



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Patologická diagnostika Lynchova syndromu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: ZDRAVOTNÍ LABORANT

Autor: Lenka Krausová

Vedoucí práce: Doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.

České Budějovice 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Patologická diagnostika Lynchova syndromu“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské/diplomové práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské/diplomové práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3. 5. 2017

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu Doc. MUDr. Ondřeji Daumovi, Ph.D. za vedení této práce. Děkuji za jeho ochotu, trpělivost, cenné rady a připomínky. Také děkuji své rodině za velkou podporu při studiu.

Patologická diagnostika Lynchova syndromu

Abstrakt

Lynchův syndrom je autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku kolorektálního karcinomu. Podle literatury až 5 % kolorektálních karcinomů může být asociováno s Lynchovým syndromem. Vzhledem k familiárnímu výskytu je jeho záchyt důležitý kvůli včasné prevenci v rodině. Depistáž je dnes založena na metodách moderní patologie. V teoretické části této práce je nejprve popsána stavba trávicí trubice, definice a historie Lynchova syndromu, a nakonec i metodika jeho depistáže v laboratoři patologie. Depistáž může být založena na hodnocení mikroskopických znaků nádoru (Semi PREDICT skóre) v histologických řezech, na imunohistochemickém vyšetření MMR (mismatch repair) proteinů, anebo na molekulárně genetickém stanovení MSI (nestability mikrosatelitů). Zejména korelaci prvních dvou metod je věnována praktická část. Náhodným výběrem byly sestaveny dvě skupiny případů kolorektálního karcinomu. První skupina sestávala z 25 případů se zachovanou imunoexpresí MMR proteinů, druhá skupina z 25 případů se ztrátou exprese alespoň jednoho MMR proteinu. Výsledky byly dále ověřeny molekulárně genetickým průkazem MSI a pro odlišení sporadických forem také analýzou genu BRAF a hypermetylace promotoru MLH1. V suspektních případech byly dále vyšetřeny germinální mutace MMR genů, které potvrdily Lynchův syndrom u 5 případů z druhé skupiny. Senzitivita Semi PREDICT skóre pro predikci MMR-deficience (a nepřímou tak pro detekci Lynchova syndromu) byla 84 %, specificita 48 %. Senzitivita molekulárně genetického stanovení MSI 87 %, po vztahování na pacienty s Lynchovým syndromem pouze 50 %, specificita 100 %. Tato práce prokázala dominantní postavení imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů v diagnostice MSI-H karcinomů, která je v současné době základem depistáže Lynchova syndromu.

Klíčová slova

Kolorektální karcinom; Lynchův syndrom; imunohistochemie; MMR; nestabilita mikrosatelitů; histologie

Diagnosis of Lynch syndrome based on pathologic examination

Abstract

Lynch syndrome is an autosomal dominant disease predisposing to cancer development. Up to 5 % of colorectal cancers may be associated with Lynch syndrome. Due to its familial occurrence the diagnosis is important for family screening. Currently it is based on methods of modern pathology. Theoretical part describes structure of gastrointestinal tract, definition and history of Lynch syndrome, and methods of its laboratory diagnostics. The diagnosis can be based on evaluation of tumor microscopical features (Semi PREDICT score) in tissue sections, immunohistochemical investigation of MMR (mismatch repair) proteins, or molecular genetic MSI (microsatellite instability) testing. Practical part focuses mainly on correlation of immunohistochemistry and MSI testing. Randomly selected cases of colorectal cancer were organized into 2 study groups. The first group consisted of 25 cases with intact MMR immunoreexpression, the second group comprised 25 cases with at least one MMR protein being deficient. For further verification molecular genetic MSI testing, along with BRAF gene analysis and MLH1 promoter methylation status to discriminate Lynch syndrome from sporadic cases, were performed. Germline analysis of MMR genes proved the diagnosis of Lynch syndrome in 5 cases of the second group. Semi PREDICT score sensitivity for MMR-deficiency prediction (and indirectly for Lynch syndrome detection) was 84 %, specificity 48 %. Sensitivity of MSI testing was 87 %, but only 50 % in Lynch syndrome subset of cases, specificity was 100 %. The results show major role of MMR immunohistochemistry in the diagnostics of MSI-H cancers, which is the cornerstone of Lynch syndrome screening.

Key words

Colorectal cancer; Lynch syndrome; immunohistochemistry; MMR; microsatellite instability; MSI; histology

OBSAH

ÚVOD.....	9
1 TEORETICKÁ ČÁST	10
1.1 Anatomická stavba tlustého střeva	10
1.1.1 Stěna trávicí trubice	10
1.1.2 Žlázy trávicí trubice.....	11
1.1.3 Jednotlivé úseky tlustého střeva	11
1.2 Histologická stavba střeva	12
1.2.1 Histologická stavba tenkého střeva	12
1.2.2 Histologická stavba tlustého střeva	13
1.2.3 Histologická stavba červovitého výběžku	14
1.2.4 Histologická stavba konečníku	14
1.3 Kolorektální karcinom (CRC)	15
1.3.1 Diagnostika kolorektálního karcinomu	16
1.3.2 Typy kolorektálních karcinomů	16
1.3.3 Komplikace způsobené kolorektálním karcinomem	18
1.4 Lynchův syndrom	18
1.4.1 Definice Lynchova syndromu	18
1.4.2 Historie Lynchova syndrom	19
1.5 Molekulární biologie Lynchova syndromu.....	20
1.5.1 Mikrosatelity a nestabilita mikrosatelitů (MSI)	21
1.5.2 MSI-H tumory a MMR geny	21
1.6 Klinické projevy Lynchova syndromu	22
1.6.1 Muir-Torreho syndrom (MTS)	23
1.6.2 Turcotův syndrom 1. typu	23
1.6.3 Syndrom bialelického mismatch repair deficitu („constitutional mismatch repair deficiency“, CMMRD).....	24
1.7 Klinická diagnostika Lynchova syndromu	25
1.7.1 Amsterdamská kritéria II	25
1.7.2 Bethesda guidelines	26
1.8 Moderní patologická diagnostika Lynchova syndromu.....	26
2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY	29
3 METODIKA VÝZKUMU.....	31
3.1 Konvenční histologické vyšetření preparátů obarvených hematoxylinem a eosinem	31

3.1.1 Model morfologické diagnostiky a jeho výhody	32
3.1.2 Příkrojení bioptického vzorku	32
3.1.3 Fixace	33
3.1.4 Proces odvodnění a prosycení tkáně parafínem ve tkáňovém procesoru	34
3.1.5 Vlastní zalévání tkání do parafínu	35
3.1.6 Krájení parafínových řezů	35
3.1.7 Napínání a natahování parafínových řezů	36
3.1.8 Odparafínování a zavodňování řezů	37
3.1.9 Barvení Hematoxylin – Eosin	37
3.1.10 Montování preparátů	38
3.1.11 Mikroskopování.....	39
3.2 Imunohistochemické vyšetření	40
3.2.1 Princip imunohistochemického vyšetření.....	40
3.2.2 Antigeny	41
3.2.3 Protilátky a hybridom	41
3.2.4 Přímá a nepřímá imunohistochemie	42
3.2.5 Vlastní postup imunohistochemického barvení.....	43
3.2.6 Imunohistochemické vyšetření exprese „mismatch repair“ (MMR) proteinů 44	
3.2.7 Imunohistochemický průkaz mutované formy proteinu BRAF V600E.....	45
3.3 Molekulárně genetická analýza	46
3.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	46
3.3.2 Reverzní hybridizace	47
3.3.3 Molekulárně genetický průkaz mutace V600E genu BRAF	47
3.3.4 Stanovení nestability mikrosatelitů (MSI).....	48
3.3.5 Stanovení hypermetylace promotoru genu MLH1	49
3.3.6 Molekulárně genetické vyšetření samotných MMR genů	49
3.4 Metodika výběru pacientů	50
4 VÝSLEDKY	51
4.1 Klinické charakteristiky jednotlivých skupin	51
4.2 Semi PREDICT skóre.....	51
4.3 Vztah imunohistochemického vyšetření MMR proteinů a molekulárně genetického stanovení MSI.....	54
5 DISKUZE	56
6 ZÁVĚR	60
7 SEZNAM LITERATURY	61

8 PŘÍLOHY	69
Příloha 1: Obrazová dokumentace	69
Příloha 2: Tabulky	75
Příloha 3: Pracovní protokoly BenchMark ULTRA Ventana	77
9 SEZNAM ZKRATEK	82

ÚVOD

Lynchův syndrom je nejčastější genetickou příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu. Pro zpracování tohoto tématu jsem se rozhodla, vzhledem k tomu, že veřejnost je s touto problematikou málo seznámena.

Diagnóza kolorektálního karcinomu (CRC) dle statistik stále narůstá a zůstává velmi aktuálním tématem. Vysoké procento CRC tvoří Lynchův syndrom. Toto geneticky podmíněné onemocnění se projevuje vznikem mnohočetných zhoubných nádorů, postihujících pacienty v různém věku. Díky včasné diagnostice Lynchova syndromu je možné pacienty více sledovat v rámci preventivních prohlídek. Řadu problémů je tudíž možno řešit již v časném stádiu vzniku nádoru. Mnoho pacientů se pak může dožít vyššího věku. Je-li diagnostikován LS, zahrnuje preventivní péče i rodinu pacienta a lze tak odhalit další potenciálně nemocné. Prevencí se snižuje jak úmrtnost, tak i náklady na léčbu čerpané ze systému veřejného zdravotnictví. Procento zachycených případů LS se zvyšuje úměrně tomu, jak se vyvíjí a zdokonalují diagnostické metody v oblasti imunohistochemie a molekulární genetiky.

Dříve si patolog ke stanovení diagnózy musel vystačit s pouhým základním histologickým barvením a morfologickým hodnocením preparátu. Vývoj přinesl možnosti upřesnění výsledků díky rozvoji imunohistochemických metod. V posledních letech se senzitivita vyšetření zvyšuje díky rozvoji molekulárně genetických metod.

V teoretické části se věnuji anatomicko-histologické stavbě trávicí trubice a podávám informace o kolorektálním karcinomu. Obsáhlejší kapitola je věnována problematice Lynchova syndromu, jeho projevům a diagnostice. V praktické části se více zabývám porovnáním senzitivity a specifity klasického histologického vyšetření s imunohistochemickými metodami. Výzkum je proveden na náhodně vybraných padesáti pacientech ze skupiny osob vyšetřovaných na Lynchův syndrom.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Anatomická stavba tlustého střeva

Trávicí systém je tvořen souvislou trubicí, která začíná v dutině ústní a končí análním kanálem. Vývojově pochází ze zárodečné vrstvy entodermu a z malé části z ektodermu a přilehlých vrstev mezodermu a mezenchymu. V dutině ústní a v hltanu se ještě objevují nepravidelnosti, ale počínaje jícnem můžeme sledovat, že její stěnu tvoří obecně čtyři základní vrstvy. Nejen u tlustého střeva, ale i u celé trávicí trubice je možno popsat obecnou stavbu (Lichnovský a Malínský, 2009).

1.1.1 Stěna trávicí trubice

Stěna trávicí trubice je tvořena čtyřmi vrstvami, které se vyznačují charakteristickou stavbou. Pokud postupujeme z vnitřní části navenek, vrstvy trávicí trubice jsou uspořádány následovně:

1. Sliznice (tunica mucosa) je růžová až červená vrstva, která je měkká a vystýlá celou trávicí trubicí. Může tvořit řasy, papily nebo klky, podle toho o jaký úsek trávicího traktu se jedná, a obvykle je pokrytá hlenem. Sliznice je krytá epitelem a pod ní je slizniční vazivo.

2. Podslizniční vazivo (tela submucosa) je řídká vrstva kolagenního vaziva, kterým probíhají bohaté pleteně krevních i mízních cév, které vedou až do slizničního vaziva společně s nervovou pletení. Od slizničního vaziva bývá oddělena tenkou vrstvou hladké svaloviny (lamina muscularis mucosae).

3. Vrstva svalová (tunica muscularis propria) se různě mění podle lokalizace. V dutině ústní, hltanu a části jícnu je svalovina příčně pruhovaná, pak se mění v ostatních částech na svalovinu hladkou. Výjimkou je zas až konec trávicí trubice, anální otvor, kde je opět přítomna příčně pruhovaná svalovina (svěrač). Svalovina je dělena na dvě vrstvy, cirkulární a podélnou, mezi nimiž je v tenké vrstvě vaziva nervová pleteň, která je potřebná pro hybnost střeva (plexus myentericus). V případě žaludku je navíc ještě jedna vrstva svaloviny, a to šikmá vrstva.

4. Povrchová vnější vrstva: Mimo pobřišnicovou dutinu ji tvoří vazivo (tunica adventitia) přecházející do okolních tkání. V pobřišnicové dutině je na vnějším povrchu trávicí trubice pokrytá plochým jednovrstevným mezotelem, pod nímž je subserózní vazivo (tunica serosa) (Čihák, 2013).

1.1.2 Žlázy trávicí trubice

Většinou se jedná o žlázy exokrinní (se zevním vyměšováním), výjimkou je pankreas, který má i endokrinní komponentu. Mohou být umístěny buď přímo v epitelu (pohárkové buňky), anebo ve slizničním či podslizničním vazivu. U velkých žláz je tomu jinak, ty jsou umístěny mimo stěnu trávicí trubice (velké slinné žlázy, játra a pankreas).

Daleko méně nápadné jsou buňky roztroušeného neuroendokrinního systému (dříve APUD systému) rozptýlené mezi exokrinními žlázovými buňkami sliznice a ve slizničním stromatu (Čihák, 2013).

1.1.3 Jednotlivé úseky tlustého střeva

Tlusté střevo (intestinum crassum) má naředlou tmavší barvu, průměrnou délku 1,3–1,7 metrů a široké je od 4 cm asi do 7,5 cm. Tento větší průsvit je pro tlusté střevo charakteristický. V tenkém střevě jsou z kašovitého obsahu vstřebávány živiny, v tlustém střevě se pak vstřebává voda a elektrolyty a je zde formována stolice, která je posléze vyloučena análním otvorem. Na těchto procesech se v tlustém střevu podílejí mikroorganismy (kvasné i hnilobné procesy). Tlusté střevo je poslední úsek trávicí trubice a skládá se z několika částí:

1. slepé střevo
2. tračník – vzestupný, příčný a sestupný
3. esovitá klička
4. konečník – ampulla, anus

Slepé střevo (intestinum caecum) je uloženo v pravé jámě kyčelní a je to nejširší část tlustého střeva, z níž ještě odstupuje slepě zakončený červovitý přívěsek (appendix vermiformis).

Tračník (colon) je hlavní částí tlustého střeva. Má několik oddílů. První je vzestupný tračník (colon ascendens), který vede od slepého střeva až vzhůru pod játra (po pravé straně v břišní dutině). Tračník příčný (colon transversum) vede pod játry a žaludkem ke slezině, směrem zprava doleva. Sestupný tračník (colon descendens) jde od sleziny dolů po levé straně břišní dutiny do levé kyčelní jámy.

Esovitá klička (colon sigmoideum) je esovitě zkroucený úsek střeva začínající u konce sestupného tračníku, vede do středu malé pánve a pokračuje jako konečník.

Konečník (rectum) končí navenek otvorem zvaným anus (řít') a je posledním úsekem střeva v malé pánvi (Čihák, 2013).

1.2 Histologická stavba střeva

Vzhledem k logické návaznosti jsem se rozhodla v této práci uvést histologickou stavbu od tenkého střeva až po konečník, aby byly zřejmé jednotlivé rozdíly v těchto úsecích.

