

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině

Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Petra Zemanová

**Posouzení asociace extraezofageálního refluxu s tumorogenezí
plicního adenokarcinomu**

Assessment of the association between extraesophageal reflux and
tumorigenesis of non-small cell lung adenocarcinoma

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Jiří Votruba, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 4. 12. 2024

Petra Zemanová

Poděkování:

Ráda bych na tomto místě poděkovala svému školiteli, doc. MUDr. Jiřímu Votrubovi, Ph.D., za jeho pečlivé vedení, cenné rady a motivaci k další práci. Mé upřímné díky patří také také prof. MUDr. Jiřímu Homolkovi, DrSc. za jeho vedení během prvních let mého Ph.D. studia, které bylo pro mě nesmírně obohacující. Mé poděkování dále směřuje k doc. MUDr. Michalu Vočkovi, Ph.D., a doc. MUDr. Františkovi Liškovi, Ph.D., za jejich odbornou pomoc a inspirativní rady. Velké poděkování patří všem kolegům z 1. TRN a Onkologické kliniky VFN a 1. LF Univerzity Karlovy v Praze za jejich podporu a spolupráci. Závěrem patří mé nejhlubší díky mé rodině za jejich neustálou podporu a povzbuzení během celé mé práce.

Identifikační záznam:

ZEMANOVÁ, Petra. Posouzení asociace extraezofageálního refluxu s tumorogenezí plicního adenokarcinomu. (*Assessment of the association between extraesophageal reflux and tumorigenesis of non-small cell lung adenocarcinoma*). Praha, 2024. 78 stran, 2 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta. Školitel doc. MUDr. Jiří Votruba, Ph.D.

Obsah

1. ABSTRAKT	6
2. SEZNAM ZKRATEK.....	8
3. LITERÁRNÍ ÚVOD	14
3.1. Definice	14
3.2. Patogeneze extraezofageálního refluxu	15
3.3. Složení refluxátu.....	16
3.3.1 Žlučové kyseliny.....	16
3.3.2 Pepsin	17
3.3.3 Pankreatické proteolytické enzymy	19
3.4. Tumorogeneze	19
3.4.1 Nezávislost na růstových faktorech	20
3.4.2 Inhibice apoptózy	23
3.4.3 Genomová nestabilita	25
3.4.4 Neomezený replikační potenciál	26
3.4.5 Nádorový zánět	27
3.4.6 Angiogeneze	31
3.4.7 Invazivita a metastazování	32
4. HYPOTÉZY	34
5. CÍLE VĚDECKÉ PRÁCE.....	35

6. EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE	36
6.1. Metodika	36
6.1.1 Vstupní kritéria	36
6.1.2 Metodika rozdělení účastníků do jednotlivých skupin.....	36
6.1.3 Sběr a zpracování vzorků.....	37
6.1.3 Statistika	38
7. VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE.....	40
7.1 Charakteristika pacientů	40
7.2 Koncentrace pepsinu v bronchoalveolární laváži	43
7.3 Lineární regresní model	48
7.4 Vztah mezi lokalizací adenokarcinomu plic a koncentrací pepsinu v BAL	49
7.5 Anamnéza kouření a její vliv na koncentraci pepsinu v BAL.....	51
7.6. Hemoragický charakter BAL jako faktor ovlivňující koncentraci pepsinu v BAL.....	53
8. DISKUSE	55
9. ZÁVĚRY A ZHODNOCENÍ CÍLŮ PRÁCE.....	61
10. SOUHRN.....	62
11. POUŽITÁ LITERATURA.....	64
12. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	74
13. PŘÍLOHY	77

1. ABSTRAKT

Význam extraezofageálního refluxu (EER) jako rizikového faktoru pro rozvoj plicního adenokarcinomu nebyl dosud dostatečně prozkoumán. Studie se zabývala otázkou, zda EER přispívá k vyšším koncentracím pepsinu v bronchoalveolární laváži (BAL) u pacientů s plicním adenokarcinomem ve srovnání s kontrolními skupinami.

Studie zahrnovala celoživotní nekuřáky a bývalé kuřáky s nejméně 5 letou nekuřáckou historií, kteří podstoupili bronchoskopii kvůli ložiskovému plicnímu postižení na CT nebo PET/CT zobrazení. Na základě histologické verifikace plicního procesu byli pacienti rozděleni do tří skupin: s plicním adenokarcinomem, s plicními metastázami při primárním mimoplicním nádoru a s plicní sarkoidózou. Plicní adenokarcinom byl dále kategorizován jako centrální nebo periferní typ. Vzorky BAL odebrané během bronchoskopie byly analyzovány na přítomnost pepsinu pomocí testu ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v koncentraci pepsinu mezi skupinou s plicním adenokarcinomem a kontrolními skupinami (plicní metastázy a plicní sarkoidóza) při zahrnutí všech vzorků BAL ($p = 0,135$). Lineární regresní analýza odhalila, že kuřácká anamnéza a hemoragický charakter BAL mají statisticky významný vliv na koncentraci pepsinu v BAL. Po vyloučení hemoragických vzorků BAL byla koncentrace pepsinu signifikantně nejnižší u pacientů s plicním adenokarcinomem ($p = 0,023$) ve srovnání s kontrolními skupinami.

Výsledky studie tedy nepodporují hypotézu o zvýšeném výskytu EER u pacientů s plicním adenokarcinomem.

Klíčová slova: extraezofageální reflux, plicní adenokarcinom, bronchoalveolární laváž, pepsin, ELISA

ABSTRACT

The significance of extraesophageal reflux (EER) as a risk factor for the development of lung adenocarcinoma has been understudied. This study investigated whether EER contributes to higher concentrations of pepsin in bronchoalveolar lavage (BAL) in patients with lung adenocarcinoma compared to control groups.

The study included lifelong non-smokers and former smokers with at least a 5-year history of non-smoking who underwent bronchoscopy due to suspicious pulmonary abnormalities detected on CT or PET/CT imaging. Based on histological verification of the lung process, patients were divided into three groups: those with lung adenocarcinoma, those with lung metastases, and those with pulmonary sarcoidosis. Lung adenocarcinoma cases were further categorized as central or peripheral types. BAL samples collected during bronchoscopy were analyzed using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) to measure pepsin levels.

No statistically significant difference in pepsin concentration was found between the lung adenocarcinoma group and the control groups when all BAL samples were included ($p = 0,135$). Linear regression analysis revealed that smoking history and the hemorrhagic character of BAL had a statistically significant impact on pepsin concentration in BAL. After excluding hemorrhagic BAL samples, pepsin concentration was significantly lower in patients with lung adenocarcinoma ($p = 0,023$) compared to the control groups.

The study results do not support the hypothesis of a higher occurrence of EER in patients with lung adenocarcinoma.

Keywords: extraesophageal reflux, lung adenocarcinoma, bronchoalveolar lavage, pepsin, ELISA

2. SEZNAM ZKRATEK

A

ALK - Anaplastic Lymphoma Kinase
APAF1 - Apoptotic Protease Activating Factor 1
APC - Adenomatous Polyposis Coli
AREG - Amphiregulin
ATR - Ataxia Telangiectasia Rad-3 Related Protein
ATM - Ataxia Telangiectasia Mutated Protein Kinase

B

BAD - Bcl-2-Associated Death Promoter
BAFF-R - B Cell-Activating Factor Receptor
BAL - Bronchoalveolar Lavage
Bax - Bcl-2-Associated X Protein
Bak - Bcl-2-Antagonist/Killer
BAR-T - Barrett's Esophagus Cell Line
Bcl-2 - B Cell Lymphoma 2
Bcl-X_L - B Cell Lymphoma-Extra Large Protein
Bcl-X_S - BCL-2-Associated X Protein Small Form
Bcl-w - B Cell Lymphoma-w
BEAS-2B - Human Bronchial Epithelial Cell Line
BH domain - Bcl-2 Homology domain
BH3 - Bcl-2 Homology 3
Bid - BH3-Interacting-Domain Death Agonist
BIM - Bcl-2-Interacting Mediator of Cell Death
BMI- Body Mass Index
BMP4 - Bone Morphogenetic Protein 4
BCR- B-cell Receptor
BOK - Bcl-2-Related Ovarian Killer
BTC – Betacellulin
BRAF- v raf murine sarcoma viral oncogene homolog B

C

CA III - Carbonic Anhydrase Isoenzyme III

CCL- C-C motif Chemokine ligand
CD4+ - Helper T Lymphocytes (CD4 Positive)
CD8 - Cytotoxic T Lymphocytes (CD8 Positive)
CD40 - Cluster of Differentiation 40
CDK2 - Cyclin-Dependent Kinase 2
CDX1 - Caudal-Related Homeobox 1
CDX2 - Caudal-Related Homeobox 2
CHK1 - Checkpoint Kinase 1
CHK2 - Checkpoint Kinase 2
CI - Confidence Interval
CIP/WAF1 - Cdk-Interacting Protein/Wild-Type p53-Activated Fragment 1
CK1 - Casein Kinase 1
COX-2 - Cyclooxygenase 2
CHUK - Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase
CXCL – C-X-C motif Chemokine ligand

D

DHH - Desert Hedgehog Ligand
DLL - Delta-Like Ligands (DLL1, DLL3, DLL4)
DNA - Deoxyribonucleic Acid
Dsh – Disheveled Protein Family

E

EER - Extraesophageal Reflux
EGF - Epidermal Growth Factor
EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor
ELAM-1 - Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPI - Epigen
ErbB - epidermal growth factor receptor-related protein family
EREG - Epregrulin

F

FASL - Fas Ligand
FASR - Fas Receptor

FGF - Fibroblast Growth Factor

FLO-1 - Esophageal Adenocarcinoma Cell Line

FOXA2 - Forkhead Box Protein A2

G

GADD55 - Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Protein 55

GDP - Guanosine Diphosphate

GER - Gastroesophageal Reflux

GERD - Gastroesophageal Reflux Disease

GLI - GLI Family of Transcription Factors (GLI1, GLI2, GLI3)

GM-CSF - Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GSH - Glutathione (Reduced)

GSK-3 β - Glycogen Synthase Kinase-3 Beta

GTP - Guanosine Triphosphate

H

HB-EGF - Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor

HBOC - Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome

Hedgehog - Hedgehog Signaling Pathway

HER2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HGF - Hepatocyte Growth Factor

HIF-1 α - Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha

H⁺/K⁺-ATPase - Hydrogen-Potassium ATPase

HOXB - Homeobox Domain Transcription Factors

HPLC - High-Performance Liquid Chromatography

Hps70 - Heat Shock Protein 70

HRE - Hypoxia Response Element

HRP – Horseradish Peroxidase

I

IAPs - Inhibitors of Apoptosis Proteins

ICAM-1 - Intercellular Adhesion Molecule 1

ICD - International Classification of Diseases

I κ B - Inhibitors of NF- κ B

IGF-1 - Insulin-Like Growth Factor 1

IGFBP-1 - Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1

IGFBP-3 - Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3

IHH – Indian Hedgehog Ligand

IKK- I κ B kinase

IL-1R - Interleukin-1 Receptor

IL-1 - Interleukin 1

IL-2 - Interleukin 2

IL-6 - Interleukin 6

IL-8 - Interleukin 8

IL-12 - Interleukin 12

INF- γ - Interferon-Gamma

iNOS – Inducible Nitric Oxide Synthase

IQR - Interquartile Range

J

JAG - Jagged Ligands (JAG1, JAG2)

K

KRAS - Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene

L

LEF/TCF - Lymphoid Enhancer Factor/T-Cell Factor

LRP - Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP5/6)

LT β R - Lymphotoxin- β Receptor

M

MAPK - Mitogen-Activated Protein Kinase

MDM2 - Mouse Double Minute 2 Homolog

MET - Mesenchymal-Epithelial Transition

MnSOD2 - Manganese-Dependent Superoxide Dismutase 2

MII-pH - Multichannel Intraluminal Impedance with pH Monitoring

MUC2, MUC3, MUC5AC, MUC5B - Mucin Proteins

MS/MS – Tandem Mass Spectrometry

N

NF- κ B - Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells

NICD - Notch Intracellular Domain

NIH 3T3 cells - A fibroblast cell line derived from mouse embryos

NIK - NF- κ B-Inducing Kinase

Notch – Notch Signaling Pathway

NOXA - Nucleolar Protein of the Apoptosis Family

NRG 1-4 - Neuregulins 1-4

NSCLC - Non-Small-Cell Lung Cancer

NTRK - Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase

O

OR - Odds Ratio

P

PD-L1 - Programmed Cell Death Ligand 1

pH – Potential of hydrogen

PI3K–AKT - phosphoinositide 3-kinase – protein kinase B pathway

PI3K-mTOR pathway - Phosphoinositide 3-kinase - mechanistic target of rapamycin pathway

pKa - Acid dissociation constant

PLC- γ 1–PKC - phospholipase C- γ 1 – protein kinase C pathway

PP-HRP – Polyphenoloxidase-Horseradish Peroxidase

PPI - Proton Pump Inhibitors

PTCH - Patched-1 Receptor

PUMA - p53 Upregulated Modulator of Apoptosis

R

RAS–MAPK - RAS-mitogen-activated protein kinase pathway

RAS-ERK pathway - RAS-extracellular signal-regulated kinase pathway

REL - v-Rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog

RELA - NF- κ B p65 subunit

RELB - NF- κ B RelB subunit

cREL - NF- κ B c-Rel subunit

RET - Rearranged During Transfection

RHD - REL Homology Domain

ROS1 - ROS Proto-Oncogene 1

RSI – Reflux Symptom Index

S

SD - Standard Deviation

Sep53 - Squamous Epithelial Stress Protein 53

Sep70 - Squamous Epithelial Stress Protein 70

SHH - Sonic Hedgehog Ligand

SMO – Smoothed Ligand

SOD - Superoxide Dismutase

SOX2 - SRY Box Transcription Factor 2

SOX9 - SRY Box Transcription Factor 9

T

TCR - T-Cell Receptor

TGF- α - Transforming Growth Factor Alpha

TGF- β - Transforming Growth Factor Beta

TLR - Toll-Like Receptors

TNF- α - Tumor Necrosis Factor-Alpha

TNFR - Tumor Necrosis Factor Receptor

TNM – Tumor, Node, Metastasis

TP53 - Tumor Suppressor Gene p53

TRAIL - TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TRAILR - TRAIL Receptor

TRG - Trans Sacculo-Tubular Elements

V

VCAM-1 - Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

W

Wnt - Wnt Signaling Pathway

X

XIAP – X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Z

ZEB $\frac{1}{2}$ - Zinc-Finger E-box-Binding Homeobox 1/2

3. LITERÁRNÍ ÚVOD

3.1. Definice

Gastroezofageální reflux (GER- gastroesophageal reflux) nastává při zpětném toku žaludečního obsahu do jícnu. Patologický reflux je diagnostikován na základě výsledků 24hodinové pH-metrie při splnění DeMeesterových kritérií: $\text{pH} < 4$ ve více než 50 epizodách za 24 hodin nebo reflux trvající déle než 1 hodinu za 24 hodin. (1) V případě, že GER vyvolává symptomy a/nebo komplikace, hovoříme o refluxní chorobě jícnu (GERD - gastroesophageal reflux disease). (2) Prevalence GERD se pohybuje v rozmezí 8,8 - 25,9% v Evropě. (3) Patofyziologickým podkladem GER je selhání obranných mechanismů, které brání zpětnému toku obsahu žaludku do jícnu. Mezi tyto poruchy patří dysfunkce dolního jícnového svěrače, především jeho snížený tonus, dále opožděné vyprazdňování žaludku, změny anatomických poměrů přispívající k mechanické poruše dolního jícnového svěrače, například v důsledku hiátové hernie nebo obezity, a porušená samočistící schopnost sliznice jícnu, kterou fyziologicky zajišťují primární a sekundární kontrakce jícnu a neutralizace žaludeční kyseliny slinami. (4)

Při průniku refluxátu nad úroveň horního jícnového svěrače nastává extraezofageální reflux (EER- extraesophageal reflux), který je sdružen s širokým spektrem ORL a plicních onemocnění. Byla prokázána příčinná souvislost nebo spolupodíl EER na vznik chronické laryngitidy a bronchitidy, chrapotu, otitis media, obstrukčních plicních onemocnění, chronického kašle, recidivujících pneumonií, bronchiektázií, intersticiálních plicních procesů a syndromu obstrukční spánkové apnoe. (5)

3.2. Patogeneze extraezofageálního refluxu

V souvislosti s vlivem EER na rozvoj plicních onemocnění jsou uváděny dvě hypotézy-refluxní teorie a reflexní teorie. Podstatou refluxní teorie jsou mikroaspirace a přímý kontakt složek refluxátu se sliznicí dýchacích cest, která postrádá přirozené ochranné mechanismy vůči působení refluxátu, a je jím tak poškozována. Mikroaspirace způsobí mechanickou obstrukci malých dýchacích cest s rozvojem chemické pneumonie a/nebo aspirační bakteriální pneumonie doprovázené zánětlivou odpovědí. (6, 7)

Reflexní teorie je založena na vagovagálním reflexu. Acidifikace jícnu při GER stimuluje vagová zakončení lokalizovaná ve sliznici distální třetiny jícnu. Podráždění vagových receptorů vyvolá bronchokonstrikci, která vede k traumatizaci sliznice a k následným chronickým zánětlivým změnám. Vagovagální reflex je vysvětlován společným embryonálním původem jícnu a tracheobronchiálního stromu a z toho resultující stejné inervace prostřednictvím nervus vagus. (8)

Platnost refluxní teorie lze podpořit studií, která využívá simultánní 24hodinovou monitoraci pH jícnu a průdušnice pomocí zavedených sond. Tato studie demonstruje korelaci mezi epizodami refluxu a následným poklesem pH v trachee se současným poklesem maximálního výdechového průtoku u pacientů s astmatem a GERD. (9) Další studie prokazuje aspiraci do dýchacích cest pomocí scintigrafické detekce radioaktivně značeného izotopu u pacientů s GERD a současnou manifestací respiračních příznaků. (10) Přítomnost refluxátu v dýchacích cestách lze také zjistit detekcí pepsinu nebo žlučových kyselin ve sputu, vydechovaném kondenzátu vzduchu nebo v bronchoalveolární laváži (BAL- bronchoalveolar lavage). (11)

Validita reflexní teorie bylo podpořeno zjištěním, že experimentální acidifikace distálního jícnu aktivuje vagálně zprostředkovaný ezofagobronchiální reflex, který vyvolává bronchokonstrikci. (12)

3.3. Složení refluxátu

Refluxát obsahuje kyselinu chlorovodíkovou, pepsin, bikarbonáty, žlučové kyseliny a jejich soli, prostaglandiny, pankreatické enzymy a bakterie. (13)

3. 3.1 Žlučové kyseliny

Žlučové kyseliny se stávají součástí refluxátu za předpokladu proniknutí duodenálního obsahu do žaludku, tedy při výskytu duodenogastrického refluxu. Základem struktury všech žlučových kyselin je steroidní kruh – steran, který se skládá ze třech šestiuhlíkatých kruhů, jednoho pětiuhlíkatého kruhu a postranním řetězcem. Žlučové kyseliny se liší počtem a pozicí hydroxylových skupin, které jsou orientovány na jednu stranu směrem od jádra, čímž vytváří hydrofilní povrch molekuly. Postranní karboxylové skupiny umožňují navázání taurinu a glycinu. (14)

Žlučové kyseliny jsou syntetizovány v hepatocytech. Výchozí komponentou pro jejich syntézu je cholesterol, jehož oxidací vznikají primární žlučové kyseliny - kyselina cholová a kyselina chenodeoxycholová. Následně jsou primární žlučové kyseliny konjugovány s taurinem a glycinem. Přibližně 90 – 95 % primárních žlučových kyselin je resorbováno v terminálním ileu aktivním kotransportem s Na^+ a enterohepatálním oběhem se dostávají do jater, kde jsou opětovně secernovány do žluče. Zbylá část primárních žlučových kyselin postupuje do tlustého střeva, kde jsou činností bakterií konvertovány na kyselinu deoxycholovou a lithocholovou. Žlučové kyseliny se tedy vyskytují v několika formách: volné, sodné a draselné žlučové soli, konjugované žlučové kyseliny a jejich soli. Konjugované žlučové kyseliny a jejich soli zaujímají největší podíl (cca 98 %) z celkového množství žlučových kyselin. Konjugace s hydrofilními aminokyselinami, glycinem a taurinem, zvyšuje rozpustnost žlučových kyselin. V procesu trávení žlučové kyseliny zajišťují emulgaci tuků v tenkém střevě, snižují povrchové napětí tukových kapének a podporují jejich rozpad. Díky své amfipatické povaze vytvářejí micely, které obsahují lipidy ve svém jádru a transportují je k enterocytům. (15)

