

Použití lidského biologického materiálu ve výzkumu 2012



Rudolf Nenutil

Masarykův onkologický ústav

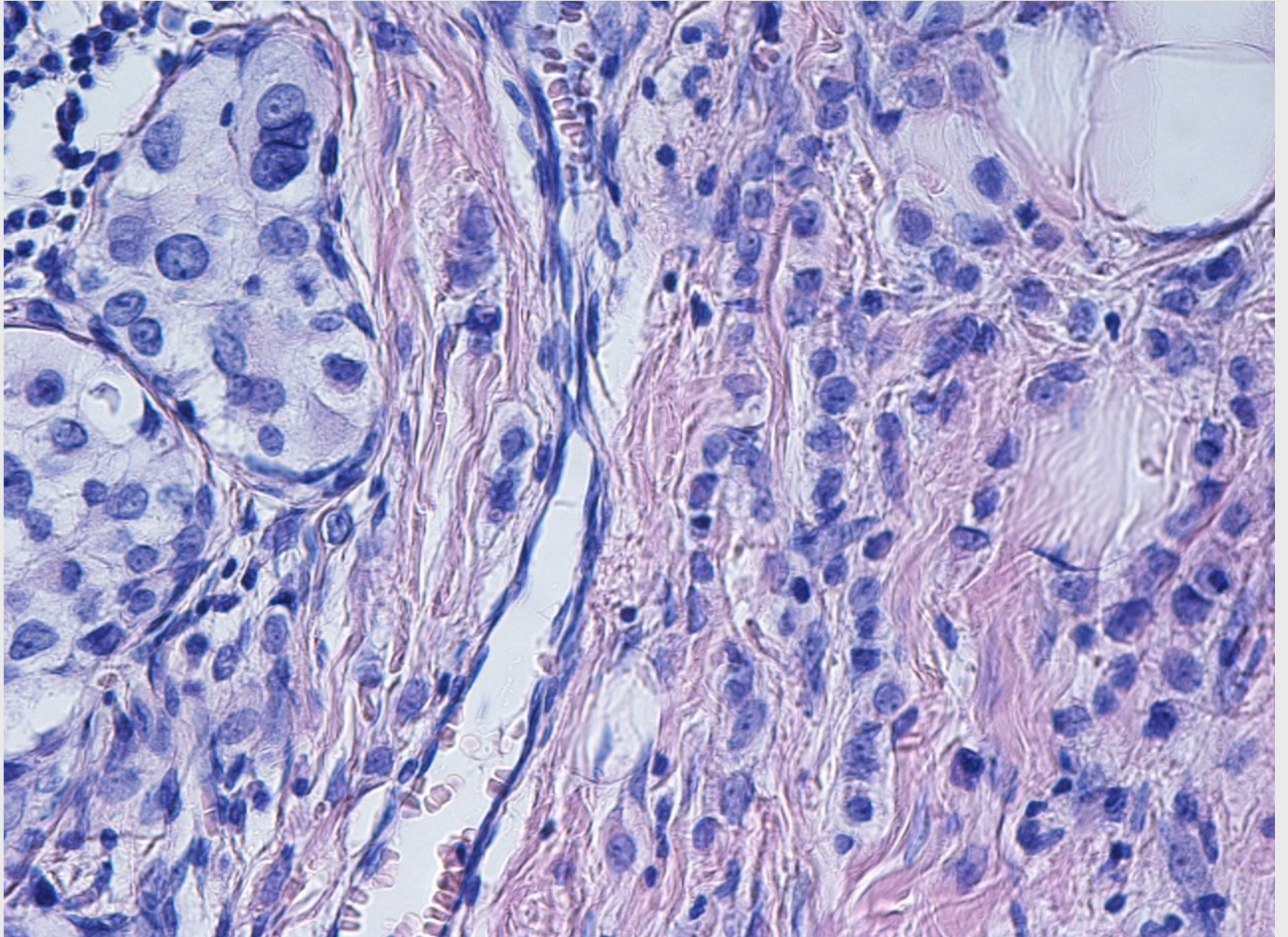
Oddělení onkologické a experimentální patologie

Proč:

Možnosti a experimentální výtěžnost buněčných modelů jsou omezené
samotná kultivace je selektivní
je velmi obtížné napodobit mikroprostředí
je prakticky nemožné napodobit interakci s imunitním systémem

Je třeba ověřit zda nepracujeme s artefakty
jsou výsledky zobecnitelné pro určitý typ nádorů ?
existuje jejich korelace s klinickými daty ?
mají potenciální význam pro použití v diagnostice nebo léčbě ?

Proč:



Klinická patologie

Angloamerický obor nezavedený v našem zdravotnictví
(„*Department of Pathology and Laboratory Medicine*“)

Klinická patologie vytváří pro lékaře u lůžka ucelený a souhrnný obraz pacienta podle nálezů všech laboratorních oborů
(*biochemie, hematologie, mikrobiologie, imunologie, histopatologie*)



Biologický materiál

Krev

Moč, stolice, sputum

Stěry

Výpotky

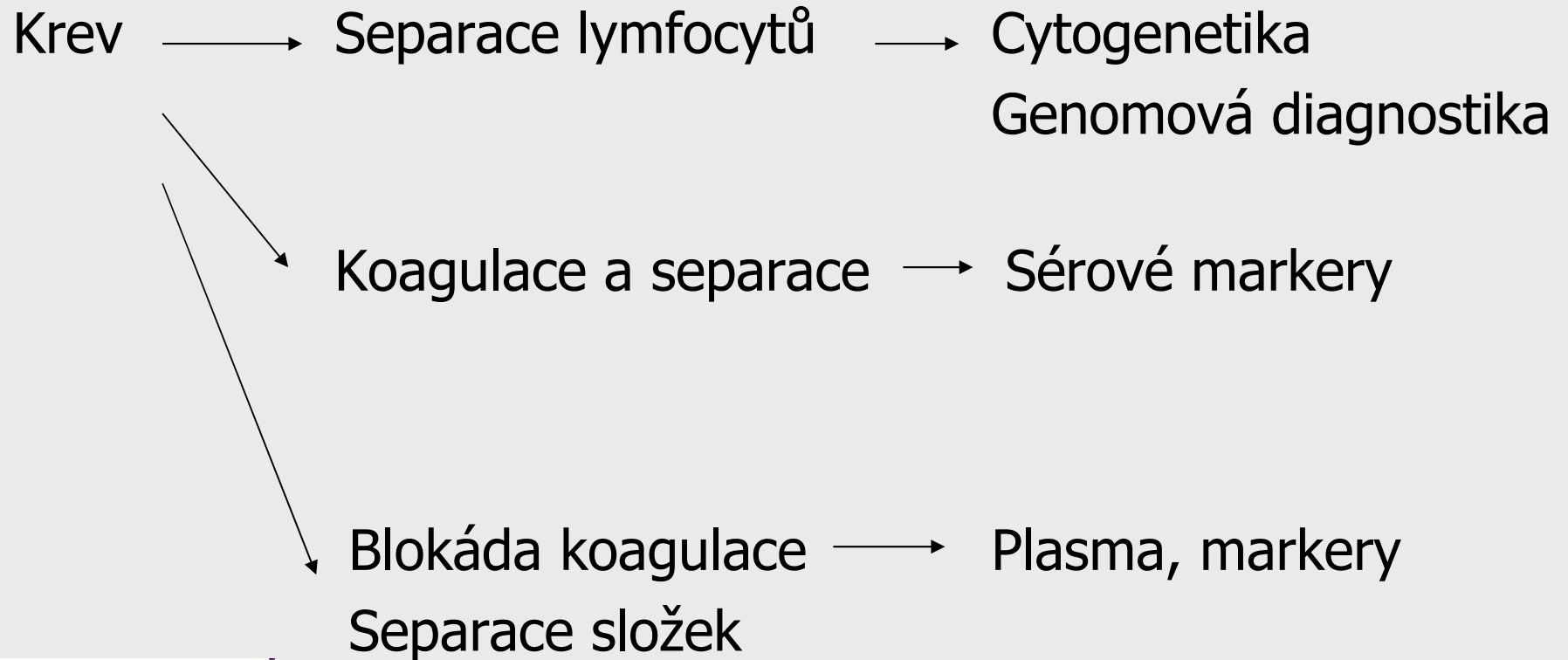
Tkáně

- punkční biopsie

- mikroexcize

- operační biopsie

Zpracování krve



Chirurgická patologie

„Surgical pathology“

Chirurgická patologie je spolupráce oborově s specializovaného patologa se stejně zaměřenými kliniky a laboratorními odborníky na tvorbě diagnózy s využitím všech současných dostupných vyšetřovacích metod.

Práce je nejčastěji organizována v mezioborových „komisích“

Příspěvek patologa:

- koordinace nálezů
- rozšířená bioptická diagnostika:
 - prognostika
 - predikce účinku léčby

Příspěvek klinika:

- koordinace vyšetření
- odběr materiálu
- orientace materiálu
- lokalizace a topika léze
- stanovení rozsahu choroby podle celkového vyšetření

Biopsie

DEFINICE:

Diagnostické histomorfologické vyšetření orgánů a tkání živých pacientů (= *máme k dispozici informaci o struktuře tkáně*)

TYPY BIOPTICKÉHO VYŠETŘENÍ:

Mikrobiopsie – („zavřená biopsie“)

- punkční silnou jehlou („*core needle*“)
- endoskopická excize

Biopsie otevřená

- diagnostická excize, mikroexcize
- vyšetření chirurgického resekátu

Cytologie

„fine needle aspiration, smear“

DEFINICE:

Diagnostické morfologické vyšetření odebraných buněk živých

pacientů (*máme k dispozici pouze mo* *tkáně*)

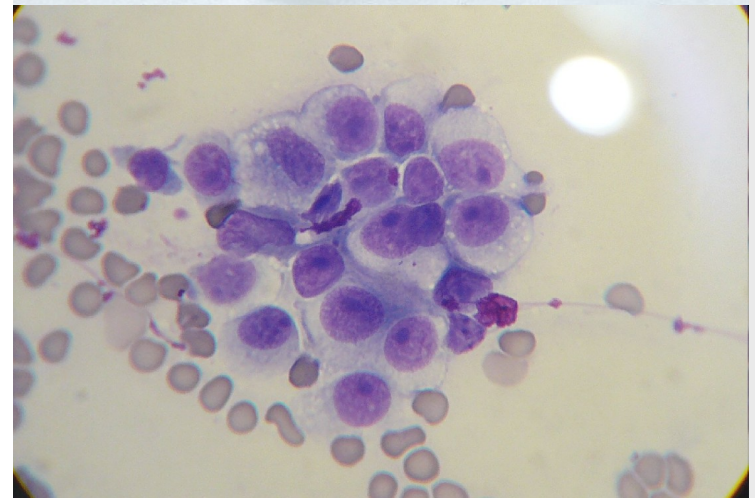
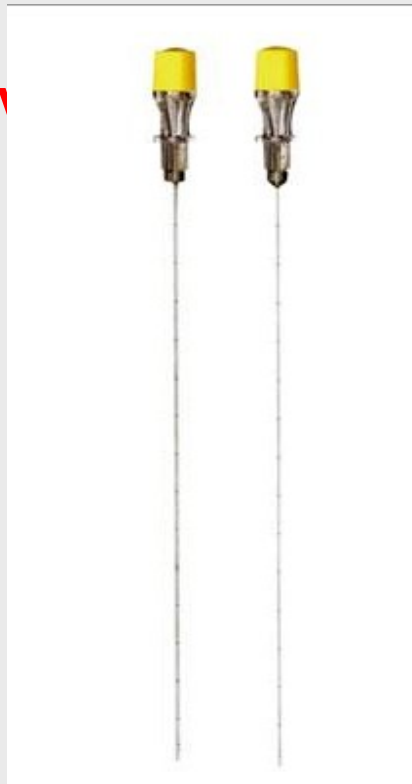
TYPY CYTOLOGICKÉHO

Punkční cytologie

- ložiskové léze
- výpotky

Exfoliativní cytologie

- stěry, otisky, sekret

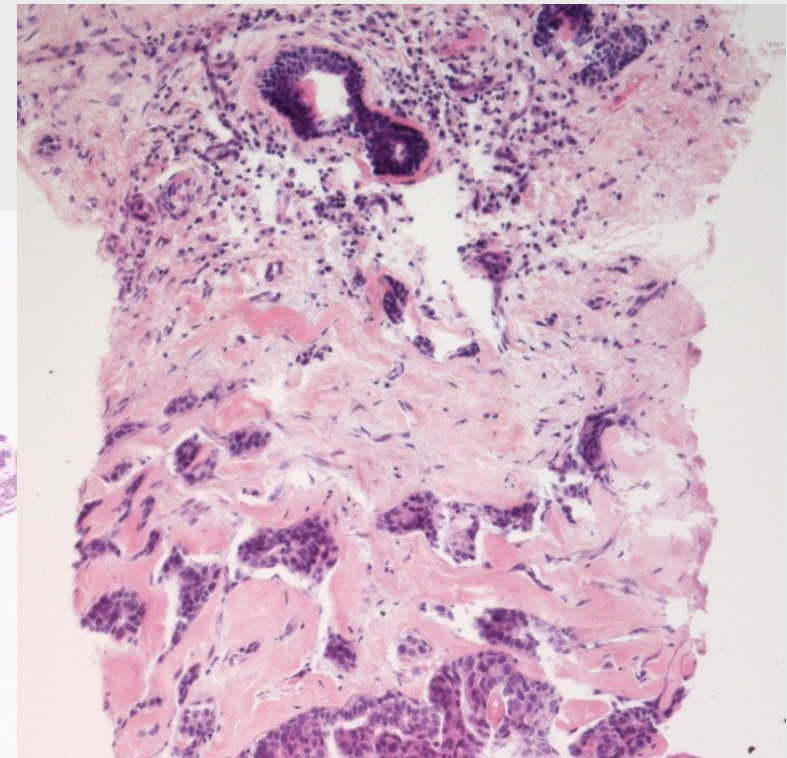
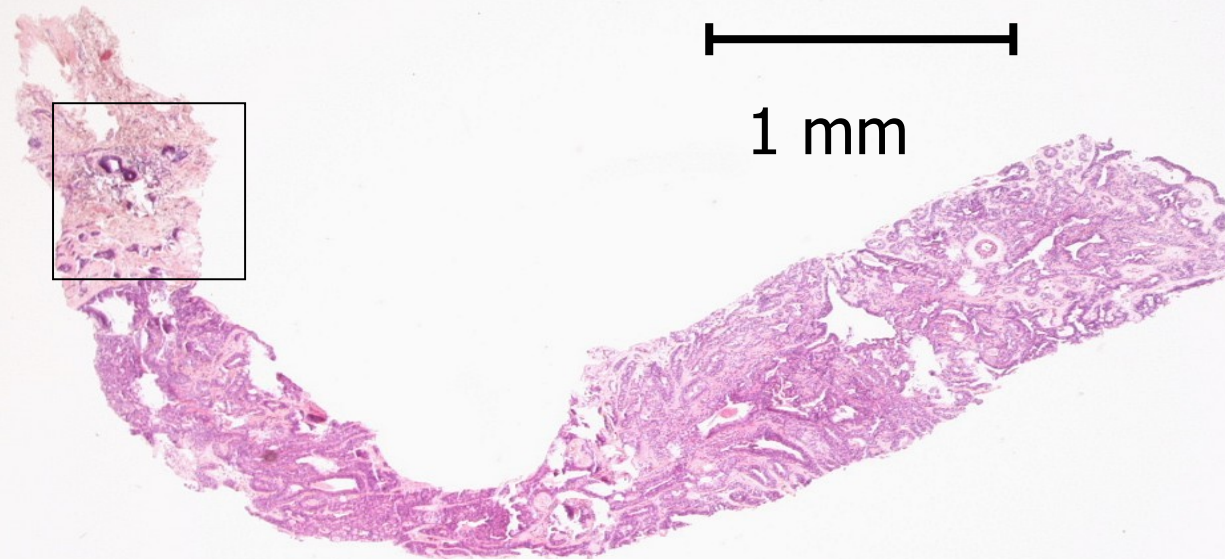
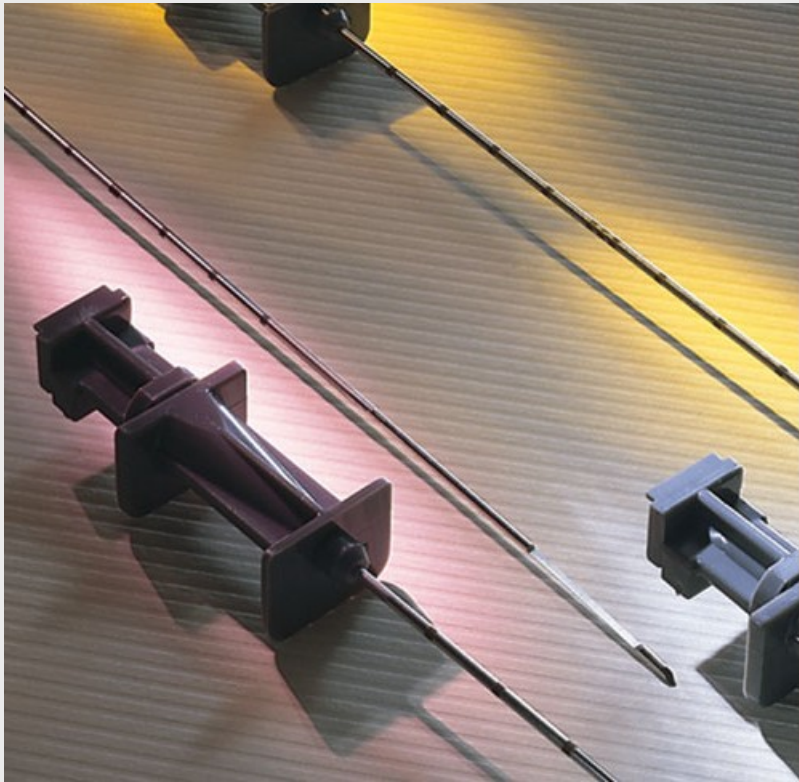


Punkční jehlová biopsie

„core needle biopsy“

DEFINICE:

Diagnostické morfologické vyšetření malého vzorku tkáně (punkční váleček)



Je možno získat:

DNA

RNA

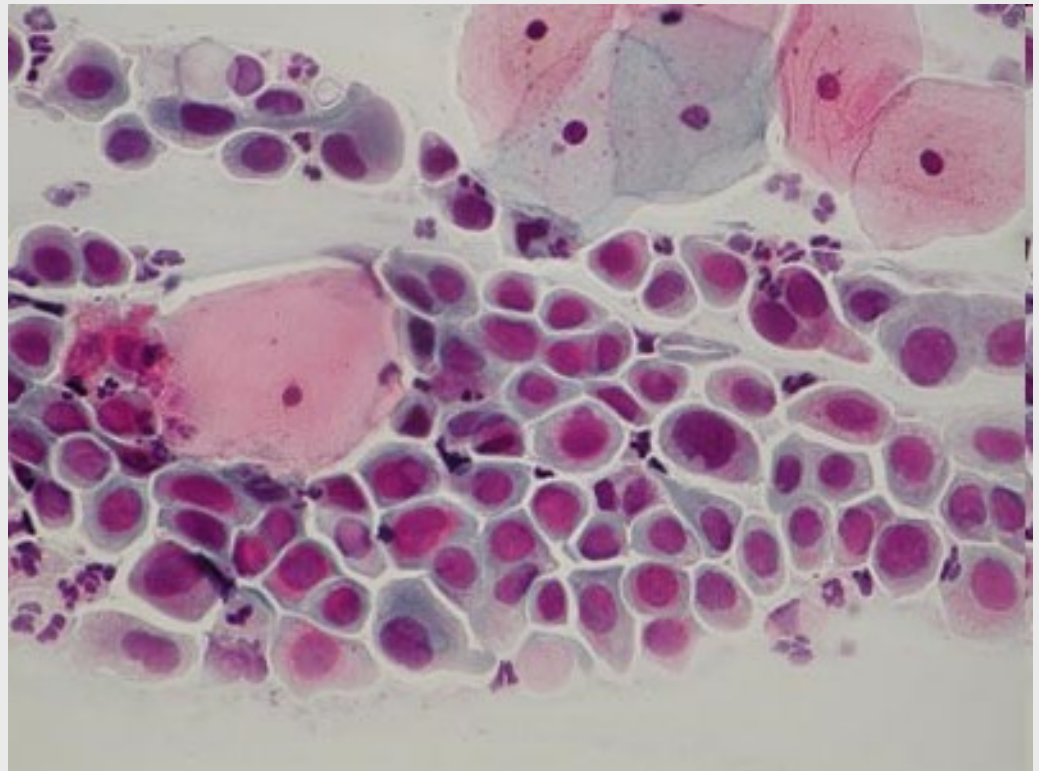
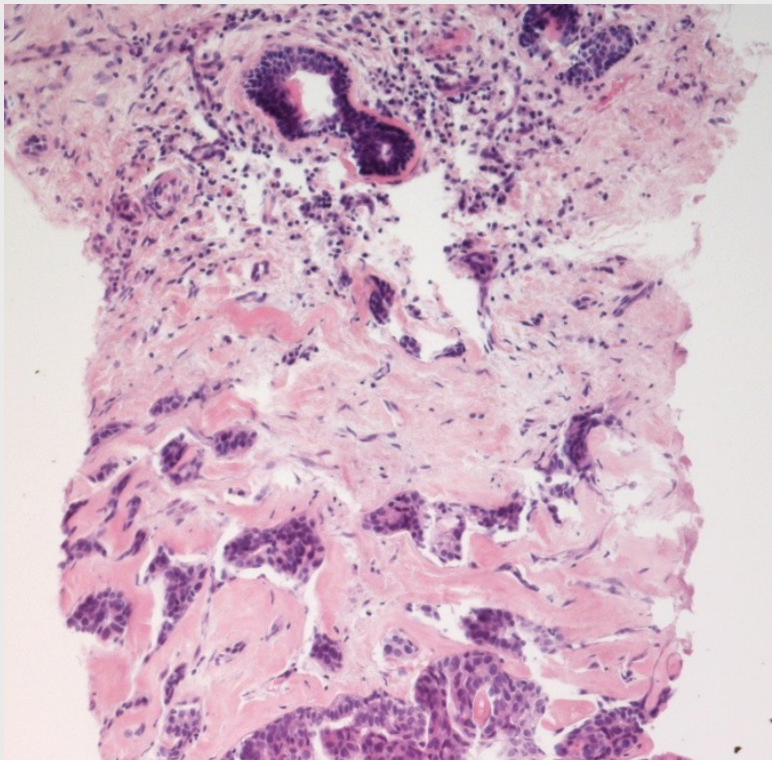
Proteiny