1.2.1 Histologická stavba tenkého střeva

Tenké střevo je delší a užší než tlusté střevo (délka 4–5 metrů, průměr 3–4 cm) a jeho četné kličky jsou uloženy v dutině břišní. Počátečním úsekem je dvanáctník (duodenum), jenž navazuje na vrátník (pylorus), dalším oddílem je lačník (jejunum), po němž následuje kyčelník (ileum), což je úsek konečný. Kyčelník ústí do tlustého střeva v pravé jámě kyčelní. Tenké střevo, stejně jako ostatní části trávicí trubice má stěnu složenou za čtyř vrstev: sliznice, podslizniční vazivo, zevní vrstva svalová a seróza (Vacek, 1995a).

Sliznice se společně s podslizničním vazivem skládá v příčné polokruhové řasy (plicae semicirculares). Slizniční řasy se převážně vyskytují ve dvanáctníku a lačníku a asi trojnásobně zvětšují rezorpční povrch. Tenké střevo má velkou schopnost rezorpce a jsou pro něj typické četné prstovité výběžky (klky), které vybíhají nad slizniční povrch. Klky zvětšují povrch a umocňují vstřebávání látek. Výška klků je různá, jejich povrch je dále zvětšen záhyby cytoplazmy kryjícího rezorpčního epitelu v submikroskopické

mikroklky. Mikroklky se ve světelném mikroskopu jeví jako asi 1 μm silný kartáčový lem. Mezi klky se nacházejí záhyby, které se prohlubují v Lieberkühnovy krypty (Vacek, 1995a; Lichnovský a Malínský, 2009).

Buňky rezorpčního epitelu se nazývají enterocyty a mezi nimi jsou roztroušeny buňky pohárkové, které vylučují hlen. Na dnech Lieberkühnových krypt jsou buňky Panethovy, které produkují enzymy. V Lieberkühnových kryptách a méně i mezi buňkami epitelu klků se vyskytují také buňky endokrinní, které vylučují některé hormony (enteroglukagon, gastrin, serotonin atd.). V elektronovém mikroskopu lze v buňkách rozlišovat granula a na jejich základě je možná klasifikace těchto buněk (Vacek, 1995a; Lichnovský a Malínský, 2009).

Jako výplň klku se uplatňuje řídké vazivo, které má v sobě volné buňky. Vazivo obsahuje hustou síť krevních vlásečnic, která je uložena těsně pod epitelem. Uvnitř klku probíhají dvě cévy, a to přívodná arteriola a odvodná venula. Také je zde široká mízní céva chylová. Slizniční svalovina tvořená snopečky hladkého svalstva umožňuje pohyby klků tím, že vybíhá až do jejich vrcholků, což je velmi důležité pro vstřebávání živin. Slizniční vazivo obsahuje velké množství lymfatických uzlíků, které se vyskytují buď jednotlivě, anebo tvoří skupiny (Vacek, 1995a).

Podslizniční vazivo je uspořádáno do silnější vrstvy pod slizniční svalovinou (lamina muscularis mucosae). Tvoří ho kolagenní vazivo, které obsahuje pleteně lymfatických a krevních cév a podslizniční nervovou pleteně. V duodenu tato vrstva navíc obsahuje Brunnerovy žlázy, což jsou rozvětvené tubulózní žlázy. Vlastní svalovou vrstvu (tunica muscularis propria) tvoří dvě vrstvy hladkého svalstva, vnitřní kruhovitá a zevní podélná, a mezi nimi jsou nervové pleteně. Povrch střeva pokrývá seroza, která je vnější vrstvou střeva (Vacek, 1995a).

1.2.2 Histologická stavba tlustého střeva

Tlusté střevo má histologickou stavbu velmi podobnou jako jiné části trávicí trubice. Je zde patrný rozdíl oproti tenkému střevu v tom, že je zde rovný povrch sliznice a nevyskytují se zde klky, pouze Lieberkühnovy krypty, které jsou oproti tenkému střevu hluboké a jsou většinou bez Panethových buněk. V epitelu je převaha pohárkových buněk, které vylučují hlen. Buněk rezorpčních ubývá. Kartáčový lem je

viditelný v elektronovém mikroskopu, ale není bohatý, mikroklky jsou vidět ojedinele a jsou krátké. Podslizniční vazivo obsahuje velké lymfatické uzlíky v malém množství. Zevní vrstva svalová je místy proložena podélnými sloupci (taeniae coli) a na povrchu je seróza, ze které vyčnívají tukové lalůčky (appendices epiploicae) (Lichnovský a Malínský, 2009).

1.2.3 Histologická stavba červovitého výběžku

Histologická stavba červovitého výběžku (processus vermiformis, appendix) se shoduje se stavbou tlustého střeva. Vzhledem k malému průměru jsou zde však jednotlivé vrstvy stěny tenčí. Je zde menší množství Lieberkühnových krypt a slizniční vazivo je téměř v celém rozsahu vyplněno lymfatickými uzlíky (Vacek, 1995a; Lichnovský a Malínský, 2009).

1.2.4 Histologická stavba konečníku

Konečník (rectum) má dva úseky, ampulární a řitní. Histologická stavba ampulárního úseku se shoduje se stavbou tlustého střeva. V řitním úseku se charakter sliznice liší tím, že se distálně mění druh epitelu. Jednovrstevný cylindrický epitel se mění ve vrstevnatý dlaždicový epitel, který dále přechází v pokožku, v níž se vyskytují mazové žlázy, potní žlázy a chlupy. Podslizniční vrstva obsahuje četné žilní pleteně. Svěrač řitní tvoří příčně pruhovaný sval uspořádaný do svalových snopců, které obkružují anální otvor (Vacek, 1995a).

Pro lepší přehlednost a porovnání jednotlivých úseků střeva jsem vytvořila Tabulku 1.

Tabulka 1. Souhrnný přehled stavby střeva

	Epitel	Typy epitelových buněk	Klky	Krypty	Svalovina
Tenké střevo	Jednovrstevný cylindrický	Rezorpční (enterocyty) Panethovy Pohárkové	Ano	Ano	Hladká – 2 vrstvy
Tlusté střevo	Jednovrstevný cylindrický	Panethovy (méně než v tenkém střevě) Pohárkové (více než v tenkém střevě)	Ne	Ano	Hladká – 2 vrstvy
Apendix	Jednovrstevný cylindrický	Jako v tlustém střevě	Ne	Ano	Hladká – 2 vrstvy
Konečník - ampulární část	Jednovrstevný cylindrický	Jako v tlustém střevě	Ne	Ano	Hladká – 2 vrstvy
Konečník - řitní část	Přechod na vrstevnatý dlaždicový epitel	Dlaždicové	Ne	Ne	Příčně pruhovaná (1 vrstva) + hladká (2 vrstvy)

(vlastní zdroj)

1.3 Kolorektální karcinom (CRC)

V České republice patří CRC k nejčastějším maligním tumorům. Rozdíl se vyskytují podle věku a pohlaví, také podle zeměpisné oblasti. Častý výskyt CRC je v USA, naopak vzácný je v Asii a v jižní Africe. Velký vliv na vznik CRC má složení potravy (Fakan, 2005; Povýšil a Šteiner, 2007).

Řada CRC vzniká na podkladě mnoha genetických a environmentálních faktorů. Jednoznačně genetický podklad je u Lynchova syndromu. Častější jsou sporadické karcinomy, zde však není jasně definovaná souvislost s genetickými predispozicemi.

Většina kolorektálních karcinomů vzniká z adenomů (z benigních nádorů). U některých pacientů (asi 6 %) je možný výskyt karcinomu současně na dvou místech,

jedná se o synchronní karcinom. Jindy se jedná o karcinom metachronní, kdy u jednoho nemocného vznikají karcinomy postupně (Povýšil a Šteiner, 2007).

Nejčastější výskyt má CRC v tračníku a rektu, proto název kolorektální karcinom. Jedná se o epitelový maligní nádor, který infiltruje střevní stěnu, dále může invadovat do krevních a lymfatických cév a následně vést ke vzniku druhotných nádorových ložisek (metastáz).

1.3.1 Diagnostika kolorektálního karcinomu

Základem pro určení správné terapie je studium nádorové morfolgie, a to makroskopické i mikroskopické. Je třeba správně určit histologickou diagnózu a zhodnotit nádorové markery.

Materiál pro histologické vyšetření se získává několika způsoby:

1. Endoskopickou biopsií, kdy se jedná o drobný vzorek ze suspektní tkáně.
2. Resekcí střeva, kdy dojde k vyjmutí celé patologické léze až po zdravou tkáň.
3. Metoda zmrazených řezů (Frozen section), která se dá použít pro rychlé peroperační stanovení typu patologického ložiska (Holubec, 2004).

Makroskopický vzhled je závislý na stupni rozvoje onemocnění, CRC může vykazovat růst buď exofytický, nebo endofytický.

Histologicky drtivá většina CRC představuje adenokarcinomy (maligní nádory, které pocházejí ze žlázového epitelu) a v různé míře produkují mucin (hlen) (Holubec, 2004).

1.3.2 Typy kolorektálních karcinomů

Na základě mikroskopické struktury je možné určit několik typů CRC dle klasifikace WHO (Hamilton et al., 2010):

1. Adenokarcinom blíže nespecifikovaný: vyznačuje se tvorbou tubulárních žlázových struktur.
2. Kribriformní adenokarcinom komedonového typu: je tvořen žlázovými strukturami s pouze drobnými luminy (dírkami) s centrální nekrózou.

3. Medulární karcinom: je charakterizovaný plochami tvořenými maligními nádorovými buňkami s vezikulárními jádry, výraznými jádérky a objemnou eozinofilní cytoplazmou, s výraznou infiltrací nádoru lymfocyty. Tento typ nádoru je téměř bez výjimky MSI-H a obvykle má dobrou prognózu.
4. Mikropapilární karcinom: sestává z drobných klastrů nádorových buněk uvnitř stromálních štěrbin, které napodobují cévní lumina.
5. Mucinózní karcinom: je definován přítomností extracelulárního hlenu, který tvoří více než 50 % objemu tumoru. Objevují se zde trsy nádorových buněk, které plavou v hlenu.
6. Pilovitý („serrated“) adenokarcinom: podobně jako jeho benigní prekurzor, přisedlý pilovitý polyp, je definován pilovitým (zubatým) profilem lumina nádorových žlázek. Tyto nádory převážně patří do skupiny sporadických MSI-H karcinomů s mutací *BRAF* a hypermethylací promotoru *MLH1*.
7. Karcinom z prstenčitých buněk: více než 50 % jeho objemu je tvořeno disociovaně rostoucími kulatými buňkami, jejichž cytoplazma je vyplněna hlenovou vakuolou, která odtlačuje jádro k buněčné membráně, takže buňka získává vzhled pečetiho prstenu.
8. Adenoskvamózní karcinom: má dlaždicovou i žlázovou komponentu.
9. Vřetenobuněčný karcinom: je charakterizován komponentou z vřetenitých buněk, které připomínají sarkom (maligní mezenchymový nádor).
10. Dlaždicový karcinom: maligní nádor tvořený dlaždicovým epitelem je v kolorektální oblasti extrémně vzácný.
11. Nediferencovaný (anaplastický) karcinom: tento nádor nemá žlázové struktury ani jiné morfologické, imunohistochemické ani molekulární známky diference.

1.3.3 Komplikace způsobené kolorektálním karcinomem

Dochází k ohrožení nemocného na podkladě stenózy střeva a mechanického obstrukčního ileu. Dalším problémem je krvácení nádoru uvnitř střeva, které se může projevit enterorhagií a anémií. Dále pak může dojít k perforaci střeva a metastazování.

Ke vzniku metastáz dochází hlavně lymfatickou cestou do regionálních lymfatických uzlin, pak také krevní cestou do jater, vzácněji i do jiných orgánů (ovaria, plíce) (Fakan, 2005; Povýšil a Šteiner, 2007).

1.4 Lynchův syndrom

1.4.1 Definice Lynchova syndromu

Lynchův syndrom (LS, dříve označován hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, HNPCC) je nejčastější genetickou příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu. Jedná se o autozomálně dominantně dědičné onemocnění, které vytváří predispozice ke vzniku zhoubných nádorů, jmenovitě kolorektálního karcinomu (nejčastěji), karcinomu endometria, ovaria, tenkého střeva, ledvinné pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže. Karcinomy při LS nevznikají v terénu polypózy. Nepřítomnost polypózy nebo jiného premorbidního fenotypu, tedy benigní změny, které by umožňovaly diagnostikovat LS ještě než vznikne maligní tumor, výrazně ztěžuje včasnou diagnostiku. Familiární karcinomové syndromy s premorbidním fenotypem je možné diagnostikovat ještě před vznikem maligního tumoru (například u neurofibromatózy 1. typu), ale LS může být diagnostikován prakticky až při nálezů maligního tumoru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného pacienta. Výjimkou z tohoto pravidla je Muir-Torreho syndrom (MTS), což je fenotypická varianta Lynchova syndromu, která se projevuje vznikem kožních sebaceózních nádorů (Kacerovská et al., 2010).

LS vzniká na základě zárodečné mutace některého z genů, které opravují chyby ve struktuře DNA vzniklé při její replikaci. V důsledku této zárodečné mutace dochází k dysfunkci opravného komplexu a hromadění chyb ve struktuře DNA, což se projevuje

rozvojem nestability mikrosatelitů (MSI) a zvýšením rizika vzniku nádorů, hlavně kolorektálního karcinomu (Fishel et al., 1993; Leach et al., 1993).

V současné době, dle publikovaných studií, odhadem až 5 % kolorektálních karcinomů vzniká ve spojitosti s LS. Tato četnost je poměrně vysoká. Dále je zde absence premorbidního fenotypu, familiární výskyt a prezentace maligních nádorů v produktivním věku. Je proto nasnadě velmi vysoká důležitost včasné diagnostiky z etického, ale i z ekonomického hlediska.

Klinická kritéria, která představují zejména Amsterdamská kritéria a Bethesda guidelines, která byla navržena a určena pro detekci pacientů vhodných na genetické vyšetření možnosti LS, nejsou dostatečně senzitivní. Vyšší senzitivity je možno dosáhnout, pokud se aplikují metody moderní patologie, jejichž diagnostika je založená na přímém nebo nepřímém průkazu MSI.

Do metod nepřímého průkazu MSI patří detekce morfologických znaků asociovaných s MSI při histologickém vyšetření tkáňových vzorků kolorektálních karcinomů, dále pak imunohistochemické vyšetření exprese mismatch repair (MMR) proteinů, které navíc umožňuje určení dysfunkčního proteinu. Aby bylo možné vyloučit sporadické nádory s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (MSI-H, microsatellite instability – high), které jsou způsobené somatickou epigenetickou inaktivací MMR genu *MLH1*, je možné využít vyšetření genu *BRAF* a analýzy metylace promotoru genu *MLH1*.

Pokud vznikne podezření na LS po tomto výše uvedeném komplexu vyšetření, mělo by nakonec dojít k jeho potvrzení pomocí detekce zárodečné mutace některého z MMR genů vyšetřením z periferní krve pacienta a následně pak v případě pozitivního průkazu k vyšetření pacientových rodinných příslušníků, aby byla možnost zajištění účinné prevence (Kokošková et al., 2014; Dušek et al., 2016).

1.4.2 Historie Lynchova syndromu

První písemnou zprávu o Lynchově syndromu podal Prof. Warthin v roce 1913, v níž popsal „karcinomovou rodinu G“ (Warthin, 1913).

Dr. Lynch prováděl podobné pozorování rodinného výskytu kolorektálního karcinomu při absenci polypů, což ho přivedlo ke „karcinomové rodině G“, aktualizoval informace a rozpoznal základní znaky LS, kterými jsou:

1. zvýšený výskyt adenokarcinomů, hlavně tlustého střeva a endometria,
2. zvýšený výskyt vícečetných tumorů,
3. autozomálně dominantní typ dědičnosti,
4. vznik nádorů v relativně mladém věku.

Lynchův syndrom byl zpočátku označován jako „syndrom karcinomové rodiny“, později pak „hereditární nepolypózní kolorektální karcinom“ (HNPCC) (Lynch et al., 1966; Lynch a Krush, 1971).

