X	0/0	0/0	8
68	Ž	58	E	N	+	X	0/0	0/0	0
69	M	49	E	N	+	X	0/0	0/0	0
70	M	63	E	N		X	0/0	0/0	11
71	M	66	R	MP		0/0	0/0	0/0	3
72	M	64	E	N		X	0/0	0/0	2
73	Ž	75	E	N		X	0/0	0/0	2
74	Ž	67	R	S		0/0	0/0	0/0	3

**Tab. 10:** ALK-negativní případy - retrospektivní část (n = 162) (pokračování)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	intenzita IHC 1. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 2. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 3. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	% FISH pozit. buněk
75	Ž	50	E	N		X	1/1	1/1	3
76	M	64	E	N		X	0/0	0/0	3
77	M	65	E	N		X	1-2/1	1/1	2
78	M	75	R	L		0/0	0/0	1/0	3
79	Ž	74	E	N		X	0/0	0/0	2
80	M	77	R	MP		0/0	0/0	0/0	2
81	Ž	61	E	N		X	0/0	0/0	10
82	Ž	68	R	A		0/0	0/0	1/0	2
83	Ž	68	R	MP		0/0	0/0	0/0	3
84	M	63	E	N		X	N/N	N/N	N
85	M	68	E	N		X	0/0	0/0	2
86	M	65	E	N		X	0/0	0/0	10
87	M	70	E	N		X	0/0	0/0	2
88	Ž	55	R	L		0/0	0/0	0/0	4
89	M	60	E	N		X	1/1	N/N	N
90	M	64	R	S		0/0	0/0	0/0	1
91	M	64	R	L		0/0	1/1	1/1	8
92	M	76	R	L		0/0	0/0	0/0	0
93	M	68	R	P		0/0	0/0	0/0	5
94	M	63	E	N		X	0/0	N/N	2
95	M	65	R	P		0/0	0/0	0/0	5
96	M	79	E	N		X	N/N	N/N	N
97	M	63	R	S		0/0	1/1	0/0	6
98	M	63	E	N		X	N/N	N/N	2
99	M	68	E	N		X	N/N	N/N	N
100	M	67	E	N		X	1/1	0/0	2
101	M	58	R	A		0/0	0/0	0/0	2
102	M	63	E	N		X	0/0	0/0	8

**Tab. 10:** ALK-negativní případy - retrospektivní část (n = 162) (pokračování)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	intenzita IHC 1. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 2. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 3. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	% FISH pozit. buněk
103	M	61	E	N		X	1/1	0/0	6
104	M	59	E	N		X	N/N	N/N	N
105	M	73	E	N		X	0/0	0/0	2
106	M	57	E	N	+	X	0/0	0/0	2
107	Ž	53	E	N		X	0/0	0/0	9
108	Ž	76	E	N		X	0/0	0/0	4
109	M	40	E	N		X	0/0	0/0	7
110	M	64	E	N		X	0/0	0/0	2
111	Ž	70	R	S		0/0	1/1	0/0	2
112	Ž	73	R	P		0/0	0/0	1/1	6
113	M	68	R	L		0/0	0/0	0/0	2
114	Ž	66	R	A		0/0	0/0	0/0	4
115	M	74	R	A		0/0	0/0	0/0	2
116	Ž	75	R	S		0/0	0/0	0/0	6
117	M	54	R	A		0/0	0/0	0/0	5
118	M	66	R	A		0/0	0/0	0/0	4
119	M	55	R	A		N/N	N/N	N/N	N
120	M	71	R	S		0/0	0/0	0/0	4
121	M	54	R	A		0/0	0/0	0/0	6
122	M	71	R	A		0/0	0/0	0/0	8
123	M	73	R	S		0/0	0/0	0/0	9
124	Ž	63	R	A		0/0	0/0	0/0	3
125	Ž	72	R	P		0/0	0/0	0/0	2
126	Ž	58	R	A		0/0	0/0	0/0	4
127	Ž	57	R	P		0/0	0/0	0/0	4
128	Ž	74	R	S		0/0	0/0	0/0	11
129	Ž	76	R	A		0/0	0/0	0/0	4
130	Ž	58	R	S		0/0	0/0	0/0	2



**Tab. 10:** ALK-negativní případy - retrospektivní část (n = 162) (pokračování)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	intenzita IHC 1. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 2. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 3. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	% FISH pozit. buněk
131	Ž	65	R	P		0/0	0/0	0/0	2
132	Ž	57	R	S/A		0/0	0/0	0/0	0
133	M	67	R	A		0/0	1/1	0/0	3
134	Ž	77	R	A		0/0	0/0	0/0	5
135	M	63	R	A		0/0	1/1	0/0	3
136	Ž	50	R	A		0/0	0/0	0/0	1
137	M	76	R	S		0/0	0/0	0/0	3
138	Ž	65	R	A		0/0	0/0	0/0	6
139	Ž	69	R	L		0/0	1/1	0/0	3
140	M	67	R	A		0/0	0/0	0/0	2
141	M	68	R	S/A		0/0	0/0	0/0	2
142	Ž	64	R	MU	+	0/0	0/0	0/0	2
143	Ž	75	R	S		0/0	0/0	0/0	1
144	Ž	53	R	A		0/0	0/0	0/0	4
145	M	69	R	S/A		0/0	0/0	0/0	0
146	M	63	R	A		0/0	1/1	0/0	1
147	M	70	R	A		0/0	0/0	0/0	N
148	M	72	R	A		0/0	0/0	0/0	0
149	M	64	R	A		0/0	1/1	0/0	3
150	M	63	R	A		N/N	2/1	0/0	2
151	Ž	63	R	S		0/0	0/0	0/0	4
152	M	73	R	P		0/0	0/0	0/0	11
153	Ž	76	R	P		0/0	0/0	0/0	2
154	Ž	74	R	A		N/N	N/N	N/N	4
155	Ž	63	R	P		0/0	0/0	0/0	0
156	M	69	R	A		0/0	0/0	0/0	0
157	Ž	72	R	A		0/0	0/0	0/0	1
158	Ž	66	R	P		0/0	0/0	0/0	1

**Tab. 10:** ALK-negativní případy - retrospektivní část (n = 162) (pokračování)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	intenzita IHC 1. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 2. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	intenzita IHC 3. v. (hodnotitel1/ hodnotitel2)	% FISH pozit. buněk
159	M	58	R	S		1/1	0/0	0/0	0
160	Ž	77	R	L		0/0	0/0	0/0	6
161	M	66	R	AC+sark		0/0	0/0	0/0	2
162	Ž	65	R	S		0/0	0/0	0/0	3

M = muž, Ž = žena, E = endobiopsie, R = resekát, A = acinární, AC = adenokarcinom, L = lepidický, MP = mikropapilární, MU = mucinózní, N = nehodnoceno, P = papilární, S = solidní, sark = sarkomatoidní rysy, X = vyšetření neprováděno, amplif. = amplifikace *EML4/ALK*

**Tab. 11:** ALK-pozitivní případy - retrospektivní část (n = 8)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	nejnižší intenzita IHC	typ přestavby genu <i>ALK</i>	% pozitivních buněk	<i>EML4</i>
1	M	80	R	S		2-3	I	43	+
2	Ž	51	R	A	+	2-3	D	26	-
3	M	78	E + R	P	+	2	I	62	+
4	Ž	71	R	P	+	3	D	50	-
5	Ž	59	R	A		2	I	47	+
6	M	49	R	A		1-2	I	36	+
7	M	56	E	S	+	3	I	68	+
8	M	67	R	S	+	2	I	46	+

M = muž, Ž = žena, E = endobiopsie, R = resekát, A = acinární, P = papilární, S = solidní I = inverze, D = delece intersticiální (centromerické) části genu *ALK*

### 5.1.3. Porovnání výsledků IHC exprese jednotlivých variant

**Tab. 12:** Senzitivita a specificita jednotlivých variant IHC detekce exprese proteinu ALK dle hodnotitelů a dvou rozdílných prahů positivity

hodnotitel 1	varianta 1 SN	varianta 1 SP	varianta 2 SN	varianta 2 SP	varianta 3 SN	varianta 3 SP
1 +	100 % (7/7)	95,0 % (114/120)	100 % (8/8)	86,2 % (150/174)	100 % (8/8)	92,5 % (148/160)
1-2 +	100 % (7/7)	99,1 % (114/115)	88,9 % (8/9)	96,8 % (150/155)	100 % (8/8)	98,7 % (148/150)

hodnotitel 2	varianta 1 SN	varianta 1 SP	varianta 2 SN	varianta 2 SP	varianta 3 SN	varianta 3 SP
1 +	100 % (7/7)	95,8 % (114/119)	100 % (8/8)	86,2 % (150/174)	100 % (8/8)	95,5 % (148/155)
1-2 +	100 % (7/7)	99,1 % (114/115)	88,9 % (8/9)	99,3 % (150/151)	100 % (8/8)	99,3 (148/149)

SN = senzitivita, SP = specificita

1 + = případy IHC hodnoceny jako 1+ a více by byly ověřeny FISH

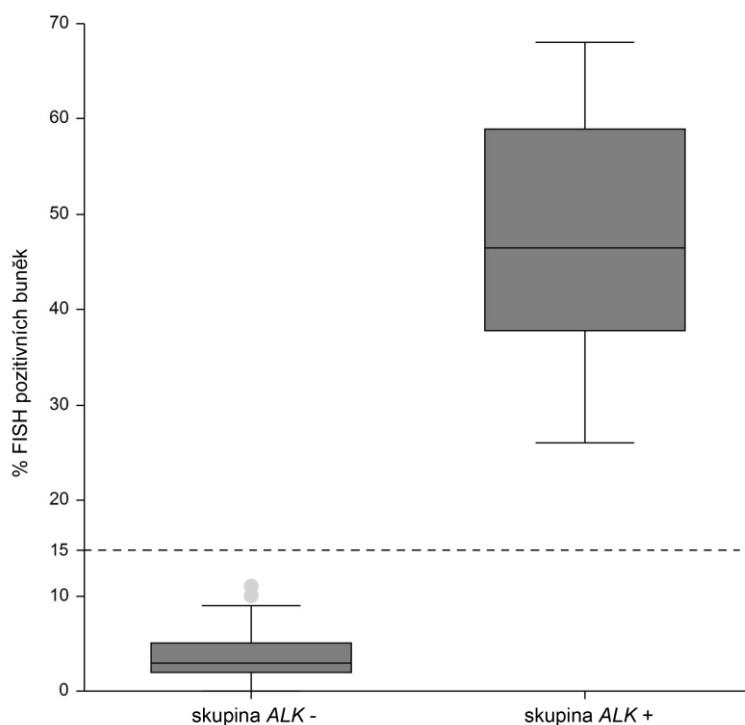
1-2 + = případy IHC hodnoceny jako 1-2+ a více by byly ověřeny FISH

### 5.1.4. Statistické zhodnocení výsledků retrospektivní části

IHC vyšetření variantou 1 bylo hodnotitelné u 120/123 (97,6 %) resekátů (3x nepřítomnost nádorové tkáně), variantou 2 bylo hodnotitelné u 121/123 (98,4 %) resekátů (2x nepřítomnost nádorové tkáně) a u 37/47 (78,7 %) malých biopsií (10x nepřítomnost nádorové tkáně). Varianta 3 byla hodnotitelná u 121/123 (98,4 %) resekátů (2x nepřítomnost nádorové tkáně) a u 35/47 (74,5 %) malých biopsií (12x nepřítomnost nádorové tkáně). FISH vyšetření bylo hodnotitelné u 116/123 (94,3 %) resekátů (příčiny nehodnotitelnosti: 6x nepřítomnost signálů, 1x nepřítomnost (vykrojení) nádorové tkáně) a u 38/47 (80,9 %) malých biopsií (příčiny nehodnotitelnosti: 1x nepřítomnost signálů, 8x nepřítomnost (vykrojení) nádorové tkáně).

Celkově bylo v souboru nalezeno 8/154 (5,2 %) případů s přestavbou genu *ALK*. Relativní počet pozitivních buněk u *ALK* FISH-pozitivních případů byl v průměru  $47,3 \pm 13,4$  % (medián 46,5 %, rozmezí 26,0 – 68,0 %), zatímco u negativních případů byl  $3,3 \pm 2,7$  % (medián 3 %, rozmezí 0 – 11,0 %) ( $p < 0.00001$ )(graf 2). Do hraniční kategorie případů s 10 – 20 % pozitivních buněk spadalo 5/170 případů (2,9 %). Celkem byla nalezena 6x (75%) inverze genů *ALK/EML4* a 2x delece intersticiální (centromerické) části genu *ALK*. Gen *EML4* byl fúzním partnerem v 6/8 (75 %) případů. V žádném z hodnocených případů nebyly zaznamenány rozdíly v expresi *ALK* proteinu ani ve FISH vyšetření přestavby genu *ALK* mezi dvěma vzorky ze stejných nádorů.

**Graf 2:** Porovnání procentuálního počtu pozitivních buněk mezi *ALK* FISH-pozitivními a *ALK* FISH-negativními případy v retrospektivní části studie



Soubor pacientů s *ALK*-pozitivním nádorem sestával z 5 mužů a 3 žen, soubor pacientů s *ALK*-negativním nádorem sestával ze 101 mužů a 61 žen. V zastoupení pohlaví nebyl zjištěn mezi těmito skupinami statisticky významný rozdíl (poměr muži/ženy v pozitivním vs. negativním souboru 5:3 vs. 101:60, tj. 1,7:1 vs. 1,7:1) ( $p = 0,99$ ).

Průměrný věk pacientů s ALK pozitivním nádorem byl  $63,9 \pm 11,9$  let (medián 63,0 let; rozmezí 49,0 – 80,0 let) v porovnání s  $65,5 \pm 7,3$  lety (medián 65,0 let; rozmezí 40,0 – 81,0 let) u pacientů s ALK negativním nádorem. Průměrný věk obou skupin se statisticky významně nelišil ( $p = 0,54$ ).

S ohledem na histologický typ ALK pozitivních nádorů se v souboru vyskytly tyto varianty: solidní 3x, acinární 3x a papilární 2x. Nápadná hlenotvorba (extra- či intracelulární) patrná již v základním HE barvení ve více než 10% nádoru byla pozorována u 5 z těchto případů.

## 5.2. Prospektivní část studie

### 5.2.1. Deskriptivní charakteristiky souboru

V prospektivní části studie bylo vyšetřeno IHC celkem 557 případů. K testování metodou FISH bylo vybráno celkem 76 případů, přičemž pouze 30 z nich splňovalo kritéria pro FISH testování stanovená v retrospektivní části (IHC pozitivita 1-2 a vyšší). Ve zbylých 46 případech se jednalo o nádory, které byly IHC velmi slabě pozitivní (1+) a dále také nádory IHC negativní (0+), které dle epidemiologických a morfoloických charakteristik častěji vykazují ALK přestavbu – acinární a invazivní mucinózní typy a AC s prokázanou hlenotvorbou, nádory u „mladších“ pacientů (do 50 let) a zároveň nekuřáků. Cílem tohoto kroku bylo maximálně omezit možnost falešné negativity vyšetření a prověřit optimálnost nastaveného prahu citlivosti IHC detekce.

### 5.2.2. Exprese ALK IHC a výsledky FISH vyšetření v prospektivní části

**Tab. 13:** Souhrnný přehled ALK IHC-negativních případů, které nebyly dále vyšetřovány FISH

počet případů	muži	ženy	IHC
481	306	175	negativní u všech

**Tab. 14:** Přehled ALK FISH-negativních případů, které byly ověřovány FISH v prospektivní části (n = 52)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	intenzita IHC	% FISH pozitivních buněk
1	Ž	57	E	AC+sark		1	2
2	M	62	R	A		2	2
3	M	61	R	A		2	2
4	M	65	E	S	+	0	2
5	M	84	E	S/MP		1	0
6	M	70	E	S		0	3
7	Ž	70	CB	N		1	N
8	Ž	78	CB	P		1	2
9	M	50	E	N		1	6
10	Ž	59	E	P		1	7
11	M	63	E	A		1	N
12	M	59	E	AC+sark		1	4
13	M	60	R	S		0	5
14	M	76	E	L		1	2
15	Ž	65	R	S		2	2
16	M	59	E	N		0	9
17	M	69	E	N		0	3
18	Ž	51	R	AC+sark	+	0	5
19	Ž	61	E	S		0	2
20	M	62	R	A/P		1	1
21	M	72	E	S/A		1	1
22	M	78	R	S		1	5
23	Ž	40	E	N		0	2
24	M	64	E	L		0	4
25	M	69	E	L		1	4
26	Ž	68	E	S		1	10
27	Ž	69	E	N		1	2
28	M	74	R	S		1	0

**Tab. 14:** Přehled ALK FISH-negativních případů, které byly ověřovány FISH v prospektivní části (n = 52) (pokračování)

případ číslo	pohlaví	věk (r.)	typ materiálu	typ nádoru	hleno- tvorba	intenzita IHC	% FISH pozitivních buněk
29	Ž	72	R	S/MP		1	1
30	Ž	63	E	N		1	N
31	Ž	67	R	ADSK		0	3
32	Ž	54	R	S/MP		1	2
33	M	55	E	A		1	2
34	M	58	R	S	+	1	N
35	M	62	R	MP	+	1	2
36	Ž	61	E	L		1	6
37	M	68	R	S		1	0
38	Ž	54	R	MP		0	0
39	M	52	R	S		1	2
40	Ž	54	R	AC+sark		0	0
41	Ž	78	R	A/MP		1	5
42	M	60	R	S		0	1,5
43	Ž	61	E	A		2	9
44	M	64	E	S		0	2
45	Ž	52	R	S		2	8
46	M	67	E	S		1	N
47	M	74	E	N		1	0
48	M	74	E	S		0	2
49	M	70	R	S		1	2
50	M	69	E	S		1	2
51	Ž	64	R	A		1	4
52	Ž	56	E	N		0	2

M = muž, Ž = žena, E = endobiopsie, R = resekát, CB = cytoblok, A = acinární, AC = adenokarcinom, sark = sarkomatoidní rysy, L = lepidický, MP = mikropapilární, N = nelze stanovit, P = papilární, S = solidní, ADSK = adenoskvamózní karcinom



**Tab. 15:** Přehled ALK FISH-pozitivních případů v prospektivní části (n = 24)

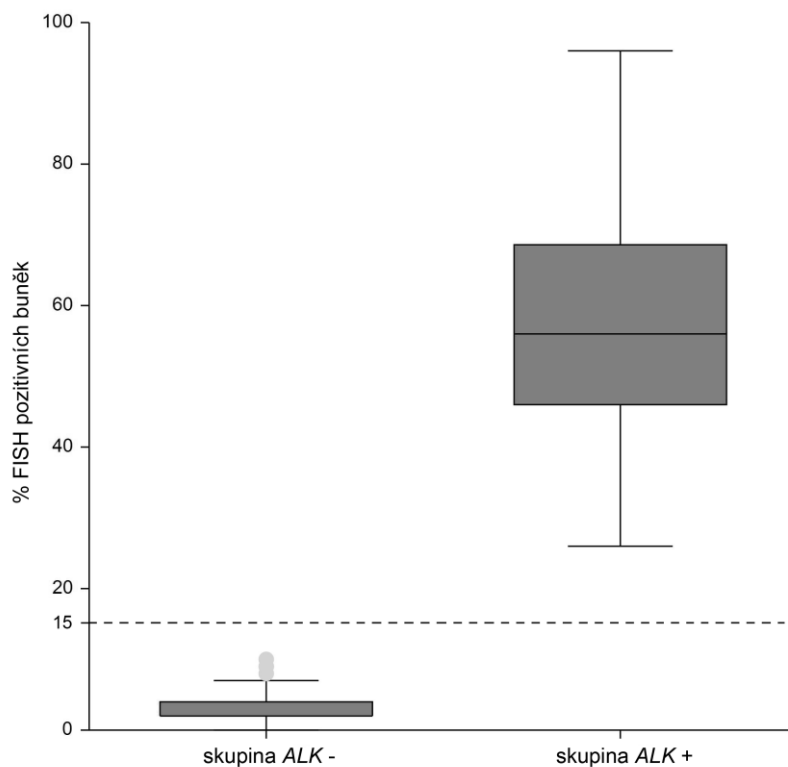
případ číslo	pohlaví	věk	typ materiálu	typ nádoru	hleno tvorba	intenzita IHC	typ přestavby genu ALK	% pozitivních buněk	EML4
1	M	67	R	MU	+	3	D	77	-
2	Ž	53	E	MP	+	3	I	50	+
3	Ž	53	E + R	MP	+	3	I	46	+
4	Ž	53	R	S		3	D	56	+
5	M	42	R	S		3	T	60	-
6	Ž	64	E	AC+sark		3	D	60	N
7	Ž	54	E	MP	+	3	I	46	+
8	M	59	E	A		3	I	61	+
9	M	37	E	S		2	I	78	+
10	Ž	33	R	A	+	3	D	96	+
11	M	36	R	S	+	2-3	D	56	-
12	M	68	E	A		3	I	53	+
13	Ž	71	E	MP		2	I	70	+
14	M	53	E	S		3	T	44	-
15	Ž	44	R	S		3	D	32	-
16	Ž	73	E	A		2-3	T	38	-
17	Ž	80	E	S		2	I	30	+
18	Ž	38	E	S	+	2	T	26	-
19	Ž	73	R	S		2	I	64	+
20	Ž	58	E	S		1-2	D	50	N
21	Ž	64	E	S		2-3	T	80	-
22	M	66	R	A	+	3	I	90	+
23	Ž	67	R	MU	+	2	I	60	+
24	Ž	73	R	MU	+	3	I	48	+

M = muž, Ž = žena, E = endobiopsie, R = resekat, A = acinární, S = solidní, AC = adenokarcinom, sark = sarkomatoidní rysy, MP = mikropapilární, MU = mucinózní, N = nelze hodnotit, I = inverze, D = delece intersticiální (centromerické) části genu ALK, T = translokace

### 5.2.3. Statistické zhodnocení výsledků prospektivní části

Celkem bylo v prospektivní části studie 24/557 ALK pozitivních případů, což představuje 4,3 %. Procento pozitivních buněk u ALK FISH-pozitivních případů bylo v průměru  $57,1 \pm 18,1$  % (medián 56,0 %, rozmezí 26,0 – 96,0 %), zatímco u negativních případů bylo  $3,0 \pm 2,5$  % (medián 2,0 %, rozmezí 0 – 10,0 %) ( $p < 0.00001$ )(graf 3). Do hraniční kategorie případů s 10 – 20 % pozitivních buněk spadal 1/76 případů (1,3 %). Celkem byla nalezena 12x inverze genů *ALK/EML4*, 7x delece intersticiální (centromerické) části genu *ALK* a 5x translokace genu *ALK*. Gen *EML4* byl fúzním partnerem ve 14/24 (58 %) případů.