Omezení:

chybí morfologická korelace (=nevíme co přesně máme)

množství materiálu je malé

vzorek je neopakovatelný

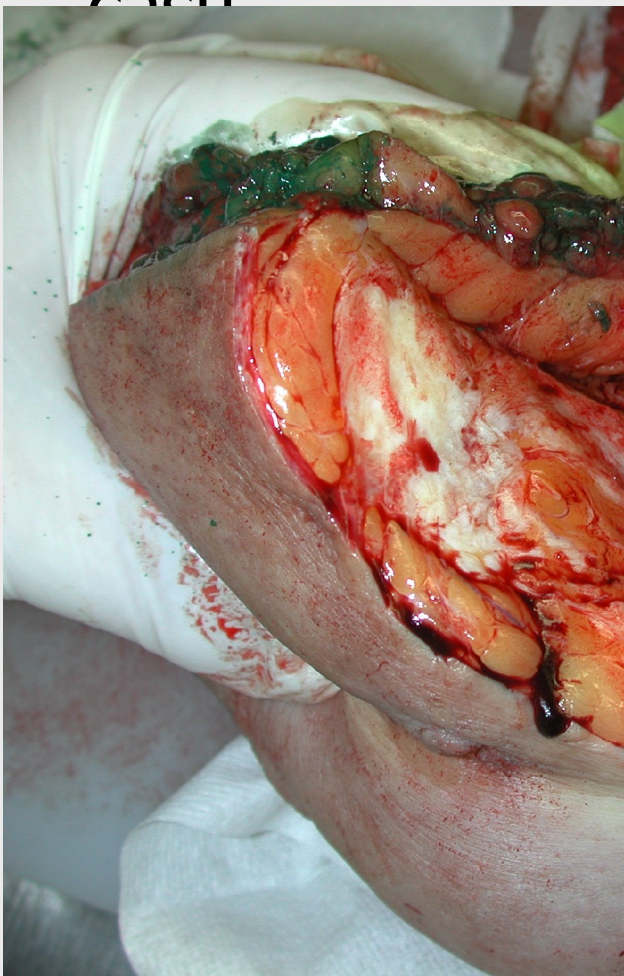


Vyšetření operačního resekátu

„surgical specimen“

DEFINICE:

Diagnostické morfologické vyšetření orgánu nebo jeho části



Klinické údaje

■ Zasláný materiál

- co a odkud jest odebráno, způsob odběru, fixace
- označení vzorku (-ů)

■ Pacient

- příznaky a jejich trvání
- relevantní výsledky provedených vyšetření (RTG, biochemie, KO, endoskopie...)
- výsledky předchozích histologických vyšetření
- další závažné choroby
- cílený dotaz

Pojišťovna: 111

Požaduje:
díl A

IČZ: 72931650

Datum žádosti: 17.05.2004 Odb: 5F1

POUKAZ NA HISTOLOGICKÉ / CYTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

pacient: [redacted] ová [redacted]

Základní diagnóza: **D486**

č. pojištěnce: [redacted] / [redacted]

č.chor.: 1159/2004

Ostatní diagnózy:

Bydliště: [redacted]

PSC : 679 22

Umístění: hospitalizace [CHIR] obj.na: 17.05.2004

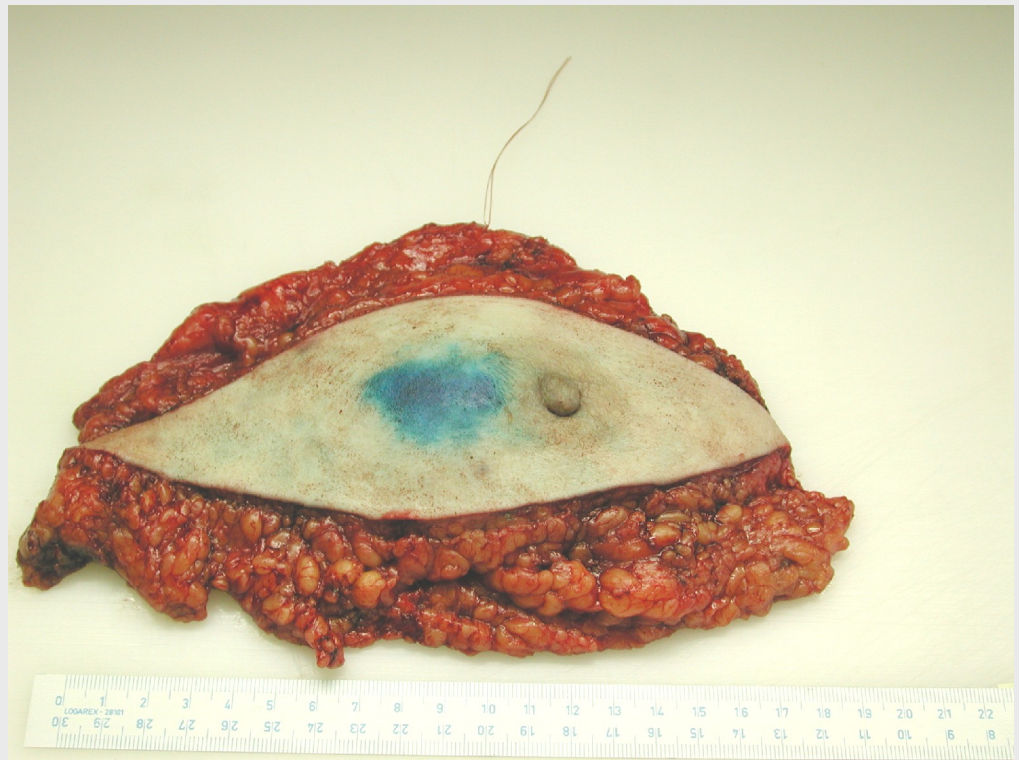
Předmět vyšetření a lokalizace: extirpát ZHQ I. mammy- drátek nahoře zevně, dlouhý steh ventrálně, krátký kraniálně.

Klinická diagnóza (popř. stručný klinický průběh): Tu mammae I. sin.

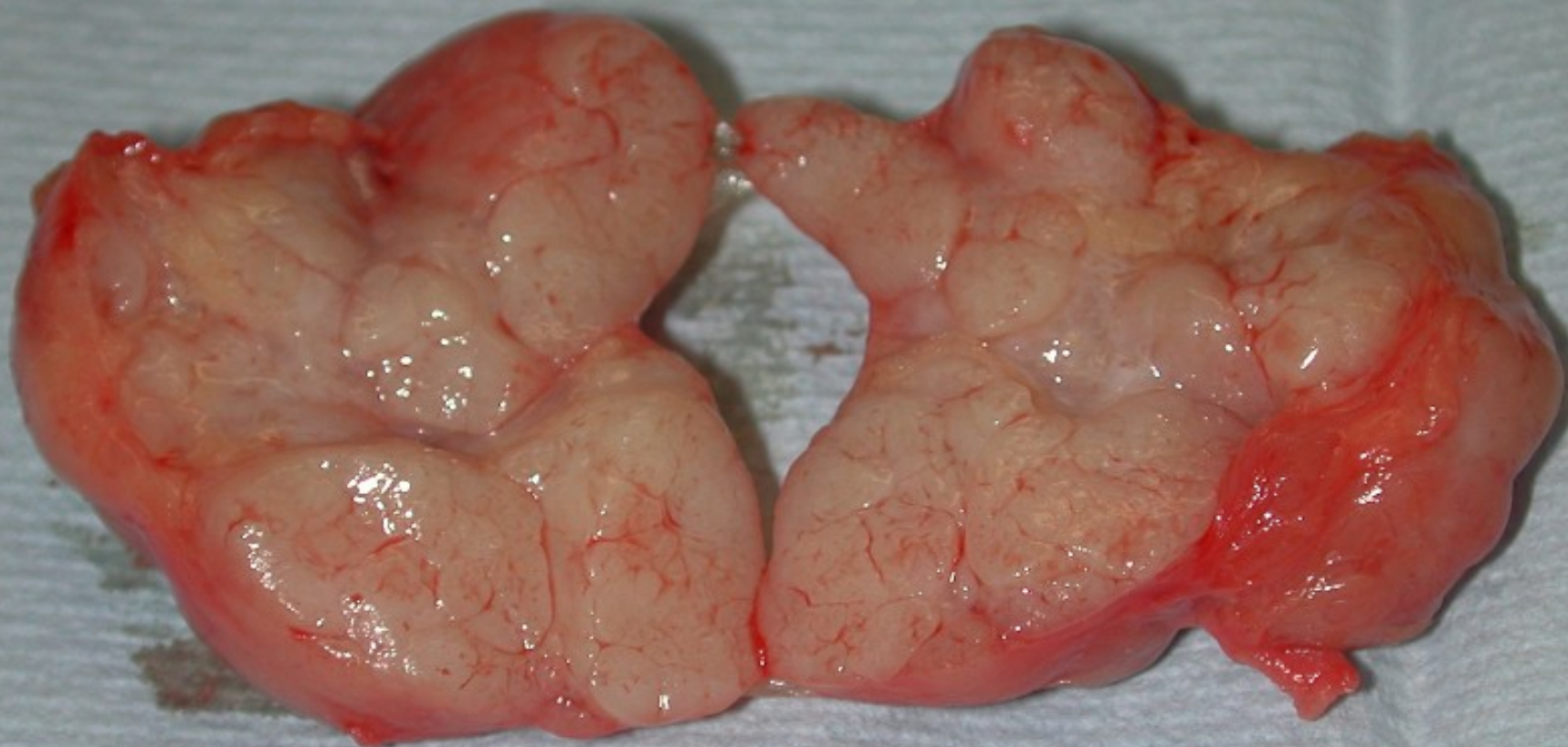
MUDr. [redacted]

Co se s materiálem děje na patologii?

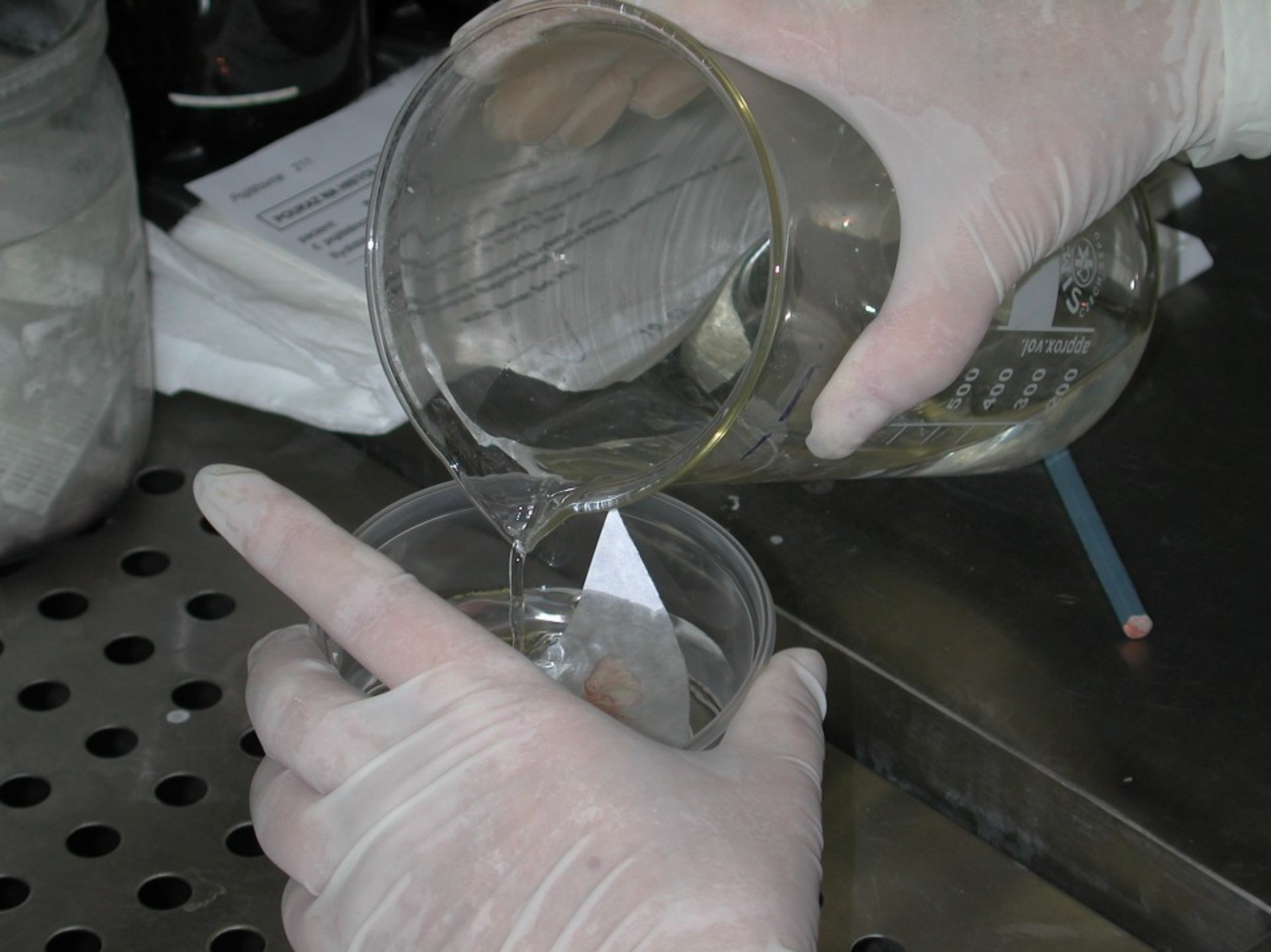
- Makroskopický popis a „příkrojení“
 - odběr na speciální metody, např. genetické
- Dokončení fixace
- Tzv. parafinový proces (voda nahrazena parafinem)
- Řezání: 4-6 mikrometrů silné řezy
- Barvení různými metodami
- Diagnostika



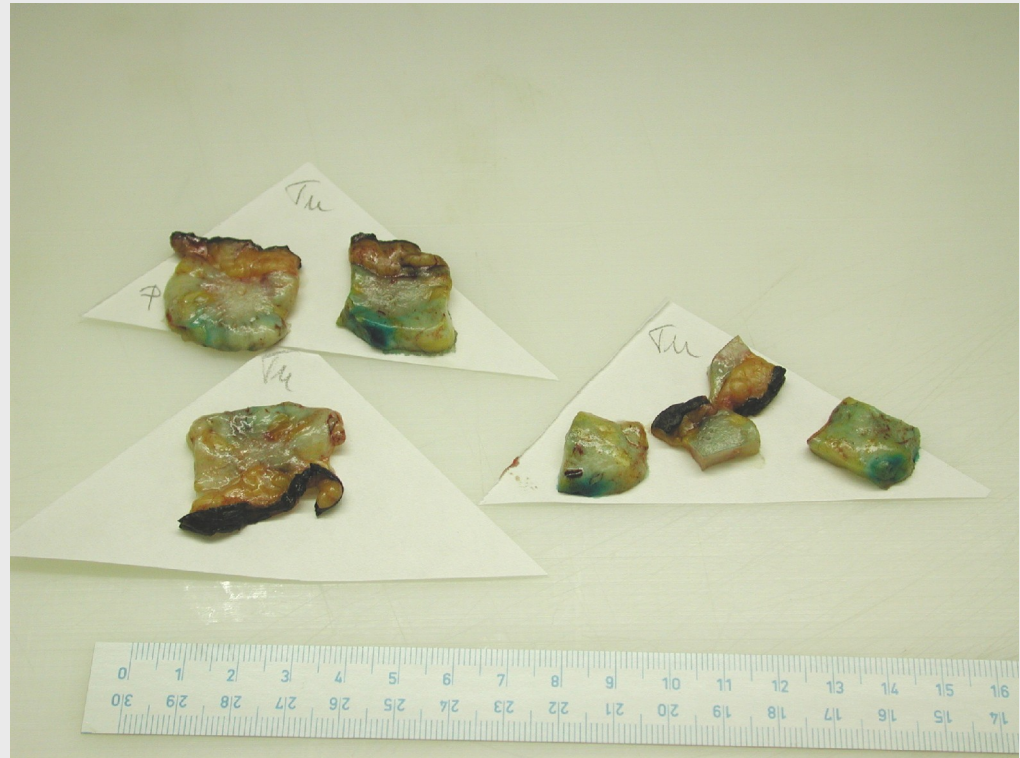
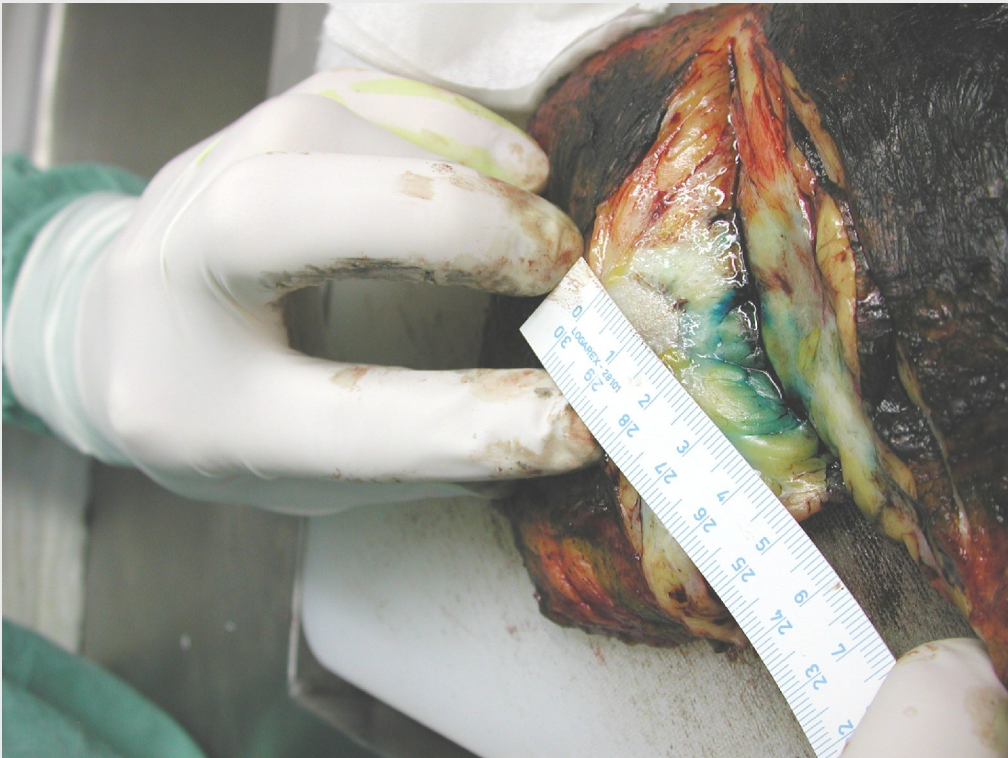












SHANDON C3 Hypercenter 300

PROGRAM MODE

NO TIME	NO STOP	NO PAUSE	PAUSE	BACK	STOP
---------	---------	----------	-------	------	------

1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1
Q	W	E	R	T	Y	U	I	O	P	/
A	S	D	F	G	H	J	K	L	;	'
←	→	Z	X	C	V	B	N	M	,	.
↑	↓	SPACE				BACK				

MODULE CONTROL

MODULE					PROGRAM				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
					6	7	8	9	STOP