V současné době je preferován název „Lynchův syndrom“, a to hned z několika důvodů: jednak z důvodu výskytu i jiných malignit, než malignit tlustého střeva, jednak kvůli příliš hluboké asociaci diagnózy HNPCC s Amsterdamskými kritérii, která je s ohledem na poznatky dnešní doby už neudržitelná. Dnes se LS diagnostikuje především na základě molekulárně genetických vyšetření. V případech splňujících Amsterdamská kritéria, ale neprokazatelného genetického poškození definujícího LS (nebo jiný známý molekulárně geneticky definovaný familiární karcinomový syndrom), se doporučuje používat termín „familiární kolorektální karcinom typu X“ (Lindor et al., 2005).

1.5 Molekulární biologie Lynchova syndromu

U většiny případů LS je jeho příčinou germinální mutace některého z genů, které mají zodpovědnost za opravy chyb vzniklých v průběhu replikace DNA, tzv. mismatch repair (MMR) genů (Fishel et al., 1993).

Za fyziologických okolností se MMR proteiny, které jsou kódované těmito geny, spojují do funkčních skupin a vznikají heterodimery MSH2-MSH6 a MLH1-PMS2. První jmenovaný dimer se uplatňuje v rozpoznávání chyb (hlavně špatně spárovaných nebo nespárovaných nukleotidů), také má podíl na zastavení buněčného cyklu a indukci apoptózy v reakci na poškození DNA. Druhý heterodimer je použit k opravě chyb, které první heterodimer najde (Kokošková et al., 2014; Dušek et al., 2016).

Pokud jsou inaktivovány obě alely některého z MMR genů, způsobí to dysfunkci celého komplexu a vznikají tzv. MSI-H tumory, tedy nádory, které mají charakteristicky vysoký stupeň tzv. nestability mikrosatelitů (Peltomaki et al., 1993; Thibodeau et al., 1993).

1.5.1 Mikrosatelity a nestabilita mikrosatelitů (MSI)

V lidském genomu se mikrosatelity vyskytují hojně. Jedná se o úseky DNA, které jsou tvořené několikanásobným opakováním jednoho až čtyř, vzácněji i více nukleotidů. Délky jednotlivých mikrosatelitů jsou za normálních okolností u jednoho jedince stejné, ale mezi jednotlivci může docházet k odlišnostem. Tyto krátké repetitivní sekvence se při replikaci DNA mohou snadno poškodit, protože v oblasti repetitivní DNA polymeráza „sklouzává“ a důsledkem toho je vznik kratších či delších úseků. Pokud je buňka zdravá a má funkční MMR systém, jsou tyto chyby ihned rozpoznány a opraveny. Pokud ovšem nedojde k identifikaci a opravě chyb vznikajících při replikaci, pak je důsledkem možnost kolísání délky mikrosatelitů a tento stav je označován jako nestabilita mikrosatelitů (microsatellite instability, MSI). MSI však není jednoznačnou příčinou vzniku nádorů, jde spíše o semikvantitativní vyjádření genetického poškození DNA výše uvedeným mechanismem.

Dle stanovení stupně MSI se rozlišují tyto stavy (Boland et al., 1998):

- MSS: stabilní mikrosatelity (microsatellite stable),
- MSI-L: nízký stupeň nestability mikrosatelitů (microsatellite instability – low),
- MSI-H: vysoký stupeň nestability mikrosatelitů (microsatellite instability – high).

1.5.2 MSI-H tumory a MMR geny

Pro účel této práce je nejvýznamnější skupina MSI-H karcinomů. Existují dva různé základní způsoby vzniku MSI-H tumorů. Buď se může jednat o sporadické

nádory, které způsobují genetické nebo epigenetické změny v somatické buňce, anebo nádory, které se vyskytují familiárně na podkladě LS jako následek germinální mutace některého z MMR genů. Jedná se o autozomálně dominantní způsob dědičnosti mutované alely. K samotnému vzniku maligního nádoru dojde však až tehdy, když se somaticky inaktivuje i druhá alela tohoto genu, jelikož MMR geny jsou typické tumor supresorové geny (Daum et al., 2014).

Při LS bývají nejčastěji postiženy geny *MLH1* a *MSH2* (dohromady až 80 %), další v řadě je gen *MSH6* (10 %). Germinální mutace ostatních MMR genů (*PMS2*, *PMS1*, *MSH3* a *MLH3*) se vyskytují vzácněji. Většinou se jedná o méně rozsáhlé mutace jako delece, inserce nebo substituce (Daum et al., 2014, Dušek et al., 2016).

Ve vzácných případech je dysfunkce MMR proteinů při LS podmíněna jinými mechanismy, jejichž neznalost může způsobit chyby při diagnostice LS. V případě genu *MLH1* byla popsána zárodečná hypermetylace promotoru genu *MLH1* vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci (Hitchins et al., 2007). Další alternativou je zárodečná delece 3' konce genu *EPCAM* (*TACSTD1*), která způsobí epigenetickou inaktivaci genu *MSH2* (Ligtenberg et al., 2009).

1.6 Klinické projevy Lynchova syndromu

Klasicky se LS prezentuje hlavně kolorektálním karcinodem tlustého střeva bez polypózy (odtud předchozí název hereditární nepolypózní kolorektální karcinom). Klinické projevy LS však mohou být velmi variabilní. Mohou se lišit podle postiženého genu nebo i typu mutace. Například pokud je pacient nosičem zárodečné mutace genu *MLH1*, často bývá jedinou diagnostikovanou malignitou kolorektální karcinom a zároveň má tento pacient riziko vzniku tohoto nádoru v nízkém věku nižší. Pokud pacienti nesou zárodečnou mutaci v genu *MSH2*, vyskytují se u nich častěji i extrakolonické nádory (Kastrinos et al., 2008).

Pokud se jedná o mutaci genu *MSH6*, jsou často prezentace LS poněkud atypické, protože mají nízkou penetranci, dále se 6x častěji pojí (u žen) s nádory endometria než s nádory tlustého střeva, a pokud tito pacienti kolorektální karcinom mají, je častěji

levostranný (v porovnání s LS způsobeným mutacemi jiných MMR genů). Mutace *MSH6* navíc nemusí vždy nutně způsobit nestabilitu mikrosatelitů, tedy vznik tumoru, který je MSI-H, díky tvorbě alternativního heterodimeru MSH2-MSH3, což může negativně ovlivnit diagnostiku LS v těchto případech (Hampel et al., 2006).

U mutace genu *PMS2* je tomu naopak, většinou totiž vedou ke vzniku MSI-H tumorů a je zde asociace s časným kolorektálním i endometriálním karcinomem. Penetrace v tomto případě také není příliš vysoká (Hendriks et al., 2006).

Existují případy, ve kterých se vyskytují kombinace klinických znaků a jsou tak výrazné, že na jejich podkladě došlo ke vzniku nových klinických syndromů. Tyto syndromy představují pouze varianty Lynchova syndromu. Jedná se o Muir-Torreho syndrom, Turcotův syndrom 1. typu a Syndrom bíalelického mismatch repair deficitu.

1.6.1 Muir-Torreho syndrom (MTS)

Má v sobě zahrnutou kombinaci alespoň jednoho kožního nádoru se sebaceózní diferenciací (například sebaceózní adenom, sebaceom a extraokulární sebaceózní karcinom) a alespoň jednoho viscerálního tumoru. Tyto mnohočetné kožní nádory se vyskytují u pacientů před 50. rokem života nebo se vyskytují v tělních partiích mimo obličej a jsou silným indikátorem onemocnění. Právě Dr. Henry Lynch upozornil v roce 1981 na spojitost MTS a LS poté, co se mu podařila identifikace pacientů s fenotypem MTS v rodině postižené LS. Tato varianta LS je unikátní v tom, že jako jediná vykazuje znaky premorbidního fenotypu a umožňuje tak diagnostikovat LS ještě před tím, než se rozvine kolorektální karcinom. MTS vzniká především na podkladě zárodečné mutace v genech *MLH1* a *MSH2*, ale *MSH2* převažuje (Kacerovská et al., 2010).

1.6.2 Turcotův syndrom 1. typu

Charakteristicky se společně vyskytují nádory mozku (většinou gliomy) a kolorektální karcinom. Při tomto onemocnění byly detekovány mutace MMR genů, hlavně *MLH1* a *PMS2* (De Rosa et al., 2000).

1.6.3 Syndrom bialelického mismatch repair deficitu („constitutional mismatch repair deficiency“, CMMRD)

Vyskytuje se velmi vzácně a jedná se o zárodečnou bialelickou mutaci MMR genů. Vzhledem k tomu, že se toto onemocnění dědí autozomálně recesivně, k jeho výskytu dojde zejména následkem incestu. Fenotyp tohoto onemocnění připomíná neurofibromatózu 1. typu, již ve velmi mladém věku však vzniká kolorektální karcinom (průměrně diagnostikováno kolem 16 let věku pacientů), dále se vyskytují hematologické malignity (hlavně T-lymfomy) a také mozkové nádory (především glioblastomy) (Gallinger et al., 2004; Bandipalliam, 2005).

Diagnosticky důležitý fakt je, že senzitivnější je imunohistochemické vyšetření (stanovení deficitu MMR proteinu) než vyšetření MSI, které může být negativní. Navíc imunohistochemické vyšetření lze provést i z nenádorové tkáně, může posloužit například kožní biopsie (Bakry et al., 2014).

1.7 Klinická diagnostika Lynchova syndromu

Dříve byl kolorektální karcinom diagnostikován pomocí Amsterdamských kritérií, která byla formulována v roce 1990 a revidována v roce 1998 na Amsterdamská kritéria II pro zvýšení senzitivity a také s přihlédnutím k možnosti prezentace LS extrakolonickou malignitou (Daum et al., 2014).

1.7.1 Amsterdamská kritéria II

Amsterdamská kritéria II (Vasen et al., 1991):

1. Nejméně tři rodinní příslušníci mají nádor, jenž se vyskytuje v rámci Lynchova syndromu (kolorektální karcinom, endometriální karcinom, karcinomy tenkého střeva a horních močových cest).
2. Nejméně jeden pacient je v příbuzenském vztahu se dvěma ostatními.
3. Postižení příslušníků rodiny se prokázalo nejméně ve dvou generacích po sobě následujících.
4. Karcinom byl diagnostikován nejméně u jednoho člena v rodině, a to ve věku nižším, než je padesát let.
5. Byl spolehlivě vyloučen syndrom familiární adenomatózní polypózy.
6. Klinická diagnóza tumoru byla potvrzena histologickým vyšetřením patologem.

Postupně se však dostávaly do popředí molekulárně genetické metody pro diagnózu LS, tudíž se stal prioritou hlavně záchyt velkého množství pacientů pro toto vyšetření, který byl upřednostněn před samotnou klinickou diagnózou LS (Kokošková et al., 2014).

V roce 1996 byla vypracována tzv. Bethesda guidelines, v roce 2000 byla revidována. Slouží k rozpoznání pacientů s CRC, u kterých má být vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (MSI), případně ještě provedeno molekulárně genetické vyšetření. Revidovaná Bethesda guidelines berou v potaz morfologické znaky tumoru, ale i klinická kritéria. Těmito rozšířenými kritérii se nedají zachytit všechny případy LS,

hlavně se jedná o postižení genů *MSH6* a *PMS2* (Dovrat et al., 2005; Hegde et al., 2005; Hendriks et al., 2006).

1.7.2 Bethesda guidelines

Revidovaná Bethesda guidelines (RBG) (Umar et al., 2004):

1. CRC u pacienta mladšího než 50 let.
2. Synchronní nebo metachronní CRC, případně jiný nádor asociovaný s Lynchovým syndromem, přičemž se nezohledňuje věk.
3. CRC s histologickými znaky MSI u pacienta mladšího 60 let.
4. Nejméně jednomu přímému příbuznému byl ve věku pod 50 let diagnostikován CRC nebo jiný nádor, který bývá součástí LS.
5. CRC nebo jiný nádor asociovaný s Lynchovým syndromem nejméně u dvou příbuzných prvního nebo druhého stupně, přičemž se nezohledňuje věk.

Bohužel ani senzitivita Revidovaných Bethesda guidelines není brána za dostatečnou, dle současných odhadů 25 % pacientů s LS systém těchto kritérií nezachytí. Amsterdamská kritéria i RBG mají velkou slabinu, a to, že je zde kladen velký důraz na rodinnou anamnézu, v níž jsou tradičně značné nedostatky, které způsobuje nedostatečná informovanost pacienta, dále nezáměr vyšetřujícího lékaře, nejistota biologické otcovství, případně se může jednat o nízkou penetraci zárodečné mutace (hlavně u genu *MSH6*) (Dušek et al., 2016).

1.8 Moderní patologická diagnostika Lynchova syndromu

V současné době je snaha o zavedení morfologických vyšetření a depistáže s vyšší senzitivitou i za cenu toho, že se sníží specifita vyšetření. Vzhledem k familiárnímu výskytu těchto maligních nádorů je to ospravedlnitelné z hlediska etiky i ekonomičnosti zdravotnictví.

Existuje několik hlavních argumentů pro zvýšení senzitivity systému záchytu tohoto onemocnění:

1. V případě, že u Lynchova syndromu kvůli falešné negativitě nedojde k jeho rozpoznání, tak to má za následek, že nedojde k identifikaci onemocnění nejen u vyšetřovaného pacienta, ale i jeho příbuzenstva.
2. Nositelem zárodečné mutace jednoho z MMR genů je asi 1 z 660 lidí.
3. U Lynchova syndromu je signifikantně zvýšené riziko vzniku kolorektálního karcinomu, a to 60–80% (Jenkins et al., 2006).
4. Progrese nádoru z adenomu (nezhoubný nádor) na karcinom (zhoubný nádor) je velmi rychlá, obvykle k ní dochází během 2–3 let. U sporadických případů je tato doba mnohem delší, 8–10 let.
5. Velmi důležitý je fakt, že průměrný věk v době diagnózy LS je 45 let na rozdíl od sporadického kolorektálního karcinomu, u kterého je průměrný věk v době diagnózy 65 let (Lynch a de la Chapelle, 1999).

Současná moderní diagnostika LS nabízí tři možnosti senzitivních modelů, které slouží k vyhledávání pacientů s podezřením na LS. Společným znakem pro tyto modely je fakt, že detekují tumory s MSI-H (molekulárně genetické vyšetření MSI), dále pak konvenční histologie, při níž se prokazují morfologické znaky charakteristické pro kolorektální karcinom s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (MSI-H) a v neposlední řadě imunohistochemický průkaz exprese MMR proteinů.

Analýza jednotlivých MMR genů je velmi nákladná, proto je třeba předem odlišit sporadické nádory. V dnešní době se k tomuto rozlišení používá dvou metod molekulární biologie.

Jedná se o analýzu genu *BRAF*, konkrétně je zde prokazována mutace V600E, která téměř nikdy není přítomna u LS, ale skoro u poloviny sporadických MSI-H karcinomů přítomna bývá. Tento mutovaný protein lze navíc prokázat i pomocí monoklonální protilátky (Kuan et al., 2014).

Další metoda je založena na průkazu hypermetylace promotoru genu *MLH1*, jedná se o marker sporadických MSI-H kolorektálních karcinomů, ale naopak u LS nebývá přítomna téměř vůbec (Domingo et al., 2004).

Je třeba zde také zmínit, že nověji se dá použít k odlišení LS od sporadických MSI-H karcinomů také protilátka proti annexinu A10 (Pai et al., 2014).

Jednotlivé možnosti detekce LS a odlišení LS od MSI-H kolorektálních karcinomů budou detailněji popsány v praktické části této práce.