**Graf 3:** Porovnání procentuálního počtu pozitivních buněk mezi ALK FISH-pozitivními a ALK FISH-negativními případy v prospektivní části studie



Senzitivita IHC vyšetření byla 100 %, specifická, vzhledem k rozšíření testování nad rámec indikace stanovené v retrospektivní části (viz kapitola 5.2.1.), byla 31,6 %. Při aplikaci původních kritérií z retrospektivní části studie by senzitivita zůstala 100 % a specifická by se zvýšila na 80,0 %. Celkem bylo FISH vyšetřeno 43 malých vzorků

(41 jehlových biopsií a 2 cytobloky) s diagnostickou výtěžností 88,4 % (u 5 případů nebylo možné stanovit ALK status v důsledku chybění nádorové tkáně úbytkem vzorků předchozími vyšetřeními) a 33 resekátů s diagnostickou výtěžností 100 %.

Soubor pacientů s ALK pozitivním nádorem sestával z 8 mužů a 16 žen, soubor pacientů s ALK negativním nádorem sestával z 336 mužů a 197 žen. V zastoupení pohlaví byl zjištěn mezi těmito skupinami statisticky významný rozdíl (poměr muži/ženy v pozitivním vs. negativním souboru 8:16 vs. 336:197, tj. 1:2 vs. 1,7:1) ( $p = 0,0034$ ).

Průměrný věk pacientů s ALK pozitivním nádorem byl  $57,5 \pm 13,6$  let (medián 58,5 let; rozmezí 33 – 80 let) v porovnání s  $65,2 \pm 8,9$  lety (medián 65 let; rozmezí 36 – 88 let) u pacientů s ALK negativním nádorem. Průměrný věk pacientů v těchto dvou skupinách se statisticky významně lišil ( $p = 0,0052$ ).

S ohledem na histologický subtyp ALK-pozitivního nádoru se v souboru vyskytly tyto varianty s převažujícím typem růstu: solidní 11x, acinární 5x, mikropapilární 4x, mucinózní 3x a AC se sarkomatoidními rysy 1x. Nápadná hlenotvorba (extra- či intracelulární) patrná již v základním HE barvení v > 10% nádoru byla pozorována u 10 případů.

Mutace genu *EGFR* byla vyšetřena u 636 případů (557 resekátů a „malých“ biopsií a 79 cytologických případů, u kterých se testování ALK neprovádělo), z toho bylo 63 (9,9 %) pozitivních, přičemž u žádného případu s pozitivní přestavbou genu *ALK* nebyla detekována současně mutace *EGFR*.

## 6. Diskuze

V době zahájení našeho výzkumu (polovina roku 2013) již existovala řada prací, které se zabývaly stanovením podílu ALK pozitivních karcinomů u jednotlivých podtypů NSCLC za použití různých detekčních postupů. Souhrnný přehled těchto prací a dosažených výsledků je uveden v tabulce 16. V průběhu našeho výzkumu byla publikována řada dalších studií, které poukazují také na geografické rozdíly ve výskytu ALK pozitivních NSCLC, jak ukazuje tabulka 17. Oba souhrny budou diskutovány v dalším textu.

Pro správné IHC hodnocení exprese ALK je klíčová volba metody detekce proteinu, tedy klonu primární protilátky a detekčního systému. Z našich výsledků uvedených v tabulce 12 vyplývá, že testované varianty se od sebe mírně liší svojí senzitivitou i specificitou. Při nastavení prahu citlivosti IHC detekce na hodnotu 1+ je senzitivita všech tří variant u obou hodnotitelů 100 %, a to při nejnižší specificitě 86,2 % (varianta 2 (D5F3, Cell Signaling + ZAL4, Invitrogen)) u obou hodnotitelů. Při nastavení prahu citlivosti IHC detekce na hodnotu 1-2+ zůstává senzitivita 100 % u varianty 1 (D5F3, Cell Signaling) a varianty 3 (5A4, Novocastra), a to při zvýšení specificity minimálně na hodnotu 98,7 % (varianta 3 (5A4, Novocastra) u hodnotitele 1). Jako nejvhodnější screeningová metoda se v podmínkách našeho pracoviště tedy jeví IHC detekce variantou 1 (D5F3, Cell Signaling) při nastavení prahu citlivosti 1-2 +, kde senzitivita je 100 % a specificita 99,1 %. Varianta 3 (5A4, Novocastra) s prahem citlivosti 1-2 + však vykazuje prakticky stejné, dostačující výsledky s hodnotami senzitivity 100 % a specificity 98,7 %. Tyto závěry jsou v souladu s dalšími studii zabývajícími se IHC detekcí exprese ALK u NSCLC, které potvrzují vhodnost jak klonu D5F3 (321, 325, 326), tak i klonu 5A4 (15, 317, 327-329). Velmi podobné výsledky dosažené pro oba klony svědčí pro jejich vzájemnou zastupitelnost. Tento poznatek byl potvrzen ve většině srovnávacích studií obou protilátek (330-336) a v běžné praxi jej lze uplatnit např. při výpadku dodávky protilátky nebo při podezření na sníženou kvalitu protilátky (nevhodný transport či uskladnění). Pokud se v některých studiích objevil rozdíl v senzitivě a specificitě mezi těmito klony, jednalo se spíše o důsledek kombinace primární protilátky s pro ni „nevhodným“ detekčním systémem, než o „selhání“ daného klonu, jelikož při změně detekčního systému byly již výsledky obou klonů srovnatelné (330, 335).

Tab. 16: Přehled publikovaných studií na téma: Testování přestavby genu *ALK* u karcinomů plic do roku 2013 (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2013 (311) )

studie	země	metoda	počet NSCLC*	počet (%) ALK+	počet AC	počet (%) ALK+	počet SCC	počet (%) ALK+	počet ADSC	počet (%) ALK+	počet NSCLC, ostatní	počet (%) ALK+	počet NECa	počet (%) ALK+	výběr pacientů
Rikova et al., 2007	Čína	RT-PCR	103	4 (4%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Soda et al., 2007	Japonsko	RT-PCR	75	5 (6,7%)	20	2 (10,0%)	11	1 (9,1%)	2	0	42	0	0	0	
Koivunen et al., 2008	USA/Korea	RT-PCR	305	8 (2,6%)	208	8 (3,8%)	88	0	9	0	0	0	0	0	
Perner et al., 2008	USA Švýcarsko	FISH/RT-PCR	603	16 (2,7%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Shinmura et al., 2008	Japonsko	RT-PCR/ Gen Seq	77	2 (2,6%)	50	2 (4,0%)	20	0	3	0	4	0	0	0	
Takeuchi et al., 2008	Japonsko	RT-PCR/ FISH/ Gen Seq	340	11 (3,2%)	253	11 (4,3%)	71	0	7	0	9	0	24	0	NE Ca zahrnutý SCLC + LCNEC

\* Mimo neuroendokrinních karcinomů (NE Ca); NSCLC = nemalobuněčný karcinom plic, AC = adenokarcinom, SCC = dlaždicobuněčný karcinom, ADSC = adenoskvamózní karcinom, SCLC = malobuněčný karcinom plic, LCNEC = velkobuněčný neuroendokrinní karcinom, RT-PCR = polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí, FISH = fluorescenční in situ hybridizace, Gen seq = genové sekvenování

Tab. 16: Přehled publikovaných studií na téma: Testování přestavby genu *ALK* u karcinomů plic do roku 2013 (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2013 (311) ) (pokračování)

studie	země	metoda	počet NSCLC*	počet (%) ALK+	počet AC	počet (%) ALK+	počet SCC	počet (%) ALK+	počet ADSC	počet (%) ALK+	počet NSCLC, ostatní	počet (%) ALK+	počet NECa	počet (%) ALK+	výběr pacientů
Boland et al., 2009	USA	IHC/ FISH/ RT-PCR	335	6 (1,8%)	185	5 (2,7%)	150	1 (0,7%)	0	0	0	0	0	0	
Martelli et al., 2009	Itálie/ Španělsko	RT-PCR/ FISH/ IHC	120	9 (7,5%)	63	3 (4,8%)	48	4 (8,3%)	2	2 (100%)	7	0	0	0	
Rodig et al., 2009	USA	IHC/ FISH	358	20 (5,6%)	358	20 (5,6%)	0	0	0	0	0	0	0	0	
Shaw et al., 2009	USA	FISH	141	19 (13,5%)	130	18 (12,8%)	2	0	4	1 (25%)	5	0	0	0	nekuřáci/lehčí kuřáci, Asiati, ženy
Takeuchi et al., 2009	Japonsko	IHC/ RT- PCR & FISH	130	4 (3,1%)	130	4 (3,1%)	0	0	0	0	0	0	0	0	
Wong et al., 2009	Čína	RT-PCR	266	13 (4,9%)	209	11 (5,3%)	34	0	0	0	23	2 (8,7%)	0	0	

IHC = imunohistochemie

Tab. 16: Přehled publikovaných studií na téma: Testování přestavby genu *ALK* u karcinomů plic do roku 2013 (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2013 (311) ) (pokračování)

studie	země	metoda	počet NSCLC*	počet (%) ALK+	počet AC	počet (%) ALK+	počet SCC	počet (%) ALK+	počet ADSC	počet (%) ALK+	počet NSCLC, ostatní	počet (%) ALK+	počet NECa	počet (%) ALK+	výběr pacientů
Jokoji et al., 2010	Japonsko	IHC	254	8 (3,1%)	254	8 (3,1%)	0	0	0	0	0	0	0	0	
Sakairi et al., 2010	Japonsko	IHC/ FISH & RT-PCR	109	7 (6,4%)	82	7 (8,5%)	18	0	0	0	9	0	0	0	
Salido et al., 2010	Španělsko	FISH/ IHC	107	3 (2,8%)	69	3 (4,3%)	30	0	0	0	8	0	0	0	
Sun Y et al., 2010	Čína	RT-PCR	52	3 (5,8%)	52	3 (5,8%)	0	0	0	0	0	0	0	0	Nekuřáci
Takahashi et al., 2010	Japonsko	RT-PCR/ Gen seq	313	5 (1,6%)	211	5 (2,4%)	75	0	0	0	27	0	0	0	
Zhang X et al., 2010	Čína	RACE/ RT-PCR	103	12 (11,7%)	62	10 (16,1%)	29	2 (6,9%)	0	0	12	0	0	0	

RACE = rychlá amplifikace cDNA

Tab. 16: Přehled publikovaných studií na téma: Testování přestavby genu *ALK* u karcinomů plic do roku 2013 (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2013 (311) ) (pokračování)

studie	země	metoda	počet NSCLC*	počet (%) ALK+	počet AC	počet (%) ALK+	počet SCC	počet (%) ALK+	počet ADSC	počet (%) ALK+	počet NSCLC, ostatní	počet (%) ALK+	počet NECa	počet (%) ALK+	výběr pacientů
Paik et al., 2011	Korea	IHC/ FISH	735	28 (3,8%)	395	27 (6,8%)	292	0	0	0	48	1 (2,1%)	0	0	
Yi et al., 2011	USA	FISH/ IHC	101	10 (9,9%)	101	10 (9,9%)	0	0	0	0	0	0	0	0	Nekuřáci s AC
An et al., 2012	Čína	RACE-PCR	239	15 (6,3%)	130	10 (7,7%)	97	4 (4,1%)	-	-	12	1 (8,3%)	0	0	
Dai et al., 2012	USA	FISH	1387	49 (3,7%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Jin et al., 2012	Korea	RT-PCR	167	10 (6,0%)	121	9 (7,4%)	46	1 (0,2%)	0	0	0	0	0	0	
McLeer-Florin et al., 2012	Francie	IHC/ FISH	441	29 (6,6%)	441	29 (6,6%)	0	0	0	0	0	0	0	0	
Murakami et al., 2012	Japonsko	RT-PCR/ IHC/ FISH	811	31 (3,8%)	713	30 (4,2%)	52	1 (1,9%)	8	0	38	0	0	0	



Tab. 16: Přehled publikovaných studií na téma: Testování přestavby genu *ALK* u karcinomů plic do roku 2013 (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2013 (311) ) (pokračování)

studie	země	metoda	počet NSCLC*	počet (%) ALK+	počet AC	počet (%) ALK+	počet SCC	počet (%) ALK+	počet ADSC	počet (%) ALK+	počet NSCLC, ostatní	počet (%) ALK+	počet NECa	počet (%) ALK+	výběr pacientů
Park et al., 2012	Korea	IHC/ FISH	258	25 (9,7%)	182	17 (9,3%)	0	0	0	0	76	8 (10,5%)	4	0	EGFR wild-type nebo neodpovídající na předchozí EGFR terapii
Shaozang et al., 2012	Čína	RT-PCR	102	8 (7,8%)	73	5 (6,2%)	14	1 (7,1%)	14	2 (14,3%)	1	0	0	0	Ženy, nekuřáci/lehčí kuřáci a/nebo AC
Wang Z et al., 2012	Čína	FISH/ IHC	113	11 (9,7%)	95	10 (10,5%)	18	1 (5,6%)	0	0	0	0	0	0	
Wu et al., 2012	Thajsko	RT-PCR/ FISH	116	39 (34%)	116	39 (34%)	0	0	0	0	0	0	0	0	EGFR wild-type, pleurální výpotek
Yang et al., 2012	USA	IHC/ FISH	300	34 (11,3%)	300	34 (11,3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	Nekuřáci
Zhang Y et al., 2012	Čína	RACE-PCR	349	15 (4,3%)	349	15 (4,3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	Ženy nekuřačky

EGFR = epidermal growth factor receptor

Tab. 16: Přehled publikovaných studií na téma: Testování přestavby genu *ALK* u karcinomů plic do roku 2013 (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2013 (311) ) (pokračování)

studie	země	metoda	počet NSCLC*	počet (%) ALK+	počet AC	počet (%) ALK+	počet SCC	počet (%) ALK+	počet ADSC	počet (%) ALK+	počet NSCLC, ostatní	počet (%) ALK+	počet NECa	počet (%) ALK+	výběr pacientů
Gainor et al., 2013	USA	FISH	1683	75 (4,4%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Li Y et al., 2013	Čína	RT-PCR/ IHC	99	7 (7,1%)	79	5 (6,3%)	7	0	0	0	13	2 (15,4%)	0	0	
Minca et al., 2013	USA	IHC/ FISH	249	32 (12,8%)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Shol let al., 2013	USA	IHC/ FISH	186	12 (6,5%)	186	12 (6,5%)									
To et al., 2013	Čína (HK)	IHC/ FISH/ RT-PCR	373	22 (5,9%)	373	22 (5,9%)	0	0	0	0	0	0	0	0	
Zhang Y-G et al., 2013	Čína	RT-PCR/ IHC/ FISH	469	20 (4,2%)	341	19 (2,6%)	112	0	4	0	12	1 (8,3%)	0	0	
Zhou et al., 2013	Čína	ARMS RT-PCR	488	28 (5,7%)	349	25 (7,2%)	101	2 (2,0%)	18	1 (5,6%)	20	0	0	0	
<b>Celkem</b>			<b>12665</b>	<b>662 (5,2%)</b>	<b>6775</b>	<b>444 (6,6%)</b>	<b>1411</b>	<b>18 (1,3%)</b>	<b>78</b>	<b>7 (9,0%)</b>	<b>376</b>	<b>17 (4,5%)</b>	<b>28</b>	<b>0</b>	

ARMS = amplifikační refrakční mutační systém

**Tab. 17:** Souhrn publikovaných studií na téma: Testování přestavby genu ALK u karcinomů plic od roku 2013<sup>a</sup> (upraveno a převzato z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2016 (319)).

studie	země	období studie	počet pracovišť ve studii	metoda	počet pacientů	počet ALK+	% ALK+	kritéria výběru pacientů
<b>Asie</b>								
Hong et al., 2014	Čína	2012-2014	1	FISH	1 016	94	9,2	NSCLC
Serizawa et al., 2014	Japonsko	2011-2013	1	RT-PCR/IHC/FISH	411	12	2,9	AC
Kim et al., 2014	Korea	2011-2013	více	FISH/IHC	510	47 <sup>b</sup>	9,2	NSCLC
Fu et al., 2015	Čína	2012-2013	1	FISH	487	44	9,0	NSCLC
Doval et al., 2015	Indie	2010-2014	1	FISH	500	15	3,0	AC
Hsu et al., 2015	Thajsko	2011-2013	více	IHC (D5F3)	295	29	9,8	EGFR-wild-type AC
Zheng et al., 2016	Čína	2007-2013	1	RT-PCR/FISH	1 407	74	5,3	AC
Lee et al., 2016	Korea	2006-2014	1	IHC/FISH	4 870	281	5,8	NSCLC
<b>Austrálie</b>								
Rogers et al., 2015	Victoria	NA	1	FISH	429	3	0,7	NSCLC
<b>Evropa</b>								
Hutarew et al., 2014	Rakousko	NA	1	IHC/FISH	303	14	4,6	AC
Ali et al., 2014	Itálie	2007-2013	1	FISH	523	20	3,8	NSCLC
Vidal et al., 2014	Španělsko	2010-2014	více	FISH	1 092	35	3,2	NSCLC
Barlesi et al., 2016	Francie	2012-2013	více	FISH	8 134	388	2,1	NSCLC
Scarpino et al., 2016	Itálie	NA	1	FISH/IHC	637	47	4,7	EGFR-wild-type AC
<b>Severní Amerika</b>								
Gainor et al., 2013a	USA	2009-2012	3	FISH	1 683	75	4,5	NSCLC
Sacher et al., 2016	USA	2002-2014	1	FISH/IHC/NGS	1 783	84	4,7	NSCLC
Kris et al., 2016	USA	2009-2012	více	FISH	1 007	80	7,9	NSCLC kromě SqCLC
<b>Celkem</b>					<b>25 087</b>	<b>1 342</b>	<b>5,3</b>	

<sup>a</sup>Zahrnuty pouze skriningové studie obsahující větší množství vzorků (>250 pacientů). U jasné se překrývajících studií byly použity pouze ty s nejaktuálnějšími a největšími datovými soubory.<sup>b</sup> Značný rozdíl mezi počty ALK-pozitivních případů vyšetřených metodami FISH (47) a IHC (29).