Vstup žlučových kyselin do buňky závisí na jejich rozpustnosti, která je určována několika faktory: počtem hydroxylových skupin obsažených ve struktuře konkrétní žlučové kyseliny, disociační konstantou (pK_a), kritickou koncentrací micel a pH. Nekonjugované žlučové kyseliny mají pK_a v rozmezí 5,2 - 6,2. I v slabě kyselém prostředí jsou nedisociované

a jsou schopné procházet buněčnou membránou. Naproti tomu konjugované žlučové kyseliny s glycinem mají disociační konstantu v rozmezí 3,8 - 4,8. Koncentrace nedisociované formy je při neutrálním pH velmi nízká, a proto konjugace do jisté míry zabraňuje vstupu žlučových kyselin do buněk. Při pH blízcím se jejich disociační konstantě se však i konjugáty s glycinem stávají neionizovanými, a tedy membránově permeabilní. V buňce jsou žlučové kyseliny ionizovány a při intracelulárním pH 6,8 - 7,1 se stávají hydrofilními, což způsobuje jejich uvěznění uvnitř buňky. Disociační konstanta pro konjugáty s taurinem činí 2. Tudíž pouze v silně kyselém prostředí jsou tyto konjugáty schopné proniknout do buněk. V prostředí slabě kyselého nebo alkalického refluxátu zůstávají žlučové kyseliny ionizované a neschopné průniku do buněk, což může vést k detergentnímu účinku na buněčné povrchy. (15, 16)

Efekt primárních a sekundárních žlučových kyselin na bronchiální sliznici byl studován in vitro na buněčných kulturách s buňkami BEAS- 2B (human bronchial epithelial cell line). Expozice těchto buněčných linií žlučovým kyselinám způsobuje zvýšenou buněčnou permeabilitu a snižuje buněčnou viabilitu. Životaschopnost BEAS-2B buněk je nepřímo úměrná koncentraci žlučových kyselin. Koncentrace lithocholové kyseliny nad $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vede k buněčné smrti, zatímco u ostatních žlučových kyselin je potřeba k vyvolání signifikantního snížení buněčné viability koncentrace $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. (17) Žlučové kyseliny dále podporují intracelulární akumulaci Ca^{2+} v pneumocytech II. typu. (18) Žlučové kyseliny v nízkých koncentracích stimulují epiteliální buňky k uvolnění prozánětlivých cytokinů (IL-6, IL-8, GM-CSF) a potlačením exprese antioxidantního enzymu MnSOD2 (manganese-dependent superoxide dismutase 2) přispívají k tvorbě kyslíkových radikálů, které poškozují DNA a jiné buněčné komponenty. (19-21)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, high-performance liquid chromatography) detekuje přítomnost žlučových kyselin v BAL v jednotkách $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS, tandem mass spectrometry) je senzitivnější metodou při měření koncentrací, protože umožňuje stanovení žlučových kyselin v jednotkách $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. (16)

3.3.2 Pepsin

Pepsin, proteolytický enzym, je produkován hlavními buňkami žaludeční sliznice v zymogenní formě jako pepsinogen. Kyselina chlorovodíková v žaludku aktivuje

autokatalytickou doménu pepsinogenu, který je tímto konvertován na aktivní formu - pepsin. Existuje osm izoform pepsinu s odlišným pH optimem, při kterém působí. Izoforma 3 tvoří přibližně 70 % z celkového množství pepsinu. Pepsin dosahuje maximální aktivity při pH v rozmezí 1,9 - 3,6. (22) V prostředí s pH nad 6,5 se stává pepsin inaktivní a při pH nad 8 dochází k jeho denaturaci. V rozpětí pH 6,5 - 8 je pepsin inaktivní, ale stabilní se schopností se vázat na slizniční buňky a opět se aktivovat při reacidifikaci prostředí během refluxní epizody nebo po vstupu do buňky. Tím lze vysvětlit fakt, že i slabě kyselý refluxát může poškodit sliznici. (23)

Již v roce 1969 Goldbergova experimentální studie demonstrovala vliv pepsinu na poškození epitelu jícnu. (24) Pepsin poškozuje sliznici dvěma mechanismy: prolomením ochranných slizničních bariér a cytotoxickým působením po průniku do buňky. Pepsin inhibuje expresi řady protektivních slizničních proteinů, jako jsou muciny MUC 2, 3, 5AC, 5B. (25) Byla prokázána korelace mezi přítomností pepsinu v laryngeální sliznici a deplecí karboanhydrázy CA III (carbonic anhydrase isoenzyme III), která katalyzuje reakce vedoucí k produkci bikarbonátů neutralizujících kyselý refluxát. CA III tak nepřímou snižuje aktivitu pepsinu, protože pepsin je aktivní v kyselém pH prostředí. (26) Průkaz pepsinu v laryngeální sliznici u pacientů s EER je spojen s deplecí tzv. stresových proteinů, konkrétně Sep70 (squamous epithelial stress protein 70), Sep53 (squamous epithelial stress protein 53) a Hps70 (heat shock protein 70). (27) Stresové proteiny jsou ve zvýšené míře exprimovány, je-li buňka vystavena stresovému stimulu. Stresové proteiny ovlivňují strukturu ostatních proteinů, účastní se jejich opravy a odstranění poškozených polypeptidů, čímž přispívají k obranyschopnosti epitelálních buněk proti poškození způsobenému refluxátem.

Přítomnost pepsinu na povrchu slizničních buněk indukuje jeho endocytózu. Pepsin je následně transportován prostřednictvím pozdních endosomů nebo TRG elementů (trans sacculo-tubular elements) do buňky. (28) V kyselém prostředí endosomů dochází k reaktivaci pepsinu, který po uvolnění do cytoplazmy poškozuje mitochondrie a Golgiho aparát. Pepsin stimuluje expresi prozánětlivých mediátorů a cytokinů, jako je IL-8, přispívá k chronickému zánětu. (29)

Pepsin lze detekovat pomocí komerčního Peptest kitu nebo imunohistochemickými metodami (ELISA, Western blot). Peptest je rychlá metoda detekce pepsinu poskytující však pouze semikvalitativní výsledky. Naopak imunohistochemické metody umožňují i kvantitativní měření.

3.3.3 Pankreatické proteolytické enzymy

Nejlépe prostudovaným pankreatickým proteolytickým enzymem obsaženým v refluxátu je trypsin. (16) Enteropeptidáza odštěpuje z molekuly trypsinogenu šest aminokyselin za vzniku trypsinu, který je činný v rozmezí pH 6 - 10. Působení trypsinu v refluxátu vyžaduje překonání jeho inaktivace v kyselém prostředí žaludku. Bylo prokázáno, že trypsin může přispět k vzniku ezofageálních slizničních erozí a ulcerací u pacientů po distální gastrektomii a u pacientů užívajících inhibitory protonové pumpy, které blokují H^+/K^+ ATPázu v parietálních buňkách, čímž potlačují sekreci kyseliny chlorovodíkové a neutralizují žaludeční šťávy. (30)

3.4. Tumorogeneze

Proces tumorogeneze je velmi složitý a komplexní děj. Transformace normální buňky na buňku nádorovou je několikastupňový proces. V roce 2000 Hanahan a Weinberg definovali šest klíčových znaků kancerogeneze: nezávislost na růstových faktorech, porucha regulace buněčného cyklu, neomezený replikační potenciál, inhibice apoptózy, angiogeneze, invazivita a metastazování. (31) O deset let později tito autoři doplnili svou původní práci o další čtyři vlastnosti nádorového vývoje: přeprogramování buněčného metabolismu, genomová nestabilita a mutace, únik před imunitním systémem a nádorový zánět. (32) V roce 2022 byl koncept nádorové patogeneze rozšířen o další čtyři charakteristiky nádorů: nemutační epigenetické změny, polymorfní mikrobiomy, senescentní buňky a fenotypové změny nádorové buňky. (33)

Vliv GER na rozvoj Barrettova jícnu, známé prekancerózy adenokarcinomu jícnu, je nesporný. (34) Pacienti s Barrettovou metaplazií mají výrazně vyšší riziko vzniku ezofageálního adenokarcinomu ve srovnání s běžnou populací.

Mnohé studie podporují hypotézu o vlivu EER na vznik laryngeálního karcinomu. (35) Nicméně je obtížné jednoznačně určit, do jaké míry je samotný reflux kauzalitou tohoto nádoru. Zvýšená prevalence refluxu u pacientů s laryngeálním karcinomem může být částečně vysvětlena současným užíváním tabákových a/nebo alkoholových výrobků v této populaci. Kouření a konzumace alkoholu jsou známé rizikové faktory pro vznik laryngeálního karcinomu a zároveň mohou přispívat k refluxu snížením tonu dolního jícnového svěrače. Bacciu a jeho kolektiv prokázali zvýšenou prevalenci refluxu ve skupině pacientů s laryngeálním karcinomem, kteří nekouřili ani nekonzumovali alkohol. (36) Reflux podněcuje skrze chronické dráždění sliznice chronický zánět vedoucí k dysplastickým změnám, které mohou přecházet

v invazivní karcinom. Danou teorii podporuje i skutečnost, že laryngeální sliznice je mnohem citlivější na iritační vlivy refluxu než sliznice jícnu. (37)

Spojitost mezi EER a vznikem nemalobuněčného plicního karcinomu (NSCLC- non-small cell lung cancer) zůstává nejasná. Nicméně lze o ní nepřímo uvažovat na základě několika skutečností: celosvětově incidence plicního adenokarcinomu roste obdobně jako adenokarcinomu jícnu. (34, 38) Centrálně uložený plicní adenokarcinom pravděpodobně vychází ze žláзовého epitelu, který je součástí sliznice dýchacích cest a může teoreticky přijít do kontaktu s refluxátem. (39)

NSCLC představuje 85 % všech karcinomů plic a je dále na základě morfologie klasifikován do hlavních dvou podtypů: non-skvamózní karcinom (zastoupený nejčastěji adenokarcinomem a jemu příbuznými jednotkami, velkobuněčným karcinomem a NOS – not otherwise specified) a skvamózní karcinom. Plicní adenokarcinom je nejčastějším histologickým subtypem, který je relativně častěji diagnostikován u nekuřáků. Přibližně 25% pacientů s diagnózou plicní rakoviny jsou nekuřáci. (40) Karcinom plic zaujímá čelní příčky v příčinách úmrtí na nádorové onemocnění. Jedním z důvodů je vysoká prevalence pokročilých stadií NSCLC v době stanovení diagnózy. Díky lepšímu porozumění nádorové imunologie a signálním drahám, které regulují buněčnou mitogenezi, diferenciaci a přežití, došlo v posledních dvaceti letech k významnému pokroku v léčbě pacientů s pokročilým NSCLC, zejména rozvojem cílené terapie a imunoterapie.

Byly identifikovány takzvané driver neboli řídicí mutace, tedy genetické změny, které zodpovídají za nádorovou transformaci. Prevalence řídicích mutací závisí na histologickém typu NSCLC, klinickém stadiu nádorového onemocnění a individuálních faktorech pacienta, jako jsou pohlaví, rasa a kouření. Nejčastější mutací u non-skvamózního NSCLC je KRAS mutace, následována mutacemi EGFR, BRAF a ALK alteracemi. U NSCLC se s četností 1-4 % také objevují aberace MET, ROS1, HER2, RET a NTRK. (41)

3.4.1 Nezávislost na růstových faktorech

Růstové faktory jsou signální proteiny, které ovlivňují buňky tkání autokrinně, parakrinně nebo juxtakrinně. Receptory pro růstové faktory patří mezi receptory s vlastní enzymatickou aktivitou. Po navázání růstového faktoru na specifický membránový receptor

dochází k aktivaci tyrosinkinázové domény receptoru, která se nachází na vnitřní straně cytoplazmatické membrány. Tato aktivace zahájí kaskádu fosforylace hydroxylových skupin tyrosinových zbytků navazujících členů intracelulární signální kaskády. Signál je následně diverzifikován do několika směrů v závislosti na vyvolávajícím růstovém faktoru. (42)

3.4.1.1 Receptor pro epidermální růstový faktor

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR, epidermal growth factor receptor), je příslušníkem rodiny ErbB/HER receptorů. Členové této rodiny receptorů se vyznačují podobnou strukturou, která jim umožňuje mezi sebou tvořit homodimery nebo heterodimery, což je nezbytnou podmínkou pro iniciaci přenosu signálu do buňky. (42) Aberantní aktivace receptorů z rodiny ErbB podporuje širokou škálu onkogenních procesů, včetně trvalé stimulace buněčné proliferace, rezistence k apoptóze, zvýšené buněčné motility, podporování angiogeneze a metastazování.

Receptor EGFR (též známý jako ErbB1 nebo HER1) je lokalizován v cytoplazmatické membráně většiny epitelových buněk a některých mezenchymových buněk. Receptor EGFR se skládá z několika částí:

- Extracelulární část, na kterou se váže ligand a která umožňuje dimerizaci (kódována exony 1-16 genu EGFR).
- Hydrofobní úsek, který tvoří polypeptidový řetězec prostupující cytoplazmatickou membránou (kódován exonem 17 genu EGFR).
- Intracelulární část, která obsahuje tyrosinkinázovou doménu a C-terminální konec (kódována exony 18-28 genu EGFR). (43)

Ligandy, které se váží na extracelulární doménu receptorů z rodiny ErbB, klasifikujeme do 3 skupin. První skupina se váže pouze na receptor EGFR a zahrnuje ligandy EGF (epidermal growth factor), TGF- α (transforming growth factor – α), AREG (amphiregulin) a EPI (epigen). Druhá skupina ligandů je schopna se vázat jak na receptory EGFR, tak na receptory ErbB4 a je reprezentována ligandy EREG (epiregulin), BTC (betacellulin) a HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor). Třetí skupina se skládá z neuregulinů NRG 1-4 a je charakterizována jejich schopností se vázat na receptory ErbB3 a/nebo ErbB4. (44) Aktivace receptorů rodiny ErbB různými ligandy vede k rozdílným buněčným odpovědím. Přesný mechanismus volby buněčné odezvy není dosud znám. Předpokládá se, že každý ligand preferenčně indukuje tvorbu

určitého dimerizačního páru členů rodiny ErbB receptorů a s ním spojenou signální dráhu. (45) Vazebnou kapacitu jednotlivých ligandů k receptoru EGFR modifikuje také pH. Například ligandy EGF a TGF- α vykazují 35 – 40 % homologii mezi sebou a vážou se s podobnou afinitou k receptoru EGFR při pH 7,4. Acidifikace (pH 6) vede k uvolnění ligandu TGF- α z vazby na receptor EGFR a tím k restauraci receptoru EGFR, zatímco EGF- EGFR komplex zůstává stabilní. (46)

Fyziologicky jsou signální transdukce aktivované receptorem EGFR klíčové pro procesy embryogeneze a organogeneze. RAS – MAPK, PI3K – AKT a PLC- γ 1 – PKC jsou hlavní signální kaskády iniciované skrze tento receptor kontrolující buněčnou proliferaci, diferenciaci, rezistenci k apoptózu, motilitu a metabolismus buňky. (44, 47)

Odchytky v signální dráze aktivované receptorem EGFR mohou podporovat vznik a progresi nádorových buněk, protože vyvolávají trvalou intracelulární signalizaci bez ohledu na přítomnost stimulačního ligandu. Mutace genu EGFR nebo overexpresi receptoru EGFR jsou spojeny s řadou solidních nádorů: nádory hlavy a krku, plicní adenokarcinom, maligní glioblastom, karcinom jícnu, kolorektální karcinom, karcinom pankreatu a karcinom prsu. (48)

Normální buňka obvykle exprimuje receptor EGFR v množství přibližně 40000 až 100000 receptorů na buňku. U nádorových buněk může docházet k overexpresi receptoru EGFR v množství více než 10^6 receptorů na buňku. Přidání epidermálního růstového faktoru do kultivace NIH 3T3 buněk s overexpresí receptoru EGFR stimuluje buněčnou růstovou aktivitu vedoucí k tvorbě transformovaných buněčných linií v kapalně kultuře a kolonií v polotuhém médiu. (49)

Studie na zvířecích modelech prokázaly, že aplikace rekombinantního EGF akceleruje mukózní a submukózní proliferaci vyústující ve ztluštění ezofageální sliznice. (50) EGF je také produkován a uvolňován buňkami slinných žlázek a podílí se procesu hojení sliznice jícnu. Původně zvažovaná teorie, že refluxní ezofagitida je zapříčiněna nedostatkem EGF, a tím omezenou schopností reparace ezofageálních lézí způsobených refluxem, byla však vyvrácena. (51) Dysplastický Barrettův jícen a adenokarcinom jícnu vykazují overexpresi receptoru EGFR v porovnání s normálním epitelem jícnu. (52, 53) Kvantita overexpresi receptoru EGFR koreluje s velikostí nádoru, dediferenciací nádorových buněk, postižením lymfatických uzlin a horším celkovým přežitím. (54, 55) Klinické studie s anti EGFR protilátkou v léčbě adenokarcinomu jícnu však nepotvrdily jejich předpokládanou účinnost. (56) Jednou z příčin je současná přítomnost mutace genu KRAS. (57)

KRAS (kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) je guanosintrifosfát vázající regulační protein. Výměnou GDP za GTP dochází k aktivaci proteinu KRAS, který následně podnítl řadu intracelulárních pochodů. Mutace genu KRAS postihují převážně kodony 12 (dominantně G12C, G12V a G12D), 13 a 61. Mutovaný protein KRAS nemá GTPázovou aktivitu, tudíž stimuluje signalizační kaskádu autonomně bez ohledu na přítomnost nadřazeného signálu. Mutace KRAS je jednou z nejčastějších genomových alterací u solidních nádorů. U plicních adenokarcinomů se vyskytuje s četností 25-30%, zatímco o plicních skvamózních karcinomů s frekvencí 4%. V kontrastu s ostatními řídicími mutacemi u NSCLC je mutace KRAS více zastoupena u kuřáků a naopak s nižší četností je detekována u asijské populace. (58)

3.4.1.2 Růstový faktor podobný inzulinu

Růstový faktor IGF-1 (insulin-like growth factor 1) se podílí na tumorogenezi svým mitogenním a antiapoptotickým působením. IGF-1 spouští intracelulární signalizaci přes RAS-ERK a PI3K-mTOR dráhy, kterou jsou zapojeny do procesu proliferace a přežití buněk. (59) Studie prokázala, že pacienti s Barrettovou metaplazií mají zvýšenou sérovou hladinu IGF-1 a současně sníženou hladinu IGFBP-1 a IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein) ve srovnání s kontrolami. (60) Avšak dosud nebylo objasněno, zda vyšší koncentrace IGF-1 přispívá k přeměně normální jícnové sliznice na Barrettovu metaplazii, nebo zda pouze odráží přítomnost metabolického syndromu u obézních jedinců s refluxem. Zůstává rovněž nejasné, zda jsou sérové hladiny IGF-1 pozitivně nebo negativně spojeny s indexem tělesné hmotnosti (BMI). (61)