POWER PAUSE STOP START END

CONCENTRATION CENTER 3P
 82 OFF, 83 OFF, 84 OFF, 85 OFF, 86 OFF, 87 OFF, 88 OFF, 89 OFF, 90 OFF

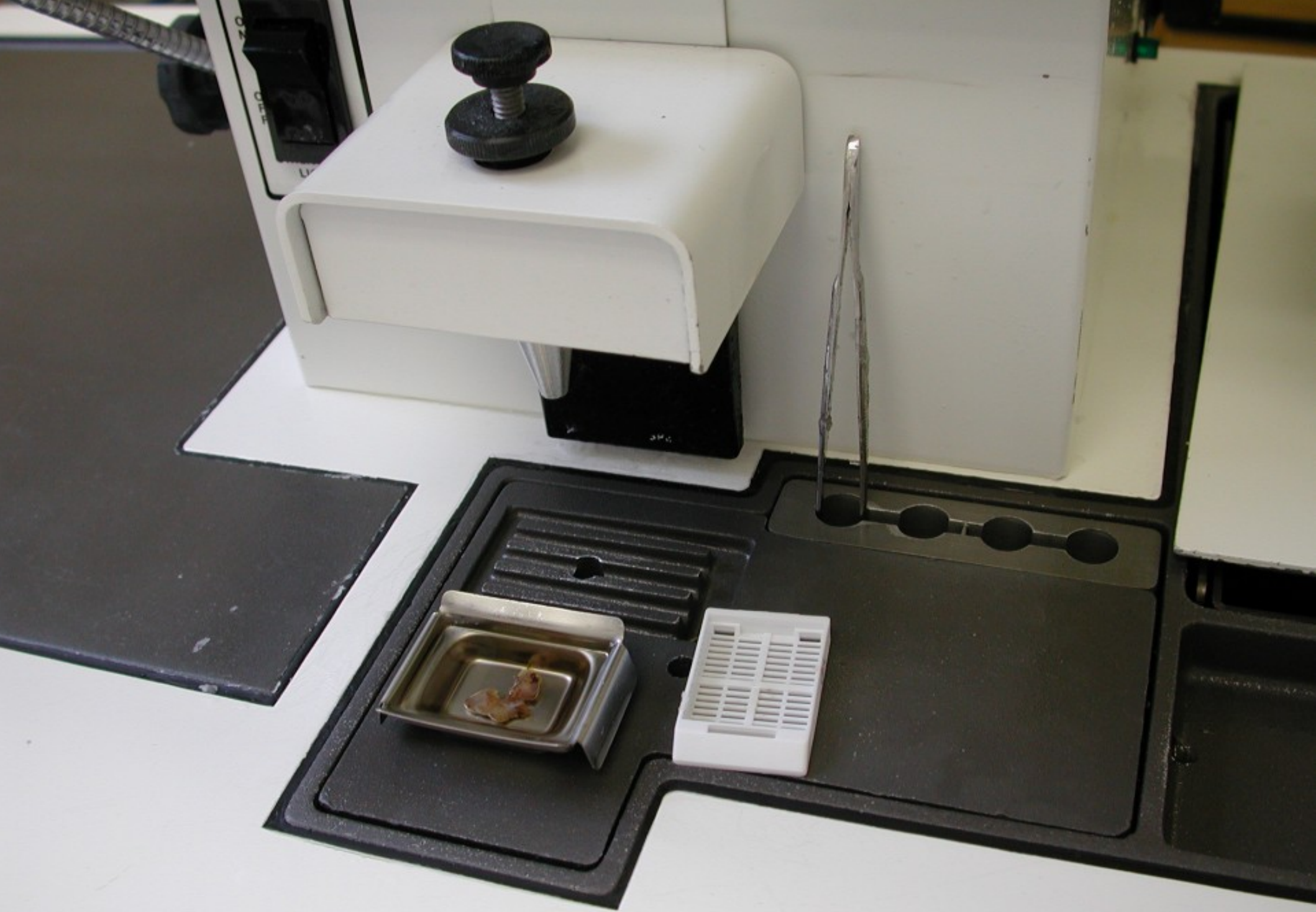
NO	PROG	TIME	DATE	TIME	DATE
01	FORMOL	40	Y	01-00-00	0-15
02	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
03	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
04	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
05	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
06	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
07	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
08	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
09	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
10	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
11	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
12	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
13	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
14	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
15	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
16	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
17	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
18	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
19	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15
20	ALVONOL	40	Y	01-00-00	0-15

TO RUN PROG PRESS "START" PRESS "END" "PROG" FOR OTHER OPTIONS

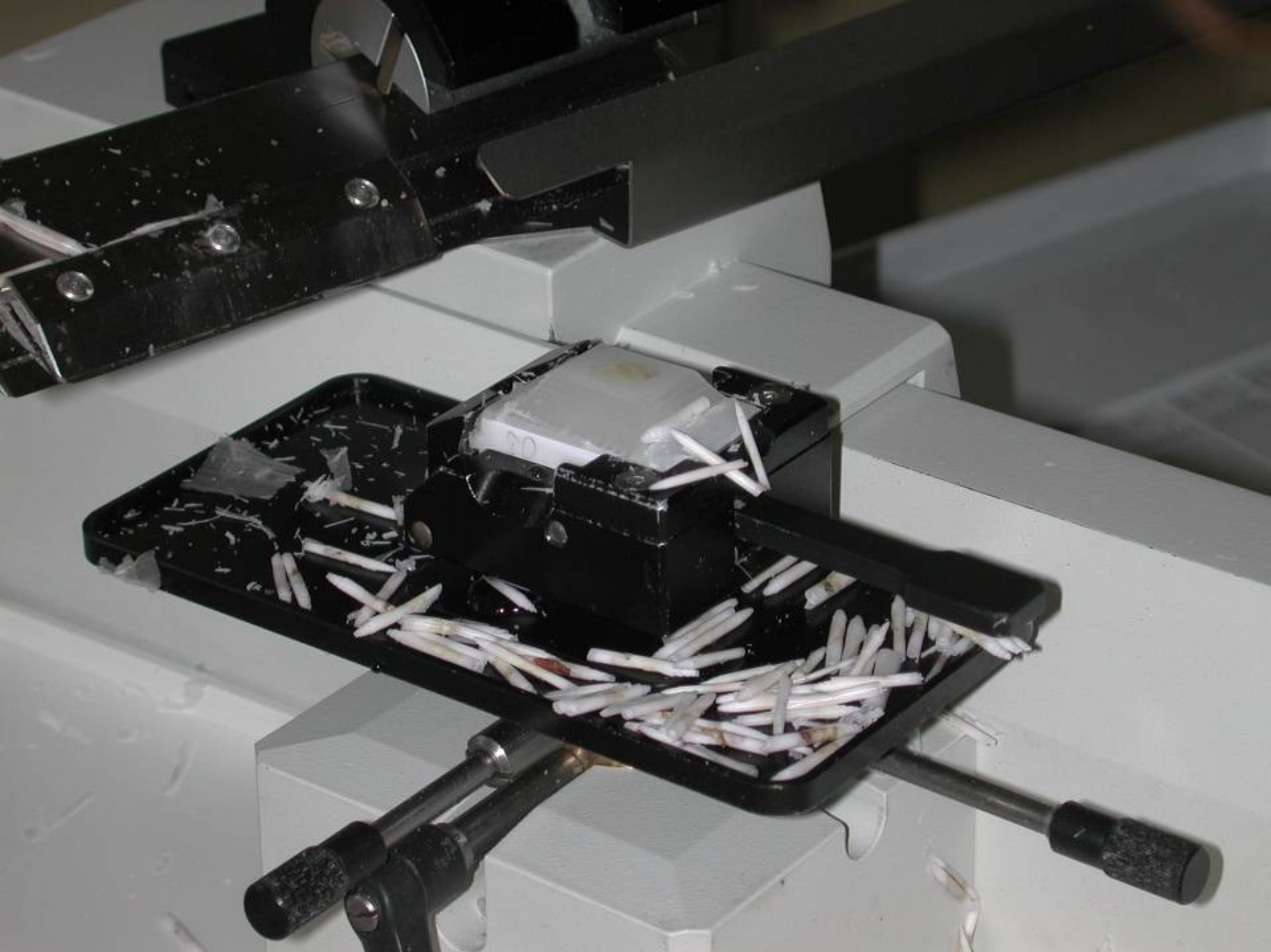
PROC MODE

10311

Hypercenter 300









50/16
9/05



MINTGLASS
Microscope Cover Glasses
Made in Germany

Slide 1
Slide 2
Slide 3
Slide 4
Slide 5

Zpracování bioptického materiálu v onkologii

Primární rozdělení tkáně	ZMRAŽENÍ			NATIVNÍ		FIXACE
Další ošetření	Kryobloky	RNAlater		Otisky, stěry	Odběr pro cytogenetiku	Parafinové bloky
Výstup I (rutinní)	Uložení do banky Izoláty pro molekulární diagnostiku			Peroperační cytologie		Bioptická diagnóza
Výstup II (speciální)	Analýza : PCR, RT-PCR atd. Proteomika			FISH, ISH (IHC)	Cytogen. diagnóza	IHC, FISH, ISH
Archiv	Kryobanka			Databáze mikroskopických obrazů		
	bloků	Izolátů	RNAlater	Databáze mikroskopických nálezů		
				Banka bloků		

Legislativní aspekty

Česká republika je členem „: Úmluvy o lidských právech a biomedicíně.“

Novela zákona 20 z roku 1966 o Zdraví lidu platná od 1.1.2008

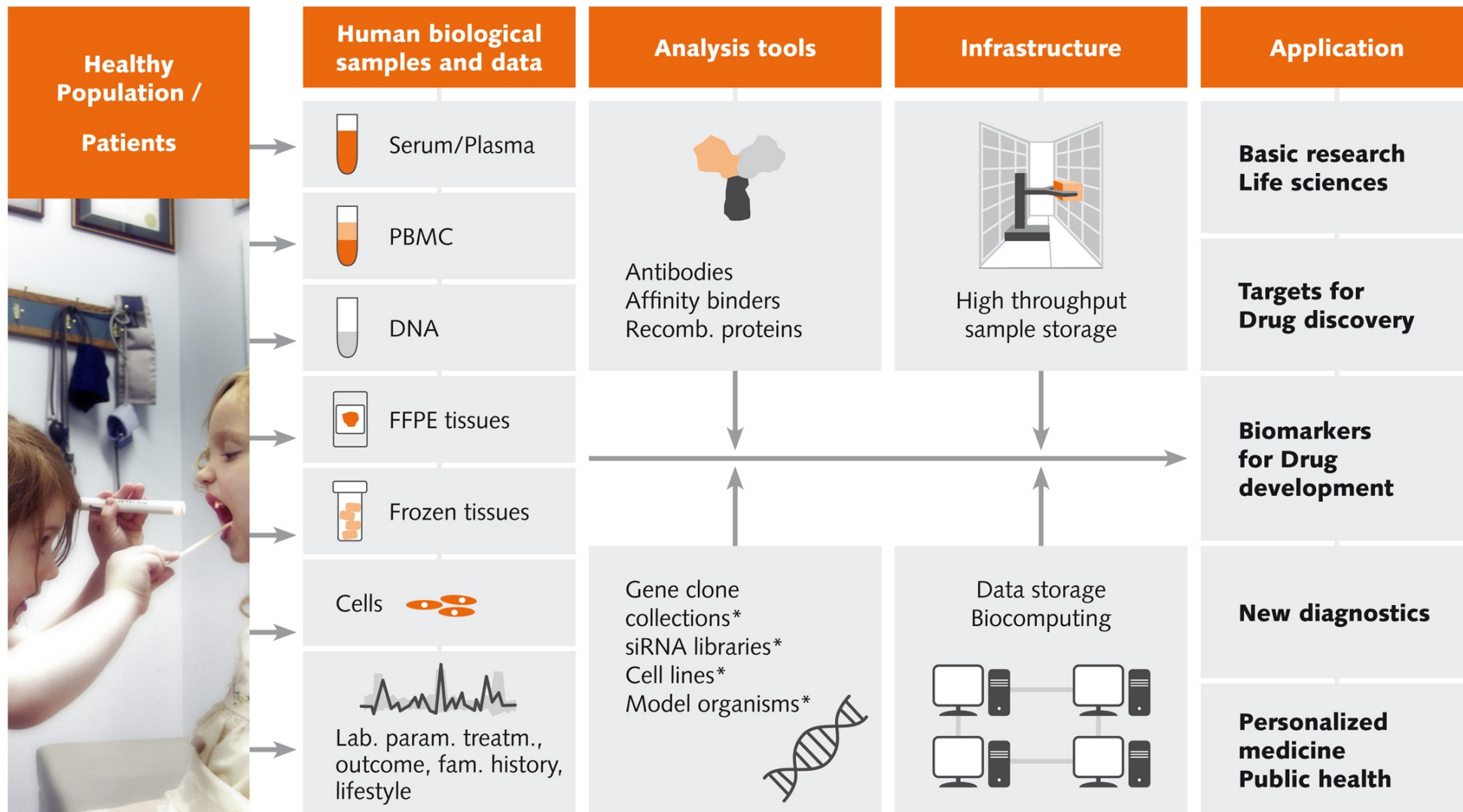
Paragraf 26:

Lidskou tkáň je pro účely vědy a výzkumu možno použít „pouze pokud byla pacientovi o možnosti jejího uchování a použití pro lékařské potřeby podána ošetřujícím lékařem informace a pacient s tím vyslovil prokazatelný písemný souhlas; součástí souhlasu je vymezení účelu použití částí těla pacienta“.

Použití materiálu z biobanky pro výzkum schvaluje lokální etická komise. Výběr z banky může rovněž podléhat schválení vědecké komise (hodnotí adekvátnost a potenciál projektu).

Banky biologického materiálu

Více např.: <http://www.isber.org> <http://www.bbmri.eu>

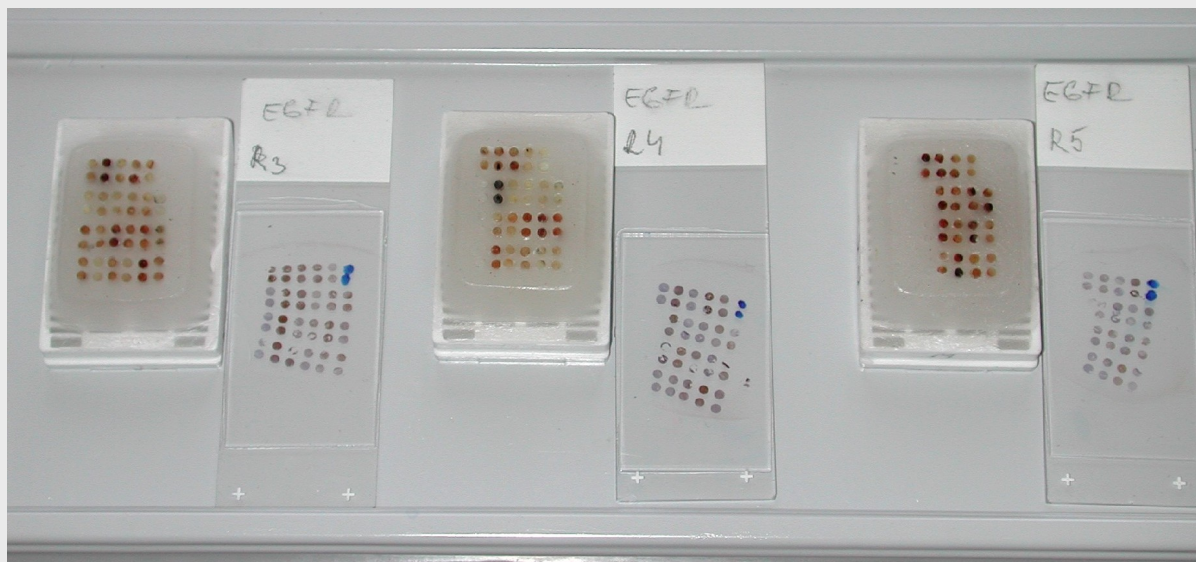


* ESFRI BMS report but not funded

Parafinový materiál

„FFPE“

- + Perfektně morfologicky charakterizovaný
 - Lze snadno mikrodisekovat v případě potřeby
 - Umožňuje perfektní lokalizaci na cílové struktuře
 - Každá patologie ho archivuje, možno vytvořit velké sestavy
- Zatížen artefakty zpracování, tj.:
 - izolace a amplifikace DNA : omezeně
 - izolace a amplifikace RNA: velmi omezeně
 - izolace a blotting proteinů: prakticky nemožné



Speciální techniky biopsie

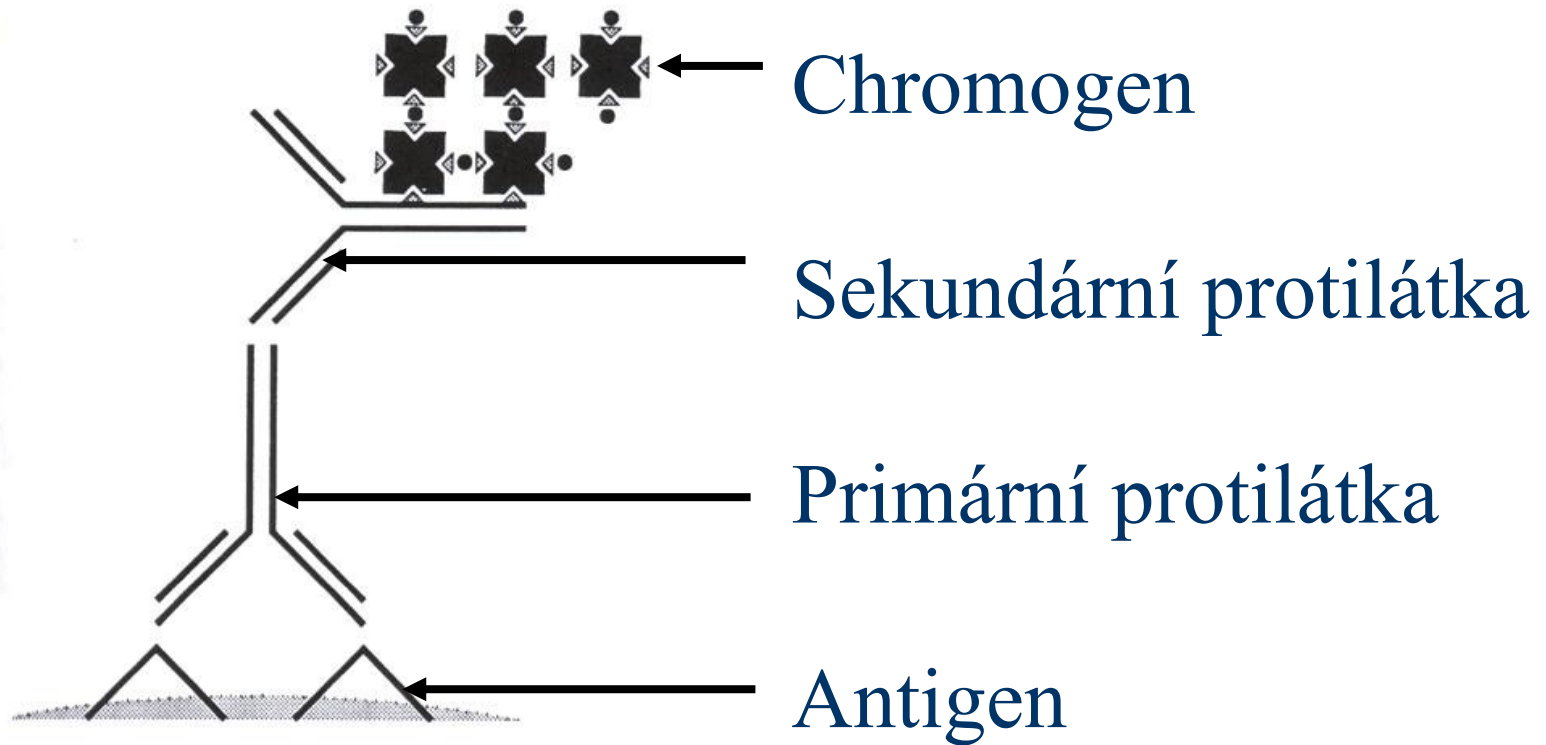
Speciální histologie:

- Histochemie
- Imunohistologie
- El. mikroskopie
- Morfometrie

Molekulární metodiky:

- ISH - hybridizace in situ (FISH)
- PCR in situ - PCR v histologických řezech
- CGH (komparativní genomová hybridizace)