2 CÍL PRÁCE A HYPOTÉZY

V této práci představím a porovnáám jednotlivé metody, které jsou na našem pracovišti využívány ke zvýšení senzitivity detekce Lynchova syndromu. Tím pádem umožňují prevenci vzniku, případně progresu maligních nádorů vznikajících v terénu tohoto familiárního nádorového syndromu. V této diagnostice uplatňujeme kombinaci těchto metod:

- Konvenční histologické vyšetření preparátů obarvených hematoxylinem a eosinem
- Imunohistochemické vyšetření exprese „mismatch repair“ (MMR) proteinů
- Imunohistochemický průkaz mutované formy proteinu BRAF V600E
- Molekulárně genetické stanovení substituce V600E genu *BRAF*
- Stanovení nestability mikrosatelitů (MSI)
- Stanovení hypermetylace promotoru genu *MLH1*
- Molekulárně genetické vyšetření samotných MMR genů.

Zatímco molekulárně genetické vyšetření MMR genů slouží již přímo k diagnostice Lynchova syndromu, výběr pacientů pro toto vyšetření je založen na vyhledávání MSI-H tumorů na podkladě konvenčního histologického vyšetření anebo imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů (na některých pracovištích alternativně molekulárně genetickým vyšetřením MSI). Stanovení hypermetylace promotoru genu *MLH1* a vyšetření sekvence genu *BRAF* (případně přítomnosti proteinu BRAF kódovaného mutovaným genem) se pak uplatňuje v odlišení Lynchova syndromu od sporadických karcinomů před samotnou molekulárně genetickou analýzou MMR genů.

Bezprostředním cílem této práce bude porovnání senzitivity a specifity samotného morfologického vyšetření s vyšetřením imunohistochemickým. Výsledky obou metod provedené na vzorcích cca. 50 pacientů budou porovnány s výsledky stanovení MSI molekulárně genetickými metodami.

Hypotéza 1: Konvenční histologické vyšetření je v diagnostice MSI-H karcinomů méně senzitivní než vyšetření imunohistochemické.

Hypotéza 2: Konvenční histologické vyšetření, imunohistochemický průkaz exprese MMR proteinů a molekulárně genetické vyšetření MSI se navzájem doplňují.

3 METODIKA VÝZKUMU

Tento výzkum je založen na porovnání výsledků vyšetřování vzorků kolorektálního karcinomu konvenční histologickou metodou založenou na barvení řezů tkáně zalité do parafinových bločků hematoxylinem a eosinem s imunohistochemickým vyšetřením exprese MMR proteinů v řezech z týchž bločků. Mimo tento hlavní cíl studie jsem jako vedlejší znak studovaných nádorů zařadila i výsledky molekulárně genetických vyšetření, které jsou u těchto případů vyšetřovány v dalším sledu. Z takto rutinně vyšetřovaných vzorků byly pro statistické zhodnocení pro účely této studie náhodně vybrány vzorky do dvou skupin na základě imunohistochemické exprese MMR proteinů: MMR pozitivní (25 případů) a MMR deficientní (25 případů). V souladu s časovým sledem provádění jednotlivých úkonů postupně uvedu metodiku zhotovení (a hodnocení) histologických preparátů, imunohistochemického vyšetření, molekulárně genetického vyšetření a výběru případů do studie.

3.1 Konvenční histologické vyšetření preparátů obarvených hematoxylinem a eosinem

V této kapitole a jejích subkapitolách bych chtěla popsat principy tohoto vyšetření, jeho výhody a přesný postup zpracování tkání pro toto vyšetření, počínaje přikrojením bioptického materiálu, přes zhotovení preparátu obarveného hematoxylinem a eosinem, až po odevzdání histologického preparátu hodnotícímu lékaři, který stanoví diagnózu pacienta.

3.1.1 Model morfologické diagnostiky a jeho výhody

Histologické vyšetření je ekonomicky nejméně náročná forma záchytu Lynchova syndromu. Je dostupné pro všechna pracoviště, která vyšetřují tkáňové vzorky karcinomů tlustého střeva a nejsou pro ně dostupné finančně nákladné metody imunohistochemické a molekulárně biologické. Je založeno na detekci morfologických znaků, které jsou typické pro kolorektální karcinom s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů. Jedná se o takzvanou „MSI-H histologii“. Tyto znaky nejsou charakteristické jen pro Lynchův syndrom, stejné znaky mohou vykazovat také sporadické MSI-H karcinomy, ale odhadem 1 z 5 MSI-H kolorektálních karcinomů se vyskytuje v rámci Lynchova syndromu.

V současné době se jako nejužitečnější model používá Model PREDICT a jeho zjednodušená forma Semi PREDICT skóre. Tento model je založen na následujících diagnostických znacích: přítomnost hlenu, který disekuje slizniční stroma v různém množství, přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL), peritumorální lymfoidní lem a výskyt plazmatických buněk mezi buňkami v zánětlivém infiltrátu ve stromatu, jejichž množství převyšuje 25 % (Hyde et al., 2010).

Pro tuto diagnostiku je potřeba zhotovení histologického preparátu, které bude detailně popsáno v následujících kapitolách.

3.1.2 Přikrojení bioptického vzorku

Nejprve je třeba makroskopického vyšetření a popis vzorku, které musí být vždy provedeno lékařem. Podle typu tkáně je přikrojení vždy individuální. Jako příklad jsem si vybrala způsob přikrojení karcinomu tlustého střeva, neboť se bezprostředně týká této práce. Zvolila jsem pracovní postup používaný mým pracovištěm, který bych zde ráda zjednodušeně popsala.

Při přikrojení resekátu tlustého střeva, které bylo odebráno pro nádorový proces, je třeba uvést, zda je resekát rozstřížený nebo nerozstřížený, jakou má délku, je nutné vyšetřit jeho okraje a doplnit popis, jaký je jejich vztah k nádoru. Dále je třeba popis samotného nádoru, jeho rozměry, makroskopický vzhled a struktura a jeho vzdálenost

od okrajů, hloubka infiltrace, případně invaze do okolních orgánů. Ze samotného nádoru se odebírá 1 blok na 1 cm největšího rozměru, nejméně však 3 bloky. Pak je nutno nabrat sliznici v okolí nádoru, její případné změny popsat, a také oba okraje resekátu. Nakonec se vyšetřují lymfatické uzliny (počet, velikost atd.). Vše je třeba podrobně popsat a zaznamenat na diktafon. Diktát je posléze přepsán sekretářkou a připojen k žádance pacienta. Přikrojený materiál je pak vložen do bio kazet a připraven k řádné fixaci a dalším postupům zpracování (POSTUP, 2016a).

3.1.3 Fixace

Základní úlohou správné fixace je rychlá a šetrná denaturace bílkovin v cytoplazmě buněk a z ní vyplývající zástava autolýzy (samovolný rozklad tkáně vlastními enzymy). Důležitá je rychlost fixace, je třeba ji provést v co nejkratším čase po odběru bioptického materiálu. Šetrnosti fixace je zase potřeba z důvodu zachování struktury tkáně, aby nebyla změněna a měla podobu jakou má tkáň za živa, a také, aby nebyla porušena barvitelnost, antigenicita bílkovin pro imunohistochemické vyšetření a intaktnost nukleových kyselin pro vyšetření molekulárně genetické. Další zásadní vlastností správné fixační tekutiny je rychlý a rovnoměrný průnik do tkáně (Vacek, 1995b).

Fixační prostředky jsou dvojího druhu, a to fyzikální a chemické. Fyzikální fixační prostředky nejsou příliš rozšířené a používají se minimálně, zejména ve formě zmrazení vzorku při peroperačním vyšetření. Chemické fixační prostředky (fixační tekutiny) se používají nejvíce, fixace je díky nim jednoduchá a jejich příprava snadná. Jsou to roztoky vyrobené z organických i anorganických sloučenin.

V histologických laboratořích je nejvíce používanou fixační tekutinou formol neboli formalín. Vyrábí se z formaldehydu, což je aldehyd kyseliny mravenčí. Do laboratoře se dodává buď koncentrovaný, 40%, který je pak ředěn vodou na 10% formol. Druhá možnost je, že laboratoř objedná z lékárny formol již naředěný, který je upraven pufrý, tudíž se stabilním pH, a je připraven přímo k použití. S formolem je třeba zacházet velmi opatrně, jedná se o bezbarvou kapalinu, která má štiplavý zápach a výrazně dráždí sliznice. Při potřísnění kůže může způsobit tvrdnutí pokožky i ekzém,

proto jsou při práci nezbytné ochranné gumové rukavice. Formol je vhodný zejména pro fixaci přehledných histologických preparátů, nehodí se však pro vyšetření cytologická (Vacek, 1995b).

3.1.4 Proces odvodnění a prosycení tkáně parafinem ve tkáňovém procesoru

Princip odvodnění tkáně spočívá v postupném přenosu tkáňových bločků stoupající řadou alkoholů (etanolů) z nižší do vyšší koncentrace alkoholu. Pokud by se tak neučinilo a vzorek by se vložil rovnou do koncentrovaného alkoholu, došlo by ke smrštění tkáně. První lázeň alkoholu je o koncentraci 0,7 objemového zlomku (70 %), druhá lázeň má koncentraci 80 % a třetí 96 %, tuto je třeba minimálně dvakrát až třikrát opakovat.

Dalším krokem je tzv. projasnění, tedy prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín, tímto procesem dojde k odstranění alkoholu z tkáně. Je tedy třeba použít látky, které dobře rozpouští parafín, jimiž v naší laboratoři jsou jedna lázeň acetonu a dvě lázně xylenu. Pokud se odvodnění a projasnění neprovede správně a ve tkáni zůstane alkohol či voda, velmi to pak komplikuje další zpracování, například krájení a barvení preparátu.

Na konec procesu se tkáň prosycuje tekutým parafinem, který má teplotu 56–58 °C a je rozdělen do tří lázní.

Všechny úkony podílející se na odvodnění, projasnění a prosycení tkáně parafinem probíhají během noci v přístrojích, které se nazývají autotechnikony nebo také tkáňové procesory, které pracují při zvýšené teplotě za použití vakua. Na našem pracovišti používáme tkáňový procesor Leica TP 1020, který obsahuje dvě lázně pufrovaného formolu, jednu lázeň 70% alkoholu, jednu lázeň 80% alkoholu, dvě lázně 96% alkoholu, jednu lázeň acetonu, dvě lázně xylenu a tři parafínové lázně. Tkáňové bločky jsou přenášeny z jednotlivých lázní v pravidelném časovém úseku jedné hodiny (Vacek, 1995b).

3.1.5 Vlastní zalévání tkání do parafínu

Při vlastním zalévání tkáně používáme čistý rozpuštěný parafín. Nikdy nemůžeme používat ten parafín, který sloužil k prosycení tkáně. Na tuto činnost používáme na našem pracovišti parafínovou zalévací linku, která má svou nádrž, do které předem parafín nasypeme. Nádrž je vyhřívána a parafín se v ní rozpustí. Rozpuštění parafínu určuje časový spínač na parafínové lince, který je naprogramovaný tak, aby se spustil vždy dvě hodiny před začátkem zalévacího procesu.

Bio kazety s tkáněmi nejprve vyjmeme z tkáňového procesoru a vyložíme je na vyhřívanou desku. Kdyby tak nebylo učiněno, tkáň by začala okamžitě tuhnout, protože už je prosycená parafínem. Dále použijeme kovovou zalévací formičku (zvolíme vhodnou velikost), do které z parafínové linky napustíme parafín, vložíme do něj tkáň, kterou správně zorientujeme a nakonec přikryjeme bio kazetou a dopustíme parafín. Dáme vychladit na chladicí desku a po chvíli můžeme vyndat z formičky hotový zalitý tkáňový bloček, který se umístí ještě do mrazničky k dochlazení a pak je připraven ke krájení (Vacek, 1995b; POSTUP, 2014a).

3.1.6 Krájení parafínových řezů

Na našem pracovišti se ke krájení parafínových řezů používají sáňkové mikrotomy, které jsou složeny z pevného podstavce, který má v sobě kluzné plochy, kde projíždějí těžké saně, ve kterých je umístěn držák na mikrotomovou žiletku. Tento držák se dá polohovat dle potřeby a můžeme tím různě měnit sklon žiletky. Každý mikrotom je opatřen mikrometrickým šroubem, který má číselnou stupnici v tisícinách milimetru (mikrometry) a slouží k nastavení tloušťky krájených řezů. Na vršku mikrotomu se nachází neapolská svorka, do které se parafínový bloček pevně upne. Principem sáňkového mikrotomu je, že bloček pevně drží a pohybuje se držák se žiletkou.

Nejprve je třeba bloček skrojit nahrubo a docílit toho, aby byla celá tkáň v řezu. Pak krájíme řezy v rozmezí 1–5 mikrometrů, tloušťku řezů uzpůsobujeme typu tkáně a také barvicí metodice. Například pro imunohistochemické barvení, uzliny a krvavé tkáně potřebujeme řezy co nejtenčí (1 mikrometr), na ostatní tkáně a běžné barvicí metody se užívají řezy o síle 2–4 mikrometry a u tukových tkání, které se krájí

problematicky, je používána hodnota až 5 mikrometrů. Řezy je možné krájet po jednom nebo tvořit série, kdy se ukrojí páska, například šesti řezů napojených na sebe. Sériových řezů se využívá v případě malých tkání, kdy je třeba dostat na sklíčko větší počet řezů (Vacek, 1995b; POSTUP, 2014b).

Kromě sáňkového mikrotomu se v naší laboratoři používají další dva typy mikrotomů, rotační a zmrazovací.

Rotační mikrotom je vhodný pro krájení sériových řezů a v naší laboratoři bývá nejčastěji využit pro zpracování makrobloků. Mikrotomová žiletka je zde umístěna v pevné svorce a proti ní dochází k pohybu svorky s parafínovým blokem, což je hlavní rozdíl oproti sáňkovému mikrotomu, u kterého se tento proces děje obráceně.

Zmrazovací mikrotom (kryomikrotom), slouží ke zpracování nativní tkáně bezprostředně po odběru, která se v přístroji namrazí na teplotu až $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tím je materiál fixován. Zpracování preparátů je díky tomu velmi rychlé a používá se u peroperačních biopsií. Celé toto zpracování trvá jen několik desítek minut. Principiálně se jedná o rotační mikrotom, který je uzavřen v kryostatickém mrazicím boxu (Vacek, 1995b; Balko et al., 2016).

3.1.7 Napínání a natahování parafínových řezů

Prvním úkolem laboranta před vlastním natahováním řezů je připravit si podložní sklíčko, na které se pak ukrojený řez natáhne. Je třeba označit ho číslem pacienta a při natahování vždy sledovat shodu označení parafínového bločku a skla. Dále je nutné na sklo uvést typ metody, kterou bude následně obarveno. V případě, že se jedná o problematický tkáňový materiál, například tukovou tkáň, je nutné potřít sklíčko chemikálií, která zajistí větší přilnavost řezu (poly-L-lysin), anebo zvolit sklíčko, které je už přímo od výrobce opatřeno adhezivní vrstvou.

Proces vlastního natahování se provádí ve vodní lázni. V naší laboratoři používáme dvě vodní lázně. První lázeň obsahuje studenou destilovanou vodu, na jejíž hladinu se přenesou ukrojené řezy. Za použití dvou pátradel provedeme úpravu řezů, opravíme nerovnosti, vybereme nejkvalitnější řezy, které přeneseme pomocí podložního skla do druhé lázně s teplou destilovanou vodou, která je vyhřátá na $42\text{--}45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zde dojde k vypnutí řezů účinkem teplé vody. Řezy nabere na sklíčko a po usušení v termostatu

při 56 °C jsou preparáty připraveny k odparafinování, zavodnění a barvení (POSTUP, 2014b).

3.1.8 Odparafinování a zavodňování řezů

Prvním krokem je zbavení tkáně parafínu, protože k barvení preparátů používáme většinou vodných roztoků barviv, a kdyby ve tkáni parafín zůstal, barvení řezů by neproběhlo.