3.4.2 Inhibice apoptózy

Působením intracelulárního stresového stimulu, kterým může být poškozená DNA, aberantní replikace DNA, oxidační stres, insuficientní substrátový nebo energetický buněčný metabolismus, dochází k převaze pro-apoptotických proteinů z rodiny Bcl-2 (B cell lymphoma 2). Tyto proteiny způsobí desintegraci zevní mitochondriální membrány, což vede k uvolnění cytochromu c do cytosolu. Cytochrom c se následně váže na cytoplasmatický protein APAF1 (apoptotic protease activating factor 1). Prokaspáza 9, navázána na komplex cytochrom c - APAF1, tvoří konečnou komponentu formulujícího se apoptosomu, ve kterém se prokaspáza 9

autokatalyticky štěpí na aktivní kaspázu 9, jejíž substráty jsou efektorové kaspázy 3, 6, 7 společné apoptotické cesty. Efektorové kaspázy poškozují jaderné lamininy, DNÁzu, cytoskeletární a regulační proteiny. Výsledkem výše popsaného sledu biochemických procesů je eliminace starých a poškozených buněk. (62)

Proteiny Bcl-2, které zodpovídají za integritu mitochondriální membrány, se vyznačují homologními BH doménami, které umožňují tvorbu dimerů mezi proteiny Bcl-2 rodiny. Tyto proteiny se klasifikují do tří skupin: pro-apoptotické faktory (např. Bax, Bak, Bok, Bcl-X_s), anti-apoptotické faktory (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w) a pro-apoptické faktory s pouze BH3 doménou (Bad, Bim, Bid, NOXA, PUMA). O tom, zda buňka nastoupí proces apoptózy, rozhoduje výsledná integrace pro-apoptotických a anti-apoptotických činitelů. V důsledku přítomnosti intracelulárního stresového signálu dochází k aktivaci pro-apoptotických faktorů mající pouze BH3 doménu, které neutralizují anti-apoptotické proteiny, čímž potencují účinky pro-apoptotických faktorů a vedou k zahájení realizace apoptózy. (62, 63)

Schopnost nádorových buněk inhibovat apoptózu je jedním z klíčových mechanismů jejich přežití. Poškození vnitřní apoptotické dráhy je u maligních onemocnění mnohem častější než alterace zevní apoptotické kaskády, která je uskutečňována navázáním ligandů smrti (FASL, TRAIL, TNF- α) na receptory smrti (FASR, TRAILR, TNFR). Efektorová dráha prostřednictvím kaskád je pro vnitřní i vnější apoptotickou kaskádu stejná. Nádorová buňka získá rezistenci k apoptóze pomocí několika mechanismů: nerovnováha mezi anti-apoptotickými a pro-apoptotickými faktory ve prospěch anti-apoptotických, redukce kaspázové aktivity, overexprese inhibitorů kaspáz a aberace na úrovni zevní apoptotické signalizace (např. mutace na úrovni receptorů smrti). (64) Vyjmenované mechanismy alterace apoptózy byly zjištěny u řady nádorových onemocnění a navíc se podílejí na vzniku mnohočetné lékové rezistence nádorových buněk k terapii. (65)

Výsledky studie na in vitro modelech ukazují, že normální ezofageální spinocelulární buňky (Het1A) po expozici žlučovým solím zvýšeně exprimují FAS receptory na buněčném povrchu. To vede k aktivaci zevní apoptotické kaskády, na rozdíl od buněk odvozených od buněk Barrettova jícnu (BAR-T) a adenokarcinomu jícnu (FLO-1), které na tuto stimulaci nereagují. Závěry studie naznačují, že rozdílná citlivost na apoptotické signály zprostředkované FAS receptorem mezi skvamózním a cylindrickým epitelem při expozici žlučovým kyselinám může hrát významnou roli v patofyziologii Barrettova jícnu. (66) Při progresi Barrettova jícnu k adenokarcinomu je zaznamenána zvýšená exprese anti-apoptotického proteinu Bcl-X_L a

naopak snížená exprese pro-apoptického proteinu Bax. (67) Podobně je pozorována vzestupná exprese survivinu, inhibitoru kaspáz, v sekvenci Barrettovy metaplazie, dysplazie a adenokarcinom. (68) Zvýšené hladiny survivinu a XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) byly také prokázány u NSCLC. (69)

3.4.3 Genomová nestabilita

Lidský genom je neustále vystaven působení mutagenů, jako jsou radiace, kyslíkové radikály, onkogenní viry nebo polycyklické aromatické uhlovodíky, které narušují jeho stabilitu. Buňka je vybavena obrannými mechanismy, které rozpoznávají a opravují chyby v DNA. Pokud dojde k neodstranitelné poruše DNA, normální buňka přechází do stavu senescence nebo apoptózy. V opačném případě dochází ke kumulaci DNA aberací umožňující vznik tzv. driver mutací, které poskytují nádorovým buňkám selekční výhody, jako jsou prorůstové vlastnosti.

Tumor supresorový gen TP53 je právem označován za strážce genomu, neboť jeho transkripční faktor p53 reguluje široké spektrum buněčných pochodů - DNA rekombinaci, chromozomální segregaci, reparaci DNA, apoptózu, buněčný cyklus, buněčnou diferenciaci, energetický metabolismus, senescenci, anti- angiogenezi a autofagii. (70) Fyziologicky je jaderný fosfoprotein p53 v buňkách trvale exprimován v nízké koncentraci díky činnosti ligázy MDM2 (mouse double minute 2 homolog), která p53 ubikvitizuje a tím ho degraduje. Gen MDM2 je transaktivován fosfoproteinem p53, takže nízká hladina fosfoproteinu p53 vede ke snížení exprese genu MDM2 a naopak. (71)

Za stresových situací, jako jsou hypoxie, poškození DNA nebo defektní telomery, dochází k chemickým modifikacím fosfoproteinu p53, včetně fosforylace, acetylace, glykosylace a metylace, což vede k jeho stabilizaci. Mezi klíčové senzory poškození DNA patří proteinkináza ATM (ataxia telangiectasia mutated protein kinase), která rozeznává dvouřetězcové zlomy a jejímž substrátem je kináza CHK2 (checkpoint kinase 2), a proteinkináza ATR (ataxia telangiectasia Rad-3 related protein), která reaguje na jednořetězcové zlomy v místě replikační vidličky nebo na poškození telomer aktivací kinázy CHK1 (checkpoint kinase 1). V důsledku poškození DNA komplexy ATM/CHK2 a ATR/CHK1 chemicky modifikují a tím stabilizují fosfoprotein p53 zapříčiňující zvýšení jeho intracelulární koncentrace. Po translokaci do jádra fosfoprotein p53 aktivuje expresi genu

CIP/WAF1 (*Cdk-interacting protein/Wild-type p53-activated fragment 1*). Produkt tohoto genu, protein p21, inhibuje komplex cyklin E/CDK2, což zastavuje buněčný cyklus v kontrolním bodě s cílem opravit poškozenou DNA. (71)

Navíc fosfoprotein p53 působí jako transkripční faktor genu GADD55 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 55*), který podporuje reparaci DNA pomocí excizního mechanismu. V případě, že oprava DNA není úspěšná, protein p53 indikuje apoptózu stimulací transkripce pro-apoptotických genů (Bax a BH3 only). (71)

Inaktivace genu TP53 je pozorována u 50 % sporadických nádorů a propůjčuje svým nositelům horší prognózu. (72) Zárodečné mutace tohoto genu zvyšují predispozici k řadě maligních nádorů, což je charakteristické pro Li-Fraumeni syndrom. Mutovaný gen TP53 ztrácí schopnost iniciovat procesy potřebné pro opravu DNA. Během replikace jsou chyby v DNA duplikovány a přenášeny do dceřiných buněk. Mutace mohou nastat i na úrovni genu kódující ubikvitinligázu MDM2, genů kódující senzory poškození DNA (ATM, ATR), genů pro efektorové aktivátory genu TP53 (CHK1, CHK2) a genů kódující proteiny účastnící se reparace DNA (např. mutace v genech pro mismatch repair spojené s Lynchovým syndromem nebo mutace v genech zapojených do homologní rekombinace u syndromu HBOC (hereditary breast and ovarian cancer syndrome)). (73)

Overexprese fosfoproteinů p53 je spojena se zvýšenou progresí Barrettova jícnu k adenokarcinomu. Detekce této overexprese může sloužit jako biomarker, který predikuje zvýšené riziko vzniku adenokarcinomu na podkladě Barrettovy metaplazie. (74, 75) V ezofageálních buňkách, které byly vystaveny kyselému prostředí o pH 4 a směsi žlučových kyselin, vznikají působením kyslíkových radikálů a enzymatické cyklooxygenace polynenasycených mastných kyselin isolevuglandiny. Tyto látky zapříčiňují precipitaci a inaktivaci fosfoproteinů p53. (76)

3.4.4 Neomezený replikační potenciál

Replikační potenciál jakékoli buněčné linie je predikován zkracováním telomer, k němuž dochází při každém buněčném cyklu. Telomery jsou nekódující repetitivní sekvence na koncích chromozomů. Po dosažení kritického zkrácení se buňka přestává dělit. Zárodečné a kmenové buňky, které mají neomezenou schopnost dělení, jsou vybaveny enzymem telomerázou, který zajišťuje doplňování repetitivních sekvencí na koncích chromozomů. Tento

enzym je rovněž exprimován nádorovými buňkami, což podmiňuje jejich neomezený replikační potenciál. (77)

Byla prokázána progresivní exprese genů kódujících telomerázu v sekvenci od normálního epitelu jícnu přes Barrettovu metaplazii po adenokarcinom. (78)

3.4.5 Nádorový zánět

Asociace mezi aberantní aktivací transkripčního faktoru NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain- enhancer of activated B cells) a tumorogenezí v prostředí chronického zánětu je dobře známa. Dysregulace signalizace přes faktor NF- κ B podporuje přežívání, proliferaci a migraci nádorových buněk, angiogenezi a metastazování, a byla zaznamenána u řady solidních i hematologických malignit. (79)

Faktor NF- κ B patří do rodiny proteinů REL, jejíž příslušníci se vyznačují specifickou homologní sekvencí 300 aminokyselin na N terminálním konci peptidového řetězce označovanou jako RHD doména (REL homology domain). Tato doména umožňuje tvorbu dimerů mezi jednotlivými proteiny rodiny REL a vazbu na specifické DNA sekvence v promotorových oblastech cílových genů a na inhibitory z rodiny I κ B (inhibitors of NF- κ B). Transkripční faktor NF- κ B je aktivován řadou stimulů, jako je oxidační stres, partikule infekčních patogenů (např. virová RNA), bakteriální lipopolisacharidy, prozánětlivé cytokiny (např. TNF- α), růstové faktory (např. EGF), cigaretový kouř, kancerogeny, UV nebo ionizující záření a poškození DNA. Transkripční faktor NF- κ B řídí expresi širokého spektra genů, jejichž proteiny regulují zánětlivou odpověď, buněčný růst, diferenciaci, apoptózu a angiogenezi. Proteiny rodiny REL se rozdělují do dvou skupin. První skupinu tvoří proteiny NF- κ B1 (p50, syntetizován ve formě prekurzoru p105) a NF- κ B2 (p52, syntetizován ve formě prekurzoru p100) proteiny. Druhá skupina zahrnuje proteiny RelA (p65), RelB, c-REL. (80)

Aktivace transkripčního faktoru NF- κ B se uskutečňuje buď kanonickou, nebo nekanonickou cestou. Iniciace kanonické dráhy, tzv. klasické cesty, nastává v důsledku stimulace receptorů pro prozánětlivé cytokiny, jako jsou receptory TNFR (tumor necrosis factor receptor), IL-1R (receptor pro IL-1), toll-like receptory (TLR3, TLR4, TLR7), antigenní receptory na povrchu T a B lymfocyty (TCR, BCR) a receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR). Aktivované receptory stimulují komplex IKK/CHUK (inhibitor kappaB kinase/conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase), což vede k fosforylaci I κ B inhibitoru.

Následné uvolnění I κ B inhibitoru z vazby na faktor NF- κ B umožňuje tvorbu preferenčního dimeru NF- κ B1 (p50)/RELA nebo NF- κ B1(p50)/c-REL a přesun vzniklého dimeru do buněčného jádra. Tam se váže na promotorové oblasti cílových genů a reguluje jejich transkripci. (80)

Nekanonická dráha je závislá pouze na činnosti kinázového komplexu IKK/CHUK. Stimulace receptorů, jakou jsou BAFF-R (B cell-activating factor receptor), LT β R (lymphotoxin- β receptor) a CD40 vyvolává aktivaci kinázového komplexu IKK prostřednictvím NIK kinázy (NF- κ B-inducing kinase). Tento kinázový komplex má schopnost fosforylovat protein p100, což způsobí odštěpení ankyrinových repetací od prekurzoru p100 a tím znemožňuje jeho transport do jádra. Vzniklý dimer p52/RELB je následně translokován do buněčného jádra. (80)

Výsledkem aktivace transkripčního faktoru NF- κ B je zvýšení exprese mediátorů zánětu, včetně chemokinů (CCL2, CCL20, CXCL13, CXCL8), buněčných adhezních molekul (ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1, E-selectin), cytokinů (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , INF- γ), růstových faktorů (GM-CSF) a inducibilních enzymů (inducibilní syntáza oxidu dusnatého (iNOS), cyklooxygenáza 2 (COX-2), 5-lipoxygenáza). Tyto mediátory podporují migraci a aktivaci zánětlivých buněk a podílejí se na utváření zánětlivého prostředí. Transkripční faktor NF- κ B reguluje transkripci genů kódujících regulátory buněčného cyklu (p21, cyklin D, p63), antiapoptotických genů (BCL-2, Bcl-2 X_L) a transkripci genů pro inhibitory apoptózy (IAPs inhibitory- např. survivin, XIAP), které ovlivňují buněčný růst a přežívání. (79- 82)

Bylo prokázáno, že složky refluxátu mohou způsobovat aberantní aktivaci a/nebo zvýšenou expresi faktoru NF- κ B. (83-86) Zvýšená exprese faktoru NF- κ B byla zaznamenána v biotovaných vzorcích ezofageální sliznice odebraných z oblastí postižených Barrettovou metaplazií nebo adenokarcinomem, zatímco v normálním dlaždicovém epitelu jícnu nebyla pozorována. (87) Tento závěr byl potvrzen i pomocí in vitro modelů, kde buněčné kultury ezofageální sliznice inkubované v přítomnosti deoxycholové kyseliny vykazovaly zvýšenou aktivitu faktoru NF- κ B a odpovídající vyšší koncentraci IL-8. (88) V sekvenci vývoje od Barrettova jícnu přes dysplazii po ezofageální adenokarcinom byla zjištěna progresivní exprese faktoru NF- κ B, survivinu a Bcl3 proteinu, který působí jako negativní regulátor NF- κ B. (68) Studie rovněž potvrdily vliv refluxátu na aktivaci faktoru NF- κ B a jeho roli v tumorigenezi hypopharyngeálního karcinomu. (89)

3.4.5.1 Chronický zánět – metaplázie – adenokarcinom

Dlouhodobé působení složek refluxátu na ezofageální sliznici vede k chronickému zánětu, který podmiňuje vznik Barrettova jícnu, známé prekancerózy adenokarcinomu jícnu vzhledem ke zvýšené pravděpodobnosti vývoje dysplasie a následného adenokarcinomu v metaplastické sliznici. (90) Barrettův jícen je definován jako náhrada diferencovaného dlaždicobuněčného epitelu sliznice jícnu cylindrickým epitelem s pohárkovými buňkami, který se fyziologicky nachází ve střevě. (91) Metaplazie představuje adaptaci sliznice na chronický zánět. Záměna epitelu se může uskutečnit dvěma cestami - transdiferenciací, tedy přeměnou skvamózních buněk na buňky intestinálního typu, nebo transkomitencí, tedy diferenciací nezralých progenitorových buněk, které mají schopnost se pod vlivem okolních faktorů vyvinout v jakoukoliv buněčnou linii. (91, 92) Mezi možné zdroje progenitorových buněk, které migrují do chronicky drážděné ezofageální sliznice v důsledku refluxu, patří buňky umístěné v bazálně vrstvě dlaždicového epitelu jícnu, buňky lokalizované v oblasti žaludeční kardia nebo gastroezofageální junkce a zárodečné buňky pocházející z kostní dřevě, které kolují krví. (93- 96)

Molekulární podstatou Barrettova jícnu je refluxem navozená upregulace transkripčních faktorů z rodiny HOXB (homeobox domain transcription factors), které jsou zodpovědné za vznik intestinálního epitelu (SOX9, FOXA2, CDX1, CDX2), a naopak downregulace transkripčních faktorů, které podmiňují dlaždicobuněčnou diferenciaci (SOX2 a p63). (97- 99) Do patogeneze intestinální metaplazie jsou zapojené vývojové signální dráhy Notch, Wnt a Hedgehog. Tyto signální dráhy řídí během embryonálního vývoje buněčné dělení a diferenciaci tkání, postnatálně zodpovídají za obnovu kmenových buněk a řízení homeostázy různých tkání. Deregulace každé z těchto signalizačních drah přispívá ke vzniku nádoru. (100)

Hedgehog signální dráha je aktivována třemi ligandy: Desert Hedgehog (DHH), Indian Hedgehog (IHH) a Sonic Hedgehog (SHH). Z nich posledně jmenovaný ligand hraje nejvýznamnější roli při rozvoji Barrettova jícnu. Navázáním Hedgehog ligandu (HH) na membránový receptor Patched-1 (PTCH) dochází k uvolnění na něm navázaného transdukčního proteinu Smoothed (SMO), který následně aktivuje transkripční aktivátory GLI1 a GLI2 a současně potlačuje transkripční supresor GLI 3. Výsledkem je exprese genů zodpovědných za buněčnou proliferaci a diferenciaci. (97)

Skvamózní buňky jícnu, které jsou vystaveny chronické expozici kyselinám a žlučovým solím při prolongovaném refluxu, zvýšeně uvolňují Sonic Hedgehog (SHH) ligand. Tento HH

ligand se váže na membránový receptor PTCH, který je lokalizovaný na stromálních fibroblastech. Pod vlivem aktivované Hedgehog signální dráhy stromální buňky ektopicky secernují protein BMP4 (bone- morphogenic protein 4), který apokrinně působí na skvamózní buňky jícnu a podněcuje u nich expresi transkripčních faktorů SOX9 (SRY box transcription factor 9) a FOXA2 (forkhead box protein A2). Tyto faktory indukují transkripci genů, jako je gen pro mucin 2 a gen pro cytokeratin 8, jejichž produkty přispívají k diferenciaci progenitorových buněk směrem k cylindrickému epitelu. (97, 101)

Notch signální dráha zprostředkovává juxtakrinní komunikaci mezi sousedními buňkami. Po vzájemném kontaktu dvou buněk dochází k navázání Delta-like ligandu (DLL1, DLL3, DLL4) a Jagged ligandu (JAG1, JAG2) na receptor Notch. Působením gamma sekretázy se odštěpuje intracelulární část receptoru NICD (Notch intracellular domain), která se přenáší do jádra a reguluje expresi cílových genů. Tyto geny se podílejí na vývoji organismu a postnatálně regulují zásoby progenitorových buněk v intestinálních a ezofageálních kryptách. (102)

Působením žlučových solí a kyselin dochází k aktivaci Notch signální dráhy prostřednictvím NF- κ B, která podmiňuje ektopickou expresi transkripčního faktoru CDX2 (caudal type homeobox 2) v ezofageálních dlaždicových buňkách, který tlumí Notch signalizaci a vede k expresi genů, jejichž produkty (Villin, Sucrase-isomaltase, MUC2) přispívají k diferenciaci progenitorových buněk na buňky pohárkové. (103)

Deregulace Wnt signální dráhy se podílí jak na patogenezi Barrettova jícnu, tak na procesu tumorogeneze. (104) Fyziologicky Wnt signální dráha řídí obnovu buněk střevní výstelky. Klíčovou komponentou kanonické Wnt signální dráhy je β -catenin, jehož hladina se mění v závislosti na aktivitě tzv. destrukčního komplexu v buňce. Tento komplex je tvořen axinem, proteinem APC (adenomatous polyposis coli), kinázou CK1 a kinázou GSK-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β). Při absenci ligandu destrukční komplex katalyzuje fosforylaci β -catenin, což zapříčiní jeho degradaci v proteozomu. Po navázání ligandu na transmembránový receptor Frizzled dochází k aktivaci Wnt signální dráhy v následující posloupnosti: aktivovaný Frizzled receptor – fosforylace koreceptoru LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor related 5/6) – translokace proteinů z rodiny Disheveled (Dsh) – inaktivace GSK-3 β a následný rozpad destrukčního komplexu. Výsledkem je akumulace β -catenin v cytoplasmě, který v jádře aktivuje transkripční faktory z rodiny LEF/TCF (lymphoid enhancer factor/T-cell factor) zapojené do řízení buněčné proliferace. (105)