Princip imunohistochemie



K čemu je to dobré

Snadné vyhledání specifických buněk

Histogeneze a typizace nádorů

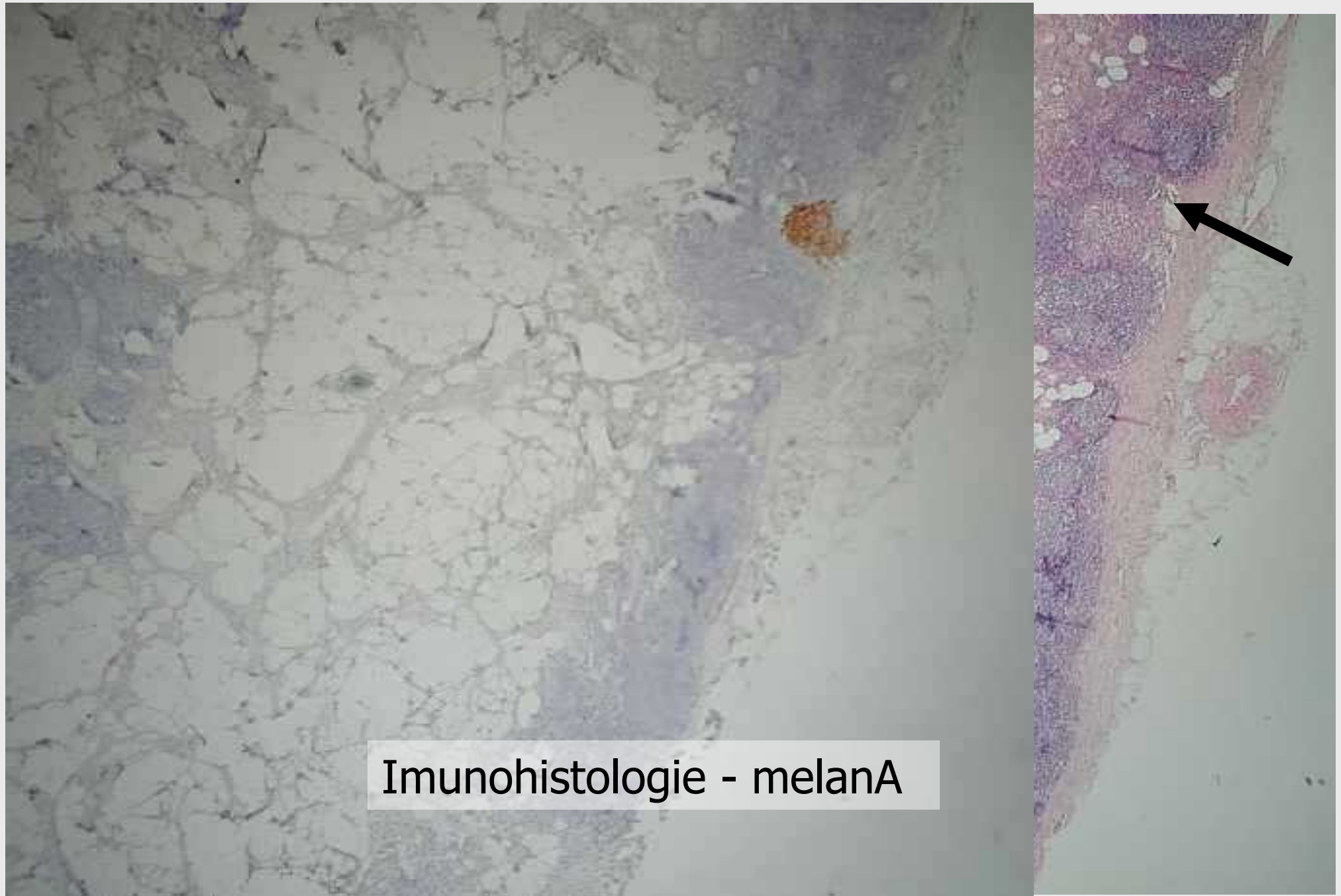
Prognostické parametry

Predikce odpovědi nádoru na léčbu

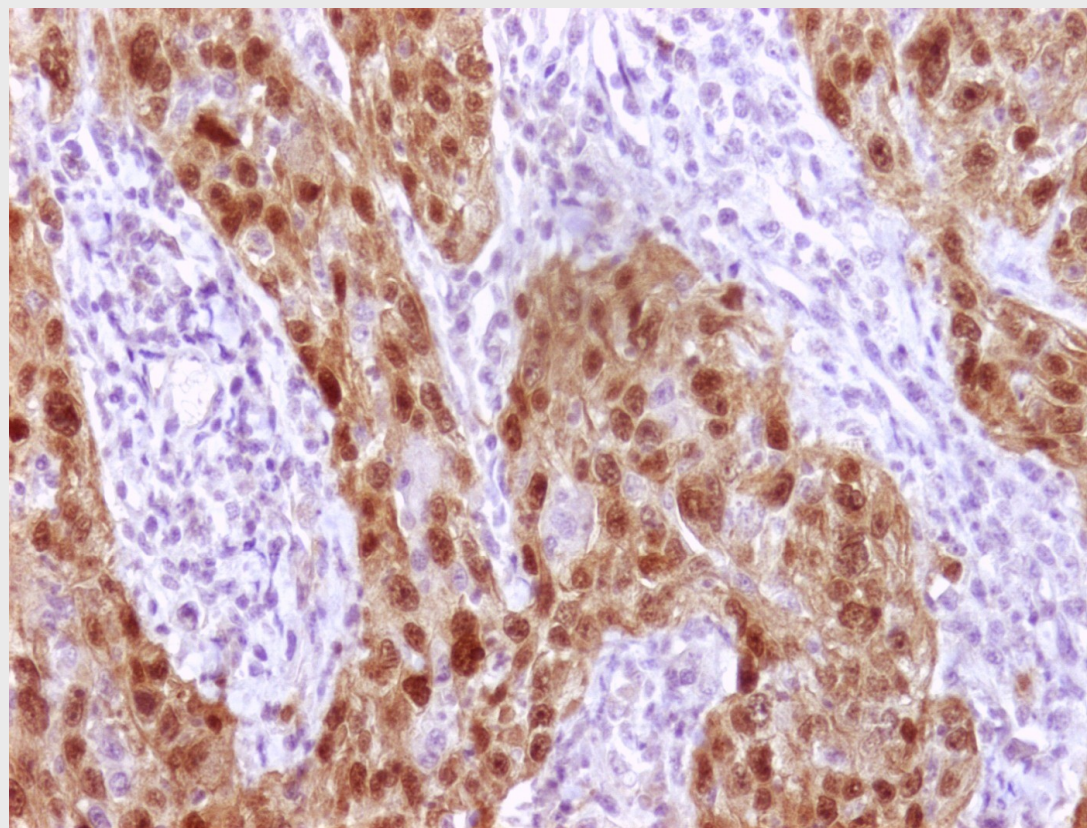
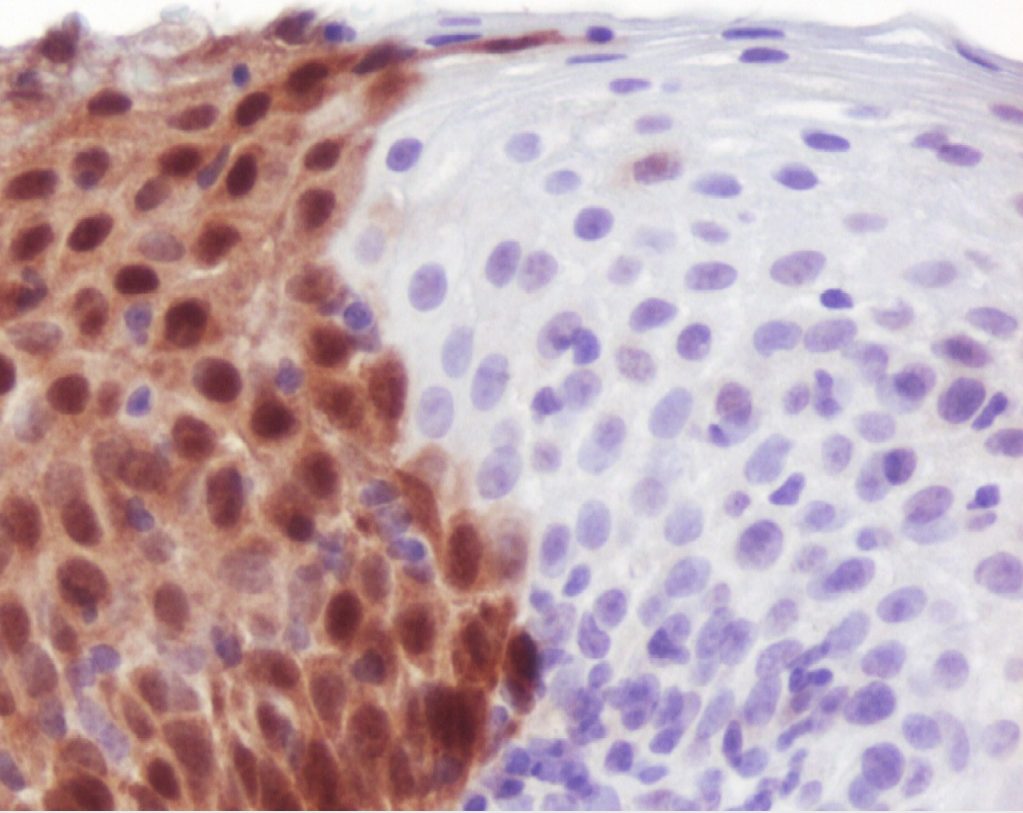
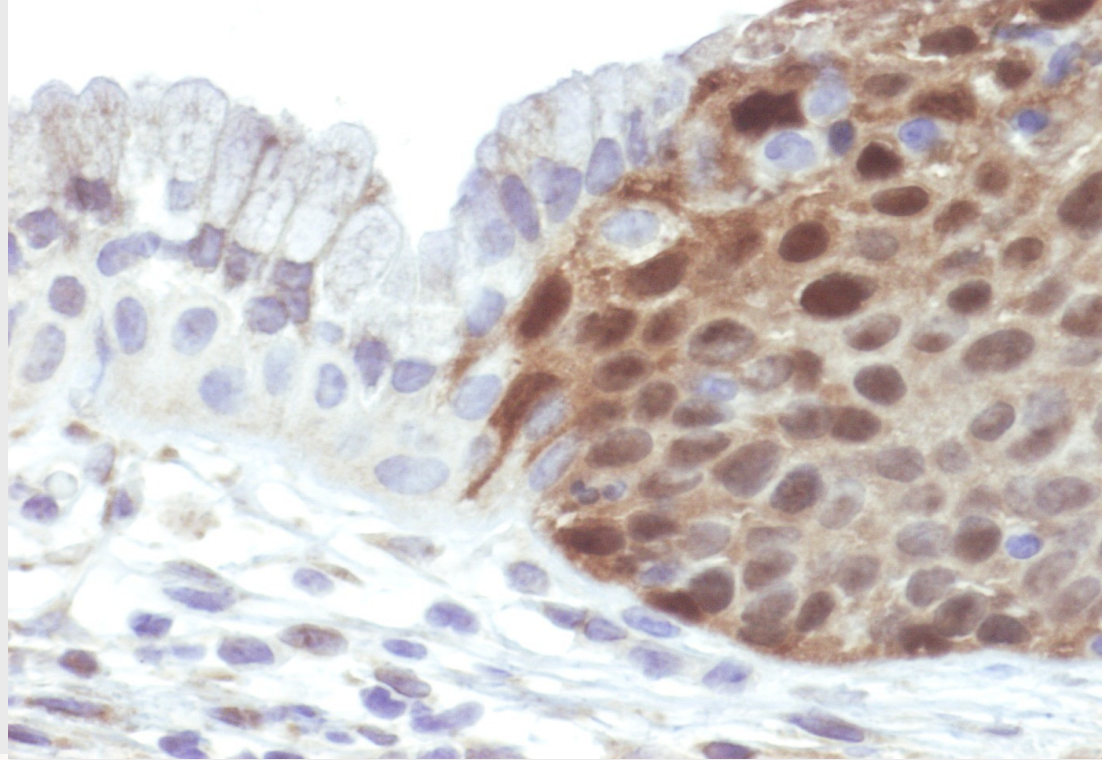
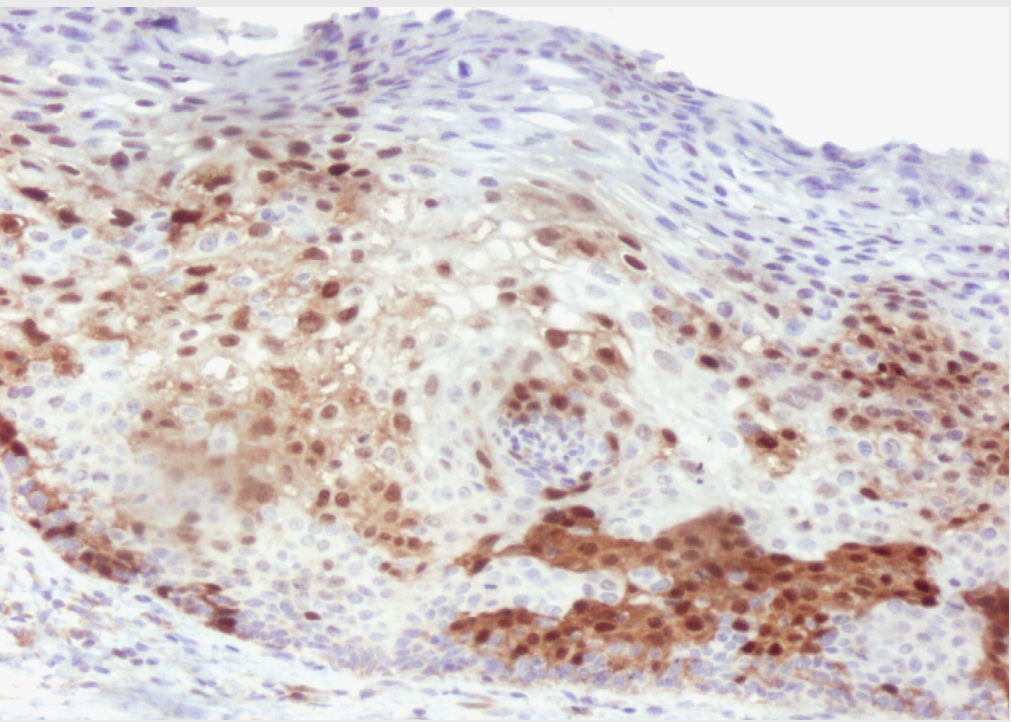
Exprese biomarkerů ve vazbě na specifickou strukturu

Koexprese biomarkerů

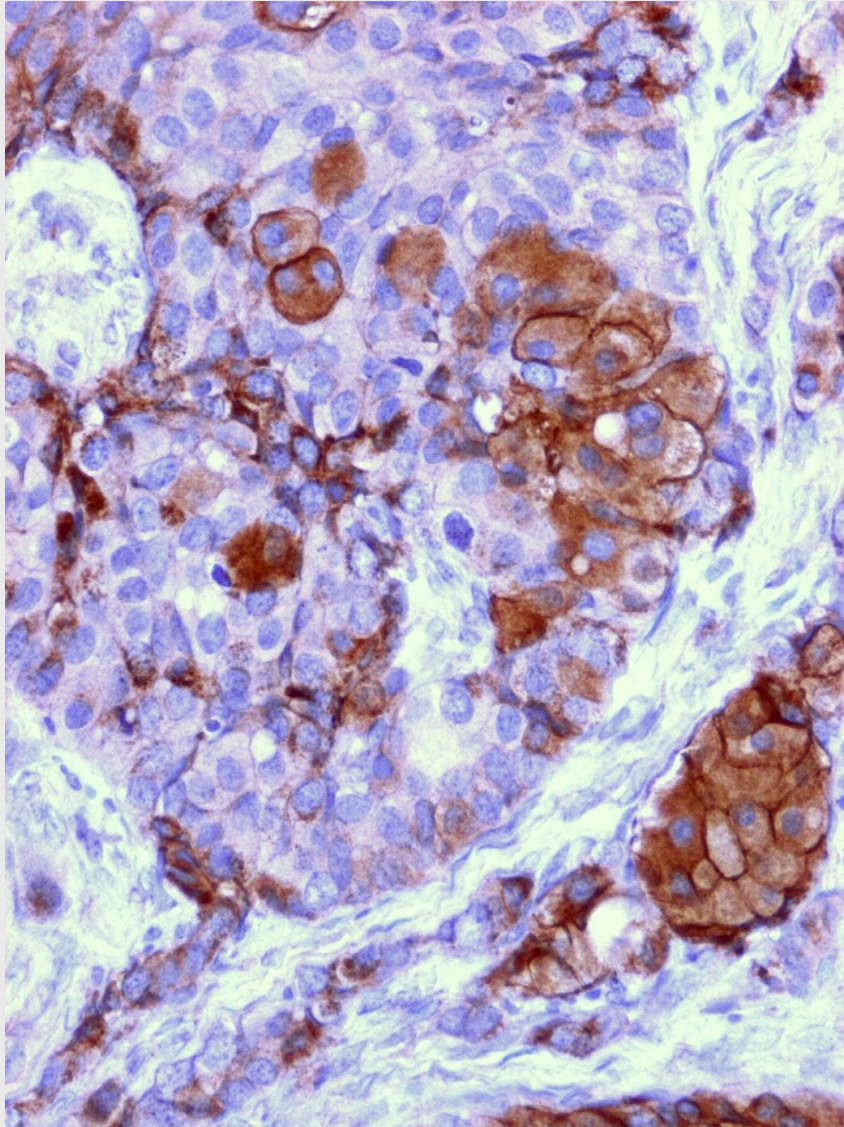
Snadné vyhledání specifických buněk



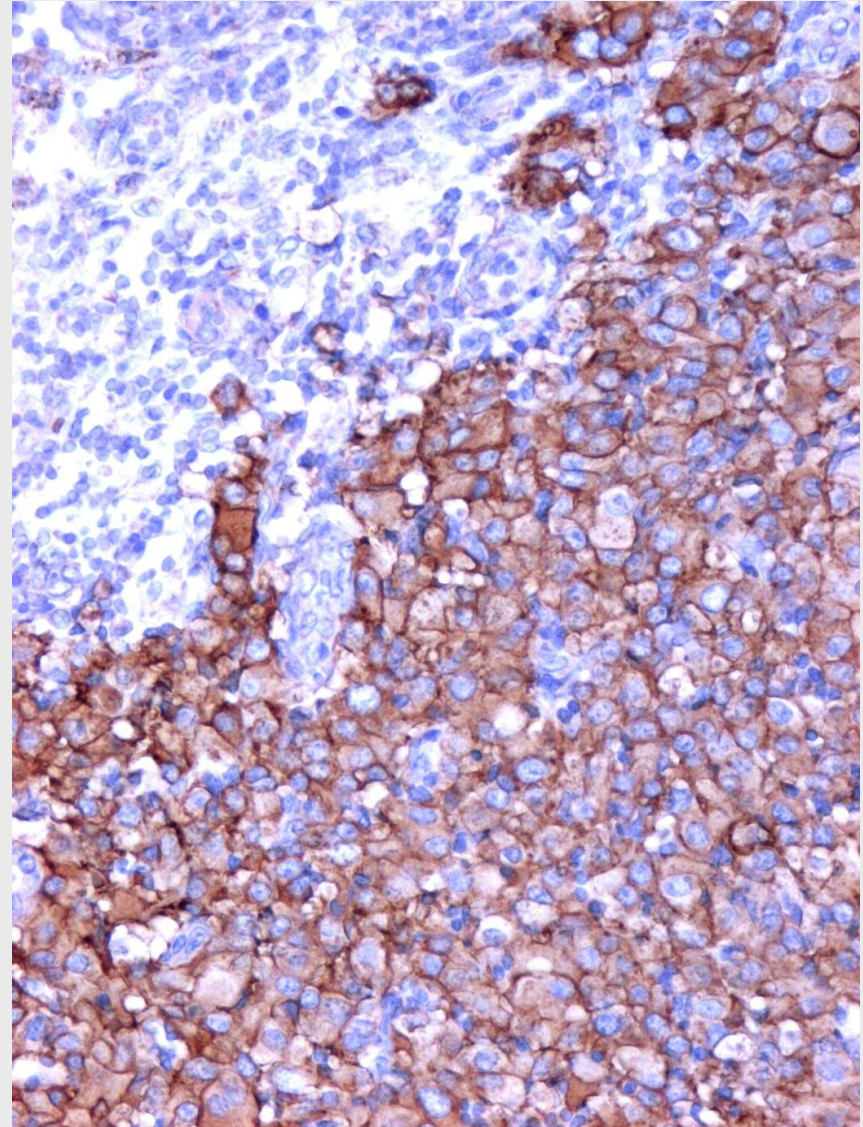
Imunohistologie - melanA



Heterogenita nádoru a metastazující klon - Her-2

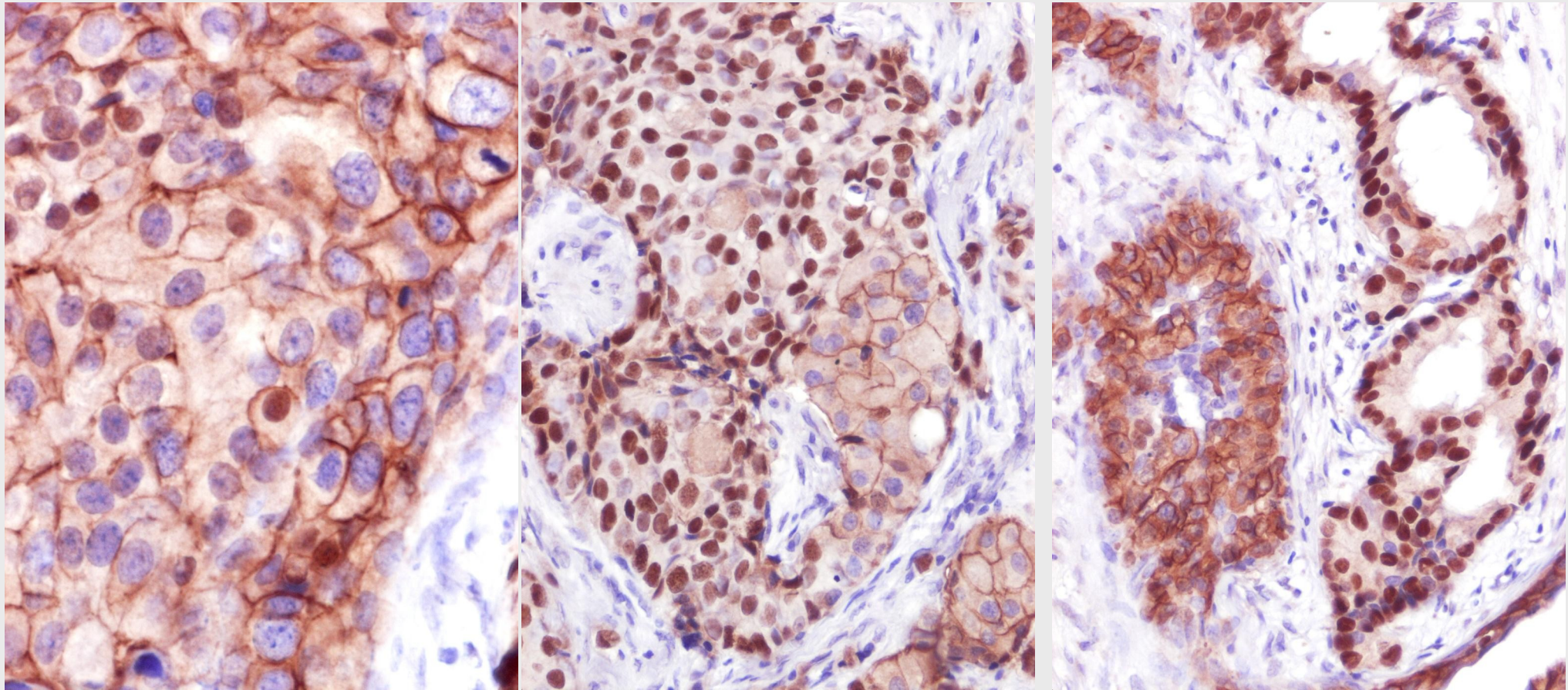


Primum



Metastáza

Klonální evoluce - paralelní barvení Her-2/neu a estrogenového receptoru v ca prsu (oba hnědá)