Aby se řezy řádně odparafinovaly, potřebujeme dvě lázně xylenu (látka rozpouštějící parafín). Xylen je rovněž látka, která se ve vodě nerozpouští, z tohoto důvodu musíme preparáty převést přes sestupnou řadu alkoholů, ve které probíhá zpětné zavodnění. Tento postup se dá provést buď ručně, anebo v barvicím automatu, který se používá v naší laboratoři, přičemž tento proces trvá zhruba 15–30 minut. Do barvicího automatu se preparáty vloží ve speciálním košíčku a podle zvoleného programu samy procházejí určitými lázněmi s tekutinami a samy se odparafinují a zavodní, případně obarví, což popíšete podrobně v další kapitole (Vacek, 1995b; POSTUP, 2014c).

3.1.9 Barvení Hematoxylin – Eosin

V neobarveném preparátu není možno pod světelným mikroskopem rozpoznat jednotlivé složky tkáně, protože nemají odlišnou lomivost světla. Proto je třeba řezy před mikroskopováním obarvit vhodným barvením, které je založené na principu, že různé složky tkáně vážou různá barviva a tím pak dojde k jejich odlišení.

V histologii používáme barviva kyselá a zásaditá. Barviva kyselá slouží k barvení cytoplazmy buněk, barviva zásaditá barví jádra buněk. Tato různá barvitelnost vzniká na podkladě odlišných chemických vlastností jádra a cytoplazmy. Nejpoužívanější kyselá barviva jsou eosin a nejpoužívanější zásadité barvivo je hematoxylin. Dále se dají barviva rozdělit na přirozená, což bývají extrakty z rostlin a živočichů, anebo barviva umělá (syntetická), připravená chemicky (Vacek, 1995b).

Barvení Hematoxylin – Eosin je základní barvení, které musí proběhnout při histologickém vyšetření každého pacienta v naší laboratoři, jedná se tedy o přehledné

barvení pro parafínové řezy. Podle výsledků tohoto barvení se pak určuje další postup a případné další barvení speciálními nebo imunohistochemickými metodami.

Pro přípravu dvou litrů roztoku Gillova hematoxylinu je třeba 8 g hematoxylinu, 0,8 g jodičnanu sodného, 70,4 g síranu hlinitého, 1420 ml destilované vody, 500 ml etylenglykolu a 80 ml ledové kyseliny octové. Všechny tyto chemikálie jsou postupně smíchány podle laboratorního postupu. V poslední době naše laboratoř přešla na používání již hotového hematoxylinu dodávaného na naše pracoviště od farmaceutických firem.

Roztok eosinu se vyrábí z 10 g žlutavého eosinu rozpustného ve vodě, 5 g dvojchromanu draselného a 800 ml destilované vody. Po rozpuštění se přidá 100 ml čistého alkoholu. Roztok eosinu naše laboratoř připravuje sama.

K barvení preparátů se použije už výše zmíněný barvicí automat, na kterém se zvolí patřičný program, a automat pak celý proces provede sám. Odparafínované a zavodněné řezy se ponoří na 7 minut do roztoku Gillova hematoxylinu, pak se diferencují v diferenciačním roztoku (4800 ml 70% alkoholu a 37,5 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové). Pak se preparáty perou v tekoucí vodě, kde dochází ke zmodrání jader buněk. Dále následuje lázeň eosinu na 30 sekund a oplach v destilované vodě. Tím je barvicí proces ukončen.

Ve výsledku barvení se do modra až fialova barví bazofilní struktury (jádro, jádérko, ribozomy). Acidofilní složky jsou obarveny eosinem, do růžova až růžovo-oranžova (cytoplazma, kolagenní vlákna, hemoglobin, svalovina) (Vacek, 1995b; Balko et al., 2016; POSTUP, 2016b).

Preparáty se v barvicím automatu odvodní vzestupnou řadou alkoholů a acetonem. Projasní se xylenem a dalšími dvěma lázněmi s aceton-xylenem a xylen-acetonem a jsou tak připraveny k montování.

3.1.10 Montování preparátů

Montování se v naší laboratoři provádí do látky zvané Pertex, která má vysoký index lomu světla a je rozpustná v xylenu. Můžeme použít ruční montování, kdy na řez kápneme Pertex a zvolna přikryjeme krycím sklíčkem. Další možností je použití montovacího automatu, který celé montování zajistí sám. Tím je preparát jako celek

hotov a je připraven k prohlížení pod mikroskopem. Skládá se z podložního skla, nabarveného řezu, montovacího média a krycího skla (POSTUP, 2014d; Balko et al., 2016).

3.1.11 Mikroskopování

V této kapitole podám stručné informace o světelném mikroskopu, neboť se jedná o přístroj nezbytný pro vnímání stavby lidského těla. Je používán v celé řadě medicínských oborů, nejen v histologii a histopatologii, ale velký přínos znamená i pro biologii, mikrobiologii, embryologii apod. Díky němu máme možnost pochopit původ řady onemocnění a změny, které v chorobných stavech probíhají. Světelný mikroskop má tři části, mechanickou, osvětlovací a optickou.

Mechanická část se skládá z podstavce mikroskopu, ze stativu, na němž se dá posunout rameno, a stolek. Umožňuje hrubý posuv, který zajišťuje makroskopické zaostření, a jemný posuv, který zaostří obraz mikroskopicky. Také je možné nastavení výšky kondenzoru. Další částí je stolek s držákem opatřený ovládacími šrouby, do kterého se upínají preparáty. K rychlému otáčení vhodných objektivů slouží revolverový nosič a na horní části mikroskopu je okulárový tubus.

Základem osvětlovací části je zdroj světla a jeho ovládání. Světlo je na pozorovaný preparát soustředěno kondenzorem s čočkami, které mají krátkou ohniskovou vzdálenost. Kondenzor má clonu ovladatelnou šroubem (Balko et al., 2016).

Optickými částmi mikroskopu jsou objektiv a okulár. Objektivy mají numericky značené zvětšení. Mohou být buď suché, anebo imerzní, které se používají pro nejsilnější zvětšení (1000x a více). Okulár tvoří většinou dvě čočky, které jsou zasazené do kovové objímky. Okulár se dá použít volitelně, dá se jím korigovat i dioptrická vada uživatele mikroskopu.

Nejčastěji používanou metodou pro pozorování obarvených preparátů je pozorování ve světelném poli, kdy světlo z viditelné oblasti (vlnová délka 400–760 nanometrů) prochází preparátem rovnoběžně s osou mikroskopu (Vacek, 1995b; Balko et al., 2016).

Pro účely této práce byly kromě běžných rutinně hodnocených znaků nádorů hodnoceny i takzvané histologické znaky MSI podle modelu PREDICT a každému

tumoru bylo na základě tohoto vyšetření přiřazeno Semi PREDICT skóre podle Tabulky 2. Jsou-li přítomny alespoň 2 znaky, je tumor hodnocen jako suspektní z MSI.

Tabulka 2: Přehled takzvaných MSI-H znaků.

Znak	Charakteristika
Lokalizace tumoru	Proximálně od slezinného ohbí tračnicku
Hlen	Jakékoli množství hlenu disekujícího stroma
Věk	Nižší než 50 let
Lymfocyty infiltrující nádor	Více než 2 lymfocyty na zorné pole velkého zvětšení
Lem lymfocytů podél nádoru	Souvislý pruh lymfocytů při invazivním okraji nádoru
Plasmatické buňky ve stromatu nádoru	Tvoří více než 25 % všech leukocytů ve stromatu

(Hyde et al., 2010)

3.2 Imunohistochemické vyšetření

V této kapitole nejprve budou popsány obecné postupy imunohistochemického vyšetření, od vysvětlení principu vazby protilátky na antigen, přes možnosti přípravy diagnostických protilátek, až po detailní popis imunohistochemické metodiky používané v naší laboratoři. Konkrétně pak bude specifikována metodika imunohistochemického průkazu MMR proteinů, díky kterému se dá získat zprostředkovaná informace o tom, jak funguje MMR komplex, a metodika průkazu přítomnosti mutované formy proteinu BRAF V600E, který se užívá k odlišení Lynchova syndromu od sporadických MSI-H karcinomů.

3.2.1 Princip imunohistochemického vyšetření

Za zakladatele imunohistochemie je považován americký patolog Albert Hewett Coons, který v roce 1941 položil základ pro tuto metodiku. V dnešní době už je imunohistochemie v histopatologické diagnostice rutinním procesem, je využívána zejména při průkazu nádorových onemocnění (Balko et al., 2016).

Jedná se o molekulárně biologickou metodu, která je založená na lokalizaci určitých antigenů v histologických řezech, tedy ve tkáních a buňkách. Využívá afinitu

primární protilátky, která je svou podstatou imunoglobulin, a prokazovaného antigenu, který má bílkovinnou povahu. Jedná se tedy o hybridizaci struktur antigenu a protilátky, které jsou komplementární. Metoda se dá provádět i ze zmrazených řezů, ale v naší laboratoři tento systém nepoužíváme. Používáme parafinové řezy z tkáně fixované nejčastěji pufrovaným formolem. Vazba protilátky a antigenu je vysoce specifická a produktem je komplex antigen-protilátka (STANDARD, 2016).

3.2.2 Antigeny

Antigen je látka, která je schopná vyvolat specifickou imunitní odpověď. Imunitní systém umí antigeny rozpoznat a reagovat na ně. Mohou pocházet buď ze samotného organismu (autoantigeny), anebo jsou to cizorodé látky z vnějšího prostředí (exoantigeny). Na cizorodé antigeny reaguje organismus tvorbou specifických protilátek, které se umí na antigen navázat a zneškodnit jej. Komplex antigenu a protilátky je označován jako imunokomplex a jeho vznik je považován jako základ imunohistochemie. Antigeny mohou mít různou biologickou povahu (polypeptid, polysacharid, protein, glykoprotein, lipid, lipoprotein).

Antigeny se skládají z makromolekul, které mají velké množství epitopů, které jsou místy pro navázání protilátky. Epitopy tvoří aminokyseliny a monosacharidy. V imunohistochemii je pro nás velmi důležitá specifická vazba protilátky s antigenem, kterou je třeba zajistit, aby antigen bylo možné dalšími postupy zviditelnit (Hořejší a Bartůňková, 2009; Balko et al., 2016).

3.2.3 Protilátky a hybridom

Protilátky jsou tvořené aktivovanými formami B-lymfocytů, tzv. plazmatickými buňkami a mají schopnost se specificky vázat na antigen a na popud určitého antigenu také dochází k jejich tvorbě. Jedná se o glykoproteiny ze skupiny imunoglobulinů. Vícetupňová imunohistochemie považuje určitou část molekuly primární protilátky za antigen, na který se pak naváže sekundární protilátka. Protilátky mohou být buď monoklonální, anebo polyklonální.

Polyklonální protilátky jsou tvořené z většího množství klonů aktivovaných plazmatických buněk, které se získávají z krevního séra zvířat imunizovaných antigenem. Díky imunitnímu systému zvířete je tvořena směs protilátek reagující proti různým epitopům antigenu, a to i těm slaběji reagujícím. Výsledná reakce je pak silná. Reakce s polyklonálními protilátkami je méně specifická než s monoklonálními protilátkami (Hořejší a Bartůňková, 2009; Balko et al., 2016).

Monoklonální protilátky jsou produkty jednoho klonu plazmatických buněk a jsou namířené proti jednomu konkrétnímu epitopu. Mají jeden izotyp. Pro imunohistochemii se tyto protilátky získávají z tzv. hybridomů, což jsou namnožené klony buněk vzniklé z fúze nenádorové plazmatické buňky a nádorové myelomové buňky. Díky nenádorové plazmatické buňce se tvoří specifická protilátka a díky nádorové buňce má hybridom schopnost se několikanásobně rozdělit (Hořejší a Bartůňková, 2009).

3.2.4 Přímá a nepřímá imunohistochemie

Při imunohistochemii se dá použít buď přímá, anebo nepřímá metoda.

Přímá metoda spočívá v aplikaci protilátky přímo na řez tkáně a na protilátku se naváže značení (enzym, fluorescenční barvivo, kov). Metoda je rychlá a jednoduchá, ale je k ní třeba vysoce koncentrované a čisté protilátky a má nižší citlivost pro světelnou mikroskopii (Balko et al., 2016).

Nepřímá nebo také sendvičová metoda je používána v naší laboratoři. Jedná se o avidin-biotinovou metodu. Protilátky a detekční systémy jsou vázány v několika vrstvách. Metoda je složitější a citlivější. V prvním kroku se sekundární protilátka označí biotinem a naváže se avidin-biotinový komplex, který se značí buď křenovou peroxidázou, nebo alkalickou fosfatázou. V druhém kroku se přítomnost komplexu, v případě peroxidázy, prokazuje barevnou reakcí s diaminobenzidinem (DAB). V případě alkalické fosfatázy se používá fuchsinový substrátový roztok. Výsledné produkty barvení, efekt vazby protilátky je posouzen ve světelném mikroskopu (STANDARD, 2016).

3.2.5 Vlastní postup imunohistochemického barvení

Základním cílem imunohistochemie je detekovat specifické antigeny za využití principu imunologické vazby, tedy výše zmíněný princip vazby antigenu a protilátky. Toto barvení je možné provádět ručním postupem, který už se v poslední době v naší laboratoři téměř nepoužívá. Od roku 2011 je ruční barvení nahrazeno přístrojovým barvením v automatu BenchMark ULTRA VENTANA od firmy Roche (Příloha 1 – Obrázek 1,) (POSTUP, 2016c).

V přístroji BenchMark ULTRA VENTANA jsou používány k barvení preparátů následující reagenty (Příloha 1 – Obrázek 2):

1. Universal DAB Detection Kit
2. Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit
3. Hematoxylin II
4. Bluing Reagent
5. Protease 1, Protease 3
6. Amplifikační kit
7. Dispensery s různými druhy protilátek

Dále jsou v přístroji následující zásobní roztoky (Příloha 1 – Obrázek 3):

1. EZ PREP Solution
2. BenchMark ULTRA LCS
3. SSC Solution
4. Reaction Buffer Concentrate
5. BenchMark ULTRA CC1

BenchMark ULTRA VENTANA je propojen s vlastním počítačem, který ovládá všechny programy přístrojem prováděné. Jeden počítač může ovládat i několik těchto přístrojů najednou. Pro jednotlivá barvení s různými protilátkami jsou zde naprogramovány speciální protokoly, které trvají různě dlouhou dobu a individuálně se liší. K počítači patří ještě tiskárna na štítky s čárovými kódy, při jejichž tisku si laborant zvolí vhodný program barvení, vytiskne štítek a opatří jím preparát, který bude následně v přístroji barven. Dle štítku (který načte kamera uvnitř přístroje) si pak BenchMark

ULTRA VENTANA sám zvolí potřebné chemikálie a protilátky, které jsou k danému barvení nezbytné. Rovněž reagentie a zásobní roztoky jsou opatřeny čárovými kódy nebo čipy, díky nimž přístroj přesně spočítá jejich použitelné množství pro daný cyklus barvení.

Nejprve je nutné přístroj převést z úsporného režimu do režimu s názvem „HOTOVO“, což znamená, že je vše připraveno k barvení. Z lednice vyndáme potřebné reagentie a protilátky, které budeme potřebovat k barvení, a vložíme je do nosičů přístroje. Pomocí ovládacího tlačítka na předním panelu otevřeme barvicí jednotky, vložíme do nich preparáty opatřené čárovými kódy a dolním tlačítkem na ovládacím panelu barvicí jednotky zas uzavřeme. Pak uvedeme přístroj do pracovního režimu „PRACUJ“. Přístroj má dvě možnosti barvení podle pracovního protokolu. Buď může pracovat jako automat, má protilátku uvnitř a dle čárového kódu ji aplikuje úplně sám, nebo lze užít funkce poloautomatu a potřebnou protilátku pak aplikuje do příslušné barvicí jednotky laborant po zvukovém a oranžovém světelném signálu. Pokud se ozve nepřetržitý zvukový signál a světlo na barvicí jednotce zčervená, znamená to chybu v průběhu barvení, která musí být odstraněna laborantem. Může se jednat o posunuté sklo v barvicí jednotce, její rozbití či chybně nalepený štítek na preparátu, který kamera nemůže načíst.