Pro hodnocení výsledku IHC detekce exprese ALK se většinou používá, podobně jako v naší studii, semikvantitativní systém hodnocení intenzity exprese (nejčastěji v rozmezí 0 + až 3 +), jehož určitou nevýhodou je nutnost stanovení prahu positivity a také interindividuální variabilita při hodnocení. Jistou alternativou je certifikovaný kit firmy Ventana využívající klon D5F3 v kombinaci s detekčním systémem OptiView, u kterého se při hodnocení exprese ALK používá binární systém (negativní vs. pozitivní) (VENTANA ALK Scoring Interpretation Guide for non-small cell lung carcinoma (NSCLC) [online]. [2012], [cit. 2017-06-02]. Dostupný z URL: <https://www.uclad.com/newsletters/ALK-LUNG-IHC-INTERPRETATION-GUIDE.pdf> (www4)). Jednoznačná interpretace výsledku barvení je hlavní výhodou této metody. I při užití certifikovaného kitu však existuje malá skupina případů, které nelze přesně klasifikovat (tzv. nejednoznačné případy, viz schéma 3 na str. 57), byť tato podskupina je podstatně menší, než skupina slabě/sporně pozitivních případů při užití semikvantitativního hodnocení. Za další nevýhody tohoto systému je možné považovat nároky na konkrétní přístrojové vybavení laboratoře (barvicí automat firmy Ventana) a také o jeden řád vyšší cenu detekčního kitu. Hodnocení exprese ALK pomocí tohoto kitu nebylo možné do naší studie zařadit i přesto, že detekce antigenu byla provedena na přístroji od tohoto výrobce (Roche), a to z toho důvodu, že v době, kdy byla realizována retrospektivní část studie (2013), nebyl tento kit použitelný na nejnovějším typu automatu, kterým je vybaveno naše pracoviště (VENTANA BenchMark ULTRA).

Celkově bylo v retrospektivní části naší studie zjištěno 8/154 (5,2 %) případů s přestavbou genu *ALK*. Tato hodnota patří spíše k těm vyšším a blíží se k horní hranici podílu ALK-pozitivních případů uváděných v jiných studiích (viz tab. 16 a 17), což může být způsobeno relativně malou velikostí souboru pozitivních případů, navíc v kombinaci s vyřazením případů s mutací *EGFR* z testování.

Diagnostická výtěžnost vyšetření stavu ALK se v retrospektivní části lišila mezi resekáty a malými biopsiemi. U resekátů je diagnostická výtěžnost velmi dobrá: 94,3 % při vyšetření FISH a minimálně 97,5 % při IHC vyšetření, zatímco u malých biopsií je nižší: 80,9 % u vyšetření FISH a minimálně 74,5 % u IHC vyšetření. Příčinou nevyšetřitelnosti u všech malých biopsií byla nepřítomnost nádorové tkáně v důsledku redukce vzorku předchozími vyšetřeními. I přes tento rozdíl je množství hodnotitelných malých biopsií dostatečné pro plošné testování exprese ALK proteinu v běžné praxi. Náš závěr však není možné porovnat s jinými studiemi, jelikož v nám známé literatuře

údaj o diagnostické výtěžnosti vzorků (hlavně malých biopsií) chybí.

Intenzita IHC exprese ALK u případů v retrospektivní části studie byla téměř vždy (s výjimkou nekrotických oblastí a okrsků s preanalytickým poškozením tkáně) homogenní v celé nádorové populaci, a to jak v resekátech, tak i v malých biopsiích, což umožňuje spolehlivou diagnostiku exprese ALK i z malých biopsií bez rizika falešné negativity v důsledku heterogenity nádorové populace. Tento závěr podporují shodné nálezy IHC i FISH vyšetření v obou náhodně vybraných vzorcích tkáně z každého tumoru v rámci složeného bloku, a to ve všech vyšetřených případech. Dále je tento fakt podpořen i záchytem dvou pozitivních případů zjištěných v resekátu a zároveň v malé biopsii od téhož pacienta, kde IHC detekce obou vzorků byla shodně pozitivní. V tomto ohledu naše výsledky nekorespondují s výsledky recentních prací, ve kterých je uváděna (velmi vzácně) intratumorální heterogenita ALK exprese/přestavby, a to ve vazbě na různé morfologické typy růstu nádorových buněk v rámci jednoho AC (337, 338). Rozpor lze vysvětlit jednak doposud popsanou vzácností tohoto fenoménu a také faktem, že v našem souboru byly přítomny vždy pouze 2 vzorky z každého tumoru, které navíc ve většině případů vykazovaly i stejný růstový typ nádoru, což snižuje možnost záchytu případné heterogenity.

Dále se v našem souboru vyskytl jeden případ, který byl ALK FISH pozitivní, avšak IHC detekce byla ve všech třech variantách negativní. Následným podrobným zkoumáním daného případu bylo zjištěno, že vyšetřovaná tkáň byla nejprve zpracována v rámci peroperační biopsie zmrazovací technikou a až dodatečně také klasickou technikou se zalitím do parafinu. Proto byl vyšetřen jiný vzorek nádoru od téhož pacienta, který nebyl zmrazen, a v tomto případě již byla IHC detekce ve všech variantách pozitivní. Byť se jedná pouze o jediný případ, lze z něj vyvodit „opatrný“ závěr, že tkáň zpracovaná zmrazovací technikou nemusí být vhodná pro IHC detekci, avšak je dostačující pro vyšetření FISH. Tuto skutečnost je vhodné zmínit ve výsledku při skriningovém vyšetření exprese ALK proteinu a je-li to možné, raději pro vyšetření vybrat vzorek, který neprošel mrazením. Vzhledem k tomu, že se na našem pracovišti od doby pozorování tohoto případu již nevyskytl další případ, který by byl vyšetřen zmrazovací technikou a zároveň byl ALK pozitivní, nebylo možné vliv zmrazení tkáně na expresi ALK proteinu ověřit. Ani v dostupné literatuře nebyl zatím tento fenomén popsán.

Ve většině případů (kromě jednoho s IHC pozitivitou 1-2 +) nádory s přestavbou genu *ALK* vykazovaly silnější IHC pozitivitu (2+ a více), zatímco FISH negativní případy byly buď IHC negativní (0 +), nebo byla pozorována pozitivita na spodní hranici prahu citlivosti (1 + a 1-2 +). Výjimkou byl jeden FISH negativní případ (případ 8 v tab. 10), který vykazoval ve všech třech IHC variantách silnou pozitivitu (3 +). Při FISH vyšetření byla však v nádoru jako vedlejší nález detekována vysoká amplifikace genů *ALK* a *EML4* (obr. 14 v kapitole 10), jejíž biologický význam je zatím nejasný a pro indikaci léčby inhibitory *ALK* irelevantní, ačkoliv se recentně objevují publikace pojednávající o možném významu amplifikace genu *ALK* jako vhodného cíle pro terapii inhibitory druhé generace (339). Tento nález mohl být příčinou falešné positivity IHC hodnocení. V literatuře je pozitivní vztah mezi amplifikací genu *ALK* a zvýšenou expresí jeho proteinu již popsán (277, 278).

Průměrný procentuální počet pozitivních buněk se u *ALK* FISH-positivních a *ALK* FISH-negativních případů statisticky signifikantně lišil, a to jak v retrospektivní části (3% (0 – 11 %) u negativních případů oproti 47 % (26 – 68 %) u pozitivních případů;  $p < 0,00001$ ), tak v prospektivní části studie (3% (0 – 10 %) u negativních případů oproti 57 % (26 – 96 %) u pozitivních případů;  $p < 0,00001$ ). Tento nález svědčí o jednoznačné interpretovatelnosti výsledků FISH vyšetření při použití prahu 15 % pozitivních buněk pro definici *ALK* pozitivního případu, který je v současné době aplikován u většiny sond (311). Do kategorie hraničních výsledků s pozitivitou 10 – 20 % buněk spadá podle různých studií 5 – 10 % případů (278, 319, 322, 340). V našem souboru to bylo 2,9 % případů v retrospektivní části a 1,3 % případů v prospektivní části. Výrazně menší podíl hraničních případů si vysvětlujeme použitím zvolené sondy, která v případech účasti genu *EML4* jako fúzního partnera umožňuje jednoznačně interpretovat i buňky s hraniční vzdáleností signálů buď jako pozitivní nebo negativní.

Nejčastějším typem pozitivní přestavby genu *ALK* byla inverze s účastí fúzního partnera *EML4*, což je v souladu s dosavadními poznatky (1, 311, 319).

V prospektivní části studie bylo diagnostikováno 24/557 (4,3 %) případů s pozitivní přestavbou genu *ALK*, což je v souladu s dosud publikovanými výsledky, které se pohybují v rozmezí 2,1 – 4,7 % v evropské populaci (319) (tab. 17). Nižší podíl *ALK*-pozitivních případů v porovnání s retrospektivní částí studie pak nejspíše souvisí s

částečnou selekcí souboru s vyřazením *EGFR* mutovaných případů v retrospektivní části. V žádném ze 46 případů, které byly testovány FISH i přesto, že nesplňovaly IHC kritéria (pozitivita IHC 1+, IHC negativní případy 0+) nebo které dle epidemiologických a morfoloických charakteristik statisticky častěji vykazují *ALK* přestavbu, nebyla nalezena přestavba genu *ALK*, což svědčí pro dostatečnou senzitivitu zvolené metody IHC detekce. Současně z tohoto nálezu vyplývá, že samotné epidemiologické charakteristiky pacienta ani morfoloické rysy nádoru nelze využít pro spolehlivý výběr případů pro následnou *ALK* analýzu. Diagnostická výtěžnost malých biopsií 88,4 % (u 5 případů nebylo možné stanovit *ALK* status v důsledku chybění nádorové tkáně redukcí vzorků předchozími vyšetřeními) je vysoká a potvrzuje závěry retrospektivní části o možnosti testování *ALK* statusu i u „malých“ biopsií.

U žádného případu s pozitivní přestavbou genu *ALK* nebyla detekována mutace *EGFR*, což je v souladu s dosud známými závěry, které popisují současný výskyt obou mutací zcela raritně, přičemž se nejspíše jedná o dvojí populaci nádorových buněk s rozdílnou mutací než o „skutečnou“ koincidenci těchto mutací v rámci jedné nádorové buňky (323, 324, 338).

I v prospektivním souboru vykazovaly nádory s přestavbou genu *ALK* silnější IHC pozitivitu (2+ a více), kromě jednoho s IHC pozitivitou 1-2 + (případ 20 v tab. 15), zatímco FISH negativní případy byly buď IHC negativní (0 +), nebo byla pozorována pozitivita na spodní hranici prahu citlivosti (1 + a 1-2 +). V pěti případech (č. 2, 3, 15, 43 a 45 v tab. 14) pak byla hodnocena exprese proteinu *ALK* 2+ a následné FISH vyšetření bylo negativní, bez vedlejších nálezů (např. amplifikace apod.). Tento jev je v literatuře znám již od roku 2012 (15) a v některých publikacích je vysvětlován jednak komplexní přestavbou genu *ALK*, která není detekovatelná metodou FISH, ale lze ji odhalit např. metodou NGS či RNA in situ hybridizací (341, 342), a jednak nízkou frekvencí přestavby genu *ALK* v nádorových buňkách, s následným přenosem fúzního proteinu intercelulární komunikací i do buněk bez přestavby genu *ALK* (343). V dalších studiích je tento fenomén spojován s malým množstvím nádorových buněk ve vzorku a s přítomností reaktivních (nenádorových) buněk, které jsou chybně interpretovány jako nádorové (344).

V zastoupení pohlaví nebyl v retrospektivní části studie nalezen statisticky významný rozdíl mezi sledovanými skupinami (poměr muži/ženy v pozitivním vs. negativním souboru 1,7 : 1,7;  $p = 0,99$ ), což může být důsledkem malého počtu pozitivních případů (8 případů). Naproti tomu v prospektivní části studie byl nalezen statisticky významný rozdíl v zastoupení pohlaví (poměr muži/ženy v pozitivním vs. negativním souboru 0,5 : 1,7;  $p = 0,0034$ ). ALK pozitivní tumor se vyskytl 2x častěji u žen (16 případů) než u mužů (8 případů), což je v souladu se současnými poznatky (345-347).

Průměrný věk pacientů s ALK pozitivním nádorem (58 let) a s ALK negativním nádorem (64 let) se statisticky významně lišil pouze v prospektivní části studie ( $p = 0,014$ ). Nepřítomnost rozdílu v retrospektivní části studie (64 let u ALK-pozitivních nádorů oproti 66 letům u ALK-negativních nádorů;  $p = 0,54$ ) lze opět přisoudit malému počtu pozitivních případů. Přinejmenším z nálezu v prospektivní části studie lze tedy konstatovat, že se ALK pozitivní nádory vyskytují v průměru u mladších pacientů, nicméně vzhledem k velmi širokému věkovému spektru a věkovému překryvu obou skupin pacientů v našem souboru nelze údaj o věku využít při výběru jednotlivých pacientů vhodných pro testování přestavby genu *ALK*. Oba tyto závěry potvrzuje i řada předchozích studií (1, 319, 345-347).

S ohledem na histologický typ ALK-pozitivního nádoru se v celém našem souboru nejčastěji vyskytovaly nádory s převažujícím solidním typem růstu (14x), následované nádory s acinárním typem růstu (8x). Mucinózní typ nebo částečná hlenotvorba (extra- a/nebo intracelulární) byla pozorována u 15 případů. Z uvedených nálezů vyplývá relativně úzký vztah ALK pozitivních nádorů k převážně solidnímu či acinárnímu typu růstu a k hlenotvorbě (mucinózní typ růstu či nápadná hlenotvorba patrná již v základním HE barvení v > 10% nádoru, event. přítomnost buněk tvaru pečetiho prstene), což je v souladu s dosavadními poznatky (1, 348-350). Avšak vzhledem k tomu, že tyto nádory mohou mít téměř jakoukoliv morfolonii, nelze s ohledem na jejich nízkou prevalenci použít morfologická kritéria pro selekci jednotlivých případů vhodných pro testování přestavby genu *ALK* v důsledku rizika výrazného snížení senzitivity vyšetření. Navíc u některých vzorků, např. cytobloků nebo endobiopsií, nelze v některých případech morfologický typ nádoru určit vůbec nebo může být v odebrané tkáni zastížen pouze minoritní růstový vzorec.



V souvislosti s ALK pozitivními nádory je v literatuře velmi dobře popsán také jejich častější výskyt u nekuřáků (1, 319, 330, 346, 347, 351). Tento parametr nebyl do našeho výzkumu zahrnut proto, že naše studie byla primárně zaměřena na metodická úskalí při vyhledávání ALK pozitivních případů a zejména proto, že FÚP slouží jako referenční laboratoř, do které přichází vzorky z velkého množství pracovišť a dohledání tohoto údaje u všech pacientů by bylo velmi obtížné.

## 7. Závěry práce

1. Byl vytvořen a studován soubor NSCLC, který je svým rozsahem plně srovnatelný se studii jiných autorů zabývajících se problematikou efektivního záchytu NSCLC s přestavbou genu *ALK*. Výsledky této studie potvrdily pozorování jiných autorů a nastínily možná úskalí tohoto vyšetření, která nebyla dosud publikována. Hlavním přínosem je pak aplikace získaných výsledků v rutinní bioptické praxi na pracovišti autora a jejich opakované úspěšné ověření v rámci mezinárodního programu externího posouzení kvality (External Quality Assessment (EQA)) organizovaného Evropskou společností patologie (ESP).

2. Byly nalezeny dvě srovnatelné skrínigové IHC metody vhodné pro detekci exprese *ALK* proteinu u NSCLC, které byly prospektivně ověřeny v rutinním testování a následně zavedeny do běžné diagnostické praxe.

3. Testování *ALK* statusu je možné provádět i na „malých“ biopsiích, tj. endobronchiálních, transbronchiálních a transtorakálních biopsiích a cytoblocích, s dostatečnou diagnostickou výtěžností.

4. Všechny vyšetřené případy vykazovaly homogenitu nádorové populace při IHC i FISH vyšetření, což umožňuje spolehlivou diagnostiku exprese *ALK* i z malých biopsií, bez rizika falešné negativity v důsledku heterogenity nádorové populace.

5. Diagnostický práh  $\geq 15$  % FISH pozitivních buněk pro *ALK* pozitivitu je jednoznačně interpretovatelný při použití sondy detekující současně přestavbu genu *ALK* a případnou účast genu *EML4*.

6. Nejčastějším typem pozitivní přestavby genu *ALK* byla inverze s účastí fúzního partnera *EML4*.

7. U žádného případu s pozitivní přestavbou genu *ALK* nebyla detekována mutace *EGFR*.

**8.** Věk a pohlaví pacientů s ALK pozitivním nádorem v našem souboru (častější výskyt u mladších pacientů a u žen) odpovídá dosud publikovaným epidemiologickým údajům.

**9.** Nejčastějším histologickým typem ALK pozitivního nádoru byl v našem souboru karcinom se solidním nebo acinárním typem růstu a s nápadnou hlenotvorbou. I tento závěr je v souladu s dosud publikovanými výsledky.

**10.** Zcela novým a klinicky vysoce relevantním poznatkem je možnost falešné negativity IHC detekce ALK proteinu u tkání, které byly nejprve zpracovány zmrazovací technikou. Tato skutečnost nebyla zatím v literatuře popsána.

## 8. Literatura

1. **Travis W.D., Brambilla E., Burke A.P., Marx A., Nicholson A.G.** *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. Lyon : IARC Press, 2015. s. 10-151.
2. **Bell D.W., Gore I., Okimoto R.A. et al.** Inherited susceptibility to lung cancer may be associated with the T790M drug resistance mutation in EGFR. *Nat Genet.* 37, 2005. s. 1315-16.
3. **Gazdar A., Robinson L., Oliver D. et al.** Hereditary lung cancer syndrome targets never smokers with germline EGFR gene T790M mutations. *J Thorac Oncol.* 9, 2014. s. 456-63.
4. **Oxnard G.R., Miller V.A., Robson M.E., Azzoli C.G., Pao W., Ladanyi M., Arcila M.E.** Screening for germline EGFR T790M mutations through lung cancer genotyping. *J Thorac Oncol.* 7, 2012. s. 1049-52.
5. **van Noesel J., van der Ven W.H., van Os T.A. et al.** Activating germline R776H mutation in the epidermal growth factor receptor associated with lung cancer with squamous differentiation. *J Clin Oncol.* 31, 2013. s. 161-64.
6. **Yamamoto H., Higasa K., Sakaguchi M. et al.** Novel germline mutation in the transmembrane domain of HER2 in familial lung adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 106, 2014. dtj 338.
7. **Shimosato Y., Suzuki A., Hashimoto T., Nishiwaki Y., Kodama T., Yoneyama T., Kameya T.** Prognostic implications of fibrotic focus (scar) in small peripheral lung cancers. *Am J Surg Pathol.* 4, 1980. s. 365-73.
8. **Russell P.A., Barnett S.A., Walkiewicz M. et al.** Correlation of mutation status and survival with predominant histologic subtype according to the new IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification in stage III (N2) patients. *J Thorac Oncol.* 8, 2013. s. 461-68.

9. **Russell P.A., Wainer Z., Wright G.M., Daniels M., Conron M., Williams R.A.** Does lung adenocarcinoma subtype predict patient survival?: A clinicopathologic study based on the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary lung adenocarcinoma classification. *J Thorac Oncol.* 6, 2011. s. 1496-504.
10. **Tsuta K., Kawago M., Inoue E. et al.** The utility of the proposed IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma subtypes for disease prognosis and correlation of driver gene alterations. *Lung Cancer.* 81, 2013. s. 371-76.
11. **Travis W.D., Brambilla E., Müller-Hermelink K.H., Harris C.C.** *WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart.* Lyon : IARC Press, 2004.
12. **Travis W.D., Brambilla E., Noguchi M. et al.** Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification. *Arch Pathol Lab Med.* 137, 2013. s. 685-705.
13. **Travis W.D., Brambilla E., Noguchi M. et al.** International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 6, 2011. s. 244-85.
14. **Kadota K., Yeh Y.C., Sima C.S., Rusch V.W., Moreira A.L., Adusumilli P.S., Travis W.D.** The cribriform pattern identifies a subset of acinar predominant tumors with poor prognosis in patients with stage I lung adenocarcinoma: a conceptual proposal to classify cribriform predominant tumors as a distinct histologic subtype. *Mod Pathol.* 27, 2014. s. 690-700.
15. **McLeer-Florin A., Moro-Sibilot D., Melis A. et al.** Dual IHC and FISH testing for ALK gene rearrangement in lung adenocarcinomas in a routine practice: a French study. *J Thorac Oncol.* 2012. s. 348-54.
16. **Lau S.K., Desrochers M.J., Luthringer D.J.** Expression of thyroid transcription factor-1, cytokeratin 7, and cytokeratin 20 in bronchioloalveolar carcinomas: an immunohistochemical evaluation of 67 cases. *Mod Pathol.* 15, 2002. s. 538-42.