Aktivace Wnt signální dráhy zvyšuje aktivitu Notch signální dráhy, expresi markerů střevní diferenciaci a produkci mucinů v dlaždicových epitelálních buňkách jícnu in vitro. (106) U pacientů s familiární adenomatózní polypózou, která je způsobena inaktivující mutací genu APC, dochází k narušení funkce destrukčního komplexu, který za normálních podmínek fosforyluje β -catenin. Tato dysfunkce vede k aberantní aktivaci Wnt signální dráhy a je spojena s až devítinásobně vyšší incidencí Barrettova jícnu ve srovnání s věkově odpovídajícími kontrolami. (107)

3.4.6 Angiogeneze

Nádorové ložisko do velikosti 1 – 2 mm³ zajišťuje své kyslíkové a výživové potřeby prostou difuzí. Po překročení této velikosti, kdy difuzní limit pro kyslík činí přibližně 100 μ m, již nádor potřebuje cévní zásobení pro dostatečný přívod živin a kyslíku. Nádorová angiogeneze probíhá několika mechanismy: pučením, tvorbou mozaikových cév, jejichž stěny jsou vystlány nádorovými buňkami, procesem vaskulogenní mimikry, kdy nádorové buňky vytvářejí kanálky propojující se s cévami, cévní koopcí, tedy růstem nádoru podél již existujících cév, a vaskulogenezí, při které vznikají primitivní cévy z migrujících endotelových buněk kostní dřene. (108)

Nádorová neovaskularizace je proces s patologicky porušenou rovnováhou mezi angiogenními faktory (např. VEGF, angiopoetiny, bFGF) a antiangiogenními faktory (např. trombospondin, endostatin) ve prospěch prvně jmenovaných. Novotvorba cév v nádoru je indukována hypoxií a zánětem a facilitována expresí onkogenů. V podmínkách kyslíkové deprivace nedochází k hydroxylaci transkripčního faktoru HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) 4- prolyl hydroxylázou, což vyústí v jeho stabilizaci. Stabilizovaný faktor HIF-1 α se váže na geny obsahující sekvenci HRE (hypoxia response element) v promotorové oblasti a stimuluje expresi genů kódující proangiogenní faktory. (108)

Dlouhodobě působící reflux na sliznici vyvolává oxidační stres. (109) Reaktivní formy kyslíku se podílejí na intracelulární signalizaci, buněčné proliferaci, energetickém metabolismu, apoptóze, imunitních reakcích a obraně proti mikroorganismům. Porušením rovnováhy mezi tvorbou a eliminací volných radikálů vzniká oxidační stres, při kterém vysoce reaktivní radikály poškozují buněčné komponenty, způsobují metabolické deregulace a mění buněčnou signalizaci. Poškození DNA zvyšuje riziko mutací v případě selhání reparačních

mechanizmů, čímž kyslíkové radikály přispívají k maligní transformaci buněk. Nádorové buňky si zároveň udržují vysokou antioxidační aktivity, aby zabránily hromadění reaktivních forem kyslíku na cytotoxické úrovni, které by mohly vyvolat k jejich zániku. (190)

Oxidační stres rovněž podporuje angiogenezi. Proliferace endotelových buněk a mikrovaskulární remodelace se vyskytují již v rané fázi chronického zánětu. Endotelové a zánětlivé buňky stimulují expresi proangiogenních faktorů, jakou jsou IL-8, VEGF (vascular endothelial growth factor a FGF (fibroblast growth factor). (110) Potenciálním negativním regulátorem angiogenní aktivity je redukovaný glutathion (GSH), který vylučováním volných kyslíkových radikálů pomáhá udržovat oxidační rovnováhu. (112) Hladina GSH je v Barrettově jícnu výrazně nižší než v normální sliznici jícnu. Naopak u Barrettovy metaplázie a adenokarcinomu jícnu byla zjištěna zvýšená hladina antioxidačního enzymu superoxiddismutázy (SOD). (113) Nadměrná exprese SOD bez adekvátního zvýšení aktivity katalázy však zvyšuje koncentraci peroxidu vodíku, který se v rámci Fentonovy reakce rozkládá na vysoce reaktivní hydroxylové radikály, což vede ke zvýšení jejich intracelulární koncentrace.

3.4.7 Invazivita a metastazování

Invazivita a metastazování patří mezi klíčové znaky nádorové progresse. Metastatická kaskáda představuje posloupnost kroků, kterými nádorová buňka musí projít, aby byla schopna založit metastázu v jiném orgánu. (114)

V iniciační fázi nádorová buňka nabývá vlastností umožňující její migraci a invazi do cév. Epitelová nádorová buňka podstupuje epitel-mezenchymovou tranzici, při níž získává mezenchymový fenotyp, který je charakterizován ztrátou adhezních molekul zajišťujících soudržnost mezi buňkami. Růstové faktory, jako jsou HGF (hepatocyte growth factor), EGF a TGF- β aktivují transkripční faktory ZEB 1/2 (zinc-finger E-box-binding homeobox 1), Slug, Snail, Twist, které snižují expresi E-cadherinu v epitelových nádorových buňkách. To vede k narušení vazby nádorových buněk na komponenty extracelulární matrix v důsledku změny exprese integrinů. (115) Modifikace cytoskeletu podněcuje polarizaci buňky a tvorbu lamelopodií a filopodií, které vznikají polymerací aktinu a elongací filament. Dopředný pohyb buňky je zajištěn aktinomyozinovou kontrakcí. (116) Migrující buňka vylučuje proteolytické enzymy typu matrixových metaloproteáz, kalikreinů a katepsinů, které štěpí proteiny

extracelulárního prostředí a vytváří prostor pro postup nádorové buňky. Okolní stroma obvykle reaguje na nádorovou invazi zánětlivou reakcí. Nádorové buňky jsou vystaveny působení zánětlivých buněk. Například nádorová infiltrace cytotoxickými CD8⁺ lymfocyty souvisí s vyšší eliminací nádorových buněk a s nižším rizikem metastazování, zatímco infiltrace CD4⁺ T lymfocyty přispívá k nádorové invazivitě stimulací makrofágů k produkci EGFR. (117)

Druhou etapou metastatické kaskády je intravazace, tedy proniknutí nádorových buněk do lymfatických nebo krevních cév. Následně nádorové buňky cirkulují v krevním řečišti jako cirkulující nádorové buňky. Denně nádor o velikosti 1 cm³ uvolní do cévního řečiště přibližně 1 milion buněk. Z tohoto množství dokáže přežít pouze 0,1% cirkulujících buněk, které odolají útokům imunitního systému nebo mechanickému poškození krevním prouděním. Tyto přeživší buňky mají schopnost zachytit se v kapilárách cílového orgánu a iniciovat vznik metastatického ložiska. (115)

V cirkulaci vznikají agregáty nádorových buněk spolu s trombocyty, leukocyty a fibrinovými vlákny. Tyto mikrotromby se zachycují v kapilárách cílového orgánu, pokud jejich velikost překročí průměr kapiláry. Buňky mikrotrombu adherují k endotelu pomocí cytoadhezínů, jakou jsou ICAM (intercellular adhesion molecule), E a P selektiny, a následně pronikají transendotelově z cévy do intersticia, kde se snaží usadit. Klíčovým faktorem pro další vývoj nádorových buněk je jejich adaptace na nové mikroprostředí. V sekundárním orgánu opět dochází ke změně fenotypu nádorových buněk prostřednictvím procesu mezenchymově-epitelové tranzice, což vede k tvorbě mezibuněčných kontaktů a spojení mezi buňkami nádoru a stromatu. (115)

Žlučové kyseliny a jejich soli obsažené v refluxátu indukují produkci a sekreci VEGF-A, který prostřednictvím transkripčních faktorů ZEB1 a ZEB2 aktivuje procesy vedoucí k přeměně stacionárních epitelových polárních buněk ezofageální sliznice na mobilní, nepolární mezenchymové buňky. (118) Chronický zánět vyvolaný refluxem přispívá k upregulaci adhezivních molekul na endotelových buňkách, jako jsou ICAM-1, VCAM a E-selektinu. (119)

4. HYPOTÉZY

V naší práci jsme testovali následující hypotézy:

- Extraezofageální reflux může hrát roli v rozvoji adenokarcinomu plic, tedy histologického podtypu NSCLC, který se relativně častěji vyskytuje u nekuřáků.
- Stanovení koncentrace pepsinu v bronchoalveolární laváži metodou ELISA může sloužit k detekci přítomnosti extraezofageálního refluxu v dolních dýchacích cestách.

5. CÍLE VĚDECKÉ PRÁCE

- Zjistit, zdali u 30 pacientů s plicním adenokarcinomem dochází k signifikantní vyššímu výskytu extraezofageálního refluxu v bronchiálním stromu ve srovnání s kontrolními skupinami. Pro detekci refluxu bude použita metoda stanovení koncentrace pepsinu v bronchoalveolární laváži pomocí testu ELISA.

6. EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

6.1. Metodika

6.1.1 Vstupní kritéria

Jedná se o prospektivní případovou (case control) studii. Do studie byli zařazeni pacienti, kteří v letech 2019- 2023 podstoupili na 1. klinice tuberkulózy a respiračních nemocí Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze bronchoskopii za účelem diagnostiky ložiskového plicního procesu a splnili vstupní kritéria studie.

Vstupní kritéria zahrnovala:

1. Věk \geq 18 let
2. Ložiskový plicní proces s indikací k bronchoskopické diagnostice
3. Histologicky verifikovaný NSCLC, subtyp adenokarcinom, metastatické postižení plic při primárním mimoplicním nádoru nebo plicní sarkoidóza
4. Celoživotní nekuřáci nebo exkuřáci s abstinencí delší než 5 let
5. Absence užívání alkoholu
6. Absence užívání inhibitorů protonové pumpy nebo H2 blokátorů během posledního měsíce

6.1.2 Metodika rozdělení účastníků do jednotlivých skupin

Na základě histologické verifikace plicního procesu byli pacienti rozděleni do tří skupin: skupina s nově diagnostikovaným plicním adenokarcinomem, skupina s metastatickým postižením plic při primárním mimoplicním nádoru a skupina s plicní formou sarkoidózy.

Plicní adenokarcinom byl dále klasifikován jako centrální nebo periferní na základě kontaktu s hilovými strukturami (tj. lobární bronchy, lobární nebo hlavní plicní tepny, hlavní plicní žíly) na CT nebo PET/CT zobrazení a/nebo podle umístění nádoru do 2 cm od proximálního bronchiálního stromu při bronchoskopickém vyšetření.

Stav kouření byl určen na základě dotazníkového šetření před provedením bronchoskopie. Při následné kontrole, zaměřené na zhodnocení histologie, byly subjekty opětovně dotazovány na status kouření. Do studie byli zařazeni pouze pacienti, kteří poskytli konzistentní odpovědi potvrzující absenci kouření v obou časových bodech.

6.1.3 Sběr a zpracování vzorků

BAL byla provedena jako součást bronchoskopického diagnostického algoritmu plicního procesu.

Provedení bronchoalveolární laváže

Flexibilní bronchoskop byl zaveden do dýchacích cest přes laryngeální masku nebo endotracheální kanylu. Po zaklínění bronchoskopu do subsegmentárního bronchu pravého středního plicního laloku byla provedena laváž aplikací 100 ml sterilního fyziologického roztoku. Odsátá bronchoalveolární tekutina byla následně uchována na suchém ledu a laboratorně zpracována do 1 hodiny od odběru.

Centrifugace a uchování

Získané dva alikvoty o objemu 1 ml byly centrifugovány (3000 otáček za minutu po dobu 15 min při teplotě 3°C). Supernatanty byly skladovány při -70°C do doby dalšího zpracování.

Měření koncentrace pepsinu

Koncentrace pepsinu v alikvotách byla měřena pomocí komerčně dostupného kitu pro pepsin (Human Pepsin ELISA Kit, BlueGene Biotech, Shanghai). Tento kit je určen pro kvantitativní stanovení pepsinu v biologických vzorcích. Vzorky byly inkubovány společně s konjugátem PP- HRP na předem potažené destičce po dobu jedné hodiny. Po inkubační době a pětinasobném promytí byly vzorky inkubovány se substrátem pro enzym HRP. Nakonec byl přidán tetramethylbenzidinový roztok zastavující reakci. Změna barvy, která nastala, byla změřena pomocí spektrofotometru. Citlivost tohoto testu je 1 pg/ml.

6.1.3 Statistika

Popisné statistiky byly prezentovány jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD, standard deviation) nebo medián s interkvartilovým rozsahem (IQR, interquartile range). K porovnání dvou skupin byl použit Wilcoxonův test a t-test. Pro srovnání více skupin (plicní adenokarcinom, plicní metastázy, plicní sarkoidóza) byl aplikován Kruskal-Wallisův test a analýza rozptylu (ANOVA test). K posouzení homogenity skupin z hlediska pohlaví, statusu kouření a přítomnosti hemoragické BAL byl použit chí-kvadrát test (χ^2 test).

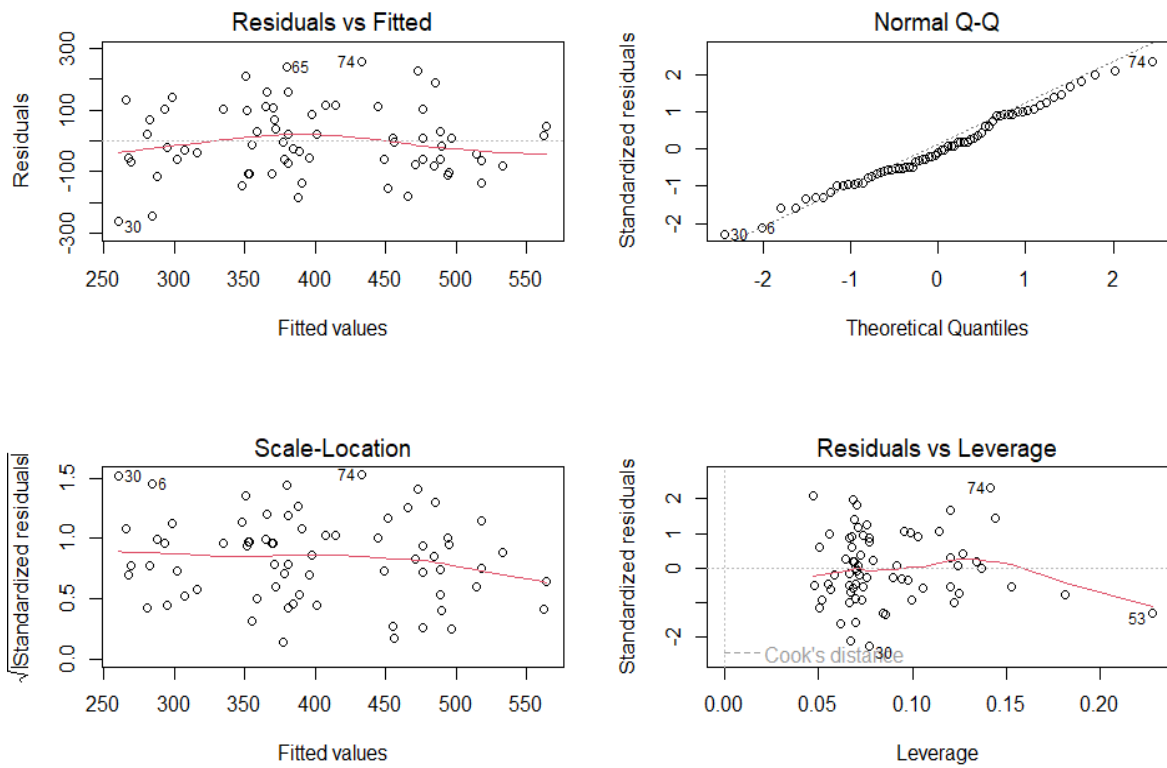
Asociace mezi koncentrací pepsinu v BAL a nezávislými proměnnými byla analyzována pomocí lineárního regresního modelu. Všechny dostupné proměnné, včetně věku, pohlaví, statusu kouření a hemoragického charakteru BAL, byly zahrnuty do modelu. Kvůli porušení předpokladu normality byli z analýzy vyloučeni dva jedinci s extrémními hodnotami pepsinu (> 1000 pg/ml). Diagnostické grafy lineárního regresního modelu (grafy 1A- 1D) ukazují, že nedochází k žádnému zásadnímu porušení předpokladů modelu.

Podrobné popisy diagnostických grafů lineárního regresního modelu jsou následující:

- **Graf reziduí vs. predikovaných hodnot (Residual vs. Fitted plot):** Vztah mezi predikovanými hodnotami a skutečnými výsledky se jeví jako lineární, což naznačuje, že model je adekvátně přizpůsoben datům a reflektuje jejich strukturu.
- **Q-Q graf (Normal Q-Q plot):** Rezidua nevykazují významné odchylky od normálního rozdělení, což je potvrzeno i výsledky Shapiro-Wilkova testu normality ($p = 0,644$).
- **Graf škály a rozložení (Scale-Location plot):** Rezidua vykazují náhodný rozptyl, což naznačuje, že předpoklad homoskedasticity je pravděpodobně splněn.
- **Graf reziduí a vlivu (Residual vs. Leverage plot):** Na tomto grafu nebyla identifikována žádná vlivná pozorování, která by mohla nepřiměřeně ovlivnit výsledky modelu.

Všechny analýzy dat byly provedeny pomocí softwaru The R Project for Statistical Computing, verze 4.2.2. (120)

Grafy 1A - 1D: Diagnostické grafy lineárneho regresného modelu



7. VÝSLEDKY EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE

7.1 Charakteristika pacientů

Do studie bylo zařazeno celkem 71 pacientů, kteří byli na základě histologické verifikace rozděleni do tří skupin. **Skupina I** zahrnovala 30 pacientů s nově diagnostikovaným adenokarcinomem plic. V této skupině bylo pohlaví rovnoměrně zastoupeno a věkový medián pacientů činil 73 let. Do **skupiny II** byli zařazeni pacienti s histologicky verifikovaným metastatickým postižením plic při primárním mimoplicním nádoru. Nejčastějšími zdroji plicních metastáz byly karcinom prsu (27,59 %) a kolorektálním karcinom (20,69 %). Medián věku této skupiny byl 68 let. **Skupina III** se skládala z pacientů s plicní formou sarkoidózy, přičemž věkový medián byl 56 let. Tabulky 1, 2, 3 uvádí základní charakteristiky pacientů v jednotlivých skupinách.