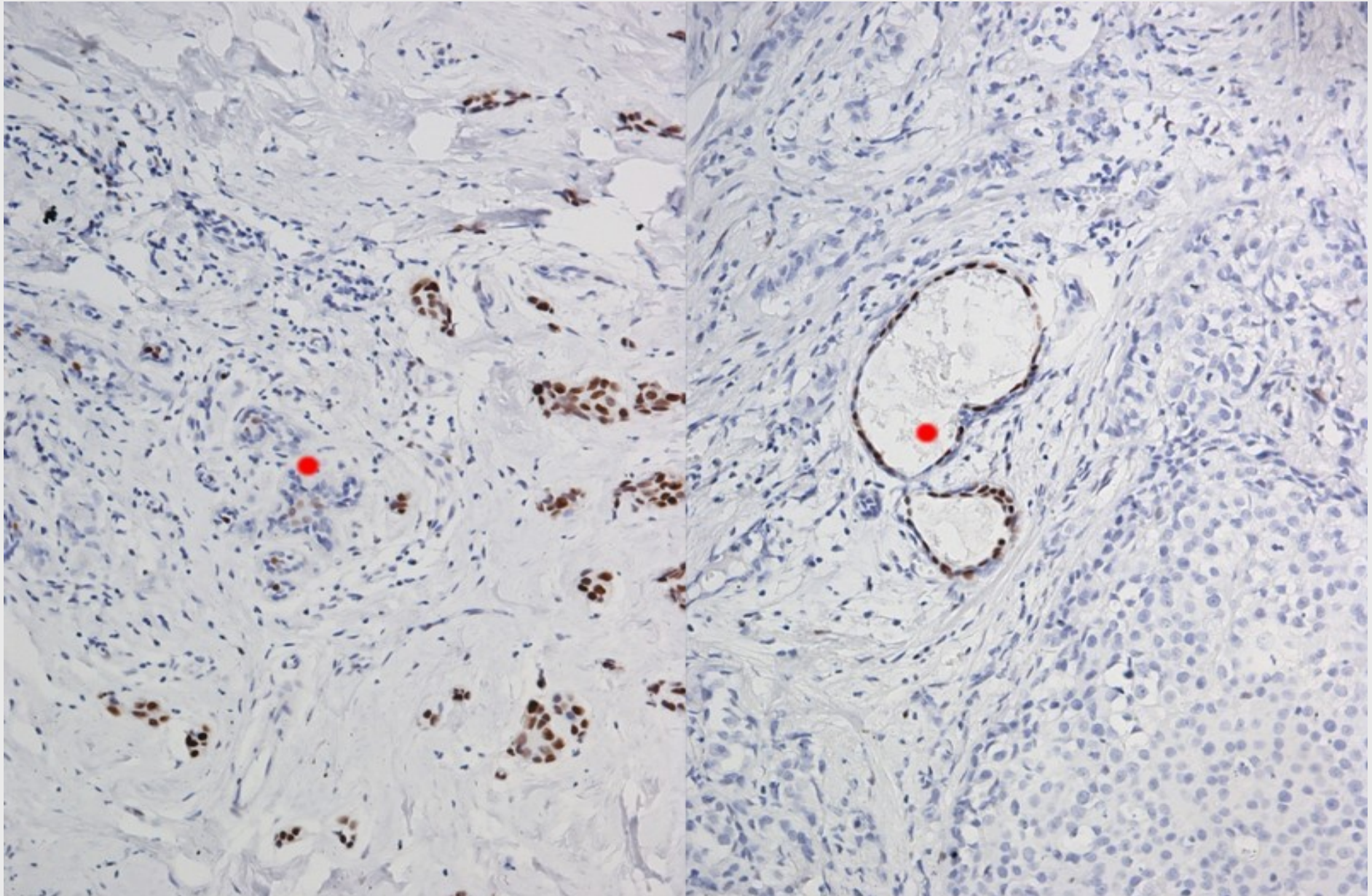


Ojedinělé buňky oba +

Divergence klonů

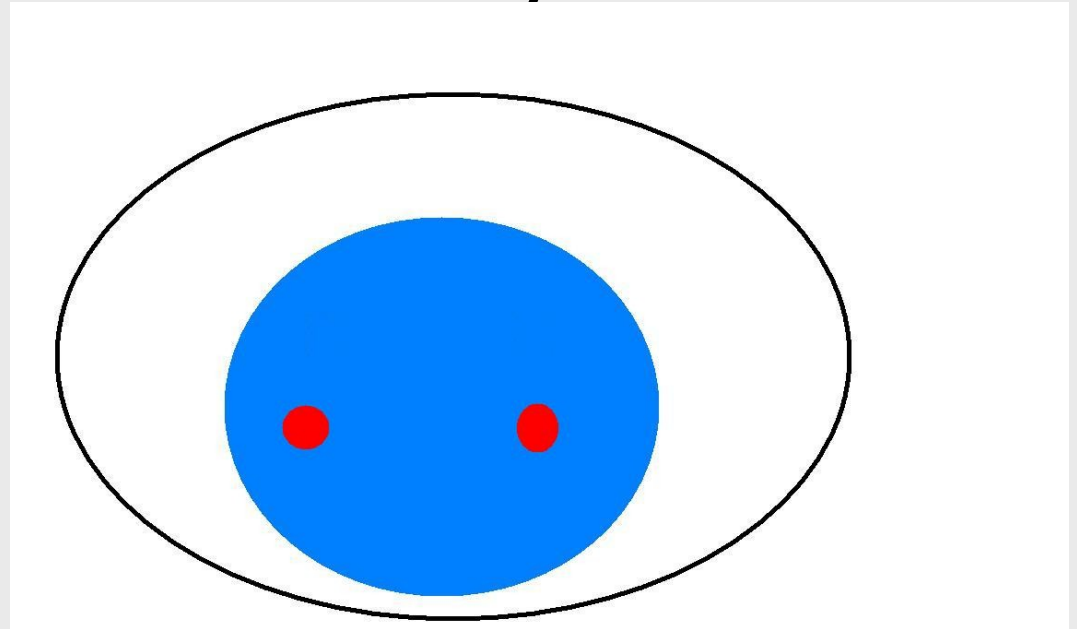
Klony samostatně

Steroidní receptory



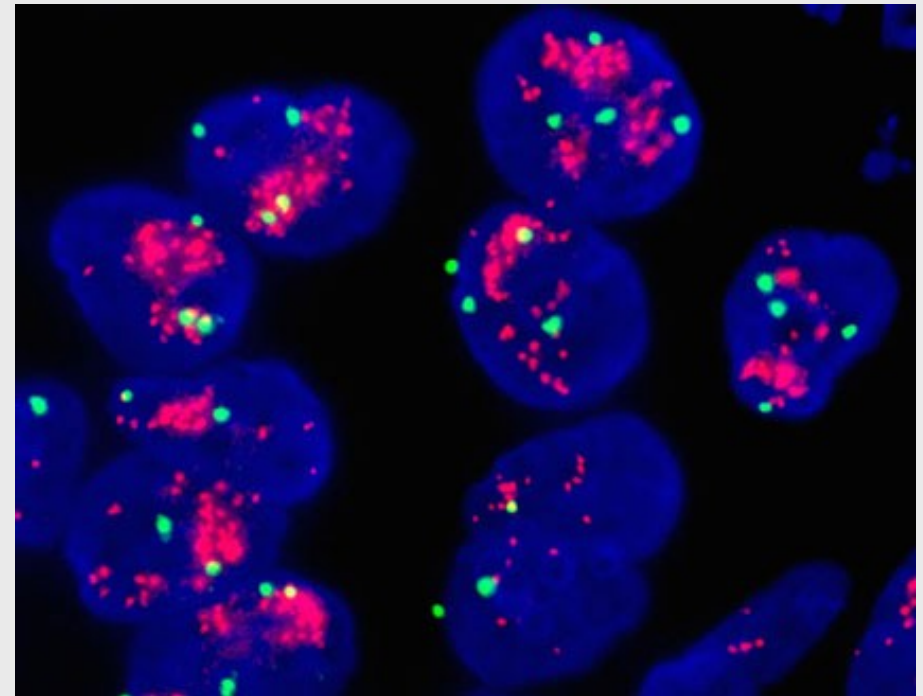
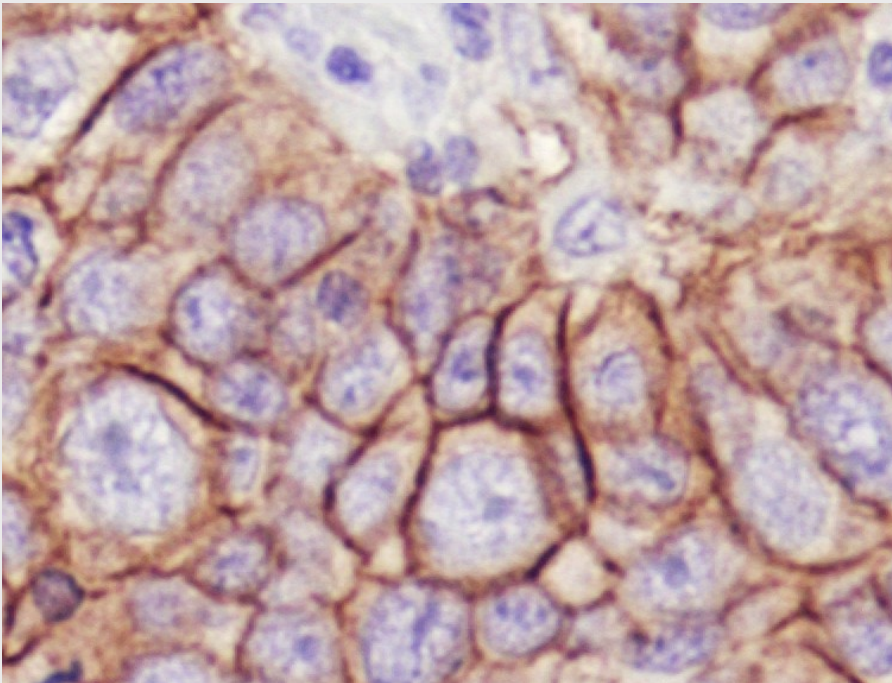
Hybridizace in-situ

- Sonda (próba) - krátký úsek DNA komplementární ke hledané sekvenci, předem označený.

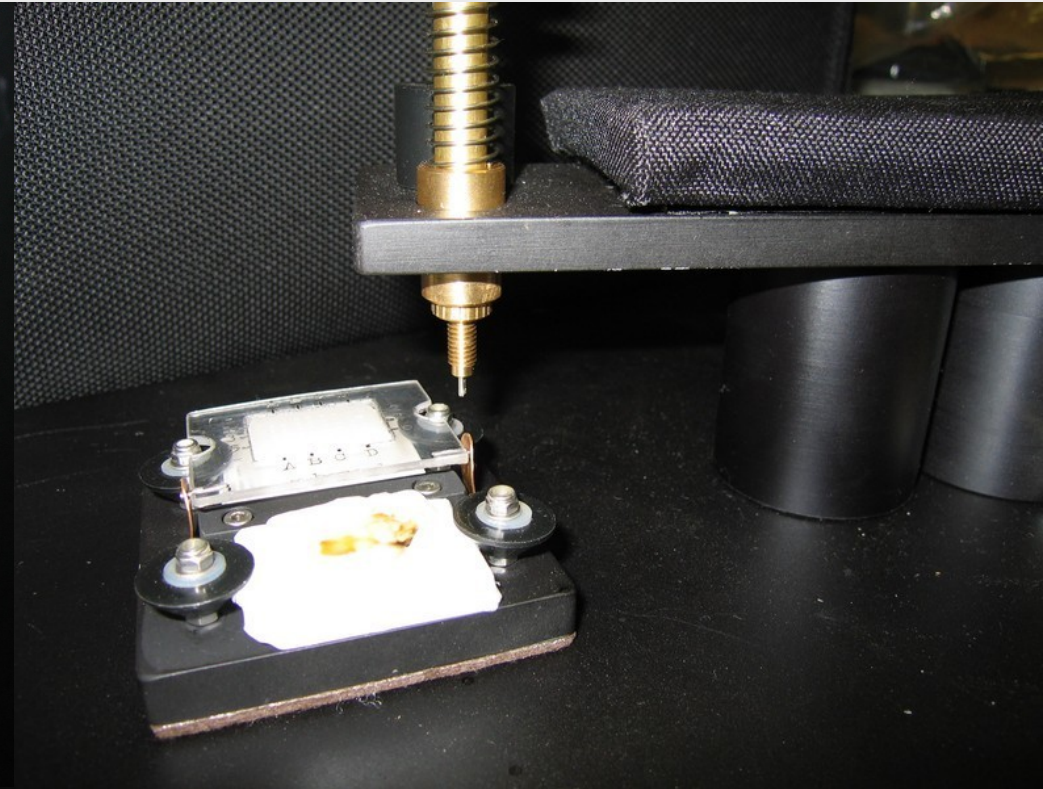


FISH

- FISH - fluorescenční in situ hybridizace
 - sonda označena fluorochromem
 - pozorování ve fluorescenčním mikroskopu
 - vyšší rozlišovací schopnost
 - možno použít několik sond současně
 - specifické sondy proti fúzním genům (bcr/abl..)

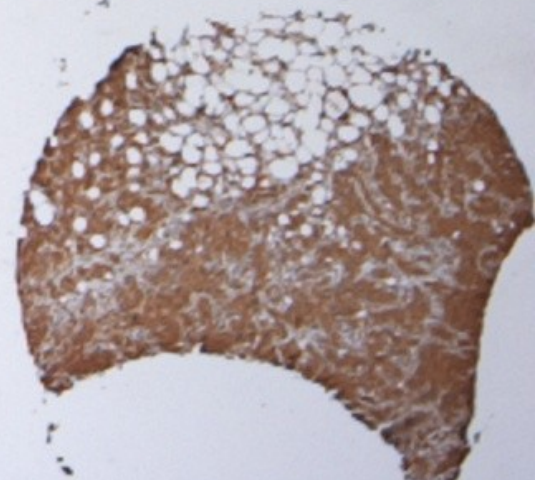
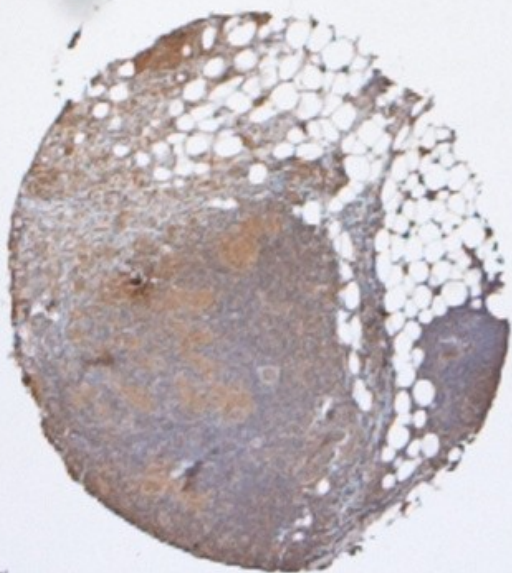
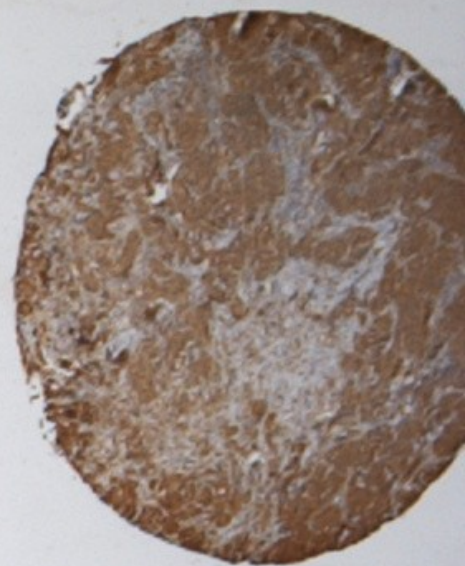
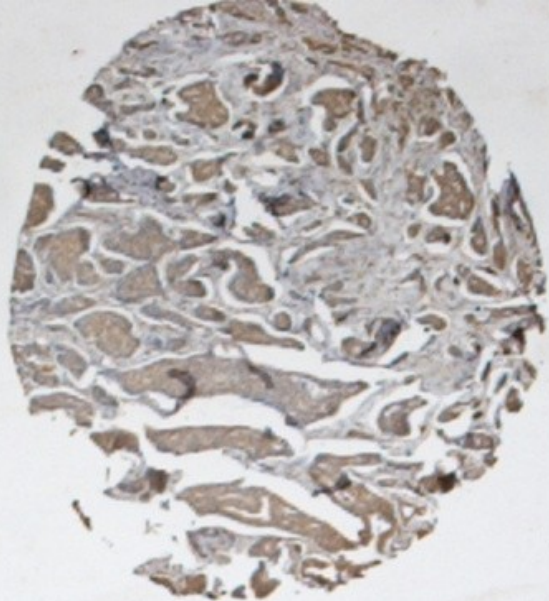
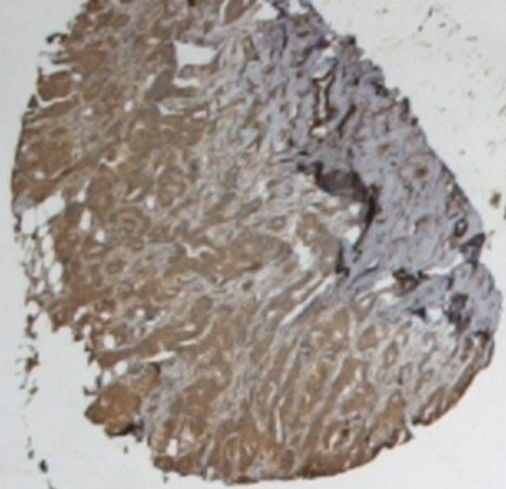


Složený tkáňový blok „Tissue array“

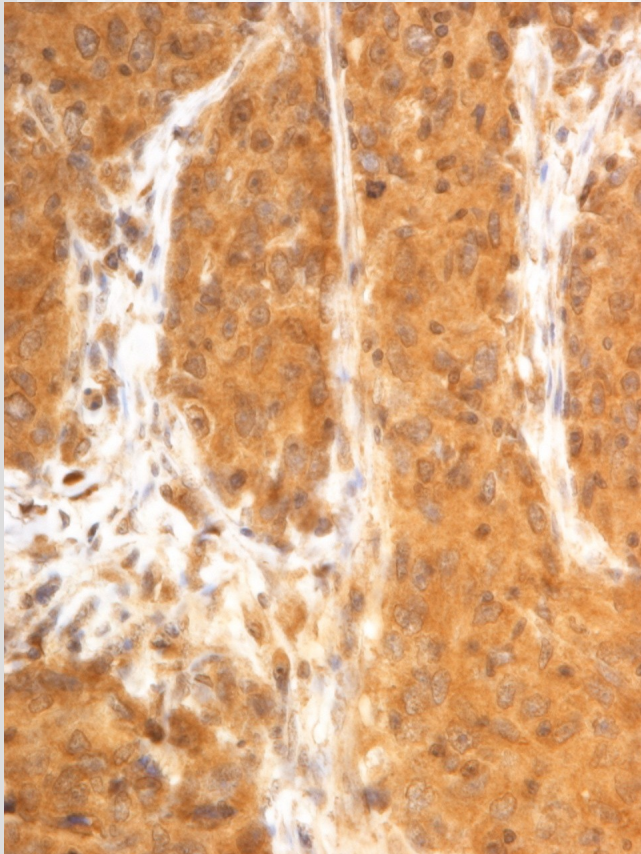


Imunohistologie - problémy

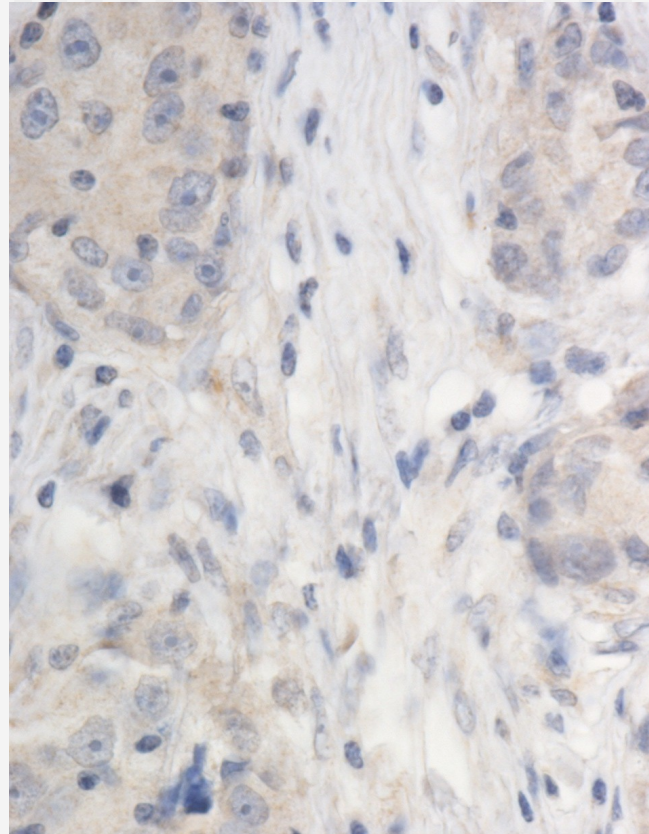
- Protilátka která blotuje nemusí být použitelná pro IHC a naopak
- Falešná pozitivita, nespecifické barvení
- Někdy obtížná interpretace