17. **Tsuta K., Ishii G., Nitadori J., Murata Y., Kodama T., Nagai K., Ochiai A.** Comparison of the immunophenotypes of signet-ring cell carcinoma, solid adenocarcinoma with mucin production, and mucinous bronchioloalveolar carcinoma of the lung characterized by the presence of cytoplasmic mucin. *J Pathol.* 209, 2006. s. 78-87.
18. **Wu J., Chu P.G., Jiang Z., Lau S.K.** Napsin A expression in primary mucin-producing adenocarcinomas of the lung: an immunohistochemical study. *Am J Clin Pathol.* 139, 2013. s. 160-66.
19. **Sugano M., Nagasaka T., Sasaki E. et al.** HNF4 $\alpha$  as a marker for invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol.* 37, 2013. s. 211-18.
20. **Nakatani Y., Kitamura H., Inayama Y.** Pulmonary adenocarcinomas of the fetal lung type: a clinicopathologic study indicating differences in histology, epidemiology, and natural history of low-grade and high-grade forms. *Am J Surg Pathol.* 22, 1998. s. 399-411.
21. **Nakatani Y., Masudo K., Miyagi Y. et al.** Aberrant nuclear localization and gene mutation of beta-catenin in low-grade adenocarcinoma of fetal lung type: up-regulation of the Wnt signaling pathway may be a common denominator for the development of tumors that form morules. *Mod Pathol.* 15, 2002. s. 617-24.
22. **Nakatani Y., Masudo K., Nozawa A. et al.** Biotin-rich, optically clear nuclei express estrogen receptor-beta: tumors with morules may develop under the influence of estrogen and aberrant beta-catenin expression. *Hum Pathol.* 35, 2004. s. 869-74.
23. **Nakatani Y., Miyagi Y., Takemura T. et al.** Aberrant nuclear/cytoplasmic localization and gene mutation of beta-catenin in classic pulmonary blastoma: beta-catenin immunostaining is useful for distinguishing between classic pulmonary blastoma and a blastomatoid variant of carcinosarcoma. *Am J Surg Pathol.* 28, 2004. s. 921-27.
24. **Morita S., Yoshida A., Goto A. et al.** High-grade lung adenocarcinoma with fetal lung-like morphology: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular analyses of 17 cases. *Am J Surg Pathol.* 37, 2013. s. 924-32.

25. **László T., Lacza A., Tóth D., Molnár T.F., Kálmán E.** Pulmonary enteric adenocarcinoma indistinguishable morphologically and immunohistologically from metastatic colorectal carcinoma. *Histopathology*. 2014. s. 283-87.
26. **Inamura K., Satoh Y., Okumura S., Nakagawa K., Tsuchiya E., Fukayama M., Ishikawa Y.** Pulmonary adenocarcinomas with enteric differentiation: histologic and immunohistochemical characteristics compared with metastatic colorectal cancers and usual pulmonary adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2005. s. 660-65.
27. **Wang C.X., Liu B., Wang Y.F. et al.** Pulmonary enteric adenocarcinoma: a study of the clinicopathologic and molecular status of nine cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014. s. 1266-74.
28. **Yousem S.A.** Pulmonary intestinal-type adenocarcinoma does not show enteric differentiation by immunohistochemical study. *Mod Pathol*. 2005. s. 816-21.
29. **Yoshida A., Tsuta K., Watanabe S. et al.** Frequent ALK rearrangement and TTF-1/p63 co-expression in lung adenocarcinoma with signet-ring cell component. *Lung Cancer*. 2011. s. 309-15.
30. **Borczuk A.C., Qian F., Kazeros A. et al.** Invasive size is an independent predictor of survival in pulmonary adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2009. s. 462-69.
31. **Maeshima A.M., Tochigi N., Yoshida A., Asamura H., Tsuta K., Tsuda H.** Histological scoring for small lung adenocarcinomas 2 cm or less in diameter: a reliable prognostic indicator. *J Thorac Oncol*. 2010. s. 333-39.
32. **Yim J., Zhu L.C., Chiriboga L., Watson H.N., Goldberg J.D., Moreira A.L.** Histologic features are important prognostic indicators in early stages lung adenocarcinomas. *Mod Pathol*. 2007. s. 233-41.
33. **Yoshizawa A., Motoi N., Riely G.J. et al.** Impact of proposed IASLC/ATS/ERS classification of lung adenocarcinoma: prognostic subgroups and implications for further revision of staging based on analysis of 514 stage I cases. *Mod Pathol*. 2011. s. 653-64.

34. **Suzuki K., Yokose T., Yoshida J., Nishimura M., Takahashi K., Nagai K., Nishiwaki Y.** Prognostic significance of the size of central fibrosis in peripheral adenocarcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg.* 2000. s. 893-97.
35. **Kadota K., Villena-Vargas J., Yoshizawa A. et al.** Prognostic significance of adenocarcinoma in situ, minimally invasive adenocarcinoma, and nonmucinous lepidic predominant invasive adenocarcinoma of the lung in patients with stage I disease. *Am J Surg Pathol.* 2014. s. 448-60.
36. **Aviel-Ronen S., Coe B.P., Lau S.K. et al.** Genomic markers for malignant progression in pulmonary adenocarcinoma with bronchioloalveolar features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. s. 10155-60.
37. **Borcuk A.C., Kim H.K., Yegen H.A., Friedman R.A., Powell C.A.** Lung adenocarcinoma global profiling identifies type II transforming growth factor-beta receptor as a repressor of invasiveness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005. s. 729-37.
38. **Sholl L.M., Yeap B.Y., Iafrate A.J. et al.** Lung adenocarcinoma with EGFR amplification has distinct clinicopathologic and molecular features in never-smokers. *Cancer Res.* 2009. s. 8341-48.
39. **Soh J., Toyooka S., Ichihara S. et al.** Sequential molecular changes during multistage pathogenesis of small peripheral adenocarcinomas of the lung. *J Thorac Oncol.* 2008. s. 340-47.
40. **Yatabe Y., Takahashi T., Mitsudomi T.** Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. *Cancer Res.* 2008. s. 2106-11.
41. **Minami Y., Matsuno Y., Iijima T., Morishita Y., Onizuka M., Sakakibara Y., Noguchi M.** Prognostication of small-sized primary pulmonary adenocarcinomas by histopathological and karyometric analysis. *Lung Cancer.* 2005. s. 339-48.
42. **Kitamura H., Kameda Y., Ito T. et al.** Cytodifferentiation of atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar lung carcinoma: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Virchows Arch.* 1997. s. 415-24.



43. **Kitamura H., Kameda Y., Ito T., Hayashi H.** Atypical adenomatous hyperplasia of the lung. Implications for the pathogenesis of peripheral lung adenocarcinoma. *Am J Clin Pathol.* 1999. s. 610-22.
44. **Mori M., Rao S.K., Popper H.H., Cagle P.T., Fraire A.E.** Atypical adenomatous hyperplasia of the lung: a probable forerunner in the development of adenocarcinoma of the lung. *Mod Pathol.* 2001. s. 72-84.
45. **Nakanishi K.** Alveolar epithelial hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 1990. s. 363-68.
46. **Noguchi M., Morikawa A., Kawasaki M. et al.** Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer.* 1995. s. 2844-52.
47. **Sterner D.J., Mori M., Roggli V.L., Fraire A.E.** Prevalence of pulmonary atypical alveolar cell hyperplasia in an autopsy population: a study of 100 cases. *Mod Pathol.* 1997. s. 469-73.
48. **Yokose T., Ito Y., Ochiai A.** High prevalence of atypical adenomatous hyperplasia of the lung in autopsy specimens from elderly patients with malignant neoplasms. *Lung Cancer.* 2000. s. 125-30.
49. **Chapman A.D., Kerr K.M.** The association between atypical adenomatous hyperplasia and primary lung cancer. *Br J Cancer.* 2000. s. 632-36.
50. **Van Schil P.E., Asamura H., Rusch V.W., Mitsudomi T., Tsuboi M., Brambilla E., Travis W.D.** Surgical implications of the new IASLC/ATS/ERS adenocarcinoma classification. *Eur Respir J.* 2012. s. 478-86.
51. **Nakayama H., Noguchi M., Tsuchiya R., Kodama T., Shimosato Y.** Clonal growth of atypical adenomatous hyperplasia of the lung: cytofluorometric analysis of nuclear DNA content. *Mod Pathol.* 1990. s. 314-20.
52. **Niho S., Yokose T., Suzuki K., Kodama T., Nishiwaki Y., Mukai K.** Monoclonality of atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Am J Pathol.* 1999. s. 249-54.

53. **Sakamoto H., Shimizu J., Horio Y., Ueda R., Takahashi T., Mitsudomi T., Yatabe Y.** Disproportionate representation of KRAS gene mutation in atypical adenomatous hyperplasia, but even distribution of EGFR gene mutation from preinvasive to invasive adenocarcinomas. *J Pathol.* 2007. s. 287-94.
54. **Takamochi K., Ogura T., Suzuki K. et al.** Loss of heterozygosity on chromosomes 9q and 16p in atypical adenomatous hyperplasia concomitant with adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol.* 2001. s. 1941-48.
55. **Yoshida Y., Shibata T., Kokubu A.** Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Lung Cancer.* 2005. s. 1-8.
56. **Yoshizawa A., Sumiyoshi S., Sonobe M. et al.** Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *J Thorac Oncol.* 2013. s. 52-61.
57. **Rekhtman N., Ang D.C., Sima C.S., Travis W.D., Moreira A.L.** Immunohistochemical algorithm for differentiation of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma based on large series of whole-tissue sections with validation in small specimens. *Mod Pathol.* 24, 2011. s. 1348-59.
58. **Stenhouse G., Fyfe N., King G., Chapman A., Kerr K.M.** Thyroid transcription factor 1 in pulmonary adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 57, 2004. s. 383-87.
59. **Kadota K., Nitadori J., Sarkaria I.S. et al.** Thyroid transcription factor-1 expression is an independent predictor of recurrence and correlates with the IASLC/ATS/ERS histologic classification in patients with stage I lung adenocarcinoma. *Cancer.* 119, 2013. s. 931-38.
60. **Yatabe Y., Kosaka T., Takahashi T., Mitsudomi T.** EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol.* 29, 2005. s. 633-39.
61. **Ordóñez N.G.** A word of caution regarding napsin A expression in squamous cell carcinomas of the lung. *Am J Surg Pathol.* 36, 2012. s. 396-401.

62. **Skirnisdottir I., Bjersand K., Akerud H., Seidal T.** Napsin A as a marker of clear cell ovarian carcinoma. *BMC Cancer*. 2013. s. 524.
63. **Fadare O., Desouki M.M., Gwin K. et al.** Frequent expression of napsin A in clear cell carcinoma of the endometrium: potential diagnostic utility. *Am J Surg Pathol*. 2014. s. 189-96.
64. **Yamashita Y., Nagasaka T., Naiki-Ito A. et al.** Napsin A is a specific marker for ovarian clear cell adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2015. s. 111-117.
65. **Iwamoto M., Nakatani Y., Fugo K., Kishimoto T., Kiyokawa T.** Napsin A is frequently expressed in clear cell carcinoma of the ovary and endometrium. *Hum Pathol*. 2015. s. 957-62.
66. **Bishop J.A., Teruya-Feldstein J., Westra W.H., Pelosi G., Travis W.D., Rekhtman N.** p40 ( $\Delta$ Np63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol*. 25, 2012. s. 405-15.
67. **Nonaka D.** A study of  $\Delta$ Np63 expression in lung non-small cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 36, 2012. s. 895-99.
68. **Girard N., Deshpande C., Lau C., Finley D., Rusch V., Pao W., Travis W.D.** Comprehensive histologic assessment helps to differentiate multiple lung primary nonsmall cell carcinomas from metastases. *Am J Surg Pathol*. 2009. s. 1752-64.
69. **Ahmad I., Singh L.B., Foth M. et al.** K-Ras and  $\beta$ -catenin mutations cooperate with Fgfr3 mutations in mice to promote tumorigenesis in the skin and lung, but not in the bladder. *Dis Model Mech*. 2011. s. 548-55.
70. **Chung J.H., Choe G., Jheon S. et al.** Epidermal growth factor receptor mutation and pathologic-radiologic correlation between multiple lung nodules with ground-glass opacity differentiates multicentric origin from intrapulmonary spread. *J Thorac Oncol*. 2009. s. 1490-95.
71. **Girard N., Ostrovnya I., Lau C. et al.** Genomic and mutational profiling to assess clonal relationships between multiple non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2009. s. 5184-90.

72. **Disibio G., French S.W.** Metastatic patterns of cancers: results from a large autopsy study. *Arch Pathol Lab Med.* 2008. s. 931-39.
73. **Dursun A.B., Demirag F., Bayiz H., Sertkaya D.** Endobronchial metastases: a clinicopathological analysis. *Respirology.* 2005. s. 510-14.
74. **Kycler W., Laski P.** Surgical approach to pulmonary metastases from breast cancer. *Breast J.* 2012. s. 52-57.
75. **Sørensen J.B.** Endobronchial metastases from extrapulmonary solid tumors. *Acta Oncol.* 2004. s. 73-79.
76. **Watanabe K., Saito N., Sugito M., Ito M., Kobayashi A., Nishizawa Y.** Incidence and predictive factors for pulmonary metastases after curative resection of colon cancer. *Ann Surg Oncol.* 2013. s. 1374-80.
77. **Davis S.D.** CT evaluation for pulmonary metastases in patients with extrathoracic malignancy. *Radiology.* 1991. s. 1-12.
78. **Hirakata K., Nakata H., Nakagawa T.** CT of pulmonary metastases with pathological correlation. *Semin Ultrasound CT MR.* 1995. s. 379-94.
79. **Seo J.B., Im J.G., Goo J.M., Chung M.J., Kim M.Y.** Atypical pulmonary metastases: spectrum of radiologic findings. *Radiographics.* 2001. s. 403-17.
80. **Chu P., Wu E., Weiss L.M.** Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 expression in epithelial neoplasms: a survey of 435 cases. *Mod Pathol.* 2000. s. 962-72.
81. **Jagirdar J.** Application of immunohistochemistry to the diagnosis of primary and metastatic carcinoma to the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 2008. s. 384-96.
82. **Mukhopadhyay S., Katzenstein A.L.** Subclassification of non-small cell lung carcinomas lacking morphologic differentiation on biopsy specimens: Utility of an immunohistochemical panel containing TTF-1, napsin A, p63, and CK5/6. *Am J Surg Pathol.* 2011. s. 15-25.
83. **Barbareschi M., Murer B., Colby T.V., Chilosi M., Macri E., Loda M., Doglioni C.** CDX-2 homeobox gene expression is a reliable marker of colorectal adenocarcinoma metastases to the lungs. *Am J Surg Pathol.* 2003. s. 141-49.

84. **Pertschuk L.P., Kim D.S., Nayer K. et al.** Immunocytochemical estrogen and progesterin receptor assays in breast cancer with monoclonal antibodies. Histopathologic, demographic, and biochemical correlations and relationship to endocrine response and survival. *Cancer*. 1990. s. 1663-70.
85. **Yang M., Nonaka D.** A study of immunohistochemical differential expression in pulmonary and mammary carcinomas. *Mod Pathol*. 2010. s. 654-61.
86. **Downes M.R., Torlakovic E.E., Aldaoud N., Zlotta A.R., Evans A.J., van der Kwast T.H.** Diagnostic utility of androgen receptor expression in discriminating poorly differentiated urothelial and prostate carcinoma. *J Clin Pathol*. 2013. s. 779-86.
87. **Sheridan T., Herawi M., Epstein J.I., Illei P.B.** The role of P501S and PSA in the diagnosis of metastatic adenocarcinoma of the prostate. *Am J Surg Pathol*. 2007. s. 1351-55.
88. **Wright G.L. Jr, Haley C., Beckett M.L., Schellhammer P.F.** Expression of prostate-specific membrane antigen in normal, benign, and malignant prostate tissues. *Urol Oncol*. 1995. s. 18-28.
89. **Pan C.C., Chen P.C., Chiang H.** KIT (CD117) is frequently overexpressed in thymic carcinomas but is absent in thymomas. *J Pathol*. 2004. s. 375-81.
90. **Pan C.C., Chen P.C., Chou T.Y., Chiang H.** Expression of calretinin and other mesothelioma-related markers in thymic carcinoma and thymoma. *Hum Pathol*. 2003. s. 1155-62.
91. **Weissferdt A., Moran C.A.** Pax8 expression in thymic epithelial neoplasms: an immunohistochemical analysis. *Am J Surg Pathol*. 2011. s. 1305-10.
92. **Chang A., Amin A., Gabrielson E., Illei P., Roden R.B., Sharma R., Epstein J.I.** Utility of GATA3 immunohistochemistry in differentiating urothelial carcinoma from prostate adenocarcinoma and squamous cell carcinomas of the uterine cervix, anus, and lung. *Am J Surg Pathol*. 2012. s. 1472-76.

93. **Gruver A.M., Amin M.B., Luthringer D.J. et al.** Selective immunohistochemical markers to distinguish between metastatic high-grade urothelial carcinoma and primary poorly differentiated invasive squamous cell carcinoma of the lung. *Arch Pathol Lab Med.* 2012. s. 1339-46.
94. **Gulmann C., Paner G.P., Parakh R.S. et al.** Immunohistochemical profile to distinguish urothelial from squamous differentiation in carcinomas of urothelial tract. *Hum Pathol.* 2013. s. 164-72.
95. **Hoang L.L., Tacha D.E., Qi W. et al.** A newly developed uroplakin II antibody with increased sensitivity in urothelial carcinoma of the bladder. *Arch Pathol Lab Med.* 2014. s. 943-49.
96. **Mei K., Liu A., Allan R.W. et al.** Diagnostic utility of SALL4 in primary germ cell tumors of the central nervous system: a study of 77 cases. *Mod Pathol.* 2009. s. 1628-36.
97. **Niehans G.A., Manivel J.C., Copland G.T., Scheithauer B.W., Wick M.R.** Immunohistochemistry of germ cell and trophoblastic neoplasms. *Cancer.* 1988. s. 1113-23.
98. **Pallesen G., Hamilton-Dutoit S.J.** Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal carcinoma. *Am J Pathol.* 1988. s. 446-50.
99. **Chu P.G., Schwarz R.E., Lau S.K., Yen Y., Weiss L.M.** Immunohistochemical staining in the diagnosis of pancreatobiliary and ampulla of Vater adenocarcinoma: application of CDX2, CK17, MUC1, and MUC2. *Am J Surg Pathol.* 2005. s. 359-67.
100. **Remo A., Zanella C., Pancione M. et al.** Lung metastasis from TTF-1 positive sigmoid adenocarcinoma. pitfalls and management. *Pathologica.* 2013. s. 69-72.
101. **Cha M.J., Lee H.Y., Lee K.S., Jeong J.Y., Han J., Shim Y.M., Hwang H.S.** Micropapillary and solid subtypes of invasive lung adenocarcinoma: clinical predictors of histopathology and outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2014. s. 921-28.

102. **Warth A., Muley T., Meister M. et al.** The novel histologic International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification system of lung adenocarcinoma is a stage-independent predictor of survival. *J Clin Oncol.* 2012. s. 1438-46.
103. **Nitadori J., Bograd A.J., Kadota K. et al.** Impact of micropapillary histologic subtype in selecting limited resection vs lobectomy for lung adenocarcinoma of 2cm or smaller. *J Natl Cancer Inst.* 2013. s. 1212-20.
104. **Flieder D.B.** Screen-detected adenocarcinoma of the lung. Practical points for surgical pathologists. *Am J Clin Pathol.* 2003. s. 39-57.
105. **Xu C.H., Wang W., Wei Y. et al.** Prognostic value of the new International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society classification in stage IB lung adenocarcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2015. s. 1430-36.
106. **Molina J.R. Yang P., Cassivi S.D., Schild S.E., Adjei A.A.** Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008. s. 584-94.
107. **Guo H.R., Wang N.S., Hu H., Monson R.R.** Cell type specificity of lung cancer associated with arsenic ingestion. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004. s. 638-43.
108. **Huang H.H., Huang J.Y., Lung C.C. et al.** Cell-type specificity of lung cancer associated with low-dose soil heavy metal contamination in Taiwan: an ecological study. *BMC Public Health.* 2013. doi: 10.1186/1471-2458-13-330 .
109. **Martinez V.D., Buys T.P., Adonis M.** Arsenic-related DNA copy-number alterations in lung squamous cell carcinomas. *Br J Cancer.* 2010. s. 1277-83.
110. **Taeger D., Johnen G., Wiethage T. et al.** Major histopathological patterns of lung cancer related to arsenic exposure in German uranium miners. *Int Arch Occup Environ Health.* 2009. s. 867-75.
111. **Klein F., Amin Kotb W.F., Petersen I.** Incidence of human papilloma virus in lung cancer. *Lung Cancer.* 2009. s. 13-18.