Tabulka 1. Charakteristika účastníků

Skupina	Plicní	Plicní	Sarkoidóza	p- value
	adenokarcinom	metastázy		
	(Skupina I)	(Skupina II)	(Skupina III)	
Velikost skupiny (%)	30 / 71 (42.25%)	29 / 71 (40.85%)	12 / 71 (16.9%)	-
Věk (medián [IQR])	73 (69,76)	68 (62,76)	56 (45,59)	<0.001 ^a
Pohlaví				
Muž	15 / 30 (50 %)	13 / 29 (44.8 %)	6 / 12 (50 %)	0.912 ^b
Žena	15 / 30 (50 %)	16 / 29 (55.2 %)	6 / 12 (50 %)	
Kouření				
Nekuřáci	15 / 30 (50 %)	16 / 29 (55.2 %)	8 / 12 (66.7 %)	0.618 ^b
Exkuřáci	15 / 30 (50 %)	13 / 29 (44.8 %)	4 / 12 (33.3 %)	
Hemoragický BAL				
Ne	23 / 30 (76.7 %)	24 / 29 (82.8 %)	11 / 12 (91.7 %)	0.515 ^b
Ano	7 / 30 (23.3%)	5 / 29 (17.2%)	1 / 12 (8.3%)	

^a) Kruskal-Wallisův test

^b) Chí-kvadrát test

Tabulka 2. Charakteristika skupiny s adenokarcinomem plic

Periferní plicní adenokarcinom	19/30 (63.33%)	
Centrální plicní adenokarcinom	11/30 (36.67%)	
TNM 8.vydání	IA2	2/30 (6.67%)
	IA3	4/30 (13.33%)
	IB	2/30 (6.67%)
	IIA	1/30 (3.33%)
	IIB	2/30 (6.67%)
	IIIA	6/30 (20.00%)
	IIIB	3/30 (10.00 %)
	IIIC	1/30 (3.33%)
	IVA	1/30 (3.33%)
	IVB	8/30 (26.67%)
Mutace		
ALK	1/30 (3.33%)	
EGFR	4/30 (13.33%)	
Negativní	25/30 (83.33%)	
PD- L1		
PD-L1 TPS < 1%	9 (30%)	
PD-L1 TPS 1-49%	12 (40%)	
PD-L1 TPS ≥ 50%	9 (30%)	

Tabulka 3. Charakteristika skupiny s plicními metastázami**Primární zdroj plicních metastáz**

Karcinom prsu	8 / 29 (27.59%)
Kolorektální karcinom	6 / 29 (20.69%)
Neuroendokrinní tumor a karcinom	3 / 29 (10.34)
Ovariální karcinom	1 / 29 (3.45%)
Karcinom pankreatu	1 / 29 (3.45%)
Melanom	2 / 29 (6.90%)
B non-Hodgkinovy lymfomy	2 / 29 (6.90%)
T non-Hodgkinovy lymfomy	1 / 29 (3.45%)
Karcinom ledviny	1 / 29 (3.45%)
Karcinom prostaty	2 / 29 (6.90%)
Sarkomy	1 / 29 (3.45%)
NUT midline karcinom	1 / 29 (3.45%)

7.2 Koncentrace pepsinu v bronchoalveolární laváži

Koncentrace pepsinu v BAL byly porovnávány mezi třemi skupinami pomocí Kruskal-Wallisova testu a ANOVA testu (tabulka 4). Medián koncentrace pepsinu činil 390.5 pg/ml ve skupině I, 449.9 pg/ml ve skupině II a 447.5 pg/ml ve skupině III. Ačkoli nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v koncentraci pepsinu mezi definovanými skupinami ($p = 0,135$, Kruskal-Wallisův test), byl pozorován trend opačný k předpokládané hypotéze, přičemž mírně vyšší koncentrace pepsinu byly nalezeny ve skupinách s plicními metastázami a plicní sarkoidózou (graf 2). Nebyla zjištěna žádná asociace mezi věkem a koncentrací pepsinu v BAL (graf 3).

Po vyloučení hemoragických vzorků BAL byla koncentrace pepsinu ve skupině I signifikantně nejnižší ($p = 0,023$, Kruskal-Wallisův test). Medián koncentrace pepsinu byl 350.9 pg/ml ve skupině I, 439.5 pg/ml ve skupině II a 503.8 pg/ml ve skupině III (tabulka 5, graf 4). Mezi skupinou II a skupinou III nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v koncentracích pepsinu ($p = 0,371$, Wilcoxonův test).

Tabulka 4. Porovnání koncentrací pepsinu v BAL mezi skupinami

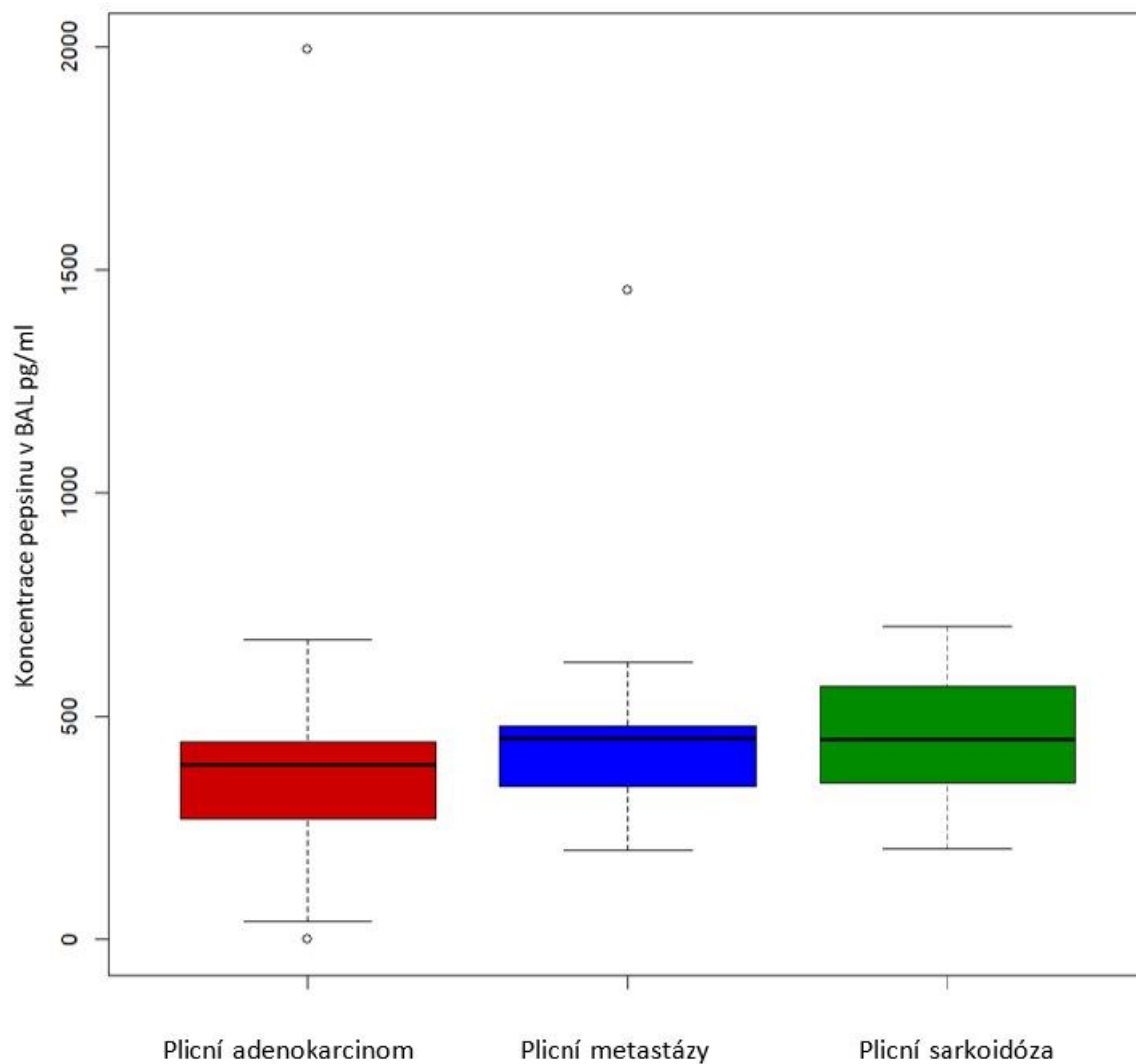
	Plicní adenokarcinom	Plicní metastázy	Plicní sarkoidóza	p-value
	n=30	n=29	n=12	
Průměr +/- SD	407.81	456.88	457.85	0,744 ^a
Koncentrace pepsinu v pg/ml	+/- 332.2	+/- 219.67	+/- 161.25	
Medián [IQR]	390.55	449.9	447.5	0,1352 ^b
	[272.45,438.45]	[343.2,478.4]	[355.35,563.95]	

^{a)} ANOVA test

^{b)} Kruskal-Wallisův test

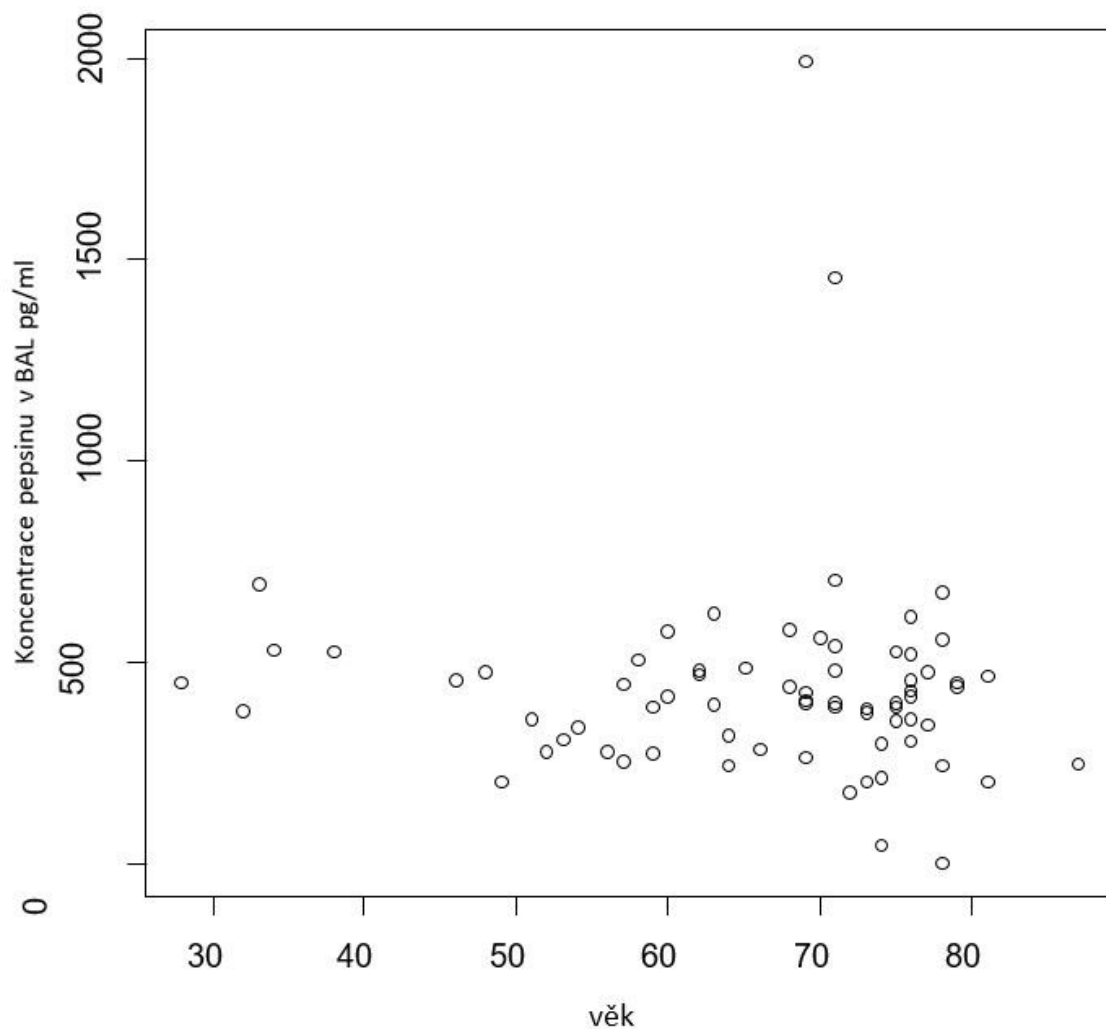
Graf 2. Porovnání koncentrací pepsinu v BAL mezi skupinami

Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p = 0,135$, Kruskal-Wallisův test) v koncentraci pepsinu v BAL mezi skupinami, přestože skupiny s plicními metastázami a plicní sarkoidózou vykazovaly trend k vyšším koncentracím pepsinu. Krabicové grafy znázorňují medián (střední čára), interkvartilový rozsah (IQR, rámeček) a rozsah od minimální po maximální hodnotu (vnější čáry), přičemž odlehle hodnoty jsou zobrazeny samostatně.



Graf 3. Korelace mezi koncentrací pepsinu v BAL a věkem pacientů

Nebyla nalezena žádná statisticky významná souvislost mezi věkem subjektů a koncentrací pepsinu v BAL. V grafu jsou jednotlivé body, které reprezentují koncentrace pepsinu v BAL, rozmístěny náhodně, bez patrných vzorců nebo trendů, což naznačuje absenci korelace mezi těmito dvěma proměnnými. Rozložení bodů je náhodné jak v horizontálním směru (věk), tak ve vertikálním směru (koncentrace pepsinu v BAL), což dále potvrzuje, že mezi těmito dvěma faktory neexistuje zjevná souvislost.



Tabulka 5. Porovnání koncentrací pepsinu v BAL mezi skupinami po vyloučení hemoragických vzorků BAL

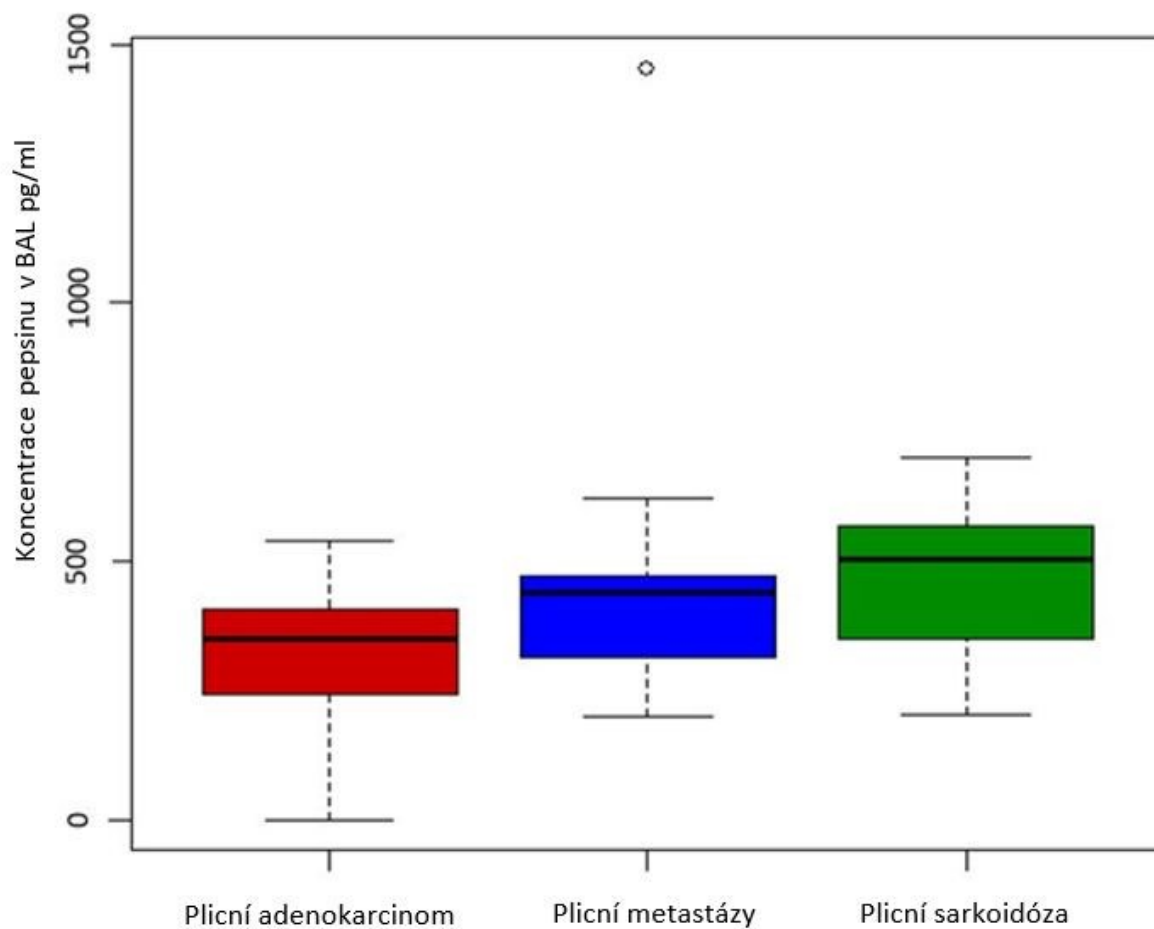
	Plicní adenokarcinom	Plicní metastázy	Plicní sarkoidóza	p-value
	n=23	n=24	n=11	
Průměr +/- SD	317.72	447.14	464.84	0,036 ^a
Koncentrace pepsinu v pg/ml	+/- 135.35	+/- 238.18	+/- 167.2	
Medián [IQR]	350.9	439.45	503.8	0,023 ^b
	[243.8,407.2]	[316.62,471.07]	[350.2,568.6]	

^a) ANOVA test

^b) Kruskal-Wallisův test

Graf 4. Porovnání koncentrací pepsinu v BAL mezi skupinami po vyloučení hemoragických vzorků BAL

Po vyloučení hemoragických vzorků BAL byla koncentrace pepsinu signifikantně nejnižší ve skupině pacientů s plicním adenokarcinomem ($p = 0,023$, Kruskal-Wallisův test). Krabicové grafy zobrazují medián (střední čára), interkvartilní rozsah (IQR, rámeček) a rozsah od minimální po maximální hodnotu (vnější čáry), přičemž odlehlé hodnoty jsou znázorněny samostatně (kruhy).



7.3 Lineární regresní model

Lineární regresní model analyzoval vztahy mezi věkem, pohlavím, stavem kouření a hemoragickým charakterem BAL jako nezávislými proměnnými a koncentrací pepsinu v BAL jako závislou proměnnou. Model identifikoval stav kouření (bývalí kuřáci) a hemoragický charakter BAL jako významné prediktory koncentrace pepsinu v BAL (tabulka 6).

Tabulka 6. Predikce koncentrace pepsinu v BAL na základě lineární regresní analýzy

	Odhad	95% interval spolehlivosti pro koeficient		p-value
		Spodní mez	Horní mez	
Průsečík (intercept)	474,957	322,4074	627,5075	4,44E-08
Plicní adenokarcinom	-75,623	-138,457	-12,7887	0,019119
Věk	-1,777	-4,24291	0,688678	0,154757
Ženské pohlaví	16,628	-42,0543	75,3099	0,573244
Exkuřáci	107,88	49,06649	166,6941	0,000508
Hemoragický vzorek BAL	99,924	23,23115	176,6161	0,011489
Koeficient determinace (R^2) = 0,2762				

7.4 Vztah mezi lokalizací adenokarcinomu plic a koncentrací pepsinu v BAL

Analýza pomocí Wilcoxonova testu neodhalila statisticky významný rozdíl ($p = 0,667$) v koncentraci pepsinu v BAL mezi skupinami pacientů s centrálně lokalizovaným (medián 382.9 pg/ml; IQR 288-450) a periferně lokalizovaným plicním adenokarcinomem (medián 398.2 pg/ml; IQR 244-435) (tabulka 7, graf 5).