Když je barvení dokončeno, automat signalizuje zeleným světlem a opět použije zvukový signál. Laborant pak otevře barvicí jednotku stiskem tlačítka, obarvený preparát vyjme a několikrát ho opláchně v teplé vodě se saponátem, aby byl zbaven mastného povlaku z reagentií. Odvodnění a montování preparátů již probíhá v jiných automatech. Na konci barvení je třeba zkontrolovat odpadní nádoby na chemikálie, případně je vylít. Pak je třeba automat uvést do úsporného režimu, uložit data a vypnout přístroj i počítač (POSTUP, 2016d).

3.2.6 Imunohistochemické vyšetření exprese „mismatch repair“ (MMR) proteinů

Provádí se vyšetření exprese hlavních MMR proteinů, tedy MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6. Na našem pracovišti tento postup funguje jako vstupní vyšetření k zařazení pacienta do diagnostiky Lynchova syndromu. Provádí se u všech kolorektálních

karcinomů, karcinomů endometria a nově se zavádí i u karcinomů horních cest močových.

Dříve se imunohistochemicky stanovovala pouze exprese MLH1 a MSH2, proto bylo upřednostňováno stanovení nestability mikrosatelitů (MSI) pro vyšší senzitivitu. Po zavedení dalších dvou protilátek, které detekují druhý heterodimer (tedy proteiny PMS2 a PMS6), se stala senzitivita stanovení MSI a imunohistochemie srovnatelná, navíc jsou v poslední době obě metody vnímány jako komplementární, jejich kombinace má totiž vyšší senzitivitu než samostatné použití jednotlivých metod.

Velkou výhodou imunohistochemie je, kromě ceny, možnost odhalit postižený gen pro další molekulárně biologické vyšetření, což výrazně sníží náklady na průkaz případné germinální mutace. Navíc je účinnější v průkazu mutací genu *MSH6*, které mohou uniknout při průkazu MSI prostřednictvím polymerázové řetězové reakce (PCR) (Shia, 2008).

Pracovní protokoly všech použitých barvení jsou umístěny v Příloze 3. Seznam a ředění použitých protilátek je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3. Protilátky použité při MMR barvení

Použité protilátky	Poměr ředění protilátky	Klon	Výrobce protilátky
MLH1	Neředí se	G168-728	Ventana Roche
MSH6	Neředí se	44	Ventana Roche
MSH2	Neředí se	G219-1129	Ventana Roche
PMS2	Neředí se	EPR 3947	Ventana Roche

(vlastní zdroj).

3.2.7 Imunohistochemický průkaz mutované formy proteinu *BRAF V600E*

K průkazu substituce V600E genu *BRAF* sloužícímu k odlišení sporadického MSI-H karcinomu od Lynchova syndromu (u nějž tato substituce přítomna nebývá) lze, kromě molekulárně genetické analýzy genu popsané v kapitole 3.3.3., použít i imunohistochemického průkazu přítomnosti abnormální formy proteinu kódovaného mutovaným genem v cytoplazmě nádorových buněk. V současné době je k dispozici klon VE-1, který je při přesném dodržení podmínek postupu barvení dostatečně senzitivní i specifický v nepřímém průkazu této formy mutace. Při nejasnostech

v interpretaci výsledku barvení je však vhodné verifikovat výsledek molekulárně genetickým vyšetřením genu *BRAF* (Kuan et al., 2014; Patil et al., 2015).

Stanovení mutované formy proteinu *BRAF* V600E se provádí v naší laboratoři prostřednictvím imunohistochemického průkazu v barvicím automatu BenchMark Ultra Ventana. Postup je popsán v kapitole 3.2.5. a pracovní protokol této metody je umístěn v Příloze 3.

3.3 Molekulárně genetická analýza

V následujících podkapitolách bude nejprve podán popis základních metodik molekulární genetiky, zejména nejdůležitější molekulárně genetické metody – PCR, která slouží k izolaci a namnožení studovaných úseků nukleových kyselin. Dále budou konkrétněji popsány metody užívané při diagnostice Lynchova syndromu, jmenovitě analýza genu *BRAF*, vyšetření MSI a molekulárně genetické vyšetření MMR genů.

3.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Mutace genu *BRAF* jsou ve vyšetřovaných vzorcích detekovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), amplifikace daného úseku deoxyribonukleové kyseliny DNA a následné reverzní hybridizace. Test lze provést z DNA izolované z fixovaných i nefixovaných tkání (NÁVOD, 2015).

PCR (polymerase chain reaction) je metoda, která slouží k izolaci a dalším analýzám genů. PCR probíhá *in vitro* a je založená na principu replikace nukleových kyselin. Díky této technice můžeme velmi rychle namnožit konkrétní nukleotidové sekvence obsažené v DNA, a to s velmi vysokou selektivitou. PCR je hojně využívána při diagnostice genetických chorob, v nádorové diagnostice, při detekci infekčního agens, v prenatální diagnostice, soudním lékařství a kriminalistice atd. Jejím prostřednictvím se dá namnožit jakýkoliv gen i z velmi malého množství DNA.

PCR probíhá v zařízení zvaném termocykler, které dokáže v krátkém čase (několik sekund) zvyšovat či snižovat teplotu o desítky stupňů Celsia. K zahájení PCR dojde pomocí syntetického primeru, což je sekvence 15–20 nukleotidů, která je shodná se sekvencemi na koncích úseku DNA, který potřebujeme namnožit. Dále je třeba všech

čtyř deoxyribonukleosidtrifostátů a DNA-polymerázy, která se izoluje z *Thermus aquaticus* (termofilní bakterie, která má optimální teplotu 72 °C).

Proces PCR začíná zahřátím směsi na 95 °C, kdy dojde k denaturaci DNA a vzniku jednořetězcových molekul. Následuje ochlazení na 50 °C. Pak se může navázat primer na komplementární sekvence DNA. V dalším kroku reakce se teplota zvýší na 72 °C, kdy dochází k polymerizaci směrem od navázaného primeru. Tak dojde ke vzniku kopie původní DNA. Dále se směs zahřeje zase na 95 °C a cyklus je opakován.

PCR slouží k vytvoření až několik milionů kopií původního úseku DNA, postačí na to 20–30 cyklů reakce. Proces je tedy velmi rychlý a umožňuje provést analýzu DNA i z velmi malého množství výchozího materiálu (Nečas, 2000; STANDARD, 2014a).

3.3.2 Reverzní hybridizace

Jedná se o rutinní metodu, která pracuje na principu PCR, ale používá se zde jiný typ primerů. Jsou to biotinylové primery. Používají se speciální stripy, které jsou tvořeny proužky nylonových membrán. Na ně se fixují specifické sondy, které mají schopnost následně hybridizovat s produkty PCR. Dalším krokem je detekce produktů kalorimetrickou reakcí. Po ukončení hybridizace se nechá strip zaschnout, přibližně čtyřicet osm hodin. Pak je odečteno genotypové určení. Pokud se linie na stripu zbarví šedohnědou barvou, je reakce považována za pozitivní (STANDARD, 2014b).

3.3.3 Molekulárně genetický průkaz mutace V600E genu *BRAF*

Tato metoda je jedna z možností, které napomáhají v diferenciální diagnostice, rozlišuje sporadický MSI-H karcinom od MSI-H karcinomu při Lynchově syndromu. Mutace V600E je přítomna až u 50 % sporadických MSI-H kolorektálních karcinomů, ale téměř nikdy u LS (Daum et al., 2014).

Mutace genu *BRAF* jsou asociovány s celou řadou nádorů, jedná se nejen o kolorektální karcinom, ale i o maligní melanom, non-Hodgkinský lymfom, papilární karcinom štítné žlázy, nemalobuněčný karcinom plic a adenokarcinom plic. Většinu těchto mutací způsobuje transverze T1799A (spočívající v záměně adeninu za thymin),

kteřá způsobí aminokyselinovou záměnu V600E, tedy substituci valinu kyselinou glutamovou v exonu 15. (Rosypal et al., 2001; NÁVOD, 2015).

Gen *BRAF* je složen z osmnácti exonů a kóduje protein, který hraje důležitou roli v regulaci signální kaskády, která ovlivňuje buněčné dělení a diferenciaci.

Mutace V600E zajišťuje buňkám transformační aktivitu. Stimuluje autofosforylaci proteinu BRAF, díky čemuž je tento protein stále v aktivním stavu.

Fosforylace zajišťuje přechod transkripčního faktoru do aktivního stavu. Aktivace probíhá prostřednictvím fosforylace na hydroxylové skupině aminokyselin serinu, treoninu nebo tyrozinu. Proces je katalyzován proteinkinázami, které přenášejí fosfátovou skupinu z adenosintrifostátu (donor), na aminokyselinový zbytek fosforylovaného protein (akceptor).

Opačný proces je označován jako defosforylace a jedná se o odstranění fosfátové skupiny. K tomuto dojde hydrolýzou z fosforylovaného proteinu, za katalýzy fosfoproteinofosfatázami.

Fosforylace ovlivňuje biochemické složení proteinu, mění se jeho umístění v buňce, zvyšuje se jeho citlivost k proteolýze atd. Defosforylace navozuje původní stav (Rosypal, 2005; NÁVOD, 2015).

3.3.4 Stanovení nestability mikrosatelitů (MSI)

MSI analýza je prováděna pomocí výše popsané PCR metody, kapilární elektroforézy (fragmentační analýzy), která rozezná fragmenty DNA, které se liší délkou pouhých několika bází, a vizualizace DNA prostřednictvím emise světla vlnové délky charakteristické pro danou molekulu po ozáření laserem.

Zjišťují se zde různé délky mikrosatelitů v analyzovaných buňkách. K této variabilitě délek mikrosatelitů dochází při dysfunkci komplexu MMR proteinů.

Kritéria a diagnostika MSI byla stanovena National Cancer Institute (NCI) v roce 1997. Jedná se o referenční Bethesda panel mikrosatelitů pro klinické testování. Panel se skládá ze dvou mononukleotidů (BAT25 a BAT26) a tří dinukleotidů (D5S346, D2S123, D17S250). Byly stanoveny tři kategorie (Murphy et al., 2006; Daum et al., 2014):

1. MSI-H: více než jeden nestabilní marker v Bethesda panelu (více než 30–40 % z lokusů ve větších panelech),
2. MSI-L: nízká nestabilita, tj. jeden nestabilní marker v Bethesda panelu (30–40 % a méně lokusů ve větších panelech),
3. MSS: nebyl prokázán žádný nestabilní marker.

3.3.5 Stanovení hypermetylace promotoru genu *MLH1*

Tato metoda slouží jako marker sporadických MSI-H kolorektálních karcinomů, protože téměř nikdy nebývá pozitivní u LS.

K detekci této epigenetické změny je v naší laboratoři preferována metoda metylačně specifické PCR. Její podstatou je bisulfidická konverze DNA studovaného vzorku, tedy deamidace nemetylovaných molekul cytosinu v promotoru genu *MLH1* (metylované cytosiny tímto způsobem deamidovat nelze), čímž se tyto přemění na uracil. Následně se pak provádí PCR se dvěma typy primerů, z nichž jedny se vážou specificky na sekvenci s uracilem, druhé na sekvenci s cytosinem. Porovnání produktů pak umožňuje stanovit míru metylace promotoru genu *MLH1* (Chan et al., 2002).

3.3.6 Molekulárně genetické vyšetření samotných MMR genů

Protože toto vyšetření již nepatří mezi metody užívané v depistáži Lynchova syndromu, ale slouží k potvrzení této diagnózy u pacientů vyselektovaných na základě výše uvedených depistážních vyšetření, a tudíž je mimo rámec této bakalářské práce, uvádím je jen v krátké ilustraci dalšího postupu a také proto, že ve výsledkové části práce jsou u některých pacientů uvedeny výsledky této analýzy.

Nejvhodnějším biologickým materiálem pro finální analýzu MMR genů je periferní krev, která je odebrána do zkumavky s protisrážlivým činidlem. Mutace, která je prokázána mimo nádorovou tkáň, potvrzuje její germinální původ. Výťažnost vyšetření z leukocytů periferní krve je podstatně vyšší než z nenádorové tkáně po předchozí fixaci formolem. Je to dáno také menší technickou náročností analýzy (Daum et al., 2014).

Jsou zde použity opět metody PCR a fragmentační analýza. Obě jsou popsány v předchozích kapitolách. Geny *MLH1*, *MSH2* a *MSH6* se analyzují z DNA, gen *PMS2* z jeho transkriptu v RNA (STANDARD, 2014c).

3.4 Metodika výběru pacientů

Ze souboru všech pacientů, přesněji řečeno jejich kolorektálních karcinomů, u nichž byla v naší laboratoři dosud imunohistochemicky vyšetřena exprese MMR proteinů, byly vyčleněny dvě rozsáhlé skupiny: MMR-pozitivní (bez ztráty exprese MMR proteinů) a MMR-deficientní (s prokázanou ztrátou exprese alespoň jednoho MMR proteinu). Zvláštní podskupinu druhé skupiny představovali pacienti, u nichž byl molekulárně geneticky potvrzen Lynchův syndrom. Následně bylo z obou těchto skupin vybráno po 25 pacientech, přičemž z druhé skupiny (MMR-deficientní) bylo vybráno 5 pacientů s Lynchovým syndromem, zbývajících 20 pacientů bez této diagnózy.

Samotný náhodný výběr z jednotlivých skupin (respektive podskupin) probíhal metodou slepého manuálního výběru: nejprve byly všem případům přidělena pořadová čísla, tato čísla byla poté přepsána na čtverečky z tvrdého kartónu rozměru 3 x 3 cm, které byly následně vloženy do tří vaků z neprůhledné látky podle výše uvedených skupin a podskupin. Obsah každého vaku byl zamíchán třesením po dobu 5 minut kontrolovanou laboratorní minutkou. Posléze bylo bez vizuální kontroly manuálně vyňato z vaku „MMR-pozitivní“ 25 čísel, z vaku „MMR-deficientní bez LS“ 20 čísel, z vaku „MMR-deficientní s LS“ 5 čísel.

4 VÝSLEDKY

Metodou náhodného výběru byly získány dvě studijní skupiny, každá sestávající z 25 případů: skupina nádorů MMR-pozitivních (Příloha 2 – Tabulka 4) a skupina nádorů MMR-deficientních (Příloha 2 - Tabulka 5). Druhá jmenovaná skupina sestávala z 20 případů sporadických MMR-deficientních tumorů a z 5 případů s Lynchovým syndromem (případy 21–25 v Tabulce 5).

Podkladem pro rozdělení do těchto dvou skupiny byly výsledky imunohistochemického vyšetření MMR proteinů. Nádory MMR-pozitivní vykazovaly zachovanou expresi všech čtyř MMR proteinů (Příloha 1 – Obrázek 4). Naopak v MMR-deficientních tumorech byl průkaz alespoň jednoho z těchto MMR proteinů negativní (Příloha 1 – Obrázek 5).

4.1 Klinické charakteristiky jednotlivých skupin

Ve skupině MMR-pozitivních tumorů byl průměrný věk pacientů 67,88 let (rozmezí 45–84 let), poměr muži/ženy byl 17/8.

Ve skupině MMR-deficientních tumorů byl průměrný věk 68,24 let (rozmezí 42–90 let), poměr muži/ženy byl 6/19. V rámci této skupiny byl průměrný věk pacientů s prokázaným Lynchovým syndromem 51,6 let (rozmezí 42–60 let), poměr muži/ženy byl 1/4, zatímco průměrný věk pacientů bez Lynchova syndromu byl 72,4 let (rozmezí 42–90 let), poměr muži/ženy byl 5/15.