112. **Srinivasan M., Taioli E., Ragin C.C.** Human papillomavirus type 16 and 18 in primary lung cancers--a meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2009. s. 1722-28.
113. **Bishop J.A., Ogawa T., Chang X., Illei P.B., Gabrielson E., Pai S.I., Westra W.H.** HPV analysis in distinguishing second primary tumors from lung metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2012. s. 142-48.
114. **Koshiol J., Rotunno M., Gillison M.L. et al.** Assessment of human papillomavirus in lung tumor tissue. *J Natl Cancer Inst*. 2011. s. 501-507.
115. **van Boerdonk R.A., Daniels J.M., Bloemena E. et al.** High-risk human papillomavirus-positive lung cancer: molecular evidence for a pattern of pulmonary metastasis. *J Thorac Oncol*. 2013. s. 711-18.
116. **Yanagawa N., Wang A., Kohler D. et al.** Human papilloma virus genome is rare in North American non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer*. 2013. s. 215-20.
117. **Devesa S.S., Bray F., Vizcaino A.P., Parkin D.M.** International lung cancer trends by histologic type: male:female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *Int J Cancer*. 2005. s. 294-99.
118. **Pesch B., Kendzia B., Gustavsson P. et al.** Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer*. 2012. s. 1210-19.
119. **Wen J., Fu J.H., Zhang W., Guo M.** Lung carcinoma signaling pathways activated by smoking. *Chin J Cancer*. 2011. s. 551-58.
120. **Houghton A.M.** Mechanistic links between COPD and lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013. s. 233-45.
121. **Rosenberger A., Bickebölller H., McCormack V. et al.** Asthma and lung cancer risk: a systematic investigation by the International Lung Cancer Consortium. *Carcinogenesis*. 2012. s. 587-97.



122. **Norkowski E., Ghigna M.R., Lacroix L. et al.** Small-cell carcinoma in the setting of pulmonary adenocarcinoma: new insights in the era of molecular pathology. *J Thorac Oncol.* 2013. s. 1265-71.
123. **Pesatori A.C., Carugno M., Consonni D. et al.** Hormone use and risk for lung cancer: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium (ILCCO). *Br J Cancer.* 2013. s. 1954-64.
124. **Travis W.D.** Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann Oncol.* 2010. s. 65-71.
125. **Planchard D., Le Péchoux C.** Small cell lung cancer: new clinical recommendations and current status of biomarker assessment. *Eur J Cancer.* 2011. s. 272-83.
126. **Svensson G., Ewers S.B., Ohlsson O., Olsson H.** Prognostic factors in lung cancer in a defined geographical area over two decades with a special emphasis on gender. *Clin Respir J.* 2013. s. 91-100.
127. **Jhun B.W., Lee K.J., Jeon K. et al.** Clinical applicability of staging small cell lung cancer according to the seventh edition of the TNM staging system. *Lung Cancer.* 2013. s. 65-70.
128. **Righi L., Volante M., Tavaglione V. et al.** Somatostatin receptor tissue distribution in lung neuroendocrine tumours: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 218 'clinically aggressive' cases. *Ann Oncol.* 2010. s. 548-55.
129. **Rindi G., Klersy C., Inzani F. et al.** Grading the neuroendocrine tumors of the lung: an evidence-based proposal. *Endocr Relat Cancer.* 2013. s. 1-16.
130. **Travis W.D., Rush W., Flieder D.B., Falk R., Fleming M.V., Gal A.A., Koss M.N.** Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol.* 1998. s. 934-44.

131. **Travis W.D.** Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2012. s. 18-30.
132. **Park K.S., Liang M.C., Raiser D.M. et al.** Characterization of the cell of origin for small cell lung cancer. *Cell Cycle.* 2011. s. 2806-15.
133. **Sutherland K.D., Proost N., Brouns I., Adriaensen D., Song J.Y., Berns A.** Cell of origin of small cell lung cancer: inactivation of Trp53 and Rb1 in distinct cell types of adult mouse lung. *Cancer Cell.* 2011. s. 754-64.
134. **Ab' Saber A.M., Massoni Neto L.M., Bianchi C.P. et al.** Neuroendocrine and biologic features of primary tumors and tissue in pulmonary large cell carcinomas. *Ann Thorac Surg.* 2004. s. 1883-90.
135. **Travis W.D., Travis L.B., Devesa S.S.** Lung cancer. *Cancer.* 1995. s. 191-202.
136. **Pardo J., Martinez-Peñuela A.M., Sola J.J., Panizo A., Gúrpide A., Martinez-Peñuela J.M., Lozano M.D.** Large cell carcinoma of the lung: an endangered species? *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009. s. 383-92.
137. **Rekhtman N., Tafe L.J., Chaft J.E. et al.** Distinct profile of driver mutations and clinical features in immunomarker-defined subsets of pulmonary large-cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2013. s. 511-22.
138. **Rossi G., Mengoli M.C., Cavazza A. et al.** Large cell carcinoma of the lung: clinically oriented classification integrating immunohistochemistry and molecular biology. *Virchows Arch.* 2014. s. 61-68.
139. **Barbareschi M., Cantaloni C., Del Vescovo V. et al.** Heterogeneity of large cell carcinoma of the lung: an immunophenotypic and miRNA-based analysis. *Am J Clin Pathol.* 2011. s. 773-82.
140. **Hwang D.H., Szeto D.P., Perry A.S., Bruce J.L., Sholl L.M.** Pulmonary large cell carcinoma lacking squamous differentiation is clinicopathologically indistinguishable from solid-subtype adenocarcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2014. s. 626-35.

141. **da Cunha Santos G., Lai S.W., Saiegh M.A. et al.** Cyto-histologic agreement in pathologic subtyping of non small cell lung carcinoma: review of 602 fine needle aspirates with follow-up surgical specimens over a nine year period and analysis of factors underlying failure to subtype. *Lung Cancer*. 2012. s. 501-06.
142. **Zhu C.Q., Shih W., Ling C.H., Tsao M.S.** Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol*. 2006. s. 790-800.
143. **Kanters S.D., Lammers J.W., Voest E.E.** Molecular and biological factors in the prognosis of non-small cell lung cancer. *Eur Respir J*. 1995. s. 1389-97.
144. **Thunnissen E., van der Oord K., den Bakker M.** Prognostic and predictive biomarkers in lung cancer. A review. *Virchows Arch*. 2014. s. 347-58.
145. **van Meerbeeck J.P., Fennell D.A., De Ruyscher D.K.** Small-cell lung cancer. *Lancet*. 2011. s. 1741-55.
146. **Scagliotti G.V., Parikh P., von Pawel J. et al.** Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008. s. 3543-51.
147. **Vansteenkiste J., De Ruyscher D., Eberhardt W.E. et al.** Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2013. s. 89-98.
148. **Semenova E.A., Nage R.I, Berns A.** Origins, genetic landscape, and emerging therapies of small cell lung cancer. *Genes Dev*. 2015. s. 1447-62.
149. **Koudelakova V., Kneblova M., Trojanec R., Drabek J., Hajduch M.** Non-small cell lung cancer--genetic predictors. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2013. s. 125-36.
150. **Huang S.M., Harari P.M.** Epidermal growth factor receptor inhibition in cancer therapy: biology, rationale and preliminary clinical results. *Invest New Drugs*. 1999. s. 259-69.

151. **Hirsch F.R., Varella-Garcia M., Bunn P.A. Jr. et al.** Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol.* 2003. s. 3798-807.
152. **Dacic S., Flanagan M., Ciepły K., Ramalingam S., Luketich J., Belani C., Yousem S.A.** Significance of EGFR protein expression and gene amplification in non-small cell lung carcinoma. *Am J Clin Pathol.* 2006. s. 860-65.
153. **Li A.R., Chitale D., Riely G.J. et al.** EGFR mutations in lung adenocarcinomas: clinical testing experience and relationship to EGFR gene copy number and immunohistochemical expression. *J Mol Diagn.* 2008. s. 242-48.
154. **Gazdar A.F.** Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene.* 2009. s. 24-31.
155. **Meert A.P., Martin B., Delmotte P. et al.** The role of EGF-R expression on patient survival in lung cancer: a systematic review with meta-analysis. *Eur Respir J.* 2002. s. 975-81.
156. **Nakamura H., Kawasaki N., Taguchi M., Kabasawa K.** Survival impact of epidermal growth factor receptor overexpression in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Thorax.* 2006. s.140-45.
157. **Genova C., Hirsch F.R.** Clinical potential of necitumumab in non-small cell lung carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2016. s. 5427-37.
158. **Cappuzzo F., Hirsch F.R., Rossi E. et al.** Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005. s. 643-55.
159. **Cappuzzo F., Ligorio C., Jänne P.A. et al.** Prospective study of gefitinib in epidermal growth factor receptor fluorescence in situ hybridization-positive/phospho-Akt-positive or never smoker patients with advanced non-small-cell lung cancer: the ONCOBELL trial. *J Clin Oncol.* 2007. s. 2248-55.

160. **Hirsch F.R., Varella-Garcia M., Bunn P.A. Jr. et al.** Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2006. s. 5034-42.
161. **Zhu C.Q., da Cunha Santos G., Ding K. et al.** Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol.* 2008. s. 4268-75.
162. **Brugger W., Triller N., Blasinska-Morawiec M. et al.** Prospective molecular marker analyses of EGFR and KRAS from a randomized, placebo-controlled study of erlotinib maintenance therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011. s. 4113-20.
163. **Hirsch F.R., Kabbinar F., Eisen T. et al.** A randomized, phase II, biomarker-selected study comparing erlotinib to erlotinib intercalated with chemotherapy in first-line therapy for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2011. s. 3567-73.
164. **Dahabreh I.J., Linardou H., Kosmidis P., Bafaloukos D., Murray S.** EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2011. s. 545-52.
165. **Morinaga R., Okamoto I., Fujita Y. et al.** Association of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations with EGFR amplification in advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2008. s. 2455-60.
166. **Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R. et al.** Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004. s. 2129-39.
167. **Paez J.G., Jänne P.A., Lee J.C. et al.** EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science.* 2004. s. 1497-500.
168. **Kosaka T., Yamaki E., Mogi A., Kuwano H.** Mechanisms of resistance to EGFR TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011. ID 165214.

169. **Lee C.K., Brown C., Gralla R.J. et al.** Impact of EGFR inhibitor in non-small cell lung cancer on progression-free and overall survival: a meta-analysis. *J Natl Cancer Inst.* 2013. s. 595-605.
170. **Nguyen K.S., Kobayashi S., Costa D.B.** Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway. *Clin Lung Cancer.* 2009. s. 281-89.
171. **Kobayashi S., Boggon T.J., Dayaram T. et al.** EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2005. s. 786-92.
172. **Pao W., Miller V.A., Politi K.A. et al.** Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med.* 2005. e. 73.
173. **Sequist L.V., Martins R.G., Spigel D. et al.** First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 2008. s. 2442-49.
174. **Mok T.S., Wu Y.L., Thongprasert S. et al.** Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009. s. 947-57.
175. **Rosell R., Molina M.A., Costa C. et al.** Pretreatment EGFR T790M mutation and BRCA1 mRNA expression in erlotinib-treated advanced non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations. *Clin Cancer Res.* 2011. s. 1160-68.
176. **Kosaka T., Yamaki E., Mogi A., Kuwano H.** Mechanisms of resistance to EGFR TKIs and development of a new generation of drugs in non-small-cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011. ID 165214.
177. **Balak M.N., Gong Y., Riely G.J. et al.** Novel D761Y and common secondary T790M mutations in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas with acquired resistance to kinase inhibitors. *Clin Cancer Res.* 2006. s. 6494-501.
178. **Kosaka T., Yatabe Y., Endoh H. et al.** Analysis of epidermal growth factor receptor gene mutation in patients with non-small cell lung cancer and acquired resistance to gefitinib. *Clin Cancer Res.* 2006. s. 5764-69.

179. **Yun C.H., Mengwasser K.E., Toms A.V. et al.** The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008. s. 2070-75.
180. **Gahr S., Stoehr R., Geissinger E. et al.** EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. *Br J Cancer.* 2013. s. 1821-28.
181. **Dearden S., Stevens J., Wu Y.L., Blowers D.** Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Ann Oncol.* 2013. s. 2371-76.
182. **Brevet M., Arcila M., Ladanyi M.** Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR. *J Mol Diagn.* 2010. s. 169-76.
183. **Yu J., Kane S., Wu J. et al.** Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non-small-cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009. s. 3023-28.
184. **Simonetti S., Molina M.A., Queralt C. et al.** Detection of EGFR mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer. *J Transl Med.* 2010. s. 135.
185. **Gu T.L., Deng X., Huang F. et al.** Survey of tyrosine kinase signaling reveals ROS kinase fusions in human cholangiocarcinoma. *PLoS One.* 2011. ID 15640.
186. **Takeuchi K., Soda M., Togashi Y. et al.** RET, ROS1 and ALK fusions in lung cancer. *Nat Med.* 2012. s. 378-81.
187. **Kim H.R., Lim S.M., Kim H.J. et al.** The frequency and impact of ROS1 rearrangement on clinical outcomes in never smokers with lung adenocarcinoma. *Ann Oncol.* 2013. s. 2364-70.
188. **Bergethon K., Shaw A.T., Ou S.H. et al.** ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012. s. 863-70.
189. **Yoshida A., Kohno T., Tsuta K. et al.** ROS1-rearranged lung cancer: a clinicopathologic and molecular study of 15 surgical cases. *Am J Surg Pathol.* 2013. s. 554-62.

190. **Cai W., Li X., Su C. et al.** ROS1 fusions in Chinese patients with non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2013. s. 1822-27.
191. **Rimkunas V.M., Crosby K.E., Li D. et al.** Analysis of receptor tyrosine kinase ROS1-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a FIG-ROS1 fusion. *Clin Cancer Res.* 2012. s. 4449-57.
192. **Rikova K., Guo A., Zeng Q. et al.** Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell.* 2007. s. 1190-203.
193. **Matsuura S., Shimura K., Kamo T. et al.** CD74-ROS1 fusion transcripts in resected non-small cell lung carcinoma. *Oncol Rep.* 2013. s. 1675-80.
194. **Wu J., Lin Y., He X. et al.** Comparison of detection methods and follow-up study on the tyrosine kinase inhibitors therapy in non-small cell lung cancer patients with ROS1 fusion rearrangement. *BMC Cancer.* 2016. s. 599.
195. **Riess J.W., Padda S.K., Bangs C.D. et al.** A case series of lengthy progression-free survival with pemetrexed-containing therapy in metastatic non--small-cell lung cancer patients harboring ROS1 gene rearrangements. *Clin Lung Cancer.* 2013. s. 592-95.
196. **Awad M.M., Katayama R., McTigue M. et. al.** Acquired resistance to crizotinib from a mutation in CD74-ROS1. *N Engl J Med.* 2013. s. 2395-401.
197. **Riely G.J., Kris M.G., Rosenbaum D. et al.** Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2008. s. 5731-34.
198. **Tam I.Y., Chung L.P., Suen W.S. et al.** Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clin Cancer Res.* 2006. s. 1647-53.
199. **Mao C., Qiu L.X., Liao R.Y. et al.** KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies. *Lung Cancer.* 2010. s. 272-78.



200. **Marks J.L., Broderick S., Zhou Q. et al.** Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2008. s. 111-16.
201. **Mascaux C., Iannino N., Martin B. et al.** The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2005. s. 131-39.
202. **Kosaka T., Yatabe Y., Onozato R., Kuwano H., Mitsudomi T.** Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2009. s. 22-29.
203. **Cardarella S., Ogino A., Nishino M. et al.** Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2013. s. 4532-40.
204. **Marchetti A., Felicioni L., Malatesta S. et al.** Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer harboring BRAF mutations. *J Clin Oncol.* 2011. s. 3574-79.
205. **Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002. s. 949-54.
206. **Sasaki H., Shimizu S., Tani Y. et al.** Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E mutation in Japanese lung adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2013. s. 51-54.
207. **Peters S., Michielin O., Zimmermann S.** Dramatic response induced by vemurafenib in a BRAF V600E-mutated lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol.* 2013. e. 341-44.
208. **Dean M., Park M., Le Beau M.M. et al.** The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. *Nature.* 1985. s. 385-88.
209. **Lutterbach B., Zeng Q., Davis L.J. et al.** Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer Res.* 2007. s. 2081-88.

210. **Peruzzi B., Bottaro D.P.** Targeting the c-Met signalling pathway in cancer. *Clin Cancer Res.* 2006. s. 3657-60.
211. **Trusolino L., Bertotti A., Comoglio P.M.** MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010. s. 834-48.
212. **Engelman J.A., Zejnullahu K., Mitsudomi T. et al.** MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science.* 2007. s. 1039-43.
213. **Giordano S., Bardelli A., Zhen Z., Menard S., Ponzetto C., Comoglio P.M.** A point mutation in the MET oncogene abrogates metastasis without affecting transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997. s. 13868-72.
214. **Schmidt L., Duh F.M., Chen F. et al.** Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat Genet.* 1997. s. 68-73.
215. **Go H., Jeon Y.K., Park H.J., Sung S.W., Seo J.W., Chung D.H.** High MET gene copy number leads to shorter survival in patients with non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010. s. 305-13.
216. **Tanaka A., Sueoka-Aragane N., Nakamura T. et al.** Co-existence of positive MET FISH status with EGFR mutations signifies poor prognosis in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer.* 2012. s. 89-94.
217. **Cappuzzo F., Marchetti A., Skokan M. et al.** Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *J Clin Oncol.* 2009. s. 1667-74.
218. **Bean J., Brennan C., Shih J.Y. et al.** MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007. s. 20932-37.
219. **Suda K., Murakami I., Katayama T. et al.** Reciprocal and complementary role of MET amplification and EGFR T790M mutation in acquired resistance to kinase inhibitors in lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2010. s. 5489-98.

220. **Awad M.M., Oxnard G.R., Jackman D.M. et al.** MET exon 14 mutations in non-small-cell lung cancer are associated with advanced age and stage-dependent MET genomic amplification and c-Met overexpression. *J Clin Oncol.* 2016. s. 721-30.
221. **Frampton G.M., Ali S.M., Rosenzweig M. et al.** Activation of MET via diverse exon 14 splicing alterations occurs in multiple tumor types and confers clinical sensitivity to MET inhibitors. *Cancer Discov.* 2015. s. 850-59.
222. **Jenkins R.W., Oxnard G.R., Elkin S., Sullivan E.K., Carter J.L., Barbie D.A.** Response to crizotinib in a patient with lung adenocarcinoma harboring a MET splice site mutation. *Clin Lung Cancer.* 2015. s. 101-04.
223. **Kong-Beltran M., Seshagiri S., Zha J. et al.** Somatic mutations lead to an oncogenic deletion of met in lung cancer. *Cancer Res.* 2006. s. 283-89.
224. **Yakes F.M., Chen J., Tan J. et al.** Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 2011. s. 2298-308.
225. **Paik P.K., Drilon A., Fan P.D. et al.** Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring MET mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discov.* 2015. s. 842-49.
226. **Adjei A.A., Schwartz B., Garmey E.** Early clinical development of ARQ 197, a selective, non-ATP-competitive inhibitor targeting MET tyrosine kinase for the treatment of advanced cancers. *Oncologist.* 2011. s. 788-99.
227. **Surati M., Patel P., Peterson A., Salgia R.** Role of MetMAb (OA-5D5) in c-MET active lung malignancies. *Expert Opin Biol Ther.* 2011. s. 1655-62.
228. **Bellezza G., Del Sordo R., Colella R.** Co-expression of receptors of the HER family correlates with clinical outcome in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Virchows Arch.* 2013. s. 663-71.
229. **Liu L., Shao X., Gao W. et al.** The role of human epidermal growth factor receptor 2 as a prognostic factor in lung cancer: a meta-analysis of published data. *J Thorac Oncol.* 2010. s. 1922-32.