Tabulka 7. Porovnání koncentrací pepsinu v BAL mezi centrálně a periferně lokalizovaným plicním adenokarcinomem

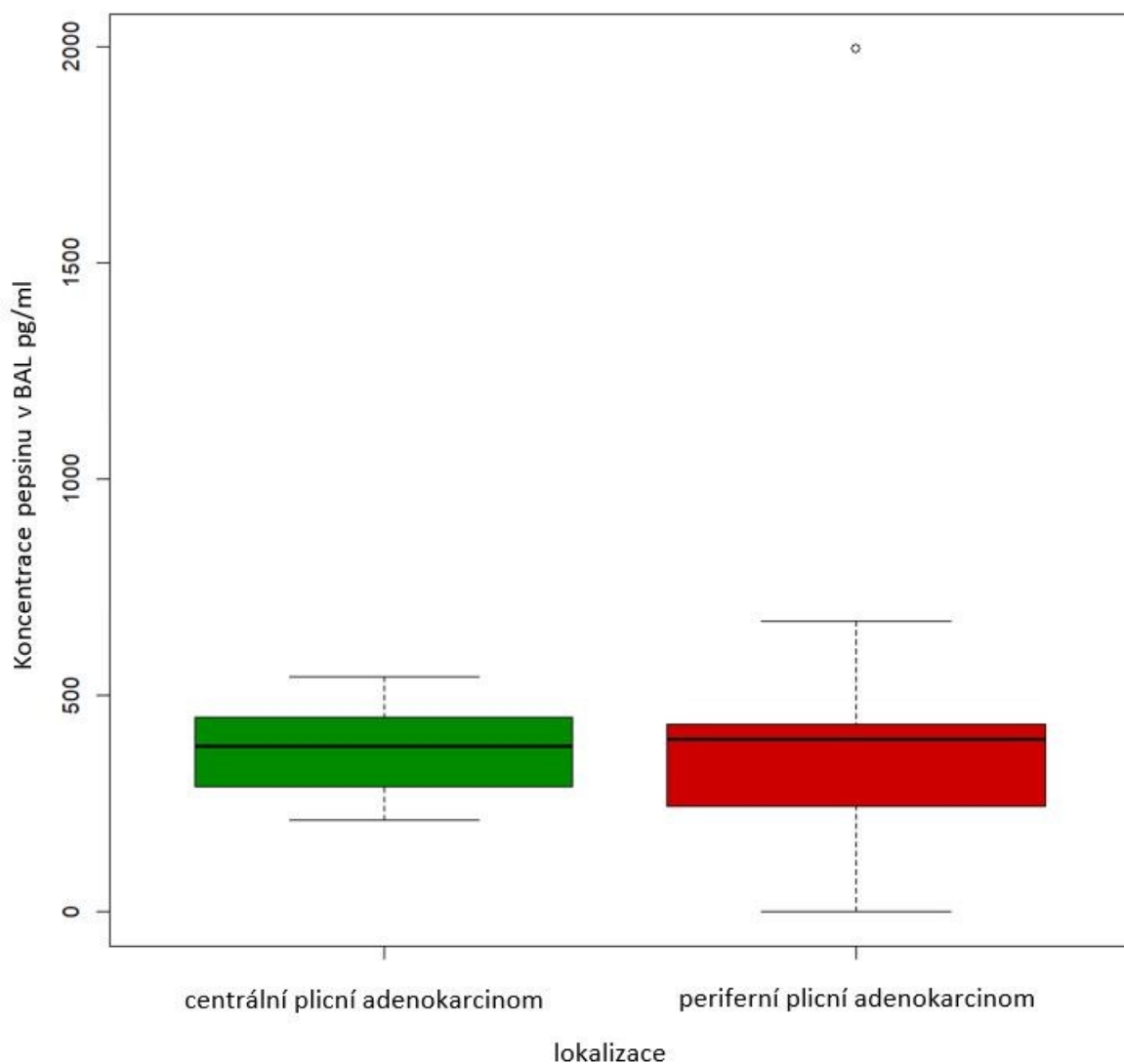
		Centrální plicní adenokarcinom n=11	Periferní plicní adenokarcinom n=19	p-value
Koncentrace pepsinu v pg/ml	Průměr +/- SD	381.35	423.12	0,681 ^{a)}
		+/- 107.42	+/- 413.17	
	Medián [IQR]	382.9	398.2	0,667 ^{b)}
		[288.45,450.15]	[243.8,434.9]	

a) t-test

b) Wilcoxonův test

Graf 5. Porovnání koncentrací pepsinu v BAL mezi periferně a centrálně lokalizovaným plicním adenokarcinomem

Wilcoxonův test neodhalil signifikantní rozdíl v koncentraci pepsinu v BAL mezi pacienty s centrálně lokalizovaným a periferně lokalizovaným plicním adenokarcinomem ($p = 0,667$). Krabicové grafy znázorňují medián (střední čára), interkvartilový rozsah (IQR, rámeček) a rozsah od minimální po maximální hodnotu (vnější čáry), přičemž odlehlé hodnoty jsou zobrazeny samostatně.



7.5 Anamnéza kouření a její vliv na koncentraci pepsinu v BAL

Koncentrace pepsinu v BAL byly porovnány mezi pacienty s historií kouření a bez ní. Bývalí kuřáci vykazovali signifikantně vyšší koncentrace pepsinu ($p = 0,001$, Wilcoxonův test, medián 458.4 pg/ml; IQR 399-546) ve srovnání s celoživotními nekuřáky (medián 350.9 pg/ml; IQR 257-447) (tabulka 8, graf 6). V naší studii jsme identifikovali dva vzorky s koncentrací pepsinu nad 1000 pg/ml, přičemž oba pocházely od bývalých kuřáků.

Po vyloučení hemoragických vzorků BAL zůstala koncentrace pepsinu u bývalých kuřáků (medián 329.5 pg/ml; IQR 247-440) stále signifikantně vyšší ($p = 0,002$, Wilcoxonův test) než u celoživotních nekuřáků (medián 451.5 pg/ml; IQR 392-487) (tabulka 9).

Tabulka 8. Srovnání koncentrace pepsinu v BAL mezi celoživotními nekuřáky a bývalými kuřáky

	Nekuřáci	Exkuřáci	p-value
	n=39	n=32	
Průměr +/- SD	353.4	537.35	0,006 ^{a)}
Koncentrace pepsinu v pg/ml	+/- 146.14	+/- 334.73	
Medián [IQR]	350.9	458.4	0,001 ^{b)}
	[257.45,446.6]	[399.17,545.95]	

^{a)} t-test

^{b)} Wilcoxonův test

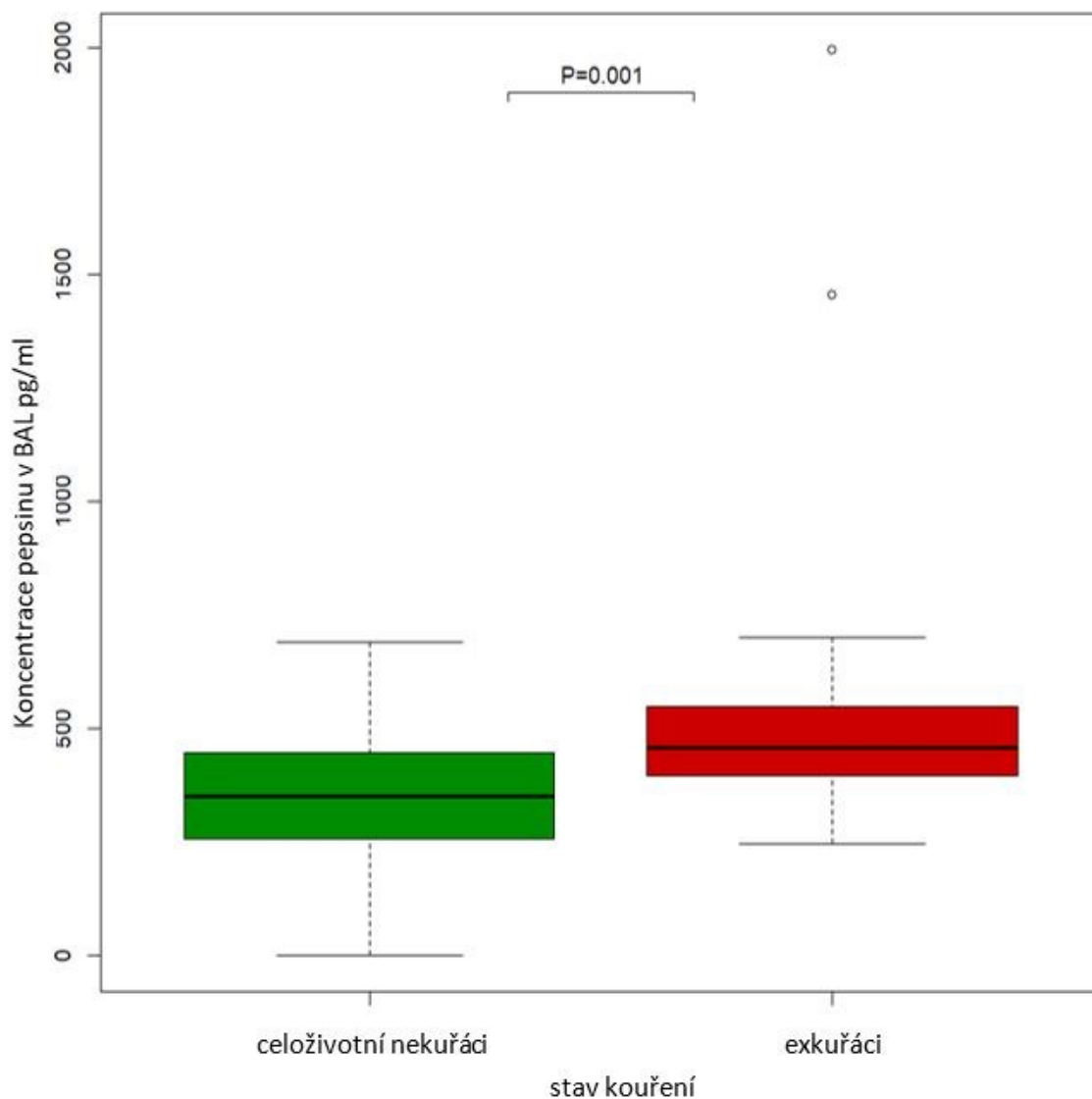
Tabulka 9. Srovnání koncentrace pepsinu v BAL mezi celoživotními nekuřáky a bývalými kuřáky po vyloučení hemoragických vzorků BAL

	Nekuřáci	Exkuřáci	p-value
	n=34	n=24	
Koncentrace pepsinu v pg/ml	Medián [IQR]	451.5	
	329.5	[392.18,487.3]	0,002 ^{a)}
	[246.85,440.42]		

^{a)} Wilcoxonův test

Graf 6. Porovnání koncentrace pepsinu v BAL mezi celoživotními nekuřáky a bývalými kuřáky

Koncentrace pepsinu v BAL byly u bývalých kuřáků signifikantně vyšší ve srovnání s celoživotními nekuřáky ($p = 0,001$, Wilcoxonův test). Krabicové grafy znázorňují medián (střední čára), interkvartilový rozsah (IQR, rámeček) a rozsah od minimální po maximální hodnotu (vnější čáry), přičemž odlehlé hodnoty jsou zobrazeny samostatně.



7.6. Hemoragický charakter BAL jako faktor ovlivňující koncentraci pepsinu v BAL

Porovnání koncentrací pepsinu mezi hemoragickými vzorky (medián 483.9 pg/ml, IQR 404-581) a nehemoragickými vzorky BAL (medián 395.4 pg/ml, IQR 280-482) prokázalo signifikantně vyšší hladiny pepsinu v hemoragických vzorcích BAL ($p = 0,01$, Wilcoxonův test) (tabulka 10, graf 7).

Tabulka 10. Srovnání koncentrace pepsin mezi hemoragickými a nehemoragickými vzorky BAL

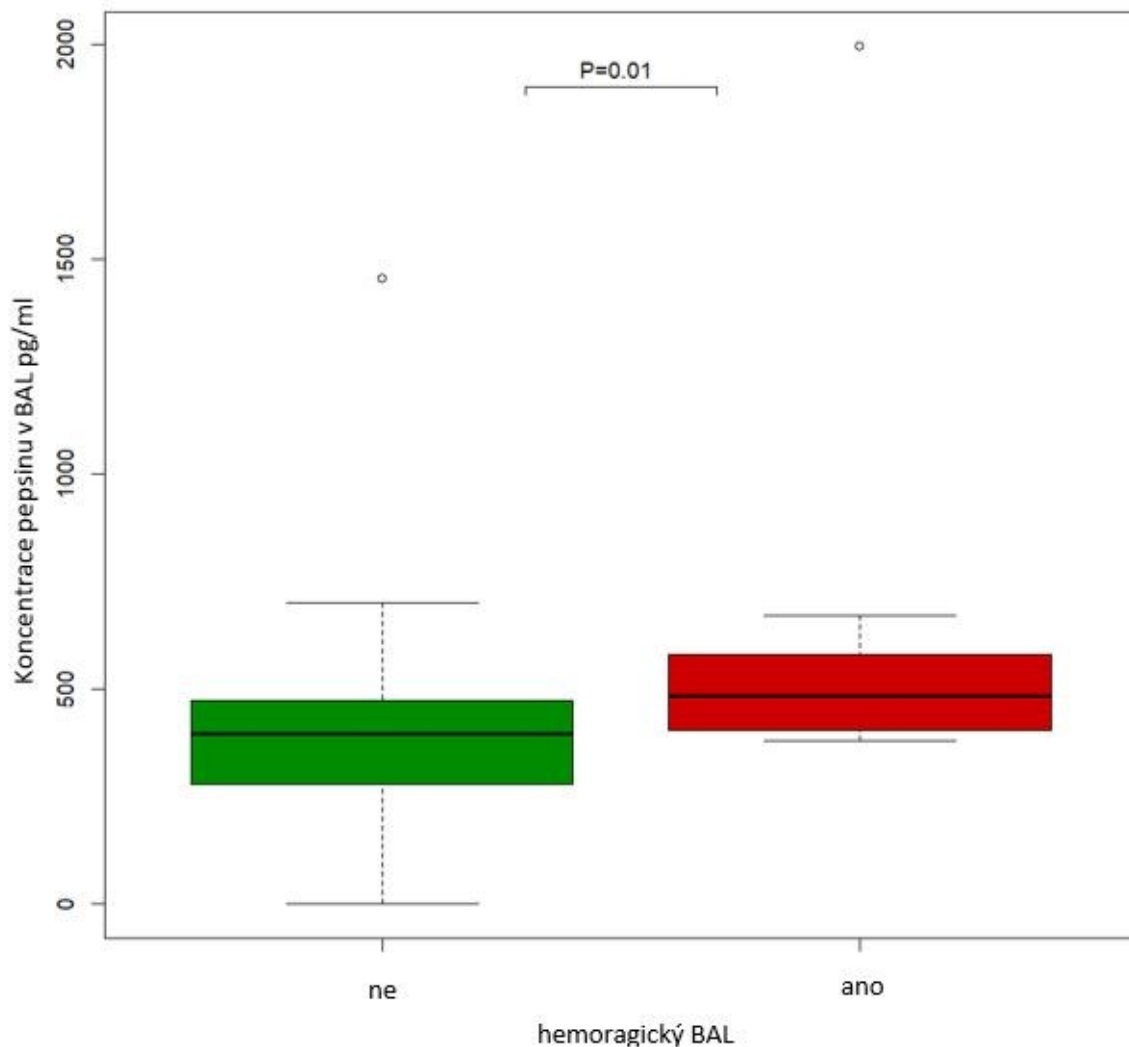
		Nehemoragický BAL	Hemoragický BAL	p-value
Koncentrace pepsinu v pg/ml		n=58	n=13	
	Průměr +/- SD	399.18	601.96	0,119 ^{a)}
		+/- 198.36	+/- 428.21	
	Medián [IQR]	395.35 [280.2,472.43]	483.9 [404,581]	0,01 ^{b)}

^{a)} t-test

^{b)} Wilcoxonův test

Graf 7. Srovnání koncentrace pepsinu mezi hemoragickými a nehemoragickými vzorky BAL

Porovnání koncentrací pepsinu mezi hemoragickými a nehemoragickými vzorky BAL ukázalo statisticky vyšší hladiny pepsinu v hemoragických BAL ($p = 0,01$, Wilcoxonův test). Krabicové grafy znázorňují medián (střední čára), interkvartilový rozsah (IQR, rámeček) a rozsah od minimální po maximální hodnotu (vnější čáry), přičemž odlehlé hodnoty jsou zobrazeny samostatně.



8. DISKUSE

V naší studii jsme zkoumali souvislosti mezi koncentrací pepsinu v BAL a různými faktory, jako je hemoragický charakter BAL, lokalizace plicního adenokarcinomu, věk, pohlaví a stav kouření. Kromě toho jsme studovali vztah mezi koncentrací pepsinu v BAL a typem ložiskového plicního procesu (plicní adenokarcinom, plicní metastázy při primárním mimoplicním nádoru nebo plicní sarkoidóza) s cílem vyhodnotit hypotézu, že EER přispívá k rozvoji plicního adenokarcinomu, tedy histologického podtypu NSCLC, který je relativně častěji diagnostikován u nekuřáků ve srovnání s ostatními histologickými subtypy NSCLC.

Pokud by existovala kauzální souvislost mezi EER a rozvojem plicního adenokarcinomu, očekávali bychom vyšší výskyt EER (hodnoceného na základě koncentrace pepsinu v BAL) u pacientů s plicním adenokarcinomem ve srovnání s pacienty s jinými typy plicních onemocnění, ať již maligními- plicní metastázy při primárním mimoplicním nádoru, nebo nemaligními- plicní sarkoidózou. Výsledky naší studie však tuto hypotézu nepodporují. Při zahrnutí všech vzorků BAL jsme mezi skupinami nezjistili statisticky významný rozdíl v koncentracích pepsinu v BAL ($p = 0,135$, Kruskal-Wallisův test). Po vyloučení hemoragických vzorků BAL, u nichž může přítomnost hemoglobinu způsobit falešně zvýšené hladiny pepsinu, byla koncentrace pepsinu v BAL u pacientů s plicním adenokarcinomem dokonce signifikantně nižší než u kontrolních skupin ($p = 0,023$, Kruskal-Wallisův test).

Výhodou naší studie je důsledné rozlišení mezi celoživotními nekuřáky a bývalými kuřáky a vyloučení současných kuřáků ze studie. Kouření je známým kofaktorem GER, protože přispívá ke snížení tonu dolního jícnového svěrače, změně motility jícnu, opožděnému vyprázdnění žaludku, zvýšené sekreci žaludeční kyseliny a snížené produkci slin, které běžně neutralizují kyselost refluxu. (121) Kouření je také významným rizikovým faktorem plicního karcinomu. Kuřáci mají až 20 krát vyšší riziko vzniku NSCLC ve srovnání s nekuřáky. (122) Silná vazba mezi kouřením a refluxem, stejně jako mezi kouřením a NSCLC, podtrhuje důležitost zohlednění anamnézy kouření při zkoumání potenciálního spojení mezi EER a NSCLC. Jinými slovy, protože většina pacientů s NSCLC má pozitivní kuřáckou anamnézu, může být zvýšená prevalence EER u těchto pacientů spíše výsledkem falešné korelace než přímé kauzální souvislosti.

Epidemiologická studie Hsu a kolektiv uvádí, že pacienti s GERD měli vyšší riziko rakoviny plic ve srovnání s populací bez GERD. (123) Hlavním nedostatkem této studie však bylo začlenění významného procenta kuřáků. Lin Li a kolektiv prokázali pomocí Mendelian randomizační analýzy, že GERD zvyšuje riziko rozvoje NSCLC (odds ratio (OR) = 1,37; 95% CI 1,16–1,63, $p = 0,0003$), avšak status kouření nebyl v tomto výzkumu zohledněn. (124) Vereczkei a kolektiv provedli kohortovou studii s 25 pacienty s resektabilním plicním adenokarcinomem a s 25 pacienty se plicním skvamózním karcinomem. GERD byl hodnocen pomocí 24hodinové pH-metrie. Reflux byl detekován u 40 % pacientů s plicním adenokarcinomem a 32 % pacientů s plicním skvamózním karcinomem. Jejich původní hypotéza, která předpokládala signifikantně vyšší výskyt refluxu u pacientů s plicním adenokarcinomem, se nepotvrdila. Je však nutné poznamenat, že 40 % pacientů s plicním adenokarcinomem a 52 % plicním skvamózním karcinomem byli kuřáci, což by mohlo vysvětlit vyšší míru GERD ve studijní skupině oproti populační prevalenci uváděné v literatuře. (125)

V retrospektivní případové studii Amarnath a kolektiv zjistili signifikantně vyšší výskyt GERD u pacientů s NSCLC ve srovnání s kontrolní skupinou bez diagnózy plicního karcinomu (20,4 % vs. 11,6 %, $p < 0,001$), což naznačuje, že GERD je rizikovým faktorem pro NSCLC (OR = 1,86, CI = 1,26 - 2,73). Léčba GERD formou H2 blokátorů nebo inhibitorů protonové pumpy nevedla ke snížení rizika NSCLC (OR = 1,01, 95% CI = 0,48 - 2,12). Studie má nicméně několik limitací. I přes relativně velký počet účastníků (N = 543) a zaměření na nekuřáckou populaci, což je oproti dříve zmíněným studiím zásadní zlepšení, jsou spolehlivost diagnózy GERD a přesnost určení nekuřáckého statusu diskutabilní. Studie zahrnovala pacienty s GERD identifikované pouze na základě kódu GERD podle mezinárodní klasifikace nemocí (ICD) v jejich zdravotních záznamech, bez ověření přítomnosti GERD buď gastrofibroskopií s biopsií nebo 24hodinovou pH-metrií. Nekuřák byl navíc určen pouze na základě absence kuřácké anamnézy, což, jak sami autoři uznávají, mohlo vést k zařazení neznámého podílu kuřáků s neúplnými záznamy. (126)

Signifikantní rozdíl v koncentracích pepsinu v BAL mezi celoživotními nekuřáky a bývalými kuřáky ($p = 0,001$, Wilcoxonův test) naznačuje, že kouření může mít dlouhodobý vliv na koncentraci pepsinu v dýchacích cestách, který přetrvává i po ukončení kouření. Lze spekulovat, že tento efekt může být způsobem oslabením dolního jícnového svěrače v důsledku kouření, které může mít dlouhodobé následky i po jeho skončení.