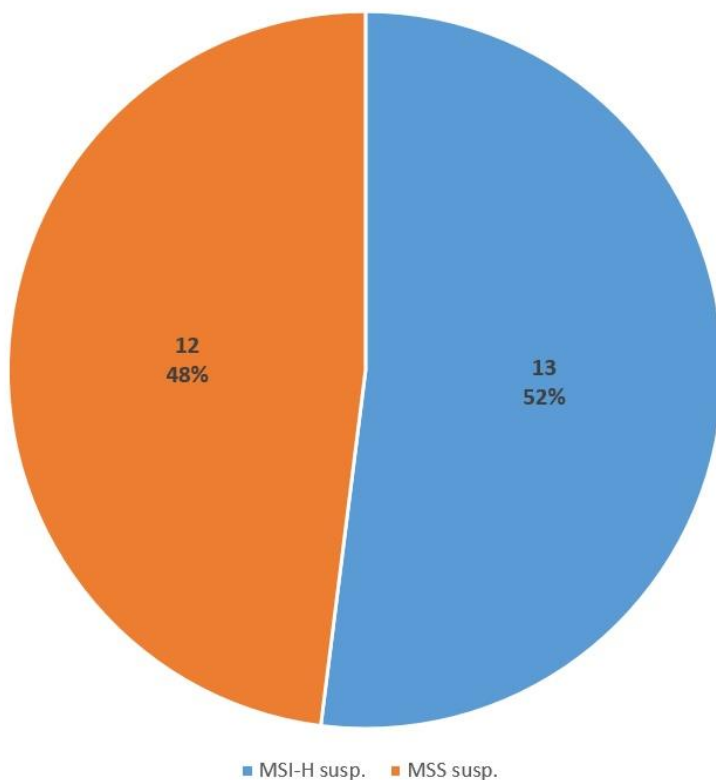
4.2 Semi PREDICT skóre

Ve všech tumorech bylo hodnoceno Semi PREDICT skóre podle Tabulky 2. Kromě věku pacienta a pravostranné lokalizace tumoru toto zahrnuje i některé histologické parametry, jmenovitě přítomnost hľenu, který disekuje slizniční stroma v různém množství (Příloha 1 – Obrázek 6), přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů (Příloha 1 – Obrázek 7), peritumorální lymfoidní lem (Příloha 1 – Obrázek 6) a výskyt

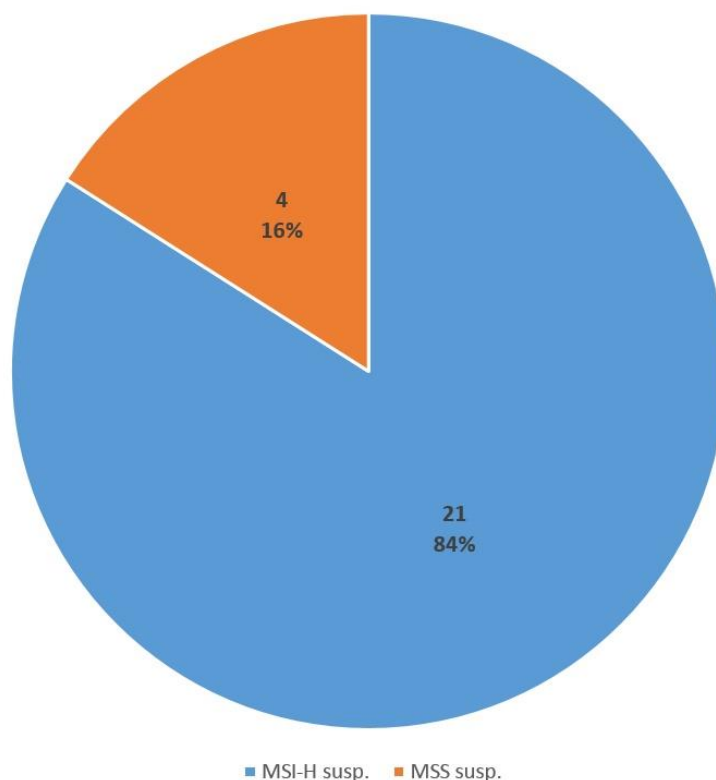
plazmatických buněk mezi buňkami v zánětlivém infiltrátu ve stromatu, jejichž množství převyšuje 25 % (Příloha 1 – Obrázek 8). Tumory, jejichž Semi PREDICT skóre bylo ≥ 2 , byly hodnoceny jako suspektní z MSI (Příloha 2 – Tabulka 4 a Tabulka 5).

Ve skupině MMR-pozitivních tumorů vykazovalo 13 (52 %) nádorů Semi PREDICT skóre ≥ 2 , tedy byly hodnoceny jako suspektní z MSI (Graf 1).

Ve skupině MMR-deficientních tumorů tyto znaky vykazovalo 21 (84 %) případů, tedy výrazně vyšší počet než ve skupině nádorů MMR-pozitivních, úplné shody však dosaženo nebylo (Graf 2).



Graf 1: Poměr tumorů podezřelých z MSI na základě Semi PREDICT skóre ve skupině nádorů se zachovanou expresí všech MMR proteinů (vlastní zdroj).



Graf 2: Poměr tumorů podezřelých z MSI na základě Semi PREDICT skóre ve skupině nádorů se ztrátou exprese alespoň jednoho z MMR proteinů (vlastní zdroj).

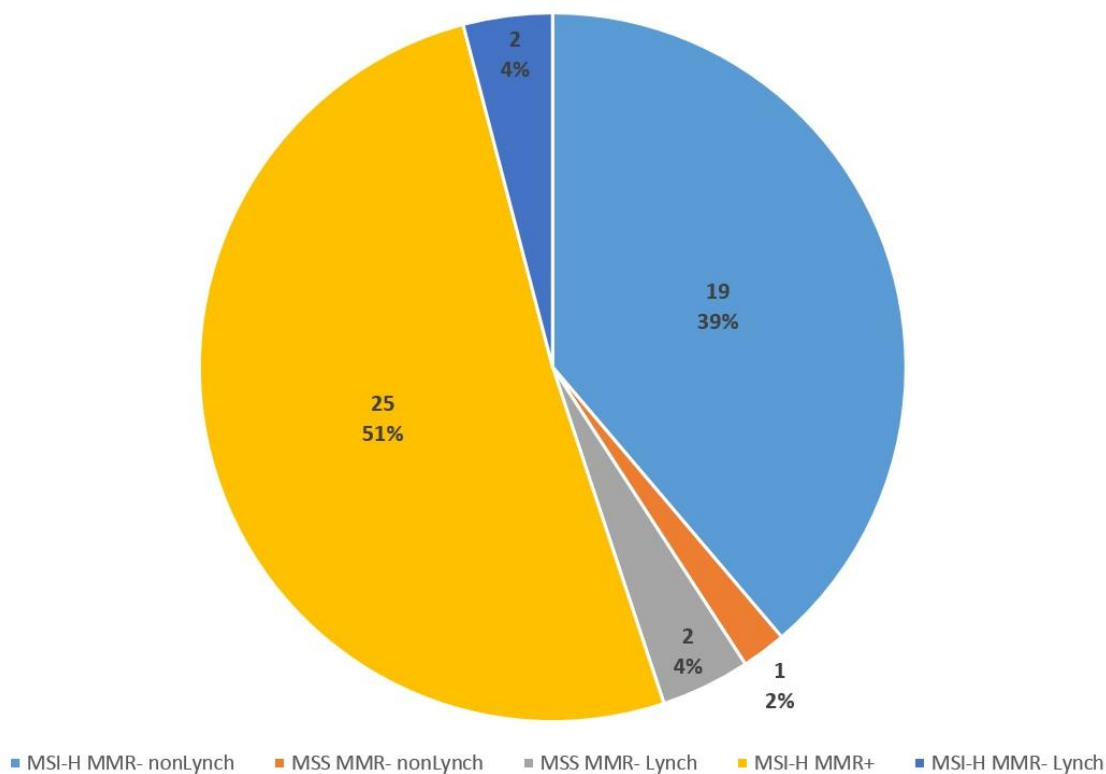
Díky počátečnímu rozdělení případů do dvou skupin podle MMR pozitivitu/deficience na základě imunohistochemického vyšetření, které bylo dáno vstupní metodikou, přinášejí údaje v Grafu 1 a 2 v jednoduché formě i údaje o senzitivitě a specificitě Semi PREDICT skóre jako testu predikujícího stav MMR systému.

Senzitivita Semi PREDICT skóre pro predikci MMR-deficience (a tím pádem nepřímo i pro detekci Lynchova syndromu) hodnocená jako poměr počtu případů se Semi PREDICT skóre ≥ 2 ($n = 21$) k celkovému počtu MMR-deficientních nádorů představujícímu součet skutečně pozitivních a falešně negativních výsledků ($n = 25$) byla ve studovaném souboru 84 %. Po zúžení výběru pouze na podskupinu pacientů s Lynchovým syndromem senzitivita dosáhla 100 %, vzhledem k nízkému počtu těchto pacientů v souboru je však statistický význam tohoto údaje malý.

Specificita Semi PREDICT skóre hodnocená jako poměr počtu případů se Semi PREDICT skóre < 2 (n = 12) ve skupině MMR-pozitivních tumorů k celkovému počtu případů v této skupině (n = 25) byla 48 %.

4.3 Vztah imunohistochemického vyšetření MMR proteinů a molekulárně genetického stanovení MSI

Ve 49 případech z 50 byla i molekulárně geneticky vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (jediný případ vyšetřen nebyl, protože vzhledem k výsledku imunohistochemického deficitu MSH2 a MSH6 bylo vysloveno silné podezření na Lynchův syndrom, které bylo následně potvrzeno průkazem germinální mutace genu *MSH2*, takže vyšetření MSI nebylo nutné). Pouze 21 tumorů vykazovalo MSI-H, všechny ve skupině MMR-deficientních nádorů. V této skupině však byly i 3 MSS tumory, dva z nich dokonce u pacientů s prokázaným Lynchovým syndromem (Graf 3).



Graf 3: Rozložení MSI v jednotlivých skupinách tumorů podle stavu MMR systému a molekulárně genetického průkazu Lynchova syndromu (vlastní zdroj).

Vzhledem k zaměření této studie je za skutečně pozitivní výsledek testu považována MMR deficeience, za skutečně negativní výsledek MMR-pozitivita. Za těchto podmínek je tedy senzitivita stanovení MSI 87 % po vztažení pouze na pacienty s Lynchovým syndromem ($n = 4$) však pouze 50 %. Specificita tohoto testu byla ve studovaném souboru 100 % (nebyly zaznamenány falešně pozitivní výsledky).

5 DISKUZE

Lynchův syndrom je nejčastější, a tedy nejvýznamnější monogenně podmíněný autozomálně dědičný syndrom familiárního kolorektálního karcinomu, přičemž jeho četnost dosahuje až 5 % všech CRC (Daum et al., 2014). Z toho důvodu se jeho diagnostika stává důležitou i pro celý systém zdravotní péče. Samotná diagnostika LS v současné době vyžaduje průkaz germinální mutace některého z MMR genů, které kódují proteiny opravující poškozenou DNA (pouze ve vzácných případech je jeho příčinou jiná genetická událost jako germinální mutace genu *EPCAM* nebo germinální metylace promotoru *MLH1*) (Fishel et al., 1993; Dušek et al., 2016). Protože je však toto vyšetření germinálních mutací velmi nákladné, nelze testovat všechny CRC, ale je nutné nejprve vybrat pacienty, u kterých je tato možnost pravděpodobná. Po řadu let k tomuto výběru sloužila (revidovaná) Bethesda guidelines (Umar et al., 2004). Vyššího záchytu lze však dosáhnout aplikací metod používaných v moderní histopatologii, a to buď stanovením Semi PREDICT skóre nádoru na základě jeho histologického vyšetření preparátů obarvených hematoxylinem a eosinem, nebo imunohistochemickým vyšetřením čtyř hlavních MMR proteinů v histologických řezech z nádoru, anebo molekulárně genetickým průkazem MSI v nádorové tkáni (Kokošková et al., 2014). V dalším sledu se pak pro vyřazení pacientů se sporadickým MSI-H karcinomem užívá molekulárně genetického průkazu substituce V600E v genu *BRAF* a hypermetylace promotoru genu *MLH1*, což jsou události, které LS prakticky vylučují (Daum et al., 2014).

Primárním cílem této práce bylo porovnání výše uvedených vstupních metod depistáže Lynchova syndromu. Protože na našem pracovišti se rutinně k této detekci nádorů suspektních z LS užívá imunohistochemického vyšetření MMR proteinů, zvolila jsem výsledky tohoto vyšetření za referenční výsledek testování a pro účely této studie vybrala z archívu našeho pracoviště metodou náhodného výběru 2 skupiny nádorů, každou složenou z 25 případů: skupinu nádorů s intaktní imunoexpresí MMR proteinů a skupinu nádorů MMR-imunodeficientních. Tato skupina obsahovala i 5 pacientů s prokázaným Lynchovým syndromem, což zhruba odpovídá i odhadovanému skutečnému zastoupení těchto nádorů mezi CRC s MSI-H (Daum et al., 2014).

Následně byla tato exprese korelována se Semi PREDICT skóre a s výsledky vyšetření MSI.

Z hlediska věku pacientů v době diagnózy CRC byly obě skupiny podobné. Ve skupině MMR-pozitivních tumorů byl průměrný věk pacientů 67,88 let (rozmezí 45–84 let) a ve skupině MMR-deficientních tumorů jako celku byl průměrný věk 68,24 let (rozmezí 42–90 let). V rámci této skupiny byl průměrný věk pacientů s prokázaným Lynchovým syndromem 51,6 let (rozmezí 42–60 let), takže logicky musel být věk pacientů v této skupině bez Lynchova syndromu výrazněji vyšší než v první skupině (průměrný věk byl 72,4 let, rozmezí 42–90 let). Z těchto klinických dat vyplývá i nedostatečná senzitivita věku pro depistáž Lynchova syndromu, protože 3 z 5 pacientů s Lynchovým syndromem byli starší než 50 let (v archivu našeho pracoviště máme i 2 pacienty s Lynchovým syndromem, u nichž byl nádor diagnostikován až ve věku 80 let, na základě náhodného výběru však do této skupiny nebyli zařazeni). Ve skupině MMR-pozitivních tumorů byli výrazně častěji zastoupeni muži (poměr muži/ženy byl 17/8), ve skupině MMR-deficientních nádorů byl tento poměr obrácený (poměr muži/ženy byl 6/19). S ohledem na fakt, že Lynchův syndrom je autozomálně dominantně dědičný, je poněkud zarážející, že v této podskupině pacientů byl poměr muži/ženy 1/4. Tento výsledek lze vysvětlit jednak nízkým počtem pacientů s Lynchovým syndromem ve studii, kvůli kterému je statistický význam těchto údajů nízký, jednak skutečností, že u žen se poměrně často Lynchův syndrom primárně manifestuje karcinomem endometria (Hampel et al., 2006).