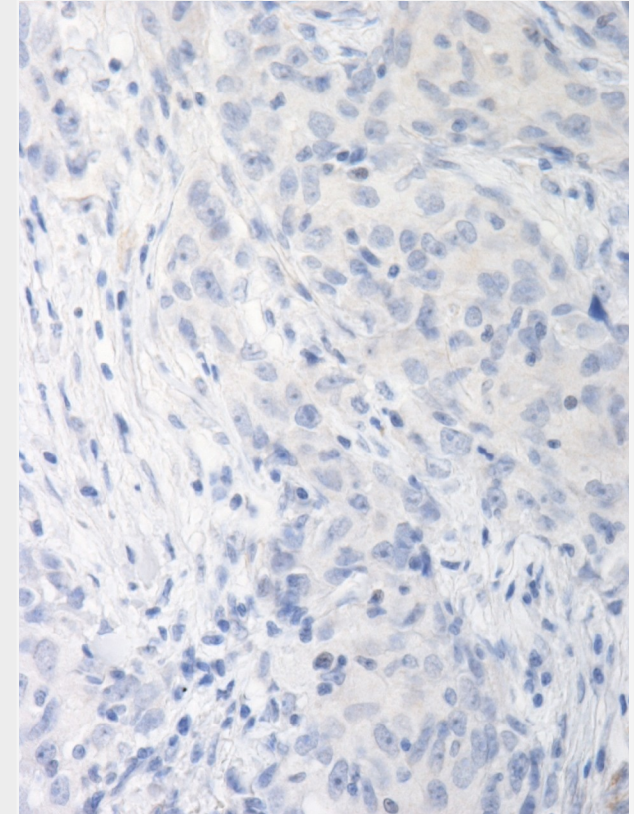
Imunohistologie - problémy



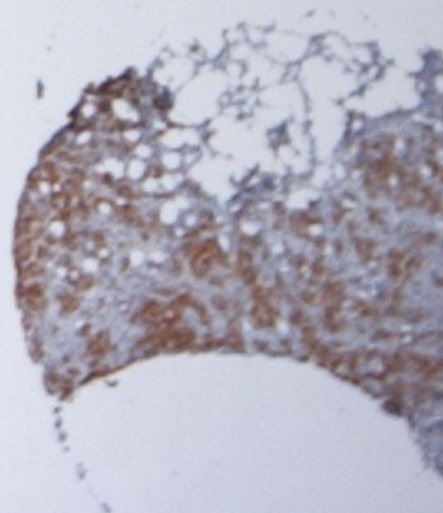
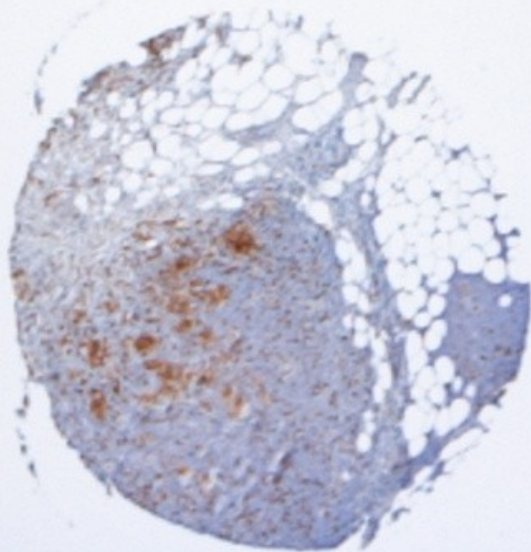
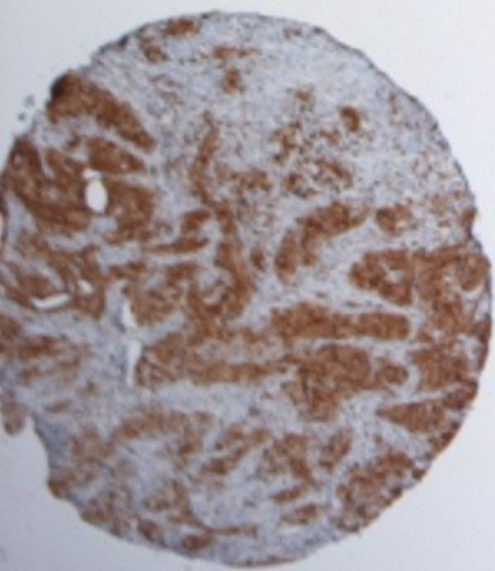
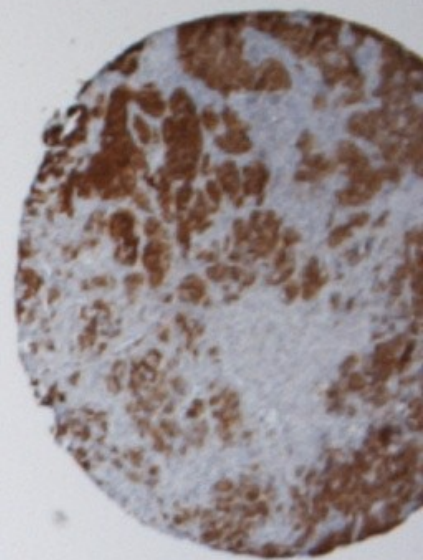
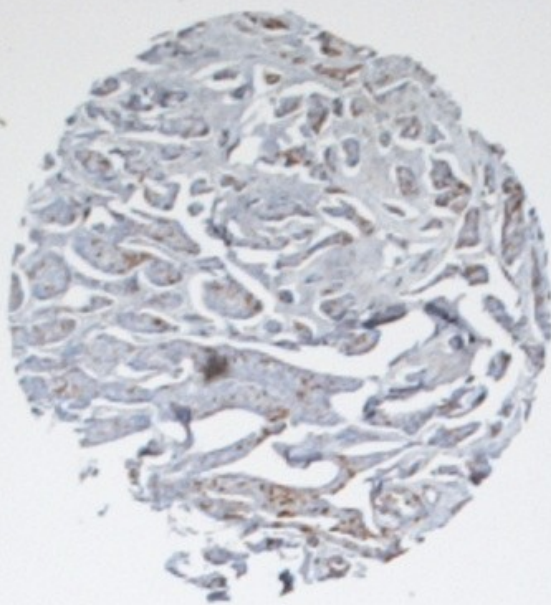
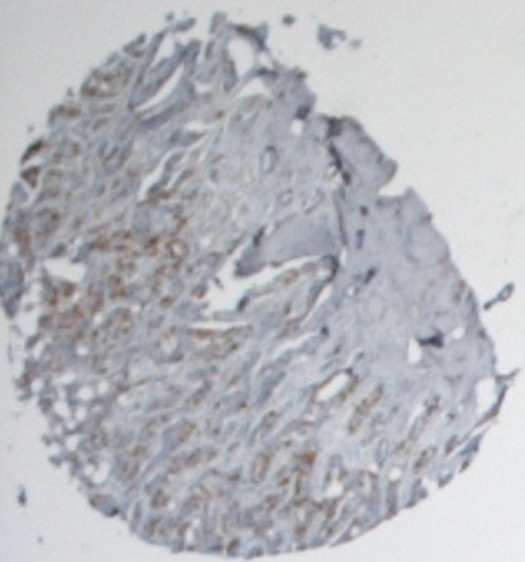
1:50



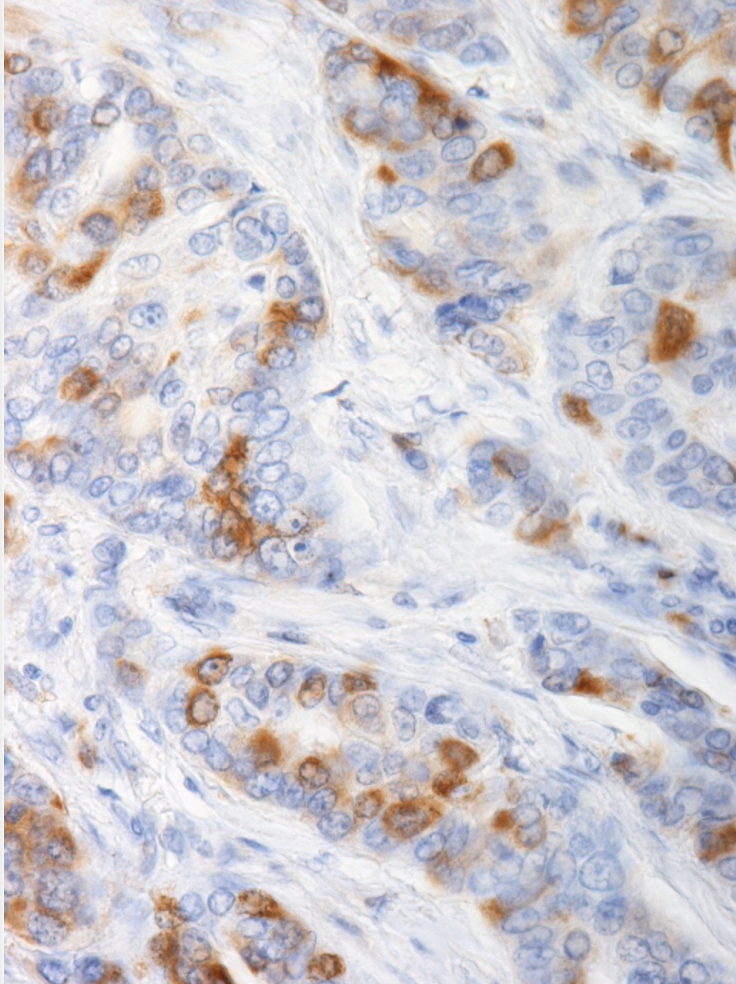
1:200



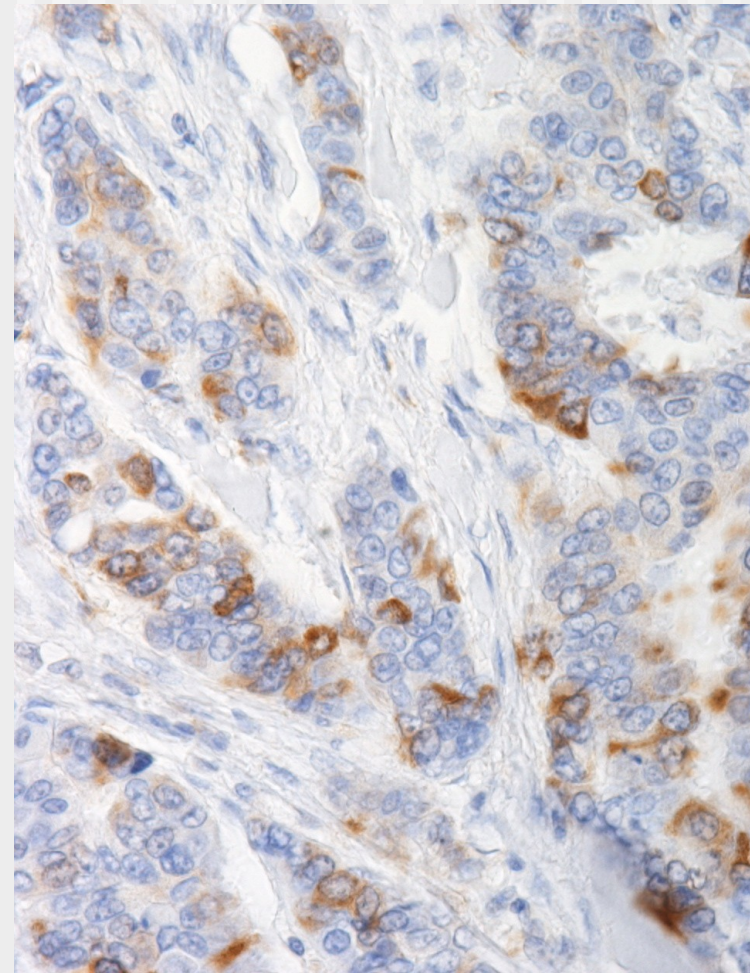
1:400



Imunohistologie - problémy



1:50



1:200

Technologie HistoRX - AQUA

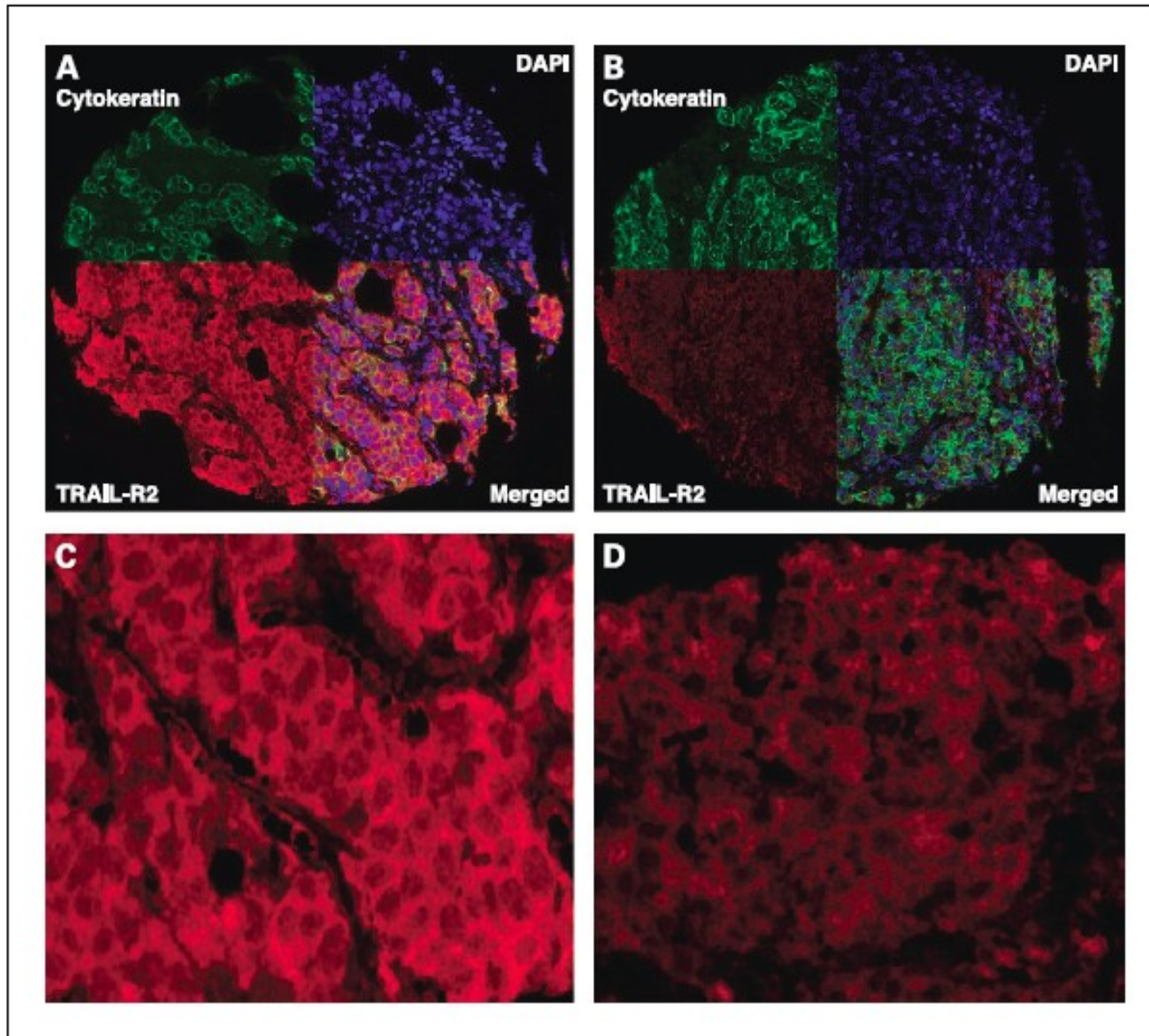
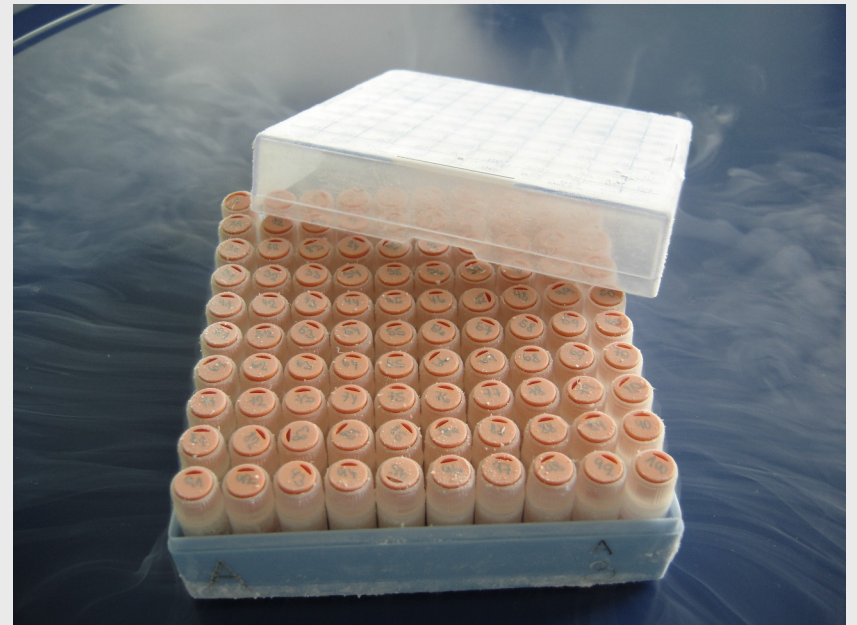


Fig. 1. High (A) and low (B) membranous TRAIL-R2 expression in a breast cancer histospot using cytokeratin to define tumor mask, 4,6-diamidine-2-phenylindole (DAPI) to define the nuclear compartment, and Cy5 for target (TRAIL-R2) identification at $\times 10$ magnification. High (C) and low (D) TRAIL R-2 expression using $\times 60$ magnification.