230. **Buttitta F., Barassi F., Fresu G. et al.** Mutational analysis of the HER2 gene in lung tumors from Caucasian patients: mutations are mainly present in adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. *Int J Cancer*. 2006. s. 2586-91.
231. **Arcila M.E., Chaft J.E., Nafa K. et al.** Prevalence, clinicopathologic associations, and molecular spectrum of ERBB2 (HER2) tyrosine kinase mutations in lung adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2012. s. 4910-18.
232. **Mazières J., Peters S., Lepage B. et al.** Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol*. 2013. s. 1997-2003.
233. **Ross H.J., Blumenschein G.R. Jr., Aisner J. et al.** Randomized phase II multicenter trial of two schedules of lapatinib as first- or second-line monotherapy in patients with advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010. s. 1938-49.
234. **Kohno T., Ichikawa H., Totoki Y. et al.** KIF5B-RET fusions in lung adenocarcinoma. *Nat Med*. 2012. s. 375-77.
235. **Suehara Y., Arcila M., Wang L. et al.** Identification of KIF5B-RET and GOPC-ROS1 fusions in lung adenocarcinomas through a comprehensive mRNA-based screen for tyrosine kinase fusions. *Clin Cancer Res*. 2012. s. 6599-608.
236. **Drilon A., Wang L., Hasanovic A. et al.** Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas. *Cancer Discov*. 2013. s. 630-35.
237. **Wang R., Hu H., Pan Y. et al.** RET fusions define a unique molecular and clinicopathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2012. s. 4352-59.
238. **Seo J.S., Ju Y.S., Lee W.C. et al.** The transcriptional landscape and mutational profile of lung adenocarcinoma. *Genome Res*. 2012. s. 2109-19.
239. **Lipson D., Capelletti M., Yelensky R. et al.** Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nat Med*. 2012. s. 382-84.

240. **Weiss J., Sos M.L., Seidel D. et al.** Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med.* 2010. s. 62-93.
241. **Hammerman P.S., Sos M.L., Ramos A.H. et al.** Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discov.* 2011. s. 78-89.
242. **Spoerke J.M., O'Brien C., Huw L. et al.** Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway alterations are associated with histologic subtypes and are predictive of sensitivity to PI3K inhibitors in lung cancer preclinical models. *Clin Cancer Res.* 2012. s. 6771-83.
243. **Heist R.S., Mino-Kenudson M., Sequist L.V. et al.** FGFR1 amplification in squamous cell carcinoma of the lung. *J Thorac Oncol.* 2012. s. 1775-80.
244. **Tran T.N., Selinger C.I., Kohonen-Corish M.R., McCaughan B.C., Kennedy C.W., O'Toole S.A., Cooper W.A.** Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) copy number is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2013. s. 462-67.
245. **Kohler L.H., Mireskandari M., Knösel T. et al.** FGFR1 expression and gene copy numbers in human lung cancer. *Virchows Arch.* 2012. s. 49-57.
246. **Wiesweg M., Ting S., Reis H. et al.** Feasibility of preemptive biomarker profiling for personalised early clinical drug development at a Comprehensive Cancer Center. *Eur J Cancer.* 2013. s. 3076-82.
247. **Ren M., Hong M., Liu G. et al.** Novel FGFR inhibitor ponatinib suppresses the growth of non-small cell lung cancer cells overexpressing FGFR1. *Oncol Rep.* 2013. s. 2181-90.
248. **Khurshid H., Dipetrillo T., Ng T. et al.** A phase I study of dasatinib with concurrent chemoradiation for stage III non-small cell lung cancer. *Front Oncol.* 2012. s. 56.
249. **Oxnard G.R., Binder A., Jänne P.A.** New targetable oncogenes in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2013. s. 1097-104.

250. **Manzo A., Carillio G., Montanino A., Costanzo R., Sandomenico C., Rocco G., Morabito A.** Focus on nintedanib in NSCLC and other tumors. *Front Med.* 2016. doi. 10.3389.
251. **Maione P., Sgambato A., Casaluca F., Sacco P.C., Santabarbara G., Rossi A., Gridelli C.** The role of the antiangiogenetic ramucirumab in the treatment of advanced non small cell lung cancer. *Curr Med Chem.* 2016. v tisku.
252. **Li Y., Li F., Jiang F., Lv X., Zhang R., Lu A., Zhang G.** A mini-review for cancer immunotherapy: molecular understanding of PD-1/PD-L1 pathway & amp; translational blockade of immune checkpoints. *Int J Mol Sci.* 2016. e. 1151.
253. **Hoos A., Ibrahim R., Korman A. et al.** Development of ipilimumab: contribution to a new paradigm for cancer immunotherapy. *Semin Oncol.* 2010. s. 533-46.
254. **Shinohara T., Taniwaki M., Ishida Y., Kawaichi M., Honjo T.** Structure and chromosomal localization of the human PD-1 gene (PDCD1). *Genomics.* 1994. s. 704-06.
255. **Ceeraz S., Nowak E.C., Noelle R.J.** B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends Immunol.* 2013. s. 556-63.
256. **Keir M.E., Butte M.J., Freeman G.J., Sharpe A.H.** PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 2008. s. 677-704.
257. **Francisco L.M., Salinas V.H., Brown K.E., Vanguri V.K., Freeman G.J., Kuchroo V.K., Sharpe A.H.** PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory t cells. *J Exp Med.* 2009. s. 3015-29.
258. **J.L., Riley.** PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev.* 2009. s. 114-25.
259. **Topalian S.L., Drake C.G., Pardoll D.M.** Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell.* 2015. s. 450-61.
260. **He Y.F., Zhang G.M., Wang X.H., Zhang H., Yuan Y., Li D., Feng Z.H.** Blocking programmed death-1 ligand-PD-1 interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine. *J Immunol.* 2004. s. 4919-28.

261. **Latchman Y., Wood C.R., Chernova T. et al.** PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2001. s. 261-68.
262. **Weissman A.M., Hou D., Orloff D.G., Modi W.S., Seunanez H., O'Brien S.J., Klausner R.D.** Molecular cloning and chromosomal localization of the human T-cell receptor zeta chain: distinction from the molecular CD3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988. s. 9709-13.
263. **Chakravarti N., Prieto V.G.** Predictive factors of activity of anti-programmed death-1/programmed death ligand-1 drugs: immunohistochemistry analysis. *Transl Lung Cancer Res.* 2015. s. 743-51.
264. **Butte M.J., Keir M.E., Phamduy T.B., Sharpe A.H., Freeman G.J.** Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 2007. s. 111-22.
265. **Mittendorf E.A., Philips A.V., Meric-Bernstam F. et al.** PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. *Cancer Immunol Res.* 2014. s. 361-70.
266. **Thompson R.H., Gillett M.D., Cheville J.C. et al.** Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. s. 17174-79.
267. **Boland J.M., Kwon E.D., Harrington S.M., Wampfler J.A., Tang H., Yang P., Aubry M.C.** Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung. *Clin Lung Cancer.* 2013. s. 157-63.
268. **Velcheti V., Schalper K.A., Carvajal D.E. et al.** Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest.* 2014. s. 107-16.
269. **Cooper W.A., Tran T., Vilain R.E. et al.** PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma. *Lung Cancer.* 2015. s. 181-88.
270. **Huang Y., Zhang S.D., McCrudden C., Chan K.W., Lin Y., Kwok H.F.** The prognostic significance of PD-L1 in bladder cancer. *Oncol Rep.* 2015. s. 3075-84.

271. **Kakavand H., Vilain R.E., Wilmott J.S.** Tumor PD-L1 expression, immune cell correlates and PD-1+ lymphocytes in sentinel lymph node melanoma metastases. *Mod Pathol.* 2015. s. 1535-44.
272. **Nduom E.K., Wei J., Yaghi N.K. et al.** PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2016. s. 195-205.
273. **Ahmadzadeh M., Johnson L.A., Heemskerk B., Wunderlich J.R., Dudley M.E., White D.E., Rosenberg S.A.** Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood.* 2009. s. 1537-44.
274. **Sfanos K.S., Bruno T.C., Meeker A.K., De Marzo A.M., Isaacs W.B., Drake C.G.** Human prostate-infiltrating CD8+ T lymphocytes are oligoclonal and PD-1+. *Prostate.* 2009. s. 1694-703.
275. **Patel S.P., Kurzrock R.** PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* 2015. s. 847-56.
276. **Kerr K.M., Tsao M.S., Nicholson A.G., Yatabe Y., Wistuba I.I., Hirsch F.R.** Programmed death-ligand 1 immunohistochemistry in lung cancer: in what state is this art? *J Thorac Oncol.* 2015. s. 985-89.
277. **Kim E.K., Kim S.** ALK gene copy number gain and immunohistochemical expression status using three antibodies in neuroblastoma. *Pediatr Dev Pathol.* 2016. v tisku.
278. **Ilie M.I., Bence C., Hofman V. et al.** Discrepancies between FISH and immunohistochemistry for assessment of the ALK status are associated with ALK 'borderline'-positive rearrangements or a high copy number: a potential major issue for anti-ALK therapeutic strategies. *Ann Oncol.* 2015. s. 238-44.
279. **Stein H., Mason D.Y., Gerdes J. et al.** The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue: evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. *Blood.* 1985. s. 848-58.



280. **Rimokh R., Magaud J.P., Berger F., Samarut J., Coiffier B., Germain D., Mason D.Y.** A translocation involving a specific breakpoint (q35) on chromosome 5 is characteristic of anaplastic large cell lymphoma ('Ki-1 lymphoma'). *Br J Haematol.* 1989. s. 31-36.
281. **Morris S.W., Kirstein M.N., Valentine M.B., Dittmer K.G., Shapiro D.N., Saltman D.L., Look A.T.** Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science.* 1994. s. 1281-84.
282. **Shiota M., Nakamura S., Ichinohasama R. et al.** Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity. *Blood.* 1995. s. 1954-60.
283. **Pulford K., Lamant L., Morris S.W. et al.** Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood.* 1997. s. 1394-1404.
284. **Delsol G., Lamant L., Mariamé B. et al.** A new subtype of large B-cell lymphoma expressing the ALK kinase and lacking the 2; 5 translocation. *Blood.* 1997. s. 1483-90.
285. **Mossé Y.P., Laudenslager M., Longo L. et al.** Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature.* 2008. s. 930-35.
286. **Lawrence B., Perez-Atayde A., Hibbard M.K. et al.** TPM3-ALK and TPM4-ALK oncogenes in inflammatory myofibroblastic tumors. *Am J Pathol.* 2000. s. 377-84.
287. **Powers C., Aigner A., Stoica G.E., McDonnell K., Wellstein A.** Pleiotrophin signaling through anaplastic lymphoma kinase is rate-limiting for glioblastoma growth. *J Biol Chem.* 2002. s. 14153-58.
288. **R.S., Tuma.** ALK gene amplified in most inflammatory breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2012. s. 87-88.
289. **Sukov W.R., Hodge J.C., Lohse C.M., Akre M.K., Leibovich B.C., Thompson R.H., Cheville J.C.** ALK alterations in adult renal cell carcinoma: frequency, clinicopathologic features and outcome in a large series of consecutively treated patients. *Mod Pathol.* 2012. s. 1516-25.

290. **Debelenko L.V., Raimondi S.C., Daw N., Shivakumar B.R., Huang D., Nelson M., Bridge J.A.** Renal cell carcinoma with novel VCL-ALK fusion: new representative of ALK-associated tumor spectrum. *Mod Pathol.* 2011. s. 430-42.
291. **Jazii F.R., Najafi Z., Malekzadeh R. et al.** Identification of squamous cell carcinoma associated proteins by proteomics and loss of beta tropomyosin expression in esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 2006. s. 7104-12.
292. **Lin E., Li L., Guan Y. et al.** Exon array profiling detects EML4-ALK fusion in breast, colorectal, and non-small cell lung cancers. *Mol Cancer Res.* 2009. s. 1466-76.
293. **Murugan A.K., Xing M.** Anaplastic thyroid cancers harbor novel oncogenic mutations of the ALK gene. *Cancer Research.* 2011. s. 4403-11.
294. **Soda M., Choi Y.L., Enomoto M.** Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007. s. 561-566.
295. **Iyevleva A.G., Raskin G.A., Tiurin V.I.** Novel ALK fusion partners in lung cancer. *Cancer Lett.* 2015. s. 116-121.
296. **Lira M.E., Kim T.M., Huang D., et al.** Multiplexed gene expression and fusion transcript analysis to detect ALK fusions in lung cancer. *J Mol Diagn.* 2013. s. 51-61.
297. **Choi Y.L., Lira M.E., Hong M., et al.** A novel fusion of TPR and ALK in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2014. s. 563-566.
298. **Hong M., Kim R.N., Song J.Y., et al.** HIP1-ALK, a novel fusion protein identified in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2014. s. 419-422.
299. **Wong D.W., Leung E.L., Wong S.K., et al.** A novel KIF5B-ALK variant in nonsmall cell lung cancer. *Cancer.* 2011. s. 2709-18.
300. **Kwak E.L., Bang Y.J., Camidge D.R.** Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010. s. 1693-1703.
301. **Mazières J., Zalcman G., Crinò L., et al.** Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: results from the EUROS1 cohort. *J Clin Oncol.* 2015. s. 992-99.

302. **Shaw A.T., Ou S.H., Bang Y.J., et al.** Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2014. s. 1963-71.
303. **Toyokawa G., Seto T.** Anaplastic lymphoma kinase rearrangement in lung cancer: its biological and clinical significance. *Respir Investig.* 2014. s. 330-38.
304. **Y.J., Bang.** Treatment of ALK-positive non-small cell lung cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2012. s. 1201-04.
305. **Camidge D.R., Bang Y.J., Kwak E.L.** Activity and safety of crizotinib in patients with ALK-positive non-small-cell lung cancer: updated results from a phase 1 study. *Lancet Oncol.* 2012. s. 1011-19.
306. **Shaw A.T., Yeap B.Y., Solomon B.J.** Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2011. s.1004-12.
307. **Shaw A.T., Kim D.W., Nakagawa K.** Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2013. s. 2385-94.
308. **Solomon B.J., Cappuzzo F., Felip E., et al.** Intracranial efficacy of crizotinib versus chemotherapy in patients with advanced ALK-positive non-small-cell lung cancer: results from PROFILE 1014. *J Clin Oncol.* 2016. s. 2858-65.
309. **Kolek V., Skříčková J., Pešek M., et al.** České zkušenosti s léčbou crizotinibem v kontextu mezinárodních studií a další perspektivy léčby ALK pozitivních nemalobuněčných karcinomů plic. *Lung Cancer News.* 2015. s. 4-8.
310. **Facchinetti F., Tiseo M., Di Maio M., Graziano P., Bria E., Rossi G., Novello S.** Tackling ALK in non-small cell lung cancer: the role of novel inhibitors. *Transl Lung Cancer Res.* 2016. s. 301-21.
311. **Tsao M.S., Hirsch F.R., Yatabe Y.** *IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer.* Aurora : IASLC Press, 2013.
312. **Dundr P., Hornyčová H., Matěj R., Ryška A., Staněk L., Tichý T.** Doporučený postup pro histologické vyšetření karcinomu plic. Společnost českých patologů ČLS JEP, 2013.

313. **Collisson E.A., Campbell J.D., Brooks A.N., et al.** Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*. 2014. s. 543-50.
314. **Chatziandreu I., Tsioli P., Sakellariou S., et al.** Comprehensive molecular analysis of NSCLC; clinicopathological associations. *PLoS One*. 2015. e. 0133859.
315. **Ryška A., Nenutil R.** Doporučený postup pro zpracování a vyšetření bioptických vzorků prsu. Společnost českých patologů ČSL JEP, 2013.
316. **Rüschoff J., Dietel M., Baretton G., et al.** HER2 diagnostics in gastric cancer- guideline validation and development of standardized immunohistochemical testing. *Virchows Arch*. 2010. s. 299-307.
317. **Sholl L.M., Weremowicz S., Gray S.W., et al.** Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol*. 2013. s. 322-28.
318. **Ali G., Proietti A., Pelliccioni S., et al.** ALK rearrangement in a large series of consecutive non-small cell lung cancers: comparison between a new immunohistochemical approach and fluorescence in situ hybridization for the screening of patients eligible for crizotinib treatment. *Arch Pathol Lab Med*. 2014. s. 1449-58.
319. **Tsao M.S, Hirsch F.R., Yatabe Y.** IASLC Atlas of ALK and ROS1 Testing in Lung Cancer. Aurora : IASLC Press, 2016.
320. **Ryška A., Matěj R.** Doporučený postup SČP ČLS JEP pro vyšetření NSCLC – aktualizace algoritmu testování ALK – únor 2016. Společnost českých patologů ČSL JEP, 2016.
321. **Mino-Kenudson M., Chirieac L.R., Law K. et al.** A novel, highly sensitive antibody allows for the routine detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas by standard immunohistochemistry. *Clin Cancer Res*. 2010. s. 1561-71.
322. **Selinger C., Cooper W., Lum T. et al.** Equivocal ALK fluorescence in-situ hybridization (FISH) cases may benefit from ancillary ALK FISH probe testing. *Histopathology*. 2015. s. 654-63.

323. **Lee T., Lee B., Choi Y.L., Han J., Ahn M.J., Um S.W.** Non-small cell lung cancer with concomitant EGFR, KRAS, and ALK mutation: clinicopathologic features of 12 cases. *J Pathol Transl Med.* 2016. s. 197-203.
324. **Gainor J.F., Varghese A.M., Ou S.H. et al.** ALK rearrangements are mutually exclusive with mutations in EGFR or KRAS: an analysis of 1,683 patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2013. s. 4273-81.
325. **Han X.H., Zhang N.N., Ma L. et al.** Immunohistochemistry reliably detects ALK rearrangements in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Virchows Arch.* 2013. s. 583-91.
326. **Salido M., Pijuan L., Martínez-Avilés L. et al.** Increased ALK gene copy number and amplification are frequent in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2011. s. 21-27.
327. **Takeuchi K., Choi Y.L., Togashi Y. et al.** KIF5B-ALK, a novel fusion oncokine identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2009. s. 3143-9.
328. **V Laffert M., Warth A., Penzel R. et al.** Anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangement in non-small cell lung cancer (NSCLC): results of a multi-centre ALK-testing. *Lung Cancer.* 2013. s. 200-6.
329. **Murakami Y., Mitsudomi T., Yatabe Y.** A screening method for the ALK fusion gene in NSCLC. *Front Oncol.* 2012. s. 24.
330. **Zwaenepoel K., Van Dongen A., Lambin S., Weyn C., Pauwels P.** Detection of ALK expression in non-small-cell lung cancer with ALK gene rearrangements--comparison of multiple immunohistochemical methods. *Histopathology.* 2014. s. 539-48.
331. **Conde E., Suárez-Gauthier A., Benito A. et al.** Accurate identification of ALK positive lung carcinoma patients: novel FDA-cleared automated fluorescence in situ hybridization scanning system and ultrasensitive immunohistochemistry. *PLoS One.* 2014. e. 107200.

332. **Park H.S., Lee J.K., Kim D.W.** Immunohistochemical screening for anaplastic lymphoma kinase (ALK) rearrangement in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2012. s. 288-92.
333. **Yi E.S., Boland J.M., Maleszewski J.J. et al.** Correlation of IHC and FISH for ALK gene rearrangement in non-small cell lung carcinoma: IHC score algorithm for FISH. *J Thorac Oncol*. 2011. s. 459-65.
334. **Paik J.H., Choe G., Kim H. et al.** Screening of anaplastic lymphoma kinase rearrangement by immunohistochemistry in non-small cell lung cancer: correlation with fluorescence in situ hybridization. *J Thorac Oncol*. 2011. s. 466-72.
335. **Conklin C.M., Craddock K.J., Have C., Laskin J., Couture C., Ionescu D.N.** Immunohistochemistry is a reliable screening tool for identification of ALK rearrangement in non-small-cell lung carcinoma and is antibody dependent. *J Thorac Oncol*. 2013. s. 45-51.
336. **Selinger C.I., Rogers T.M., Russell P.A. et al.** Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: a multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*. 2013. s. 1545-53.
337. **Zito Marino F., Liguori G., Aquino G. et al.** Intratumor heterogeneity of ALK-rearrangements and homogeneity of EGFR-mutations in mixed lung adenocarcinoma. *PLoS One*. 2015. e. 0139264.
338. **Cai W., Lin D., Wu C. et al.** Intratumoral heterogeneity of ALK-rearranged and ALK/EGFR coaltered lung adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2015. s. 3701-09.
339. **Zito Marino F., Rocco G., Morabito A. et al.** A new look at the ALK gene in cancer: copy number gain and amplification. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2016. s. 493-502.
340. **Camidge D.R., Skokan M., Kiatsimkul P. et al.** Native and rearranged ALK copy number and rearranged cell count in non-small cell lung cancer: implications for ALK inhibitor therapy. *Cancer*. 2013. s. 3968-75.