Fakt, že stav kouření v naší studii byl určen pouze na základě přímého dotazování a nikoliv objektivními metodami, jako je např. detekce kotininu, představuje jedno z omezení našeho výzkumu. Nicméně detekce kotininu poskytuje relevantní výsledky pouze několik týdnů po ukončení kouření. Naše studie rozlišovala mezi celoživotními nekuřáky a bývalými kuřáky, kteří se zdržovali kouření více než 5 let. Toto omezení tedy pravděpodobně nemělo výrazný vliv na klasifikaci našich pacientů. Přestože uplynula dlouhá doba od ukončení kouření, je překvapivé, že koncentrace pepsinu v BAL zůstávají signifikantně vyšší u bývalých kuřáků ve srovnání s celoživotními nekuřáky.

Koncentrace pepsinu v BAL byla nejvyšší ve skupině pacientů s plicní sarkoidózou, avšak tento výsledek nebyl statisticky významný. Navíc tato skupina zahrnovala pouze 12 účastníků, což představuje jedno z omezení naší studie. V současné době neexistuje žádný mechanismus spojující reflux a plicní sarkoidózu. Přesto některé studie naznačují možnou souvislost mezi těmito dvěma patologickými stavy. (127, 128) Pešek se svým kolektivem prokázali vysokou prevalenci GERD u pacientů se sarkoidózou. Pomocí 24hodinové multikanálové jícnové impedance s pH-metrií byl reflux detekován u 19 z 25 pacientů. GERD může souviset s některými komorbiditami u pacientů se sarkoidózou a může negativně ovlivnit rozsah parenchymového postižení plic. (127) Ověření hypotézy o zvýšené prevalenci EER u pacientů s plicní sarkoidózou si vyžaduje další výzkum s větším počtem účastníků v této kohortě.

Fukui a kolektiv navrhli, že periferně lokalizovaný plicní adenokarcinom pravděpodobně vzniká z pneumocytů typu II a Clara buněk, zatímco centrálně lokalizovaný plicní adenokarcinom by mohl mít svůj původ v glandulárním epitelu. (39) Tento epitel, umístěný ve sliznici dýchacích cest, může přijít teoreticky do kontaktu s refluxátem a být potencionálně náchylnější vůči účinkům refluxu. Naše studie však nepodpořila hypotézu, že centrálně lokalizovaný plicní adenokarcinom je spojen s vyšším výskytem EER než periferně lokalizovaný plicní adenokarcinom.

V naší studii jsme prokázali statisticky vyšší koncentrace pepsinu v hemoragických vzorcích ve srovnání s nehemoragickými vzorky BAL ($p = 0,01$, Wilcoxonův test). Falešně pozitivní výsledky detekce pepsinu v hemoragických vzorcích pomocí ELISA mohou být

způsobeny interferencí hemoglobinu a dalších krevních proteinů s činidly používanými v ELISA testu. (129) Z tohoto důvodu byly hemoragické vzorky vyloučeny. Naopak koncentrace pepsinu v BAL není závislá na věku pacientů a pohlaví.

Vzhledem k faktu, že pepsin není normálně přítomen ve vysokých koncentracích v dolních dýchacích cestách, je opodstatněný předpoklad, že jeho detekce v BAL může být biomarkerem aspirace. Nicméně je třeba podotknout, že detekce EER v dolních dýchacích cestách stanovením koncentrace pepsinu v BAL metodou ELISA není etablovanou a standardizovanou metodou pro diagnostiku tohoto stavu. Diagnostika EER je složitá a v současnosti neexistuje žádný zlatý standard diagnostického algoritmu. Mezi standardizované a uznávané metody průkazu EER patří dotazníky typu RSI (reflux symptom index), endoskopie (ezofagogastroduodenoskopie, laryngoskopie, videolaryngoskopie) s biopsií a 24hodinová dvoukanálová pH-metrie nebo multikanálová intraluminální impedance s pH monitorováním. (130)

Bohužel použití dotazníků typu RSI je u našich pacientů omezené kvůli výraznému překrývání symptomů mezi EER a plicními onemocněními (např. kašel, dušnost, zahlenění, bolest na hrudi..). Ostatní zmíněné metody znamenají další invazivní vyšetření pacientů, přičemž každá z nich má své limity. Při endoskopii horních dýchacích cest je nález v ORL oblasti nespecifický pro reflux a nemusí odrážet stav v dolních dýchacích cestách.

Zatímco pH-metrie je spolehlivá při detekci kyselého refluxu, nedokáže rozlišit mezi kyselým a nekyselým refluxem. Tato diferenciace je klinicky relevantní, protože nekyselý reflux obsahující žlučové kyseliny a jejich soli, pankreatické kyseliny a pepsin, se podílí na patogenezi plicních onemocnění. Prodloužená expozice těmto látkám může vyvolat zánětlivou reakci, remodelaci dýchacích cest a poškození plicní tkáně.

Multikanálové intraluminální impedance s pH-metrií (MII-pH) má výhodu v detekci jak kyselého, tak nekyselého refluxu. Avšak i tento postup má své nevýhody, jakožto technická složitost, nepohodlí pacientů a obtížná interpretace výsledků.

Provedení BAL během bronchoskopie, která je běžnou součástí diagnostiky plicních procesů u těchto pacientů, je komfortnější a navíc umožňuje získání vzorku přímo z dolních

dýchacích cest. Na druhé straně použití BAL omezuje výběr kontrolní skupiny na pacienty již indikované k bronchoskopii, protože nábor dobrovolníků z normální populace by byl eticky pochybný vzhledem k invazivní povaze bronchoskopie.

Výsledky naší studie naznačují, že stanovení koncentrace pepsinu v BAL by se v budoucnu mohlo stát dalším cenným nástrojem bronchoskopické diagnostiky plicních onemocnění. EER přispívá k rozvoji a/nebo k exacerbaci řady plicních chorob. Většina dosud publikovaných studií, které využívaly stanovení koncentrace pepsinu v BAL jako biomarkeru aspirace u dospělých, se zaměřila na EER jako potenciální příčinný faktor exacerbace idiopatické plicní fibrózy a dalších progredujících fibrotizujících intersticiálních plicních nemocí, rozvoje recidivujících pneumonií u ventilovaných pacientů a rozvoje obliterující bronchiolitidy po plicní transplantaci. (131-135) Tyto studie, podobně jako naše studie, byly navrženy s cílem porovnat hladiny pepsinu v BAL mezi specifickými skupinami pacientů a kontrolními skupinami. Účastníci studií byli rekrutováni z řad pacientů podstupující bronchoskopii kvůli diagnostice plicního onemocnění. Pouze jedna studie zařadila do kontrolní skupiny zdravé dobrovolníky. Je však třeba poznamenat, že se jednalo o skupinu čítající pouze 4 dobrovolníky s věkovým mediánem 39 let, přičemž výběr byl omezen na zdravotníky dané nemocnice. (132) Stejně jako naše studie ani ostatní výzkumy využívající pepsin jako biomarker aspirace neměly za cíl definovat patologické hodnoty pepsinu v BAL.

K zodpovězení tedy zůstává standardizace dané metody. Na rozdíl od sliznice jícnu nedisponuje sliznice dýchacích cest obrannými mechanismy proti působení složek refluxátu. Ve skutečnosti je náchylnější k poškození způsobenému refluxátem. Obecné tvrzení, že každá mikroaspirace refluxu do dýchacích cest vedoucí k detekci pepsinu v BAL je kauzálně spojena s rozvojem nebo zhoršením plicního onemocnění, není opodstatněné. Je proto klíčové stanovit patologické práh koncentrace pepsinu v dolních dýchacích cestách pro EER a zvážit všechny faktory, které ovlivňují hladinu pepsinu v BAL, než bude tato metoda zavedena do běžné klinické praxe. Dle závěrů naší studie se těmito faktory jeví hemoragický charakter BAL a anamnéza kouření.

Literatura uvádí, že hladina pepsinu v BAL může být ovlivněna i jinými faktory než aspirací, jako je kontaminace bronchoskopu obsahem horních dýchacích cest, doba od poslední refluxní epizody v okamžiku provádění BAL nebo poloha pacienta. (135)

V budoucnu bude nezbytné provést další studie zaměřené na stanovení klinicky relevantních hodnot koncentrace pepsinu v BAL. Tyto studie by měly zahrnovat větší a různorodější kohorty, včetně účasti zdravých dobrovolníků. Dále bude klíčové definovat všechny faktory, které ovlivňují koncentraci pepsinu v BAL.

Přesný mechanismus, jakým reflux může přispět k rozvoji plicního adenokarcinomu, zůstává stále neobjasněn. Naše studie nezkoumala kauzální cesty spojující reflux s tumorogenezi plicního adenokarcinomu. Na základě předchozích výzkumů, které zkoumaly sekvenci reflux - Barrettův jícn - ezofageální adenokarcinom, lze hypotetizovat, že chronický zánět vyvolaný refluxem může vést ke zvýšené proliferaci buněk a jejich nádorové transformaci.

Ověření této teorie pomocí jedno-buněčné transcriptomiky by bylo velmi vhodné. Tento přístup by mohl poskytnout cenné poznatky o tom, jak zánět způsobený refluxem ovlivňuje buněčné a molekulární procesy, které se podílejí na vývoji plicního adenokarcinomu. Analýza genových profilů jednotlivých buněk by umožnila lepší pochopení heterogenních reakcí na reflux a identifikaci klíčových mechanismů, které přispívají k rozvoji adenokarcinomu plic.

Naše studie měla několik limitací. Mezi hlavní nedostatky patří malý počet účastníků a metodologické aspekty. Zejména skupina pacientů s plicní sarkoidózou zahrnovala pouze 12 účastníků, což mohlo snížit statistickou sílu srovnání a ovlivnit spolehlivost výsledků.

Dalším důležitým omezením je absence standardizace detekce pepsinu v BAL metodou ELISA jako biomarkeru pro EER v dolních dýchacích cestách. Tento přístup, ačkoli méně invazivní než pH-metrie, postrádá etablované prahové hodnoty, což může ztěžovat interpretaci výsledků. K tomu přispívá i skutečnost, že přítomnost hemoragických vzorků BAL může způsobit falešně pozitivní výsledky, což zvyšuje riziko chybných závěrů.

Tyto faktory zdůrazňují potřebu dalšího výzkumu a vypracování standardizovaných protokolů, které by umožnily efektivnější využití stanovení koncentrace pepsinu jako spolehlivého biomarkeru pro diagnostiku refluxu v dolních dýchacích cestách.

9. ZÁVĚRY A ZHODNOCENÍ CÍLŮ PRÁCE

Hlavním cílem studie bylo vyhodnotit hypotézu, že EER přispívá k rozvoji plicního adenokarcinomu, a to na základě porovnání koncentrací pepsinu v BAL mezi skupinou pacientů s adenokarcinomem plic a kontrolními skupinami.

Studie nenalezla statisticky významný rozdíl v koncentracích pepsinu v BAL mezi pacienty s plicním adenokarcinomem a kontrolními skupinami (plicní metastázy, plicní sarkoidóza). Po vyloučení hemoragických vzorků BAL však byla koncentrace pepsinu u pacientů s plicním adenokarcinomem signifikantně nejnižší.

Lineární regresní model identifikoval dvě proměnné, kuřáckou anamnézu a hemoragický charakter BAL, jako významné faktory ovlivňující koncentraci pepsinu v BAL. Věk a pohlaví se neukázaly jako relevantní faktory.

Metoda detekce pepsinu v BAL pomocí testu ELISA vykazuje potenciál sloužit jako možný biomarker aspirace, nicméně vyžaduje další validaci, standardizaci a stanovení diagnostických prahových hodnot pro širší klinické užití.

10. SOUHRN

Studie porovnávala koncentrace pepsinu v BAL mezi pacienty s plicním adenokarcinomem, s metastatickým postižením plic při primárním mimoplicním nádoru a s plicní sarkoidózou. Statisticky významné rozdíly v koncentracích pepsinu mezi těmito třemi skupinami nebyly nalezeny ($p = 0,135$), což naznačuje, že souvislost mezi EER a plicním adenokarcinomem, která je popisována v literatuře, může být spíše důsledkem rozdílů v kouření mezi jednotlivci s přítomnosti či nepřítomnosti refluxu než skutečným kauzálním vztahem.

Lineární regresní analýza odhalila, že kuřácká anamnéza a hemoragický charakter BAL mají statisticky významný vliv na koncentraci pepsinu v BAL. Po vyloučení hemoragických vzorků BAL vykazovala skupina s plicním adenokarcinomem signifikantně nejnižší koncentraci pepsinu ($p = 0,023$).

Signifikantní rozdíl v koncentracích pepsinu mezi celoživotními nekuřáky a bývalými kuřáky ukazuje, že kouření může mít dlouhodobý vliv na koncentraci pepsinu v dýchacích cestách.

SUMMARY

The study compared pepsin concentrations in BAL among patients with lung adenocarcinoma, metastatic lung involvement and pulmonary sarcoidosis. No statistically significant differences in pepsin concentrations were found between these three groups ($p = 0,135$). This finding suggests that the association between extraesophageal reflux and lung adenocarcinoma described in the literature may be more related to differences in smoking habits among individuals with or without reflux, rather than a true causal relationship.

Linear regression analysis identified smoking history and the hemorrhagic character of the BAL as significant factors influencing pepsin concentrations. After excluding hemorrhagic BAL samples, the lung adenocarcinoma group showed significantly lower pepsin levels compared to the other groups ($p = 0,023$).

A significant difference in pepsin concentrations between lifelong non-smokers and former smokers suggests that smoking may have a long-term impact on pepsin levels in the airways, which persists even after smoking cessation.

11. POUŽITÁ LITERATURA

1. Johnson LF, DeMeester TR. Development of the 24-hour intraesophageal pH monitoring composite scoring system. *J Clin Gastroenterol.* 1986;8(Suppl 1):52-58.
2. Vakil N et al. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006;101(8):1900-20.
3. El-Serag HB et al. Update on the epidemiology of gastro-oesophageal reflux disease: a systematic review. *Gut.* 2014;63(6):871–880.
4. Castell DO et al. Review article: the pathophysiology of gastro-oesophageal reflux disease-oesophageal manifestations. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20(Suppl 9):14–25.
5. Poelmans J, Tack J. Extraoesophageal manifestations of gastro-oesophageal reflux. *Gut.* 2005;54(10):1492–1499.
6. Adhami T et al. The role of gastric and duodenal agents in laryngeal injury: an experimental canine model. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(11):2098–2106.
7. Raghavendran K et al. Aspiration-induced lung injury. *Crit Care Med.* 2011;39(4):818-826.
8. Canning BJ, Mazzone SB. Reflex mechanisms in gastroesophageal reflux disease and asthma. *Am J Med.* 2003;115(Suppl 3A):S45-S48.
9. Jack CI et al. Simultaneous tracheal and oesophageal pH measurements in asthmatic patients with gastro-oesophageal reflux. *Thorax.* 1995;50(2):201-204.
10. Ruth M et al. Scintigraphic detection of gastro-pulmonary aspiration in patients with respiratory disorders. *Clin Physiol.* 1993;13(1):19-33.
11. Davis CS et al. A review of the potential applications and controversies of non-invasive testing for biomarkers of aspiration in the lung transplant population. *Clin Transplant.* 2010;24(3):E54-61.
12. Amarasiri DL et al. Response of the airways and autonomic nervous system to acid perfusion of the esophagus in patients with asthma: a laboratory study. *BMC Pulm Med.* 2013;13:33.
13. Lechien JR et al. Clinical Outcomes of Laryngopharyngeal Reflux Treatment: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Laryngoscope.* 2019;129(5):1174-1187.
14. Mukhopadhyay S, Maitra U. Chemistry and biology of bile acids. *Current Science.* 2004;87(12):1666-1683.

15. Stamp D, Jenkins G. An overview of bile-acid synthesis, chemistry and function. In *Bile Acids: Toxicology and Bioactivity*. eds Jenkins GJ a Hardie L. The Royal Society of Chemistry. 2008:1-13.
16. Pearson JP, Parikh S. Review article: nature and properties of gastro-oesophageal and extra-oesophageal refluxate. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33(Suppl.1):2–7.
17. Aldhahrani A et al. Effects of bile acids on human airway epithelial cells: implications for aerodigestive diseases. *ERJ Open Res*. 2017;3(1):00107-2016.
18. Oelberg DG, Downey SA, Flynn MM. Bile salt induced intracellular Ca⁺⁺ accumulation in type II pneumocytes. *Lung*. 1990;168:297–308.
19. D'Ovidio F et al. Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;129(5):1144–1152.
20. Wu YC et al. Bile acid aspiration in suspected ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2009;136(1):118–124.
21. Schiffman SC et al. The resistance of esophageal adenocarcinoma to bile salt insult is associated with manganese superoxide dismutase expression. *J Surg Res*. 2011;171(2):623–630.
22. Kageyama T. Pepsinogens, progastricsins, and prochymosins: structure, function, evolution, and development. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(2):288–306.
23. Johnston N et al. Activity/stability of human pepsin: implications for reflux attributed laryngeal disease. *Laryngoscope*. 2007;117(6):1036–1039.
24. Goldberg HI et al. Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. *Gastroenterology*. 1969;56(2):223–230.
25. Samuels TL et al. Mucin gene expression in human laryngeal epithelia: effect of laryngopharyngeal reflux. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2008;117(9):688–695.
26. Johnston N et al. Pepsin and carbonic anhydrase isoenzyme III as diagnostic markers for laryngopharyngeal reflux disease. *Laryngoscope*. 2004;114(12):2129–2134.
27. Johnston N et al. Effect of pepsin on laryngeal stress protein (Sep70, Sep53, and Hsp70) response: role in laryngopharyngeal reflux disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2006;115(1):47–58.
28. Johnston N et al. Receptor-mediated uptake of pepsin by laryngeal epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2007;116(12):934–938.
29. Johnston N et al. Pepsin in nonacidic refluxate can damage hypopharyngeal epithelial cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009;118(9):677-85.

30. Kono K et al. Trypsin activity and bile acid concentrations in the oesophagus after distal gastrectomy. *Dig Dis Sci.* 2006;51(6):1159–64.
31. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57–70.
32. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–674.
33. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31-46.
34. Coleman HG, Xie SH, Lagergren J. The Epidemiology of Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 2017;154(2):390-405.
35. Parsel SM et al. Gastroesophageal and Laryngopharyngeal Reflux Associated With Laryngeal Malignancy: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2019;17(7):1253-1264.e5.
36. Bacciu A et al. Effects of gastroesophageal reflux disease in laryngeal carcinoma. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2004;29(5):545-548.
37. Johnston N et al. Cell biology of laryngeal epithelial defenses in health and disease: further studies. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2003;112(6):481–491.
38. de Groot PM et al. The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* 2018;7(3):220–233.
39. Fukui T et al. Lung adenocarcinoma subtypes based on expression of human airway basal cell genes. *Eur Respir J.* 2013;42(5):1332–1344.
40. Okazaki I et al. Lung Adenocarcinoma in Never Smokers: Problems of Primary Prevention from Aspects of Susceptible Genes and Carcinogens. *Anticancer Res.* 2016;36(12):6207-6224.
41. Skoulidis F, Heymach JV. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nat. Rev. Cancer.* 2019;19(9):495–509.
42. Perona R. Cell signalling: growth factors and tyrosine kinase receptors. *Clin Transl Oncol.* 2006;8(2):77–82.
43. Roskoski R Jr. The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacol. Res.* 2014;79:34–74.
44. Chen J et al. Expression and Function of the Epidermal Growth Factor Receptor in Physiology and Disease. *Physiol Rev.* 2016;96(3):1025-1069.
45. Graus-Porta D et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* 1997;16(7):1647–1655.