Hluboce zmrazená tkáň

- + Méně zatížen artefakty zpracování:
 - izolace a amplifikace DNA : ano
 - izolace a amplifikace RNA: ano
 - izolace a blotting proteinů: ano
- Horší morfologická charakterizace
- Limitované možnosti TMA
- Méně snadná mikrodisekce
- Zdroje tkání jsou omezené



Následné využití získaných nukleových kyselin

RNA

- Kvantitativní RT-PCR
- Expresní DNA čipy
- Sekvenace
- mikroRNA exprese a profily

Stanovení prognózy a predikce léčebné odpovědi

DNA

- PCR diagnostika (HPV 16...)
- Sekvenace, RFLP analýza - detekce mutací a polymorfizmů (p53, KRAS, DPD,...)
- Metylační status

Individualizace léčby pacientů s nádorovým onemocněním

Následné využití získaných proteinů

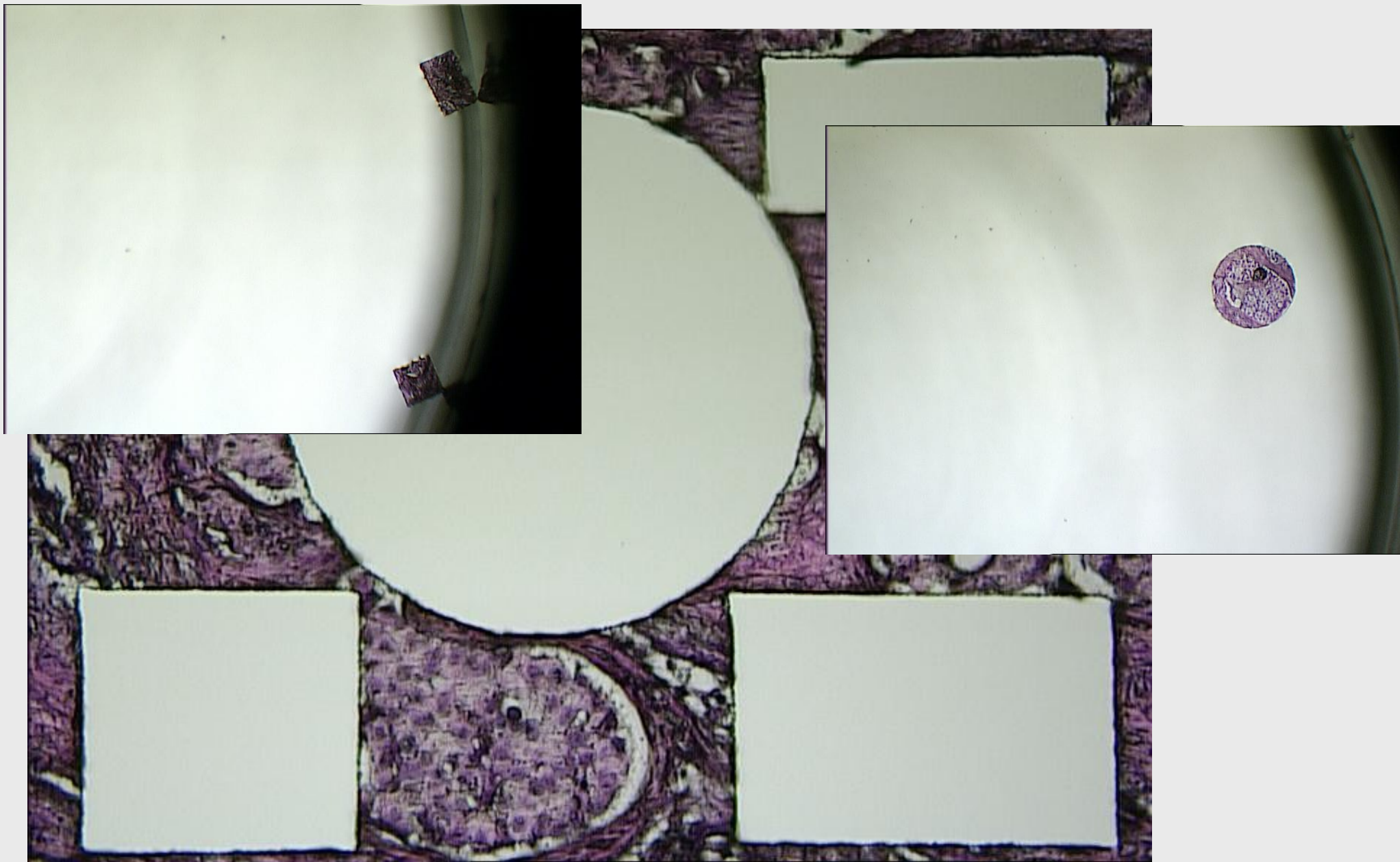
Imunoblotting

ELISA

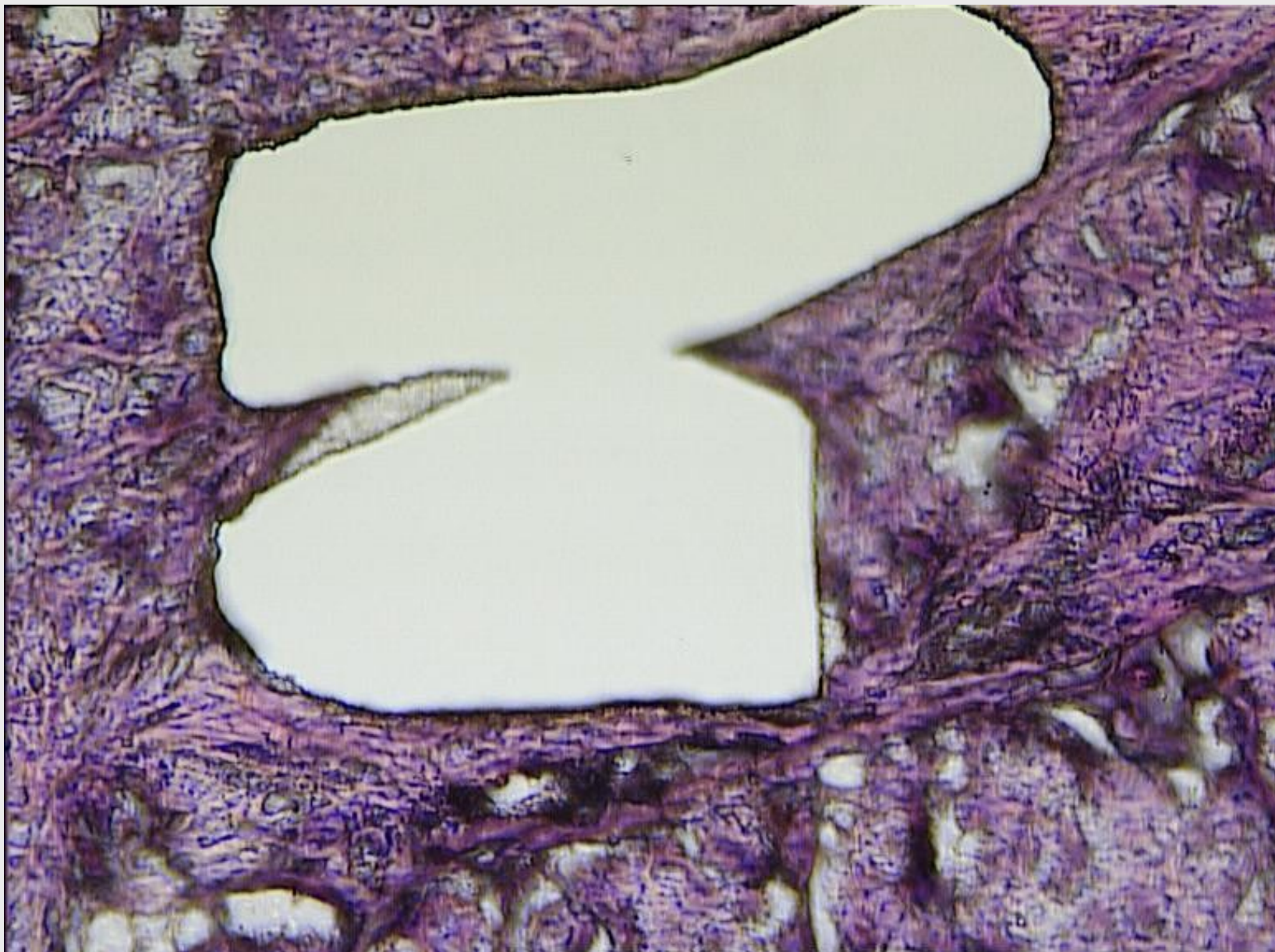
2D elektroforéza

Hmotnostní spektrometrie

Laserová mikrodisekce - praxe



Laserová mikrodisekce - praxe



Prognostické a prediktivní parametry

Prognóza = pravděpodobnost bezpříznakového přežití po definovanou dobu

příklad: klinické stadium nemoci (anatomický rozsah)

Predikce = pravděpodobnost příznivé odpovědi na určitou léčebnou modalitu.

příklad: přístomnost estrogenového receptoru (odpověď na antiestrogeny)

Prognóza, predikce odpovědi na cílenou léčbu

Faktory ovlivňující indikaci „necílené“ léčby: prognostické

- Klinické stadium
- Histologický typ
- Histopatologický grade

Faktory ovlivňující indikaci „cílené“ léčby: prediktivní

Přítomnost cílových struktur:

- Hormonální receptory
- Tyrosinkinázy (např. rodina EGFR, c-kit)
- Přítomnost specifických mutací (např K-ras, B-raf V600, EGFR, c-kit)

Makroskopický popis

- Stručný a výstižný popis materiálu, zaznamenány zvl. údaje pro pT pN klasifikaci a pro posouzení resekcčních hranic.
 - orgán, ložisko a jeho velikost (mm), vztah k okrajům či okolním strukturám, další změny...
 - mízní uzliny, jejich počet, patologický vzhled...

Mikroskopický náález

- V nejjednodušších případech může chybět
- Popis patologických změn ve tkáních, výsledky speciálních vyšetření (imunohistochemie...)
- Pro klinika „nezajímavé“, ale:
 - má forenzní hodnotu
 - jiný patolog umí podle popisu rekonstruovat obraz a rozvést diff. dg. rozvahy (*např. duplicita nebo metastáza*)

Závěr

- Jasně formulované závěry ke všem vyšetřeným tkáním (dle platných klasifikací).
- V případě nejednoznačného nálezu diferenciálně-diagnostická rozvaha.
- Doporučení dalšího diagnostického postupu, nový odběr...).
- ***„Co není v závěru, jako by nebylo“***

Jaké informace navíc obsahuje „onkologický“ bioptický nálezn?

- Histologický typing
- Histologický grading
- Staging WHO – TNM klasifikace
- Resekční okraje
- Vaskulární invaze, cílové molekuly (SR, EGFR, HER-2, C-KIT), imunitní odpověď, prognostické znaky (p53, Ki 67)

Předmět vyšetření a lokalizace: 1 souzlinní sentinelové p. axily, akt. 2000

2 resekát mhq p. mamy, steh obv. , perop. zhodnoc.

Klinická diagnóza (popř. stručný klinický průběh): ca mamma el. dx.

Prosíme vyšetření histologické, SR, HER2, proliferace a materiál na TB

Makroskopický nález: 1) SNB z l.dx. axilly: laločnatá, zčásti lipomatózní lymfatická uzlina délky 19 mm, nesuspektní (dr. Lžičařová) - kryo nezhotoveno.

SNB - zpracováno kompletně.

2) Orientovaný exstirpát vel. 45x55x50 mm. Na řezu v kaudální části infiltrát vel. 15x8x12 mm, kaudální okraj 5 mm, laterální okraj 3 mm, dorsální okraj 2 mm (fasciální), mediální okraj 10 mm, ventrální a kraniální 20 mm (dr. Lžičařová).

Odebrán nativní materiál pro tkáňovou banku.

Odebrán nativní materiál na p53.

Zapsala H. Chaloupková.

Mikroskopický nález: ad2):

1: para normal=mediální okraj: solidní a kribriformní low grade DCIS s nekrozami. K okraji 1mm.

2: para tumor: invazivní karcinom trabekulární a tubulární (15%) stavby, jaderná variabilita střední, mitotická aktivita fokálně až 9/2,5mm². BR skóre 6, grade 2. Angioinvaze přítomna. V okolí tumoru low grade DCIS s nekrozami, kribriformní stavby, SR pozitivní.

3: tumor: idem.

4-5: tumor+kaudální okraj: okraj 3mm pro invazivní a 1mm pro minoritní DCIS komponentu

6-8: dorsální okraj: 5mm pro invazivní karcinom. DCIS zasahuje bezprostředně do okraje- fascii zde neidentifikuji.

9: dorsolaterální okraj: 5mm pro obě složky.

ad1): 10-11: SNB: mízní uzlina, v HE bez patologie, po seriovém prořezání a detekci CK 19: bez metastatického postižení.

Imunohistochemické stanovení receptorů nádorových buněk bl.č. : 3

ER Labvision SP1, PR Novocastra NCL-PGR-312. Ki67 Labvision SP6.

ER: 100%

PR: 95%

Proliferační antigen Ki-67: 57%

Závěr:

Invazivní ductální karcinom G2 v terénu G2 DCIS. Resekční okraje pro DCIS pozitivní (dorsálně) a těsné 1mm (mediálně a kaudálně). VNPI = 9.

Angioinvaze: ANO.

SR silně pozitivní při vysoké proliferaci. Her-2 dle dokumentace negativní - 0 (Plzeň).

SNB: negativní.

KLASIFIKACE:

topografie(ICD-O-3): C509 (vpravo), morfologie(ICD-O-3): 8500/32, dg: C509, pTNM(7): pT1c (15 mm) N0(i-)(sn) (sn uzliny[poz/vyš]: 0/1) [pN], L1

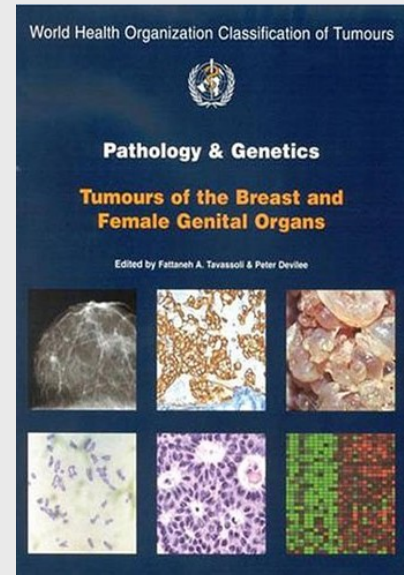
Sumarizace – co u nádorů stanovujeme

- **Typ** - názvosloví (WHO, ICD-O)
- **Stadium** – anatomický rozsah nádoru (TNM)
- **Grade** – morfologický odhad malignity nádoru
- **Rating** - prognostika a predikce účinku specifické terapie

Histologický typ

Standardní nomenklatura WHO (ICDO-3):

8500/33 ← Grade 1 až 3



Morfologie

Např.

8890 spinocelulární
karcinom

9010 fibroadenom

...

Biologické chování

0 benigní

1 nejisté

2 in-situ

3 maligní

6 metastáza

MKN-O-3 ČV

MEZINÁRODNÍ
KLASIFIKACE
NEMOCÍ
PRO ONKOLOGII
Třetí vydání
ČESKÁ VERZE

**C24 JINÉ A NESPECIFIKOVANÉ ČÁSTI
ŽLUČOVÝCH CEST**
C24.0 Extrahepatický žlučovod, NS

Vývod žlučový, NS
Ductus choledochus
Ductus cysticus
Vývod žlučnicku
Ductus hepaticus
Vývod jaterní
Oddího svěrač

C24.1 Ampulla hepatopancreatica

Vaterova ampula
Periampulární oblast

C24.8 Přesahující léze žlučových cest

Poznámka: nádory postihující
intrahepatické i
extrahepatické
žlučovody viz též pozn.
na str. 59

C24.9 Biliární trakt, NS

Žlučové cesty, NS

C25 PANKREAS
C25.0 Hlava pankreatu
C25.1 Tělo pankreatu
C25.2 Ocas pankreatu
C25.3 Vývod pankreatu

Santoriniho vývod
Ductus pancreaticus
Wirsungův vývod
Ductus pancreaticus accessorius

C25.4 Langerhansův ostrůvek

Endokrinní pankreas

C25.7 Jiné určené části pankreatu

Krček pankreatu
Collum pancreatis

C25.8 Přesahující léze pankreatu

(viz pozn. na str. 59)

C25.9 Pankreas, NS
Slinivka břišní, NS

**C26 JINÉ A NEPŘESNĚ DEFINOVANÉ
ORGÁNY TRÁVICÍHO TRAKTU**
C26.0 Intestinální trakt

Střevo, NS

C26.8 Přesahující léze trávicího traktu

Poznámka: Nádory orgánů tr.
traktu, jejichž místo
vzniku nelze kódovat
v žádné z položek
C26.0., (viz také j.
na str. 59)

C26.9 Gastrointestinální trakt, NS

Trávicí ústrojí, NS

**C30 - C39 RESPIRAČNÍ SYSTÉM
A NITROHRUDNÍ ORGÁNY**
C30 DUTINA NOSNÍ A STŘEDNÍ
C30.0 Dutina nosní

(nepatří sem nos, NS C76.0)

Vnitřní nos

Naris

Nosní chrupavka

Nosní sliznice

Septum nosní, NS

(nepatří sem zadní okraj sept.
nosního C11.3)

Skořepa nosní

Vestibulum nasi

C30.1 Střední ucho

Vnitřní ucho

Zvukovod

Tuba auditiva

Eustachova trubice

Antrum mastoideum

Cavum tympani

8052/3 Papilární dlaždicový karcinom
Papilární epidermoidní
karcinom

8053/0 Dlaždicový papilom, invertovaný
8060/0 Dlaždicová papilomatóza
Papilomatóza, NS

8070/2 Dlaždicový karcinom in situ, NS
Epidermoidní karcinom in situ,
NS

Intraepidermální karcinom, NS

Intraepiteliální skvamózní
karcinom

8070/3 Dlaždicový karcinom, NS

Epidermoidní karcinom, NS

Dlaždicový epitelom

**8070/6 Dlaždicový karcinom,
metastatický, NS**
**8071/3 Dlaždicový karcinom, rohovějící,
NS**

Dlaždicový karcinom
velkobuněčný, rohovějící
Epidermoidní karcinom,
rohovějící

**8072/3 Dlaždicový karcinom
velkobuněčný, nerohovějící, NS**

Dlaždicový karcinom,
nerohovějící, NS
Epidermoidní karcinom,
velkobuněčný, nerohovějící

**8073/3 Dlaždicový karcinom
malobuněčný, nerohovějící**

Epidermoidní karcinom,
malobuněčný, nerohovějící

**8074/3 Dlaždicový karcinom
vřetenobuněčný**

Epidermoidní karcinom,
vřetenobuněčný
Dlaždicový karcinom,
sarkomatoidní

8075/3 Dlaždicový karcinom, adenoidní
Dlaždicový karcinom,
pseudoglandulární
Dlaždicový karcinom,
akantolytický

**8076/2 Dlaždicový karcinom in situ se
spornou stromální invazí**
Epidermoidní karcinom in situ
se spornou stromální invazí

**8076/3 Dlaždicový karcinom,
mikroinvazivní**
**8077/2 Dlaždicová intraepiteliální
neoplazie, stupeň (grade) III**
(viz Pravidla kódování, str. ...)

Cervikální intraepiteliální
neoplazie, stupeň (grade) III
(C53._)

CIN III, NS (C53._)

CIN III s těžkou dysplazií
(C53._)

Vaginální intraepiteliální
neoplazie, stupeň (grade) III
(C52._)

VAIN III (C52._)

Vulvární intraepiteliální
neoplazie, stupeň (grade) III
(C51._)

VIN III (C51._)

Anální intraepiteliální
neoplazie, stupeň (grade) III
(C21.1)

AIN III (C21.1)

**8078/3 Dlaždicový karcinom s tvorbou
„robu“**
8080/2 Queyratova erytroplazie (C60._)
8081/2 Bowenova nemoc (C44._)
Intraepidermální dlaždicový
karcinom, Bowenův typ
(C44._)

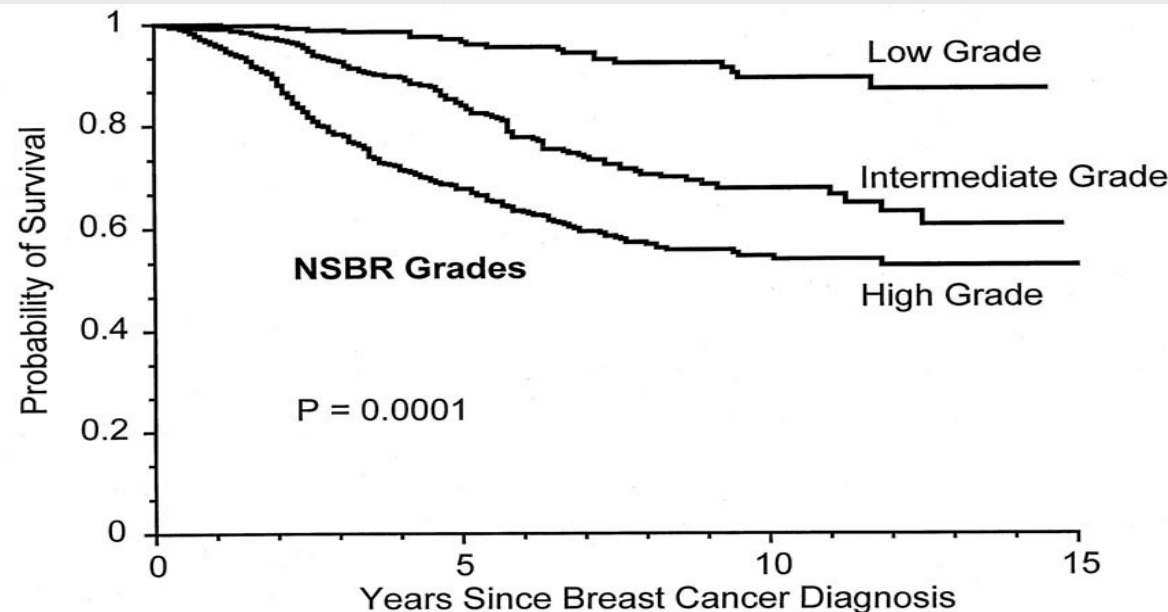
8082/3 Lymfoepitelový karcinom
Lymfoepitelom
Lymfoepiteliomu podobný
karcinom
Schminckeův nádor (C11._)

Histologický grade

Odhad „stupně malignity“, „diferenciace“

V praxi = konvenční morfologická kritéria, liší se podle lokalizace a morfologie nádoru

- Karcinom prsu: tubulární formace, jaderná polymorfie, mitotická aktivita
- Sarkomy měkkých tkání: podobnost výchozí buňce, nekrózy, mitotická aktivita
- Folikulární lymfomy: zastoupení „větších buněk“
- Prostata: Gleason skóre
- ...



TNM a klinické stadium

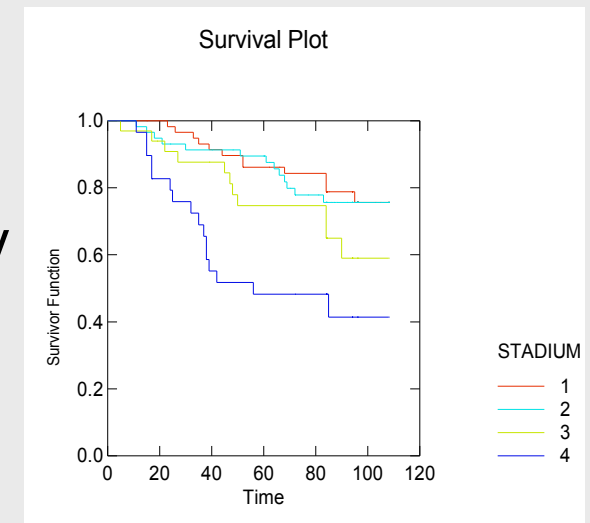
T(umor) **N**(odi) **M**etastases

- Tumor: nejčastěji kombinace velikosti a anatomického rozsahu
- Uzlinové metastázy: ano-ne, případně počet a lokalizace
- Vzdálené metastázy

Bez prefixu: klinická, prefix p pooperační ...