341. **Peled N., Palmer G., Hirsch F.R. et al.** Next-generation sequencing identifies and immunohistochemistry confirms a novel crizotinib-sensitive ALK rearrangement in a patient with metastatic non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2012. e. 14-16.
342. **Ren S., Hirsch F.R., Varella-Garcia M., Aisner D.L., Boyle T., Zhou C., Camidge D.R.** Atypical negative ALK break-apart FISH harboring a crizotinib-responsive ALK rearrangement in non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2014. e. 21-23.
343. **Klammer H., Mladenov E., Li F., Iliakis G.** Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status. *Cancer Lett.* 2015. s. 58-71.
344. **Sholl L.M., Weremowicz S., Gray S.W., Wong K.K., Chirieac L.R., Lindeman N.I., Hornick J.L.** Combined use of ALK immunohistochemistry and FISH for optimal detection of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *J Thorac Oncol.* 2013. s. 322-28.
345. **Xu L., Lei J., Wang Q.Z., Li J., Wu L.** Clinical characteristics of patients with non-small cell lung cancers harboring anaplastic lymphoma kinase rearrangements and primary lung adenocarcinoma harboring epidermal growth factor receptor mutations. *Genet Mol Res.* 2015. s. 12973-83.
346. **Tufman A.L., Edelmann M., Gamarra F. et al.** Preselection based on clinical characteristics in German non-small-cell lung cancer patients screened for EML4-ALK translocation. *J Thorac Oncol.* 2014. s. 109-13.
347. **Paik J.H., Choi C.M., Kim H. et al.** Clinicopathologic implication of ALK rearrangement in surgically resected lung cancer: a proposal of diagnostic algorithm for ALK-rearranged adenocarcinoma. *Lung Cancer.* 2012. s. 403-09.
348. **Shaw A.T., Yeap B.Y., Mino-Kenudson M. et al.** Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol.* 2009. s. 4247-53.
349. **Zaric B., Stojsic V., Panjkovic M. et al.** Clinicopathological features and relation between anaplastic lymphoma kinase (ALK) mutation and histological subtype of lung adenocarcinoma in Eastern European Caucasian population. *J Cancer.* 2016. s. 2207-12.

350. **Choi I.H., Kim D.W., Ha S.Y., Choi Y.L., Lee H.J., Han J.** Analysis of histologic features suspecting anaplastic lymphoma kinase (ALK)-expressing pulmonary adenocarcinoma. *J Pathol Transl Med.* 2015. s 310-17.

351. **Williams A.S., Greer W., Bethune D., Craddock K.J., Flowerdew G., Xu Z.** ALK+ lung adenocarcinoma in never smokers and long-term ex-smokers: prevalence and detection by immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch.* 2016. s. 533-40.



## 9. Seznam tabulek, grafů a schémat

### Seznam tabulek

- Tab. 1: Incidence zhoubných nádorů průdušky a plic v České republice (na 100 000 obyvatel) ve vybraných obdobích – str. 13
- Tab. 2: WHO klasifikace nádorů plic 2015 – str. 15
- Tab. 3: TNM klasifikace karcinomů plic dle WHO klasifikace 2015 – str. 30 – 31
- Tab. 4: Rozdělení karcinomů plic do klinických stádií dle WHO klasifikace 2015 – str. 32
- Tab. 5: Porovnání klonů protilátek používaných při IHC detekci proteinu ALK u NSCLC (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2013 (311)). – str. 56
- Tab. 6: Popis IHC vyšetření zvolenou primární protilátkou (varianta 1) – str. 62
- Tab. 7: Popis IHC vyšetření zvolenou primární protilátkou (varianta 2) – str. 62
- Tab. 8: Popis IHC vyšetření zvolenou primární protilátkou (varianta 3) – str. 63
- Tab. 9: Popis FISH vyšetření – str. 64
- Tab. 10: ALK-negativní případy - retrospektivní část – str. 68 – 74
- Tab. 11: ALK-positivní případy - retrospektivní část – str. 74
- Tab. 12: Senzitivita a specificita jednotlivých variant IHC detekce exprese proteinu ALK dle hodnotitelů a dvou rozdílných prahů positivity – str. 75
- Tab. 13: Souhrnný přehled ALK IHC-negativních případů, které nebyly dále vyšetřovány FISH – str. 78
- Tab. 14: Přehled ALK FISH-negativních případů, které byly ověřovány FISH v prospektivní části – str. 79 – 80
- Tab. 15: Přehled ALK FISH-positivních případů v prospektivní části – str. 81
- Tab. 16: Přehled publikovaných studií na téma: Testování přestavby genu *ALK* u karcinomů plic do roku 2013 (upraveno a převzato z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK

Testing in Lung Cancer, 2013 (311) ) – str. 85 – 90

Tab. 17: Souhrn publikovaných studií na téma: Testování přestavby genu ALK u karcinomů plic od roku 2013<sup>a</sup> (upraveno a převzato z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2016 (319)) – str. 91

### Seznam grafů

Graf 1: Incidence zhoubných nádorů průdušky a plic v České republice (na 100 000 obyvatel) ve vybraných obdobích – str. 13

Graf 2: Porovnání procentuálního počtu pozitivních buněk mezi ALK FISH-pozitivními a ALK FISH-negativními případy v retrospektivní části studie – str. 76

Graf 3: Porovnání procentuálního počtu pozitivních buněk mezi ALK FISH-pozitivními a ALK FISH-negativními případy v prospektivní části studie – str. 82

### Seznam schémat

Schéma 1: Vyšetřovací postup k záchytu případů NSCLC s translokací zahrnující gen *ROS1* – str. 43

Schéma 2: Nemutovaný gen *ALK* a různé typy jeho fúze u plicních karcinomů. Tmavě modré oblasti u fúzních partnerů představují coiled-coil domény, oranžová u genu *ALK* transmembránovou doménu a červené kinázovou doménu (převzato a upraveno z Tsao et al. IASLC Atlas of ALK Testing in Lung Cancer, 2013 (311) ) – str. 53

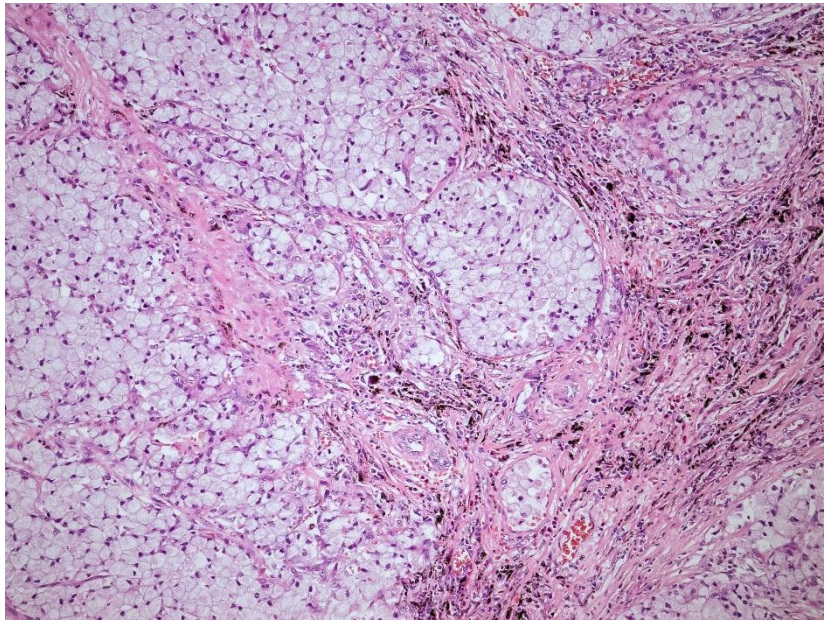
Schéma 3: Vyšetřovací postup k záchytu případů NSCLC s translokací zahrnující gen *ALK* (převzato a upraveno z [www2](#)) – str. 55

Schéma 4: Znázornění rozložení signálů genů *ALK* a *EML4* na 2. chromozómu a v jádře nádorové buňky bez přestavby (levá část) a s inverzí *EML4-ALK* (pravá část) – str. 58

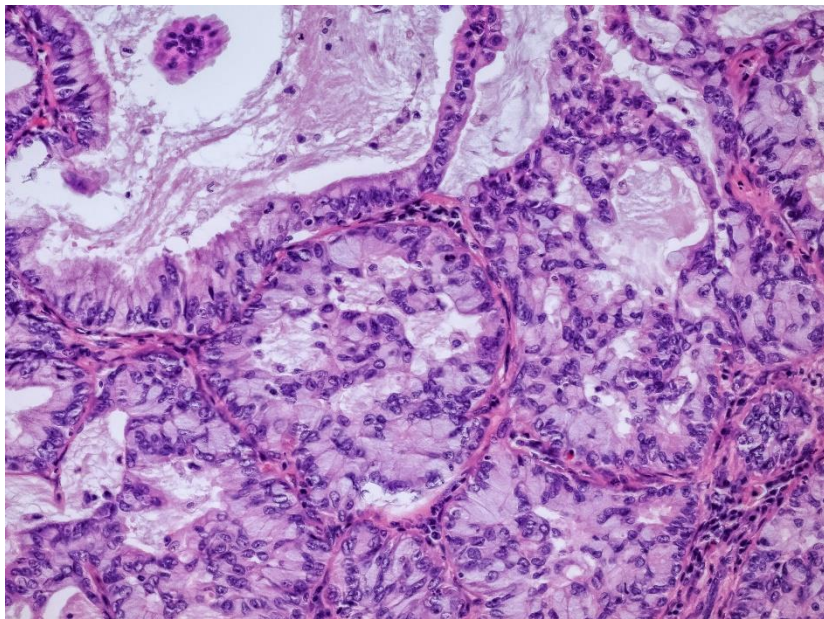
Schéma 5: Rozložení tkáňových vzorků ve složeném bloku vyrobeném metodou TMA. – str. 61

Schéma 6: Výrobce doporučený postup interpretace signálu pro sondu ZytoLight® SPEC ALK/EML4 TriCheck™ Probe (Zytovision, Bremerhaven, Německo) – str. 66

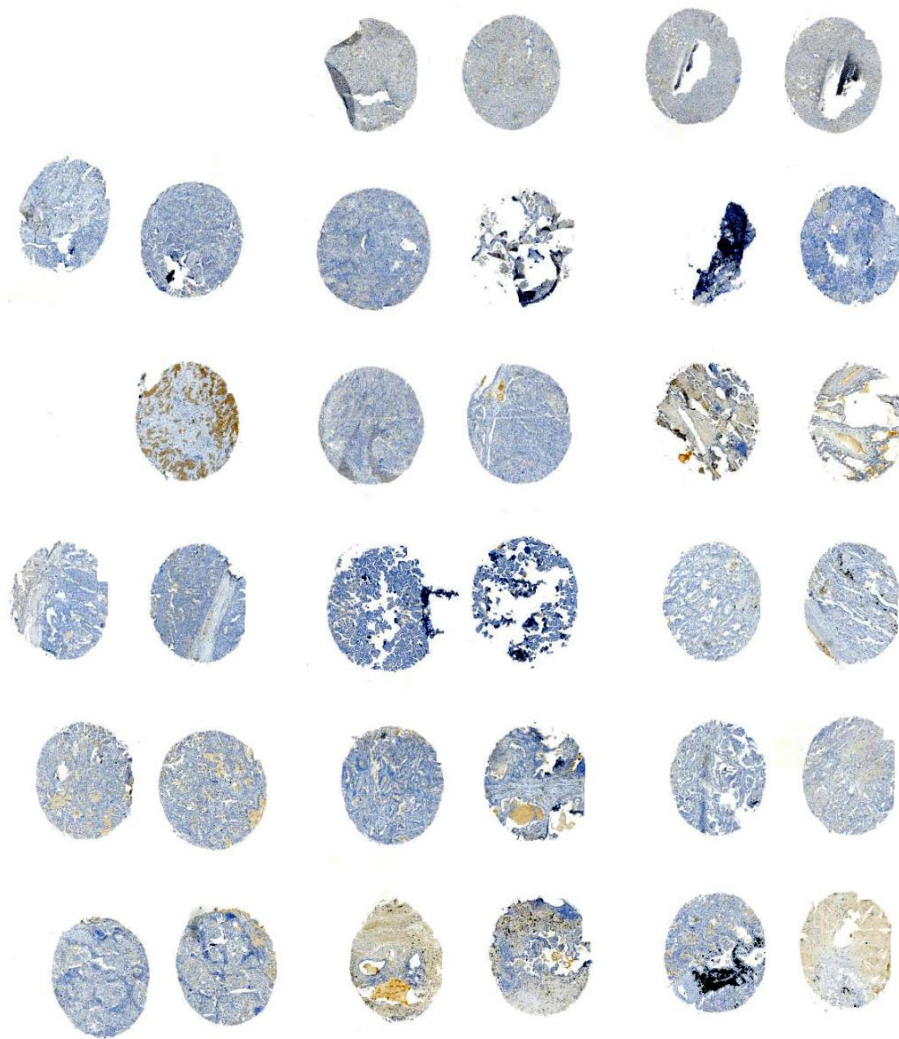
## 10. Fotodokumentace



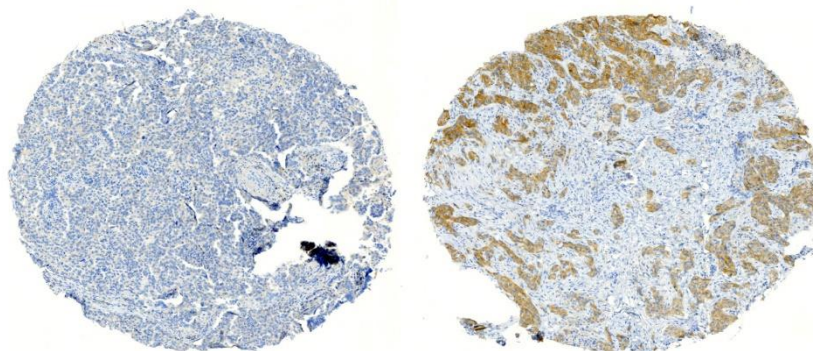
Obr. 1.: Morfologická varianta adenokarcinomu plic s častějším výskytem přestavby genu *ALK* – solidní tumor s morfológií buněk tvaru pečetního prstene (zvětšení 100x).



Obr. 2.: Morfologická varianta adenokarcinomu plic s častějším výskytem přestavby genu *ALK* – acinárně rostoucí adenokarcinom s intra- i extracelulární hlenotvorbou (zvětšení 200x).

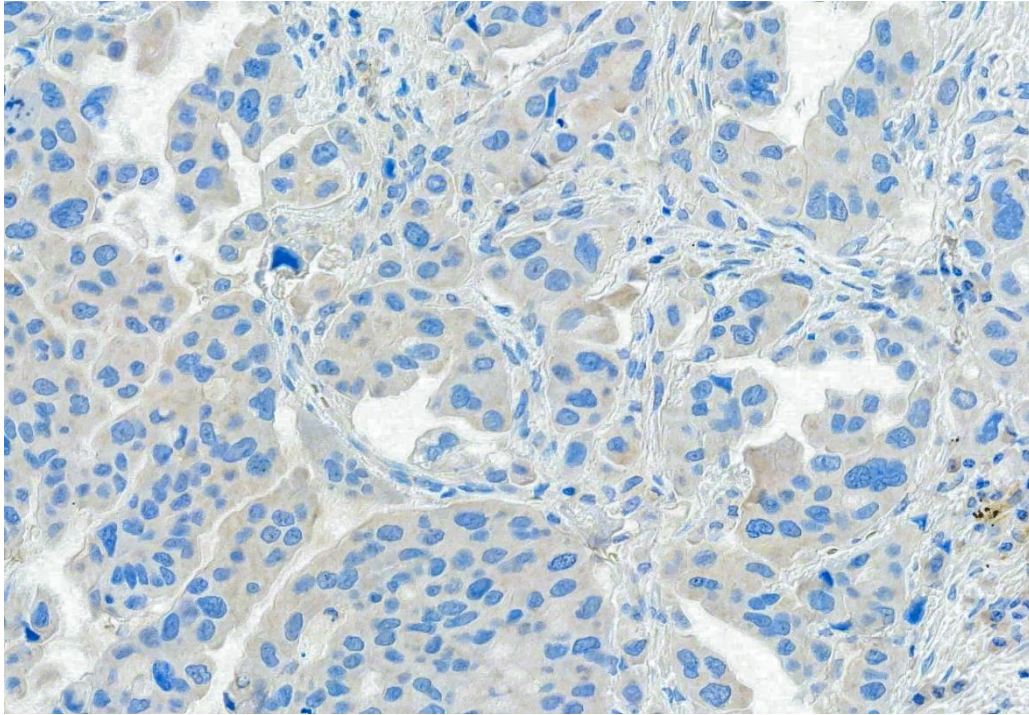


Obr. 3.: Histopogram složeného bloku technikou TMA (zvětšení 10x).

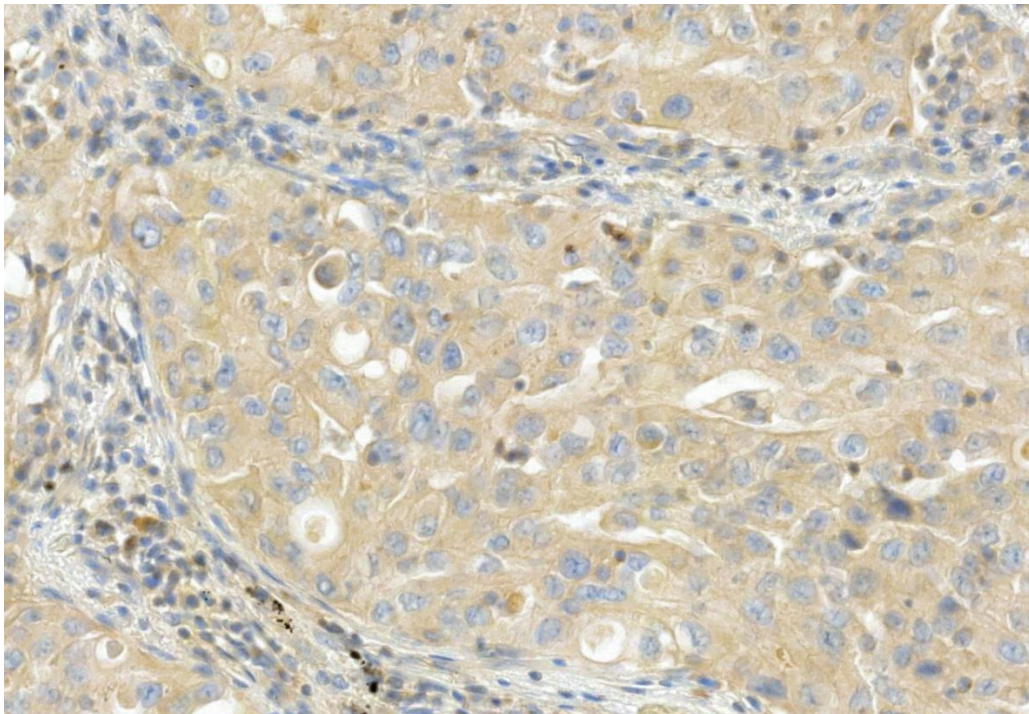


Obr. 4.: Detail na sousední řezy dvou nádorů, vlevo negativní (intenzita 0+), vpravo pozitivní (intenzita 2+) (zvětšení 50x).



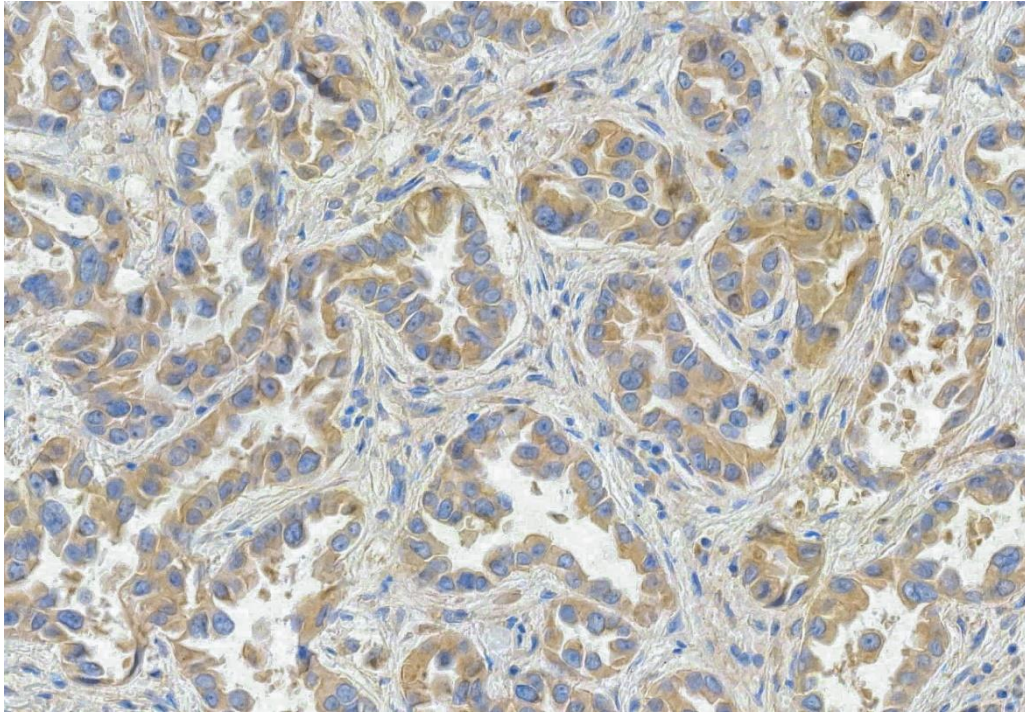


Obr. 5.: Intenzita exprese ALK proteinu v nádorových buňkách - intenzita 0+ (klon D5F3, ředění 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), (zvětšení 400x).