46. French AR et al. Intracellular trafficking of epidermal growth factor family ligands is directly influenced by the pH sensitivity of the receptor/ligand interaction. *J. Biol. Chem.* 1995;270(9):4334–4340.
47. Wee P, Wang Z. Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2017;9(5):52.
48. Yarden Y, Pines G. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(8):553–563.
49. Di Fiore PP et al. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell*. 1987;51(6):1063–1070.
50. Tarnawski AS, Ahluwalia A. The Critical Role of Growth Factors in Gastric Ulcer Healing: The Cellular and Molecular Mechanisms and Potential Clinical Implications. *Cells*. 2021;10(8):1964.
51. Kongara K, Varilek G, Soffer EE. Salivary growth factors and cytokines are not deficient in patients with gastroesophageal reflux disease or Barrett’s esophagus. *Dig Dis Sci*. 2001;46(3):606–609.
52. Jankowski J et al. Increased expression of epidermal growth factor receptors in Barrett’s esophagus associated with alkaline reflux: a putative model for carcinogenesis. *Am J Gastroenterol*. 1993;88(3):402–408.
53. Li Y et al. Cyclooxygenase-2 and epithelial growth factor receptor up-regulation during progression of Barrett’s esophagus to adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2006;12(6):928–934.
54. Wang KL et al. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer*. 2007;109(4):658–667.
55. Wilkinson NW et al. Epidermal growth factor receptor expression correlates with histologic grade in resected esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2004;8(4):448–453.
56. Mukherjee K et al. Esophageal adenocarcinoma: treatment modalities in the era of targeted therapy. *Dig Dis Sci*. 2010;55(12):3304–14.
57. Lord RV et al. K-ras codon 12 mutations in Barrett oesophagus and adenocarcinomas of the oesophagus and oesophagogastric junction. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15(7):730–736.

58. Ferrer, I et al. KRAS-Mutant non-small cell lung cancer: From biology to therapy. *Lung Cancer*. 2018;124:53–64.
59. Liu YC et al. Autocrine stimulation by insulin like growth factor I is involved in the growth, tumorigenicity and chemoresistance of human esophageal carcinoma cells. *J Biomed Sci*. 2002;9(6 Pt 2):665–674.
60. Greer KB et al. Association of insulin and insulin-like growth factors with Barrett's oesophagus. *Gut*. 2012;61(5):665–672.
61. Kubo H et al. Insulin-like growth factor-1 levels are associated with high comorbidity of metabolic disorders in obese subjects; a Japanese single-center, retrospective-study. *Sci Rep*. 2022;12(1):20130.
62. Vitale I et al. Apoptotic cell death in disease-Current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death Differ*. 2023;30(5):1097-1154.
63. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
64. Fulda S. Tumor resistance to apoptosis. *Int J Cancer*. 2009;124(3):511-515.
65. Baguley BC. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol*. 2010;46(3):308-316.
66. Naran S et al. Bile salts differentially sensitize esophageal squamous cells to CD95 (Fas/Apo-1 receptor) mediated apoptosis. *J Surg Res*. 2011;171:504-509.
67. Van der Woude CJ et al. Expression of apoptosis-related proteins in Barrett metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence: a switch to a more resistant phenotype. *Hum Pathol*. 2002; 3(7):686-692.
68. Puccio I et al. Immunohistochemical assessment of Survivin and Bcl3 expression as potential biomarkers for NF- κ B activation in the Barrett metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. *Int J Exp Pathol*. 2018;99(1):10-14.
69. Krepela E et al. Increased expression of inhibitor of apoptosis proteins, survivin and XIAP, in non-small cell lung carcinoma. *Int J Oncol*. 2009;35(6):1449–1462.
70. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*. 2009;137(3):413–431.
71. Wang H et al. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy. *Signal Transduct Target Ther*. 2023;8(1):92.
72. Kandoth C et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*. 2013;502(7471):333–339.

73. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. Mutant p53 as a guardian of the cancer cell. *Cell Death Differ.* 2019;26(2):199-212.
74. Hritz I et al. Increased p53 expression in the malignant transformation of Barrett esophagus is accompanied by an upward shift of the proliferative compartment. *Pathol Oncol Res.* 2009;15(2):183-192.
75. Kastelein F et al. Aberrant p53 protein expression is associated with an increased risk of neoplastic progression in patients with Barrett oesophagus. *Gut.* 2013;62(12):1676-1683.
76. Caspa Gokulan R et al. Gastroesophageal Reflux Induces Protein Adducts in the Esophagus. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;7(2):480–482.e7.
77. Shay JW, Bacchetti S: A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33(5):787-791.
78. Morales CP, Lee EL, Shay JW: In situ hybridization for the detection of telomerase RNA in the progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer.* 1998;83(4):652-659.
79. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441(7092):431-436.
80. Pires BRB et al. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes (Basel).* 2018;9(1):24.
81. Hayden MS, Ghosh S. NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev.* 2012;26(3):203–234.
82. Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF-κB signaling. *Cell.* 2008;132(3):344–362.
83. Huo X et al. Deoxycholic acid causes DNA damage while inducing apoptotic resistance through NF-κB activation in benign Barrett's epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(2):G278-G286.
84. Fang Y et al. Gastroesophageal reflux activates the NF-κB pathway and impairs esophageal barrier function in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013;305(1):G58-G65.
85. McAdam E et al. Reflux composition influences the level of NF-κB activation and upstream kinase preference in oesophageal adenocarcinoma cells. *Int J Cancer.* 2015;136(3):527-535.

86. Cronin J et al. In vitro and ex vivo models of extended reflux exposure demonstrate that weakly acidic mixed reflux heightens NF- κ B-mediated gene expression. *Dis Esophagus*. 2011;24(5):360-370.
87. Abdel-Latif MM et al. NF-kappaB activation in esophageal adenocarcinoma: relationship to Barrett's metaplasia, survival, and response to neoadjuvant chemoradiotherapy. *Ann Surg*. 2004;239(4):491-500.
88. Jenkins GJ et al. The bile acid deoxycholic acid (DCA) at neutral pH activates NF-kappaB and induces IL-8 expression in oesophageal cells in vitro. *Carcinogenesis*. 2004;25(3):317-323.
89. Sasaki CT, Issaeva N, Vageli DP. In vitro model for gastroduodenal reflux-induced nuclear factor-kappaB activation and its role in hypopharyngeal carcinogenesis. *Head Neck*. 2016;38(Suppl 1):E1381-E1391.
90. Morales CP, Sozza RF, Spechler SJ. Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet*. 2002;360(9345):1587-1589.
91. Tosh D, Slack JM. How cells chance their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(3):187-194.
92. Jankowski JA et al. Barrett's metaplasia. *Lancet*. 2000;356(9247):2079-85.
93. Quante M et al. Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer Cell*. 2012;21(1):36-51.
94. Wang X et al. Residual embryonic cells as precursors of a Barrett's-like metaplasia. *Cell*. 2011;145(7):1023-1035.
95. Jiang M et al. Transitional basal cells at the squamous-columnar junction generate Barrett's oesophagus. *Nature*. 2017;550(7677):529-533.
96. Sarosi G et al. Bone marrow progenitor cells contribute to esophageal regeneration and metaplasia in a rat model of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus*. 2008;21(1):43-50.
97. Wang DH et al. Hedgehog signaling regulates FOXA2 in esophageal embryogenesis and Barrett's metaplasia. *J Clin Invest*. 2014;124(9):3767-3780.
98. Tsukamoto T et al. Down-regulation of a gastric transcription factor, Sox2, and ectopic expression of intestinal homeobox genes, Cdx1 and Cdx2: inverse correlation during progression from gastric/intestinal-mixed to complete intestinal metaplasia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2004;130(3):135-145.
99. Chen H et al. Molecular mechanisms of Barrett's esophagus. *Dig Dis Sci*. 2011;56(12):3405-3420.

100. Takebe N et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(8):445-464.
101. Wang DH et al. Aberrant epithelial-mesenchymal Hedgehog signaling characterizes Barrett's metaplasia. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1810-1822.
102. Fre S et al. Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*. 2005;435(7044):964-968.
103. Morrow DJ et al. Pathogenesis of Barrett's esophagus: bile acids inhibit the Notch signaling pathway with induction of CDX2 gene expression in human esophageal cells. *Surgery*. 2009;146(4):714-722.
104. Moyes LH et al. Activation of Wnt signalling promotes development of dysplasia in Barrett's oesophagus. *J. Pathol*. 2012;228(1):99-112.
105. Duchartre Y, Kim YM, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;99:141-149.
106. Kong J et al. Cox2 and β -catenin/T-cell factor signaling intestinalize human esophageal keratinocytes when cultured under organotypic conditions. *Neoplasia*. 2011;13(9):792-805.
107. Gatalica Z et al. Barrett's esophagus in the patients with familial adenomatous polyposis. *Fam Cancer*. 2014;13(2):213-217.
108. Saman H et al. Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5):1172.
109. Yoshida N. Inflammation and oxidative stress in gastroesophageal reflux disease. *J Clin Biochem Nutr*. 2007;40(1):13-23.
110. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):R453-R462.
111. Maulik N, Das DK. Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(8):1047-1060.
112. Hayes JD, McLellan LI. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res*. 1999;31(4):273-300.
113. Peters WH et al. Glutathione and glutathione S-transferases in Barrett's epithelium. *Br J Cancer*. 1993;67(6):1413-1417.
114. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):453-458.

115. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275-292.
116. Ridley AJ et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302(5651):1704-1709.
117. DeNardo DG et al. CD4⁺ cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*. 2009;16(2):91-102.
118. Zhang Q et al. Acidic Bile Salts Induce Epithelial to Mesenchymal Transition via VEGF Signaling in Non-Neoplastic Barrett's Cells. *Gastroenterology*. 2019;156(1):130-144.e10.
119. Rieder F et al. Inflammatory mediators in gastroesophageal reflux disease: impact on esophageal motility, fibrosis, and carcinogenesis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298(5):G571-G581.
120. R core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing (Version 4.2.2); R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2022. Available online: <https://www.R-project.org>
121. Argyrou A, Legaki E. Risk factors for gastroesophageal reflux disease and analysis of genetic contributors. *World J. Clin. Cases*. 2018;6(8):176–182.
122. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003;123:21S.
123. Hsu et al. Risk of lung cancer in patients with gastro-esophageal reflux disease: A population-based cohort study. *PeerJ*. 2016;4:e2753.
124. Li L, Ren Q. Causal associations between gastroesophageal reflux disease and lung cancer risk: A Mendelian randomization study. *Cancer Med*. 2023;12(6):7552–7559.
125. Vereczkei A, Horvath OP. Gastroesophageal reflux disease and non-small cell lung cancer. Results of a pilot study. *Dis. Esophagus*. 2008;21(5):457–460.
126. Amarnath S, Starr A. The Association Between Gastroesophageal Reflux Disease and Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Case-Control Study. *Gastroenterol. Res*. 2022;15(4):173–179.
127. Soares RV et al. Interstitial lung disease and gastroesophageal reflux disease: key role of esophageal function tests in the diagnosis and treatment. *Arq Gastroenterol*. 2011;48(2):91-7.
128. Pešek M et al. Sarkoidóza a gastroezofageální reflux. *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. 2018;78(5),153-157.

129. Human Pepsin (PP) Elisa Kit. Available online: <https://www.elisakit.cc/uploads/file/e01p0699-human-pp-c.pdf>
130. Cui N et al. Laryngopharyngeal reflux disease: Updated examination of mechanisms, pathophysiology, treatment, and association with gastroesophageal reflux disease. *World J Gastroenterol.* 2024;30(16):2209-2219.
131. Kim Y et al. Association between Pepsin in Bronchoalveolar Lavage Fluid and Prognosis of Chronic Fibrosing Interstitial Lung Disease. *Tohoku J Exp Med.* 2018;246(3):147-153.
132. Ward C et al. Pepsin like activity in bronchoalveolar lavage fluid is suggestive of gastric aspiration in lung allografts. *Thorax.* 2005;60(10):872-874.
133. Davis CS et al. Pepsin concentrations are elevated in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis after lung transplantation. *J Surg Res.* 2013;185(2):e101-8.
134. Blondeau K et al. Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur Respir J.* 2008;31(4):707-713.
135. Lee JS, Song JW. Bronchoalveolar lavage pepsin in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur. Respir. J.* 2012;39(2):352–358.

12. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Publikace související s tématem disertační práce

Zemanova P, Vocka M, Vanickova Z, Liska F, Krizova L, Kalab J, Votruba J. Does Extraesophageal Reflux Support the Development of Lung Adenocarcinoma? Analysis of Pepsin in Bronchoalveolar Lavage in Non-Smoker Patients. *Cancers (Basel)*. 2024;16(15):2687. **IF 4,5** (2023), **Q1** in Oncology

Zemanová P, Vočka M, Vaníčková Z, Liška F, Křížová L, Kaláb J, Votruba J. Je stanovení pepsinu v bronchoalveolární laváži vhodným biomarkerem pro diagnostiku extraezofageálního refluxu? *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. - článek schválený k publikaci.

Krizova L, Benesova I, **Zemanova P**, Spacek J, Strizova Z, Humlova Z, Mikulova V, Petruzelka L, Vocka M. Immunophenotyping of peripheral blood in NSCLC patients discriminates responders to immune checkpoint inhibitors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2024;150(2):99. **IF 2,7** (2023)

Publikace v impaktovaných časopisech zaměřené na problematiku karcinomu plic

Krejci D, Opalka P, Krejci J, Zemanova M, **Zemanova P**, Kultan J, Fischer O, Skrickova J, Bratova M, Cernovska M, Hrnčiarik M, Coupkova H, Hurdalkova K, Barinova M, Koubkova L, Dolezal D, Safanda M, Pesek M, Svaton M. Comparison of Chemotherapeutic Regimens Frequently Used in Metastatic Non-squamous NSCLC Treatment. *Anticancer Res*. 2021;41(5):2597-2603. **IF 2,4** (2021)

Blazek J, Hosek P, Hrabcova K, Bratova M, Kultan J, Hrnčiarik M, Cernovska M, **Zemanova P**, Krejci J, Koubkova L, Stastny M, Svaton M. Serious Immune-related Adverse Events Are Associated With Greater Efficacy of Nivolumab Therapy Against Non-small Cell Lung Cancer. *In Vivo*. 2023;37(5):2229-2236. **IF 1,8** (2023)

Svaton M, Zemanova M, **Zemanova P**, Kultan J, Fischer O, Skrickova J, Jakubikova L, Cernovska M, Hrnčiarik M, Jirousek M, Krejci J, Krejci D, Bilek O, Blazek J, Hurdalkova K, Barinova M, Melichar B. Impact of Concomitant Medication Administered at the Time of Initiation of Nivolumab Therapy on Outcome in Non-small Cell Lung Cancer. *Anticancer Res*. 2020;40(4):2209-2217. **IF 2,4** (2020)

Votruba J, **Zemanova P**, Lambert L, Vesela MM. The Role of Airway and Endobronchial Ultrasound in Perioperative Medicine. Biomed Res Int. 2015: 754626. **IF 2,1** (2015)

Votruba J, Charouz D, **Zemanova P**, Benes J, Tomancova V, Michalek, P. New methods of brachyradiotherapy catheter stabilization in the airways. Respiratory Medicine Case Reports. 2015. 754626. <https://doi.org/10.1016/j.rmcr.2015.11.001> **IF 0,8**

Publikace v odborných časopisech bez impakt faktoru zaměřené na problematiku karcinomu plic

Zemanová P. Funkční plicní vyšetření před plicní resekci- kazuistika. Onkol Revue. 2019;6(1):25–28.

Petruželka L, Votruba J, Křížová Ľ, Špaček J, Zemanová M, **Zemanová P**. Prediktivní testování plicních nádorů - pohled onkologa. Acta Medicinæ. 2021;10(11-13):12-15.

Zemanová P, Zemanová M. Entrectinib v léčbě ROS1 pozitivního pokročilého nemalobuněčného plicního karcinomu a v léčbě solidních nádorů s NTRK fúzí. Acta Medicinæ. 2021;10(16):64-67.

Zemanová P, Zemanová M. Osimertinib v terapii pokročilého neskvamózního nemalobuněčného plicního karcinomu. Remedia. 2022;32:232–234.

Zemanová P, Zemanová M, Černý V. Kazuistiky pacientů s ALK pozitivním NSCLC a mozgovými metastázami. Onkologie. 2023;17(1):57-61.

Zemanová M, **Zemanová P**. Léčba nádorů plic s řídicími mutacemi - nové molekuly a indikace. Onkologická revue. 2023;10(5):337-343.

Zemanová P, Křížová Ľ, Špaček J. Přínos sekvenování nové generace v terapii nemalobuněčného plicního karcinomu - zaměřeno na rezistence u EGFR mutovaného nemalobuněčného plicního karcinomu. Acta Medicinæ. 2023;12(8-9):18-20.

Zemanová P, Zemanová M, Špaček J. Pokrok v léčbě pokročilého nemalobuněčného karcinomu plic s mutací G12C onkogenu KRAS. Onkologická revue. 2024;11(3):225-229.

Zemanová P, Zemanová M, Špaček J. Cemiplimab v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic. Farmakoterapie. 2024;20(1):17-21.

Zemanová P, Zemanová M. Imunoterapie u pacientky s malobuněčným karcinomem plic. Kazuistiky v onkologii, hematoonkologii a hematologii. Acta medicinæ. 2022;4:64-66

Knižní publikace

Zemanová P, Zemanová M. Nádorová duplicita? In: Pešek M. Pneumoonkologie v kazuistikách: úspěchy a kontroverze v hrudní onkologii. Praha. Maxdorf. 2018;35-39.

Publikace v odborných časopisech bez impakt faktoru nesouvisející s tématem disertační práce ani s problematikou karcinomu plic

Matoušek V, **Zemanová P**, Stach Z. Pneumotorax, který nebyl pneumotoraxem, Anest. intenziv. Med. 2021;32(1):48-51.

Zemanová P. Primární nádory pleury: Farmakoterapeutická revue. 2022;7(5):452-457.

Zemanová P, Zemanová M, Špaček J. Maligní pleurální mezoteliom- kazuistika. Onkologická revue. 2023;10(5):383-386.

Zemanová P, Kaláb J, Votruba J, Homolka J. Vzácná příčina sekundárního Cushingova syndromu. Kazuistiky v diabetologii. 2017;15:39-42.

13. PŘÍLOHY- PŘILOŽENÉ PUBLIKACE

DOKUMENT 1

Zemanova P, Vocka M, Vanickova Z, Liska F, Krizova L, Kalab J, Votruba J. Does Extraesophageal Reflux Support the Development of Lung Adenocarcinoma? Analysis of Pepsin in Bronchoalveolar Lavage in Non-Smoker Patients. *Cancers (Basel)*. 2024;16(15):2687

DOKUMENT 2

Zemanová P, Vočka M, Vaníčková Z, Liška F, Křížová L, Kaláb J, Votruba J. Je stanovení pepsinu v bronchoalveolární laváži vhodným biomarkerem pro diagnostiku extraezofageálního refluxu? *Studia Pneumologica et Phthiseologica*. - článek schválený k publikaci.

DOKUMENT 3

Krizova L, Benesova I, **Zemanova P**, Spacek J, Strizova Z, Humlova Z, Mikulova V, Petruzelka L, Vocka M. Immunophenotyping of peripheral blood in NSCLC patients discriminates responders to immune checkpoint inhibitors. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2024;150(2):99. **IF 2,7** (2023)