Klinické stadium: určité kombinace TNM, římské číslice I-IV

Např. pT1 pN0 pM0 stadium I
pT1-2 pN1 pM0 stadium II
jakékoliv pT jakékoliv pN M1 stadium IV

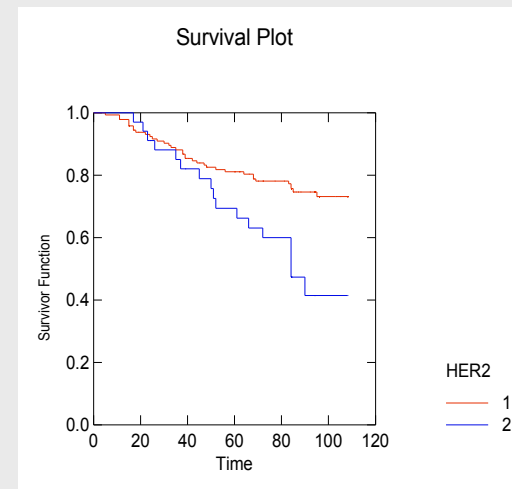
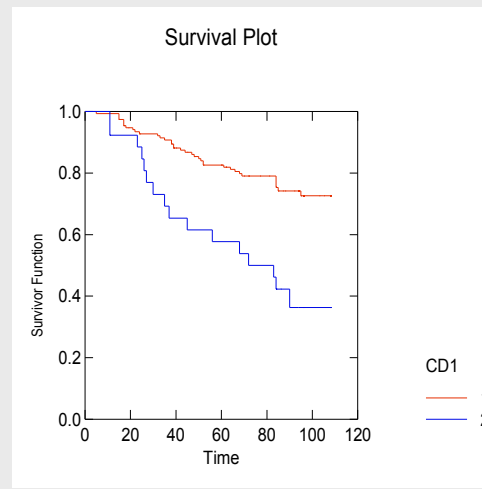
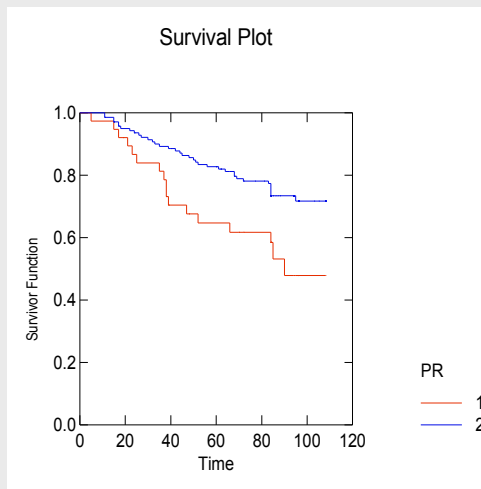


Biologické prediktory, rating

Specifické pro některé nádory např.:

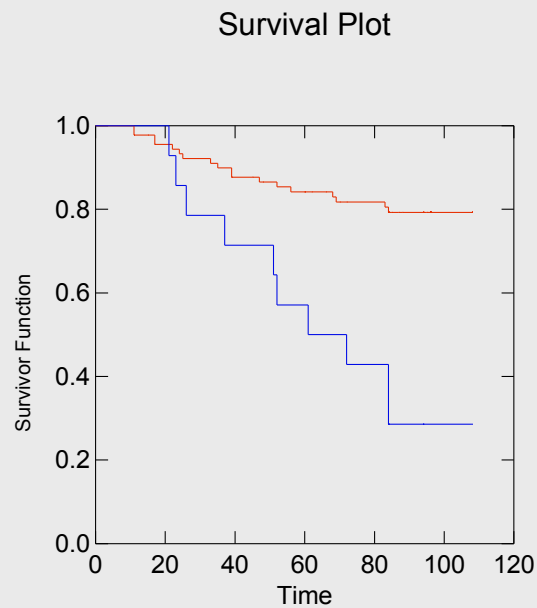
- Estrogenový receptor a Her-2 amplifikace u karcinomu prsu
- Mutace K-ras u karcinomu tlustého střeva
- ...

Určují někdy i odpověď na specifickou (tzv. „biologickou nebo cílenou“ léčbu

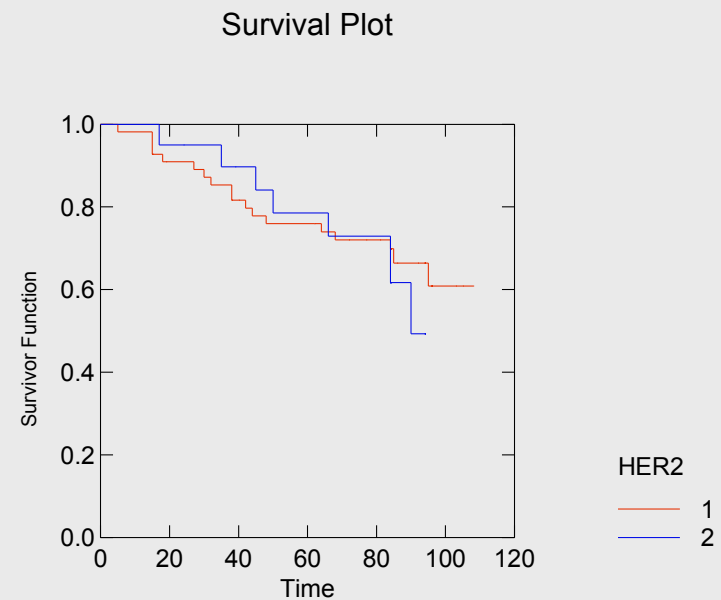


Jenže to není tak jednoduché

Prognostické a prediktivní parametry spolu navzájem korelují
Léčba může vše ovlivnit..



Bez chemoterapie



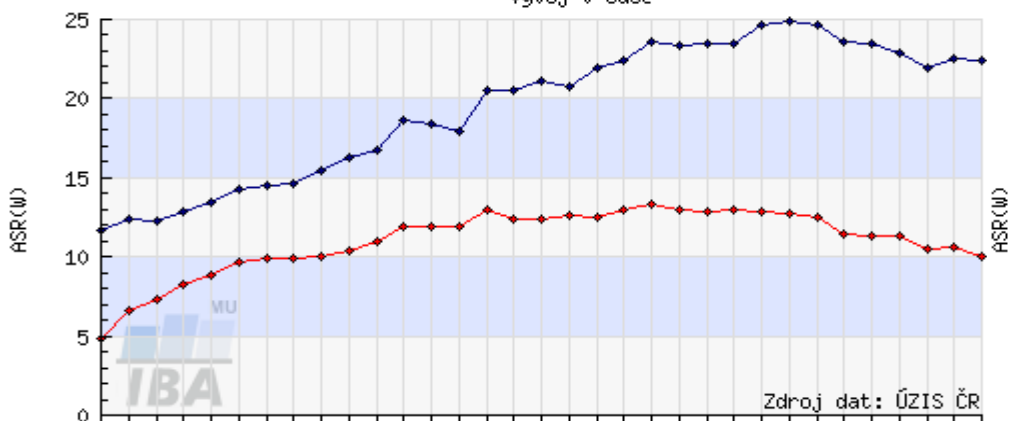
S chemoterapií

K čemu je to dobré

- Indikace onkologické léčby
- Sledování epidemiologie nádorů a úspěšnosti léčby nebo diagnostiky
- Výzkum, klinické studie

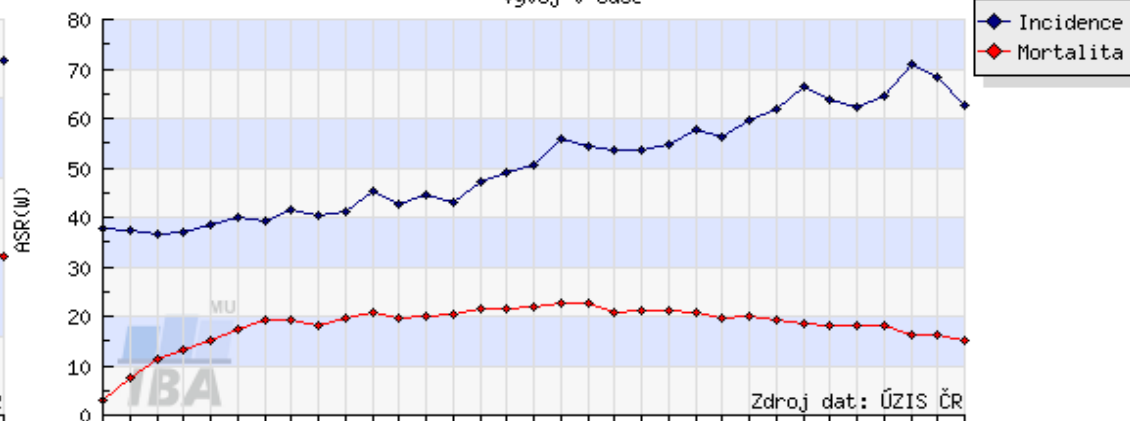
C18 - ZN tlustého střeva

Vývoj v čase



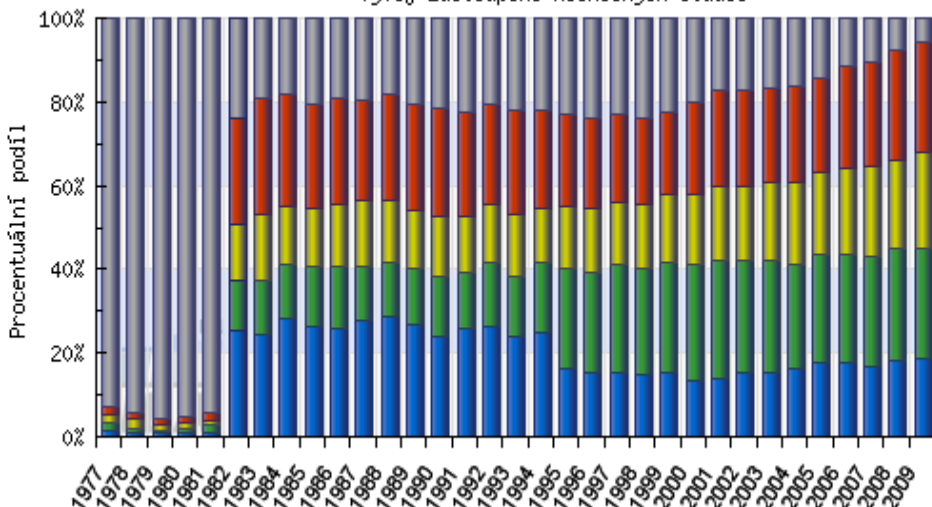
C50 - ZN prsu, ženy

Vývoj v čase



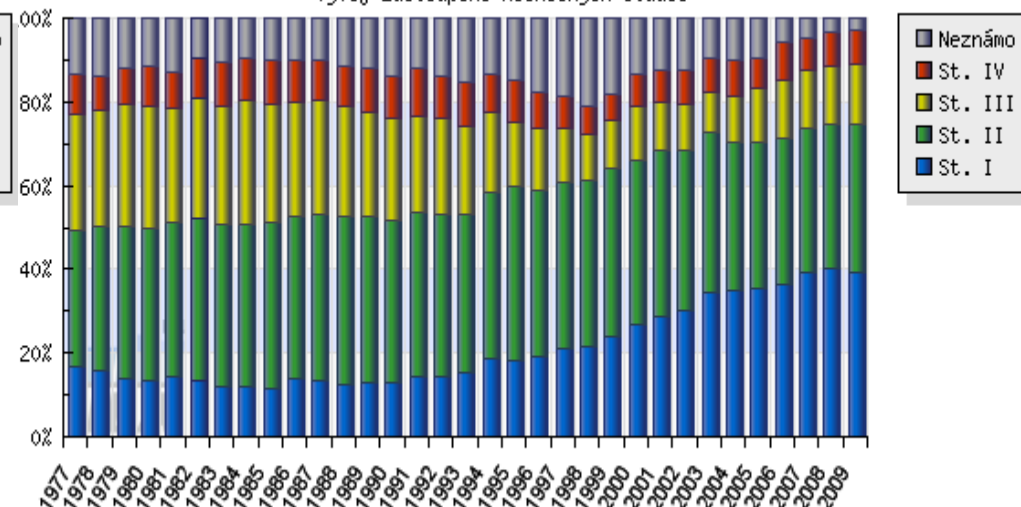
C18 - ZN tlustého střeva

vývoj zastoupení klinických stadií



C50 - ZN prsu, ženy

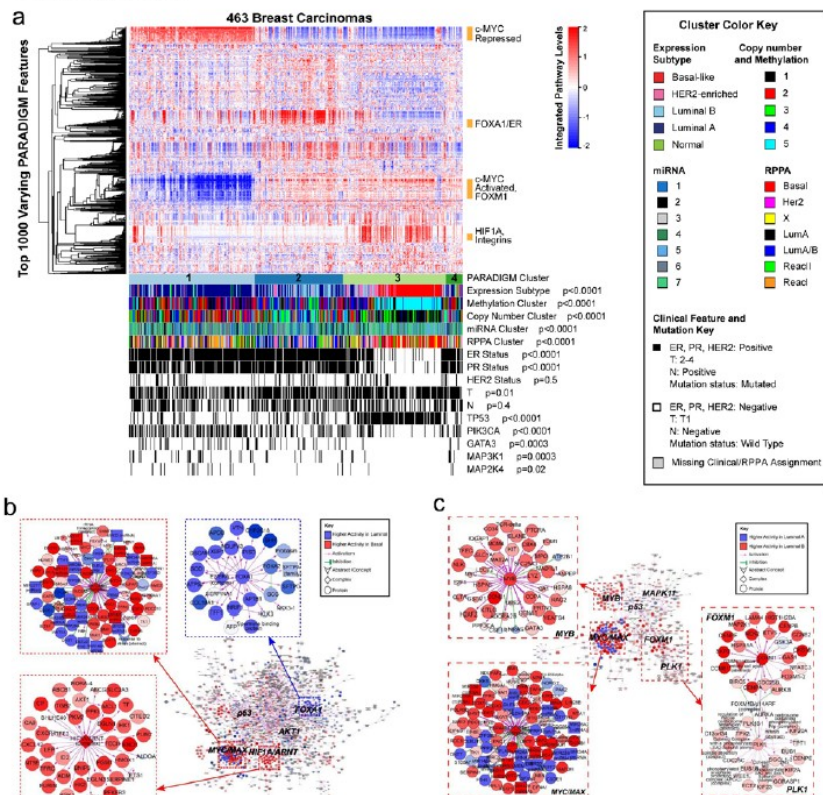
vývoj zastoupení klinických stadií



K čemu je to dobré

- Molekulární klasifikace nádorů
- „Cancer genome project“ <http://icgc.org/>
- Mapování drah a „druggable targets“ The Cancer Genome Atlas Network – Nature, v tisku

Supplemental Figure 17



Supplemental Figure 17. Integrated pathway analyses identified using PARADIGM. a) Heatmap display of top 1000 varying pathway features within PARADIGM consensus clusters. Samples are arranged in order of their consensus cluster membership and PAM50 subtype, methylation, copy number, microRNA and RPPA cluster membership assignments, ER, PR and HER2 status, tumor size, node status and mutation status for TP53, PIK3CA, GATA3, MAP3K1 and MAP2K4, for each sample is displayed below. For each variable, the p-value from the χ^2 test of associations with consensus clusters was displayed. Selected pathways showing distinct activation patterns among the consensus clusters were labeled (vertical orange bar). b) Differentially activated pathway features between Basal-like and Luminal (A+B) breast cancers. Largest interconnected regulatory subnetwork of differentially activated IPLs is displayed, with network hubs showing interconnectivity > 20 edges labeled. Larger views of the HIF1, JARID1A, MYC/MAX, and FOXA1/ER hubs are shown as insets. Color intensity reflects activity differences between subtype (red: higher in basal, blue: higher in luminal). Purple arrows denote activation. Node shapes reflects pathway concept type (inverted v: abstract concept, diamond: complex, circle: protein). Node size is scaled to the significance of differential activation. c) Differentially activated pathway features between Luminal A and Luminal B breast cancers. Largest interconnected regulatory subnetwork of differentially activated IPLs is displayed, with network hubs showing interconnectivity > 15 edges labeled. A larger view of the MYC/MAX, MYB, FOXM1 and PLK1 hubs are shown as insets. Color intensity reflects activity differences between subtype (red: higher in Luminal B, blue: higher in Luminal A). Purple arrows denote activation. Green tees represent inhibition. Node shapes reflects pathway concept type (inverted v: abstract concept, diamond: complex, circle: protein). Node size is scaled to the significance of differential activation.

Supplemental Table 6. List of potential drug targets based on somatic mutation and DNA copy number changes.

Gene	Candidate Drugs	No. of Mutations	No. of Patients	Mutation	Domain of the Mutations		
					Kinase	Extracellular	Other
				Avg # overall mutations			
				Avg overall mutation rate			
				Avg # of non-silent mutations			
				Avg non-silent mutation rate			
				# hypermutated samples			
Tyrosine Kinases							
EGFR	Gefitinib, Cetuximab, others	5	5	T273A, E282K, C526S, T847K, H1062P	1	3	1
ERBB2	Lapatinib, Trastuzumab, others	8	7	L755S (2), D769H, V777L, V842I, G309A, (L759W + R678Q)	6	1	1
ERBB3	MM-121, MM-111, AMG888	9	9	F94L, Q153*, D297Y, T359I, A378P, L783V, L792V, T1169P, E1261A	2*	5	2
ERBB4	Lapatinib, Neratinib	6	6	D73V, P172R, G500E, T703K, E1205K, P1292S	1	3	2
KIT		5	5	P36T, I99M, A219V, A280V, G432E	0	5	0
PDGFRA	Imatinib, Masitinib (AB1010)	3	3	E571K, R822H, R981P	2	0	1
PDGFRB		2	2	D453E, R437H	0	2	0
ABL1		4	4	e7-1, Y458H, D501E, V741fs	2	na	2
ABL2	Imatinib, Dasatinib, Nilotinib	2	2	D227Y, R612K	0	na	2
DDR2		6	6	S123I, E361D, A407P, K616N, S674Y, R752H	3	3	0
DDR1	Imatinib, Nilotinib, and Bafetinib (INNO-406)	1	1	E619Q	1	0	0
FGFR2		4	4	N550K (3), S588C	4	0	0
FGFR3	Dovitinib (TKI258), AZD4547	1	1	P688S	1	0	0
FGFR4		3	3	E326K, A484T, E741fs	2	1	0
JAK1		2	2	G600W, K1090Q	2*	na	0
JAK2	tofacitinib (CP-690550), ruxolitinib (INCB018424 or INC424)	5	5	Y44*, L55P, R115I, Y132*, N646fs	1*	na	4
JAK3		2	2	F110fs, R741Q	1*	na	1
TYK2		4	4	I684S (2), L443V, E437K	2*	na	2
ALK		3	3	G843R, R1275*, FGM1271in_frame_del	2	1	0
ROS1	Crizotinib	5	5	S551F, E596K, e41+2, N2234K, T2266R	1	2	2
LTK		1	1	E374D	0	1	0
MET	Foretinib, Tivantinib (ARQ 197), MetMAb (PRO143966)	3	3	R412G, G225D, (RS359in_frame_del+ A361in_frame_del+ M362fs)	0	3	0
MST1R		1	1	R845Q	0	1	0
Ser/Thr Kinases							
AKT1		12	12	E17K (11), L52R	0	na	12
AKT2	MK2206	1	1	E356K	1	na	0
AKT3		3	3	R66*, P310A, S375*	2	na	1
BRAF	vemurafenib	3	3	K698R, L537S, E309*	2	na	1
CDK4							
CDK6	PD0332991	1	1	H139Q			
Cyclin D1		1	1	R260C			
PIK3CA Pathway							
PIK3CA		205	178	Most common mutations at codons 345, 542, 545, 1047	105		100
PIK3R1	BKM120, GDC-0941, and others	14	14	Most common mutations in region of 456-469 and 564-575			
PIK3R3		1	1	L326R			
PTEN		18	17	e5-1, e6+2, e6-2, E288fs, T319fs, HY64in_frame_del, K128N, K266*			
INPP4B		4	4	G554D, R362Q, Q347E, G220R			
BRCA1 or 2 mutations							
BRCA1 Germline	Cisplatin, Carboplatin, PARP inhibitors	13	13	Many nonsense, frameshift, or missense mutations			
BRCA1 Somatic		7	7				
BRCA2 Germline	Cisplatin, Carboplatin, PARP inhibitors	14	14	Many nonsense, frameshift, or missense mutations			
BRCA2 Somatic		10	10				

Jak má vypadat sestava biologického materiálu k výzkumnému použití

Epidemiologicky reprezentativní (průřezová, „konsekutivní“) – k evaluaci jevu nebo biomarkeru

Nebo naopak velmi cílená (= uniformní ve všech parametrech kromě sledovaného), k objevu nových biomarkerů

Musí být k dispozici klinická data

Materiál musí být homogenně zpracovaný

Materiál musí být adekvátní k zamýšleným metodám

Musí být proveditelná (a provedena) kontrola kvality pro použité metody