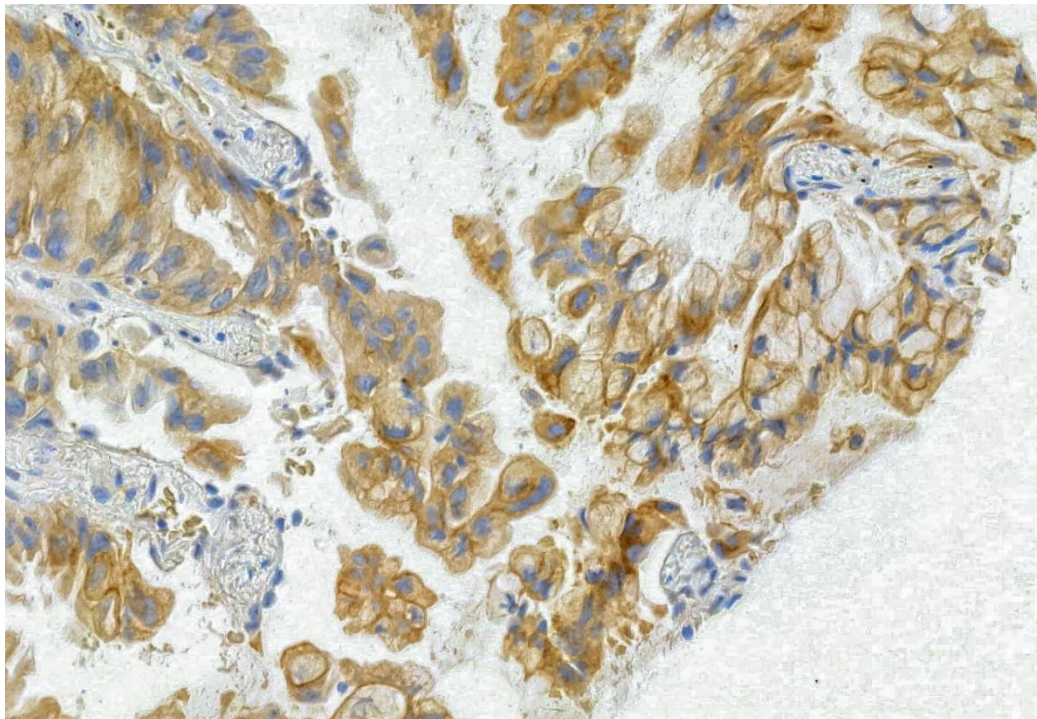


Obr. 6.: Intenzita exprese ALK proteinu v nádorových buňkách - intenzita 1+ (klon D5F3, ředění 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), (zvětšení 400x).



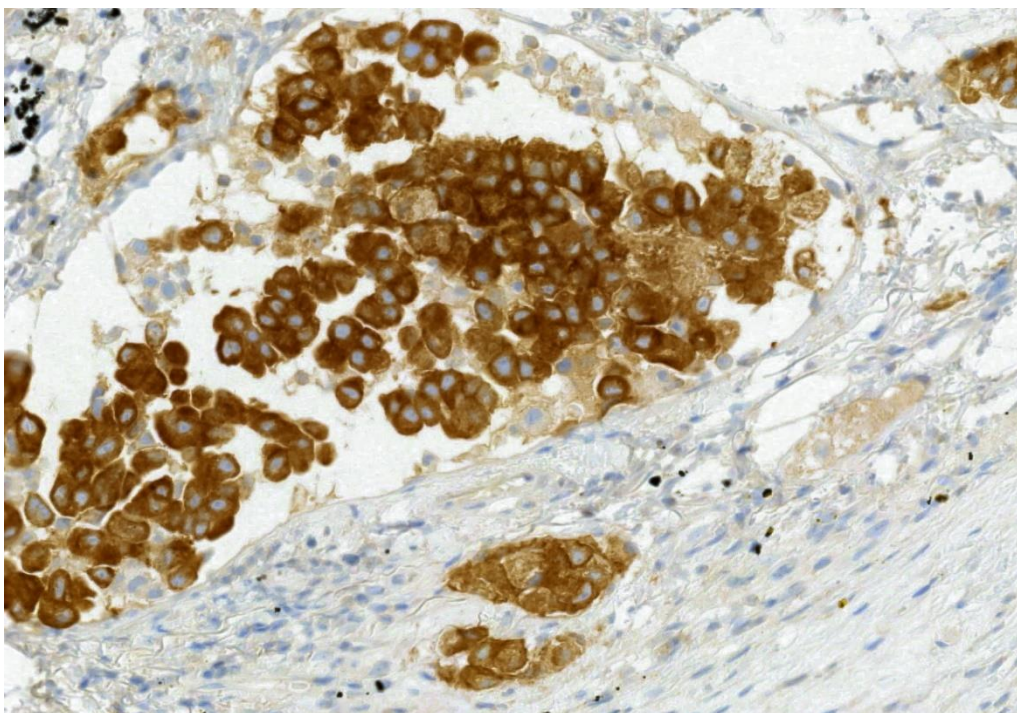


Obr. 7.: Intenzita exprese ALK proteinu v nádorových buňkách - intenzita 1-2+ (klon D5F3, ředění 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), (zvětšení 400x).

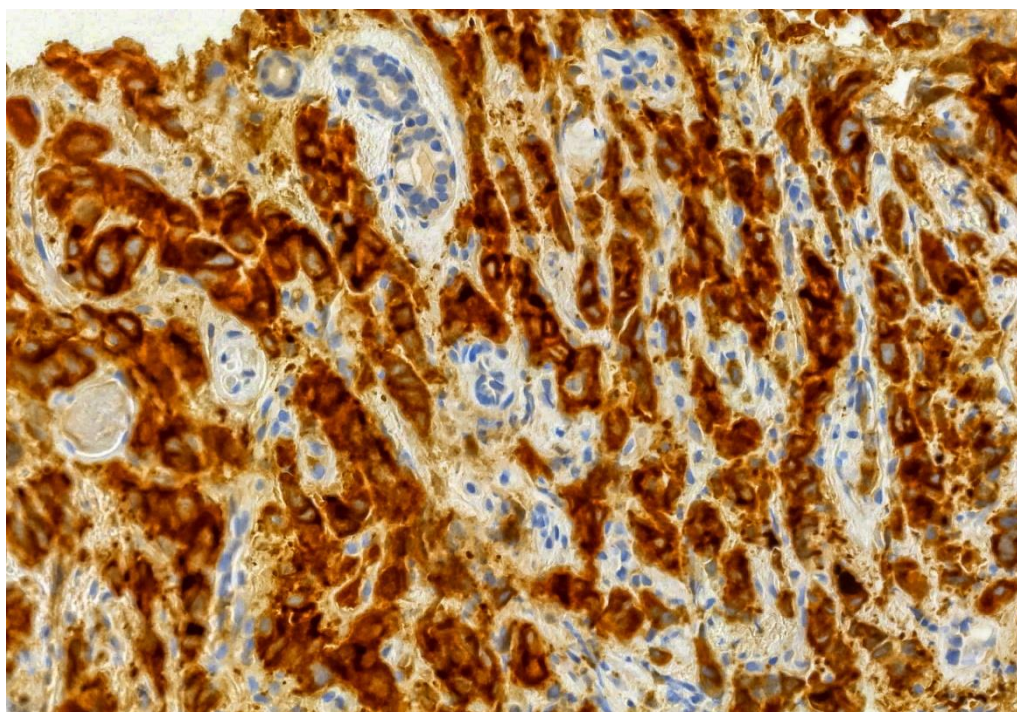


Obr. 8.: Intenzita exprese ALK proteinu v nádorových buňkách - intenzita 2+ (klon D5F3, ředění 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), (zvětšení 400x).

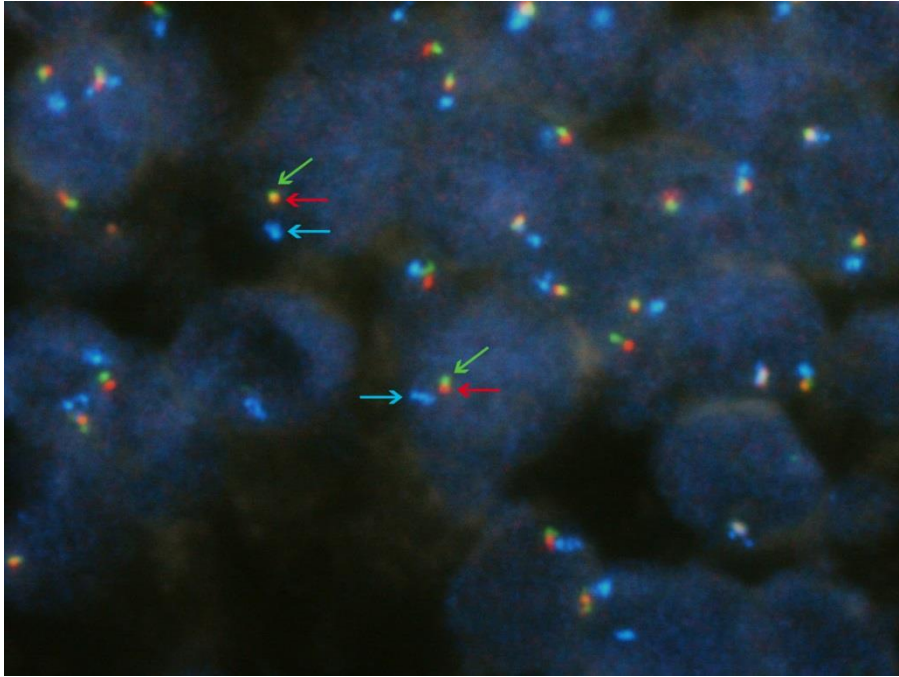




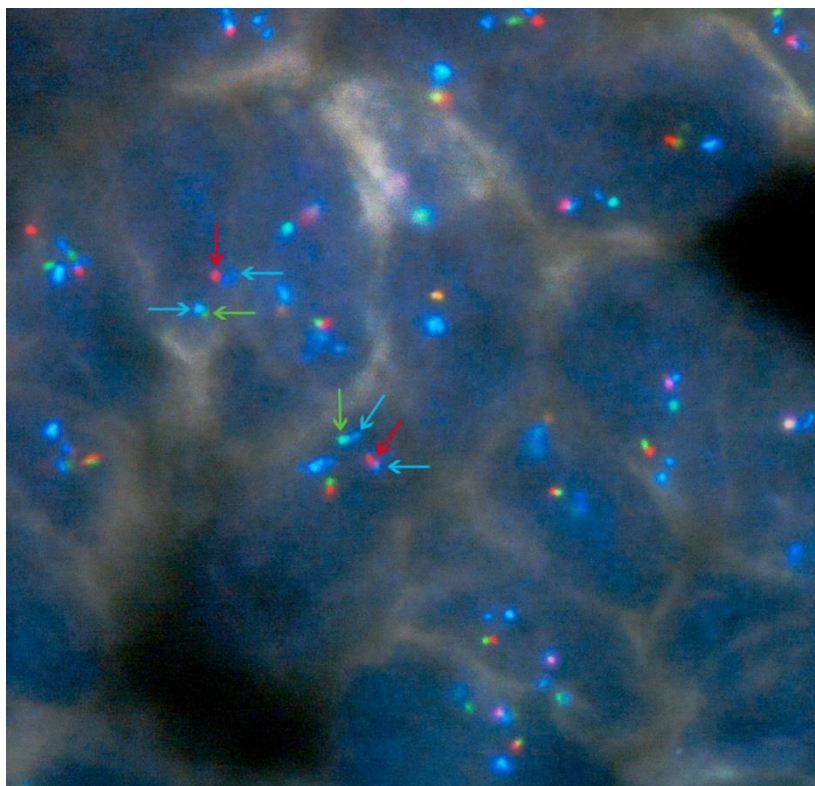
Obr. 9.: Intenzita exprese ALK proteinu v nádorových buňkách - intenzita 2-3+ (klon D5F3, ředění 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), (zvětšení 400x).



Obr. 10.: Intenzita exprese ALK proteinu v nádorových buňkách - intenzita 3+ (klon D5F3, ředění 1:100, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), (zvětšení 400x).

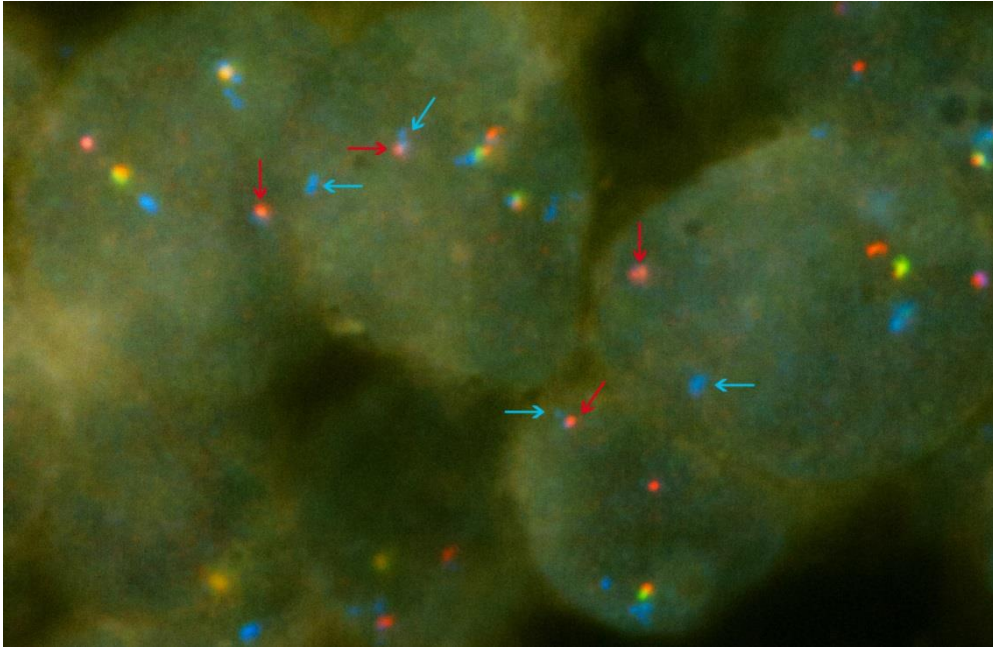


Obr. 11.: Nádorové buňky bez přestavby genu *ALK* (červený a zelený signál v těsné blízkosti nebo se překrývající za vzniku žlutého signálu; absence nadpočetného modrého signálu), (zvětšení 1000x).

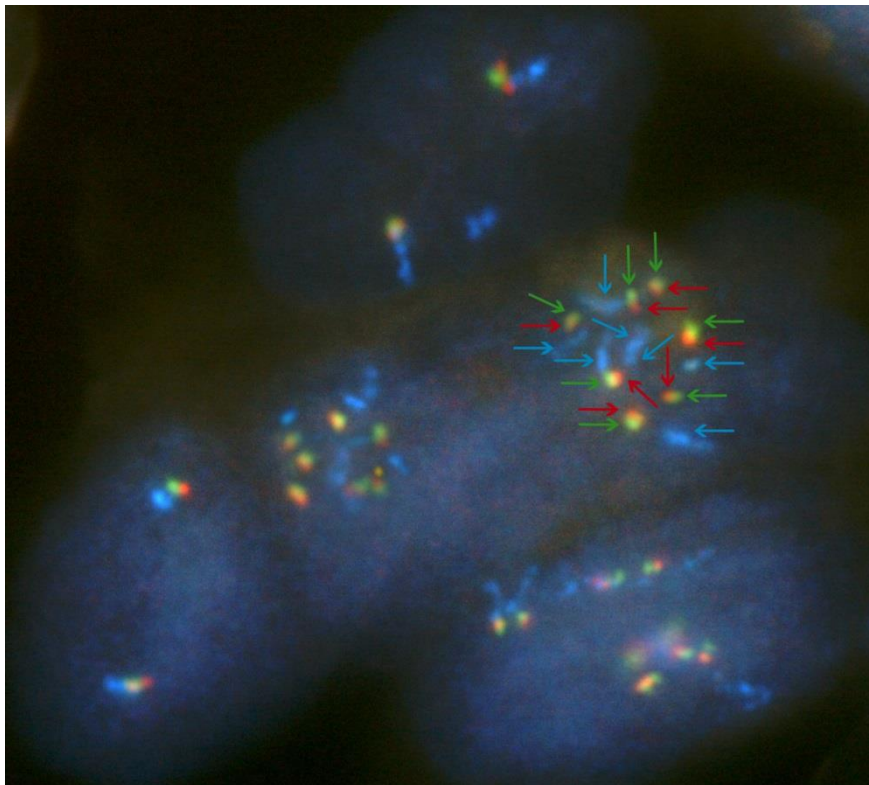


Obr. 12: Inverze genu *ALK* (oddělené červené a zelené signály) s *EML4* jako fúzním partnerem (modré signály), (zvětšení 1000x).





Obr. 13: Inverze genu *ALK* se ztrátou intersticiální DNA (samostatné červené signály, zelené signály chybí) s účastí *EML4* jako fúzním partnerem (modré signály), (zvětšení 1000x).



Obr. 14: Amplifikace genů *ALK* (červený a zelený signál v těsné blízkosti nebo se překrývající za vzniku žlutého signálu) a *EML4* (modré signály), (zvětšení 1000x).

## 11. Poděkování

*Práce byla podpořena programy PRVOUK P37/11 a P27/LF1/1 a OPPK CZ.2.16/3.1.00/24509 a projekty BBMRI\_CZ LM2015089, SVV 260181 a SVV 260289. Retrospektivní část studie byla také částečně finančně podpořena edukačním grantem firmy Pfizer.*

Závěrem bych rád poděkoval všem, kteří mi byli v průběhu celého doktorského studia a tvorby této disertační práce nápomocni. Na prvním místě chci poděkovat přednostovi Fingerlandova ústavu patologie a zároveň mému školiteli prof. MUDr. A. Ryškovi, Ph.D., a také mému školiteli konzultantovi doc. MUDr. J. Lacovi, Ph.D., kteří mi byli vždy nápomocni a ochotně mi svými cennými připomínkami a nápady pomáhali v průběhu studia a zejména při tvorbě této disertační práce. Děkuji také všem ostatním kolegům z Fingerlandova ústavu patologie za podporu v průběhu celého studia, zejména kolegyním MUDr. H. Hornychové, Ph.D. a MUDr. M. Nové za pomoc s prohloubením mých znalostí na poli imunohistochemie a plicní patologie, RNDr. K. Sieglkové za cenné rady a spolupráci při realizaci estetické stránky této práce a MUDr. E. Hovorkové, jejíž humor, pozitivní myšlení a neutuchající podpora mi byly velkou oporou i v dobách mého pesimismu. MUDr. Igoru Sirákovi, Ph.D., velice děkuji za ochotnou spolupráci při statistické analýze dat. Prof. MUDr. I. Šteinerovi, CSc., velmi děkuji za pečlivé přečtení rukopisu a cenné připomínky k finální podobě disertační práce.

Vlastní výzkum ani tuto práci by nebylo možné realizovat bez vstřícnosti a spolupráce laborantek bioptické, imunohistochemické a molekulárně patologické laboratoře, zejména pí M. Dvořákové a pí E. Šmídové. Stejně tak by práce nemohla vzniknout bez vzorné spolupráce s pracovníci archivu Fingerlandova ústavu patologie. Všem patří moje poděkování.

Můj největší dík však patří mé rodině a mé přítelkyni Katce, kteří projevují obdivuhodnou míru tolerance a pochopení pro mé zaneprázdnění a pro situace plynoucí z mé prchlivé povahy, nejen v průběhu doktorského studia.