Semi PREDICT skóre se hodnotí na základě parametrů klinických (věku pacienta a pravostranná lokalizace tumoru) a histologických (přítomnost hlenu, který disekuje slizniční stroma v různém množství, přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů, peritumorální lymfoidní lem a výskyt plazmatických buněk mezi buňkami v zánětlivém infiltrátu ve stromatu, jejichž množství převyšuje 25 %). Tumory, jejichž Semi PREDICT skóre bylo ≥ 2 , tedy vykazují alespoň 2 z výše uvedených znaků, jsou hodnoceny jako suspektní z MSI. Senzitivita Semi PREDICT skóre pro predikci MMR-deficience (a tím pádem nepřímo i pro detekci Lynchova syndromu) hodnocená jako poměr počtu případů se Semi PREDICT skóre ≥ 2 ($n = 21$) k celkovému počtu MMR-deficientních nádorů představujícímu součet skutečně pozitivních a falešně negativních výsledků ($n = 25$) byla ve studovaném souboru 84 %. Po zúžení výběru pouze na

podskupinu pacientů s Lynchovým syndromem senzitivita dosáhla 100 %. Vzhledem k nízkému počtu těchto pacientů v souboru je však statistický význam tohoto údaje malý. Specificita Semi PREDICT skóre hodnocená jako poměr počtu případů se Semi PREDICT skóre < 2 (n = 12) ve skupině MMR-pozitivních tumorů k celkovému počtu případů v této skupině (n = 25) byla 48 %. Tato nízká specificita však není limitujícím faktorem, použije-li se Semi PREDICT skóre pouze jako vstupní vyšetření na pracovištích, která nemají možnost imunohistochemického vyšetření MMR proteinů, a případy hodnocené podle Semi PREDICT skóre jako pozitivní jsou posléze odeslány na pracoviště vyšetřující imunoexpresi MMR proteinů.

MSI byla molekulárně geneticky stanovena ve 49 případech z 50 (nebyl vyšetřen 1 případ Lynchova syndromu, protože vzhledem k výsledku imunohistochemického deficitu MSH2 a MSH6 bylo vysloveno silné podezření na Lynchův syndrom, které bylo následně potvrzeno průkazem germinální mutace genu *MSH2*, takže vyšetření MSI nebylo nutné). Pouze 21 tumorů vykazovalo MSI-H, všechny ve skupině MMR-deficientních nádorů. V této skupině však byly i 3 MSS tumory, dva z nich dokonce u pacienta s prokázaným Lynchovým syndromem. Vzhledem k zaměření této studie je za skutečně pozitivní výsledek testu považována MMR deficeience, za skutečně negativní výsledek MMR-pozitivita. Za těchto podmínek je tedy senzitivita stanovení MSI 87 %, po vztažení pouze na pacienty s Lynchovým syndromem (n = 4) však pouze 50 %. Specificita tohoto testu byla ve studovaném souboru 100 %. Přestože tedy nebyly zaznamenány falešně pozitivní výsledky, nízká senzitivita stanovení MSI v rámci této studie svědčí pro to, že molekulárně genetické stanovení MSI není vhodným vstupním markerem pro depistáž Lynchova syndromu, zejména s přihlédnutím k pouze 50% senzitivitě v naší (byť malé) podskupině pacientů s prokázaným Lynchovým syndromem. Přes tradovaný názor, že imunohistochemické vyšetření exprese MMR proteinů a molekulárně genetické stanovení MSI se vzájemně doplňují a mohou zvýšit senzitivitu depistáže, v souboru případů vybraných do této studie se to nepotvrdilo. Popsané falešně negativní případy stanovení MSI svědčí pro to, že molekulárně geneticky stanovovaná MSI-H je pouze marker tohoto typu genetického poškození buňky, které není tímto molekulárně genetickým vyšetřením vyloučeno. Pro to svědčí fakt, že v jednom z těchto 3 případů byl imunohistochemický průkaz deficeience MLH1 a PMS2 podpořen molekulárně genetickým průkazem hypermetylace promotoru genu

MLH1 (který vede k jeho inaktivaci a tedy i imunonegativitě), ve zbývajících 2 případech byl zase imunohistochemický výsledek potvrzen průkazem germinálních mutací příslušných MMR genů.

6 ZÁVĚR

Tato studie v rámci bakalářské práce prokázala dominantní postavení imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů v diagnostice MSI-H karcinomů, která jsou v současné době základem depistáže Lynchova syndromu. Semi PREDICT skóre má nižší senzitivitu a zejména specifitu, na pracovištích bez možnosti vyšetření imunoexprese MMR proteinů jej však lze využít k výběru případů pro imunohistochemické vyšetření na specializovaném pracovišti. Samotné stanovení MSI na podkladě molekulárně genetického vyšetření standardního panelu mikrosatelitů se v této studii jeví jako nedostatečně senzitivní a nevhodné jako samostatný vstupní marker. Význam může mít však v případech, kdy je imunohistochemické barvení špatně hodnotitelné a nelze na jeho základě dojít k jednoznačnému závěru.

7 SEZNAM LITERATURY

1. BAKRY, D., ARONSON, M., DURNO, C., RIMAWI, H., FARAH, R., ALHARBI, Q. K., ALHARBI, M., SHAMVIL, A., BEN-SHACHAR, S., MISTRY, M., CONSTANTINI, S., DVIR, R., QADDOUMI, I., GALLINGER, S., LERNER-ELLIS, J., POLLETT, A., STEPHENS, D., KELIES, S., CHAO, E., MALKIN, D., BOUFFET, E., HAWKINS, C., TABORI, U., 2014. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer*. 50(5), 987-996, doi: 10.1016/j.ejca.2013.12.005.
2. BALKO, J., TONAR, Z., VARGA, I., 2016. *Memorix histologie*. Praha: Triton. 529 s. ISBN 978-80-7553-009-7.
3. BANDIPALLIAM, P., 2005. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer*. 4(4), 323-333, doi: 10.1007/s10689-005-8351-6.
4. BOLAND, C. R., THIBODEAU, S. N., HAMILTON, S. R., SIDRANSKY, D., ESHLEMAN, J. R., BURT, R. W., MELTZER, S. J., RODRIGUEZ-BIGAS, M. A., FODDE, R., RANZANI, G. N., SRIVASTAVA, S., 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 58(22), 5248-5257, ISSN: 0008-5472.
5. ČIHÁK, R., 2013. *Anatomie 2*. 3. vydání. Praha: Grada. 512 s. ISBN 978-80-247-4788-0.
6. DAUM, O., BENEŠ, Z., HADRAVSKÝ, L., STEHLÍK, J., ČERNÁ, K., DUŠEK, M., KOKOŠKOVÁ, B., MICHAL, M., 2014. Lynchův syndrom v rukách patologa. *Cesk Patol*. 50(1), 18-24, ISSN: 1210-7875.
7. DE ROSA, M., FASANO, C., PANARIELLO, L., SCARANO, M. I., BELLI, G., IANNELLI, A., CICILIANO, F., IZZO, P., 2000. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene*. 19(13), 1719-1723, doi: 10.1038/sj.onc.1203447.

8. DOMINGO, E., LAIHO, P., OLLIKAINEN, M., PINTO, M., WANG, L., FRENCH, A. J., WESTRA, J., FREBOURG, T., ESPIN, E., ARMENGOL, M., HAMELIN, R., YAMAMOTO, H., HOFSTRA, R. M., SERUCA, R., LINDBLOM, A., PELTOMAKI, P., THIBODEAU, S. N., AALTONEN, L. A., SCHWARTZ, S., JR., 2004. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet.* 41(9), 664-668, doi: 10.1136/jmg.2004.020651.
9. DOVRAT, S., FIGER, A., FIDDER, H. H., NEOPHYTOU, P., FIREMAN, Z., GEVA, R., ZIDAN, J., FLEX, D., MEIR, S. B., FRIEDMAN, E., 2005. Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer.* 4(4), 291-294, doi: 10.1007/s10689-005-1255-7.
10. DUŠEK, M., HADRAVSKÝ, L., ČERNÁ, K., STEHLÍK, J., ŠVAJDLER, M., KOKOŠKOVÁ, B., DUBOVÁ, M., MICHAL, M., DAUM, O., 2016. Diagnóza Lynchova syndromu od patologa. *Klin Onkol.* 29(3), 180-186, ISSN: 0862-495X.
11. FAKAN, F., 2005. *Přehled patologie pro bakalářské zdravotnické obory*. Praha: Karolinum. 112 s. ISBN 978-80-2461-054-2.
12. FISHEL, R., LESCOE, M. K., RAO, M. R., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., GARBER, J., KANE, M., KOLODNER, R., 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 75(5), 1027-1038, ISSN: 0092-8674.
13. GALLINGER, S., ARONSON, M., SHAYAN, K., RATCLIFFE, E. M., GERSTLE, J. T., PARKIN, P. C., ROTHENMUND, H., CROITORU, M., BAUMANN, E., DURIE, P. R., WEKSBERG, R., POLLETT, A., RIDDELL, R. H., NGAN, B. Y., CUTZ, E., LAGARDE, A. E., CHAN, H. S., 2004. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology.* 126(2), 576-585, ISSN: 0016-5085.
14. HAMILTON, S. R., BOSMAN, F. T., BOFFETTA, P., ILYAS, M., MORREAU, H., NAKAMURA, S. I., QUIRKE, P., RIBOLI, E., SOBIN, L. H., 2010. Carcinoma of the colon and rectum. In: BOSMAN, F. T., CARNEIRO, F., HRUBAN, R. H., THEISE, N. D. *WHO classification of tumours of the digestive system*. 4. edition. Lyon: IARC, p. 134-146. ISBN 978-92-832-2432-7.
15. HAMPEL, H., FRANKEL, W., PANESCU, J., LOCKMAN, J., SOTAMAA, K., FIX, D., COMERAS, I., LA JEUNESSE, J., NAKAGAWA, H., WESTMAN, J. A.,

- PRIOR, T. W., CLENDENNING, M., PENZONE, P., LOMBARDI, J., DUNN, P., COHN, D. E., COPELAND, L., EATON, L., FOWLER, J., LEWANDOWSKI, G., VACCARELLO, L., BELL, J., REID, G., DE LA CHAPELLE, A., 2006. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Research*. 66(15), 7810-7817, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1114.
16. HEGDE, M. R., CHONG, B., BLAZO, M. E., CHIN, L. H., WARD, P. A., CHINTAGUMPALA, M. M., KIM, J. Y., PLON, S. E., RICHARDS, C. S., 2005. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res*. 11(13), 4689-4693, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2025.
17. HENDRIKS, Y. M., JAGMOHAN-CHANGUR, S., VAN DER KLIFT, H. M., MORREAU, H., VAN PUIJENBROEK, M., TOPS, C., VAN OS, T., WAGNER, A., AUSEMS, M. G., GOMEZ, E., BREUNING, M. H., BROCKER-VRIENDS, A. H., VASEN, H. F., WIJNEN, J. T., 2006. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology*. 130(2), 312-322, doi: 10.1053/j.gastro.2005.10.052.
18. HITCHINS, M. P., WONG, J. J., SUTHERS, G., SUTER, C. M., MARTIN, D. I., HAWKINS, N. J., WARD, R. L., 2007. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germline epimutation. *New England Journal of Medicine*. 356(7), 697-705, doi: 10.1056/NEJMoa064522.
19. HOLUBEC, L., 2004. *Kolorektální karcinom: Současné možnosti diagnostiky a léčby*. Praha: Grada. 194 s. ISBN 80-247-0636-9.
20. HOŘEJŠÍ, V., BARTŮŇKOVÁ, J., 2009. *Základy imunologie*. 4. vydání. Praha: Triton. 316 s. ISBN 978-80-7387-280-9.
21. HYDE, A., FONTAINE, D., STUCKLESS, S., GREEN, R., POLLETT, A., SIMMS, M., SIPAHIMALANI, P., PARFREY, P., YOUNGHUSBAND, B., 2010. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol*. 34(12), 1820-1829, doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f6a912.
22. CHAN, A. O., BROADDUS, R. R., HOULIHAN, P. S., ISSA, J. P., HAMILTON, S. R., RASHID, A., 2002. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol*. 160(5), 1823-1830, doi: 10.1016/S0002-9440(10)61128-5.
23. JENKINS, M. A., BAGLIETTO, L., DOWTY, J. G., VAN VLIET, C. M., SMITH, L., MEAD, L. J., MACRAE, F. A., ST JOHN, D. J., JASS, J. R., GILES, G. G.,

- HOPPER, J. L., SOUTHEY, M. C., 2006. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 4(4), 489-498, doi: 10.1016/j.cgh.2006.01.002.
24. KACEROVSKÁ, D., KAZAKOV, D. V., ČERNÁ, K., HADRAVSKÝ, L., MICHAL, M., JR., DOSTÁL, J., SKÁLOVÁ, A., JR., MICHAL, M., 2010. Muir-Torre syndrom - fenotypická varianta Lynchova syndromu. *Cesk Patol.* 46(4), 86-94, ISSN: 1210-7875.
25. KASTRINOS, F., STOFFEL, E. M., BALMANA, J., STEYERBERG, E. W., MERCADO, R., SYNGAL, S., 2008. Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 17(8), 2044-2051, doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0301.
26. KOKOŠKOVÁ, B., DAUM, O., BENEŠ, Z., DUŠEK, M., STEHLÍK, J., ČERNÁ, K., HADRAVSKÝ, L., MICHAL, M., 2014. Moderní diagnostika Lynchova syndromu. *Gastroent a Hepatol.* 68(2), 157-165, doi: 1804-7874
27. KUAN, S. F., NAVINA, S., CRESSMAN, K. L., PAI, R. K., 2014. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. *Hum Pathol.* 45(3), 464-472, doi: 10.1016/j.humpath.2013.10.026.
28. LEACH, F. S., NICOLAIDES, N. C., PAPADOPOULOS, N., LIU, B., JEN, J., PARSONS, R., PELTOMAKI, P., SISTONEN, P., AALTONEN, L. A., NYSTROM-LAHTI, M., ET AL., 1993. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 75(6), 1215-1225, ISSN: 0092-8674.
29. LIGTENBERG, M. J., KUIPER, R. P., CHAN, T. L., GOOSSENS, M., HEBEDA, K. M., VOORENDT, M., LEE, T. Y., BODMER, D., HOENSELAAR, E., HENDRIKS-CORNELISSEN, S. J., TSUI, W. Y., KONG, C. K., BRUNNER, H. G., VAN KESSEL, A. G., YUEN, S. T., VAN KRIEKEN, J. H., LEUNG, S. Y., HOOGERBRUGGE, N., 2009. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature Genetics.* 41(1), 112-117, doi: 10.1038/ng.283.

30. LICHNOVSKÝ, V., MALÍNSKÝ, J., 2009. *Přehled histologie člověka v obrazech 2. díl*. 2 ed. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 190 s. ISBN 978-80-244-2277-0.
31. LINDOR, N. M., RABE, K., PETERSEN, G. M., HAILE, R., CASEY, G., BARON, J., GALLINGER, S., BAPAT, B., ARONSON, M., HOPPER, J., JASS, J., LEMARCHAND, L., GROVE, J., POTTER, J., NEWCOMB, P., TERDIMAN, J. P., CONRAD, P., MOSLEIN, G., GOLDBERG, R., ZIOGAS, A., ANTON-CULVER, H., DE ANDRADE, M., SIEGMUND, K., THIBODEAU, S. N., BOARDMAN, L. A., SEMINARA, D., 2005. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *Jama*. 293(16), 1979-1985, doi: 10.1001/jama.293.16.1979.
32. LYNCH, H. T., SHAW, M. W., MAGNUSON, C. W., LARSEN, A. L., KRUSH, A. J., 1966. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med*. 117(2), 206-212, ISSN: 0003-9926.
33. LYNCH, H. T., KRUSH, A. J., 1971. Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer*. 27(6), 1505-1511, ISSN: 0008-543X.
34. LYNCH, H. T., DE LA CHAPELLE, A., 1999. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *Journal of Medical Genetics*. 36(11), 801-818, ISSN: 0022-2593.
35. MURPHY, K. M., ZHANG, S., GEIGER, T., HAFEZ, M. J., BACHER, J., BERG, K. D., ESHLEMAN, J. R., 2006. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers. *J Mol Diagn*. 8(3), 305-311, doi: 10.2353/jmoldx.2006.050092.
36. Návod N-G-57. Bioptická laboratoř Plzeň. Zpracoval/a: ŠEDIVCOVÁ, M., Verze 06. 2015
37. NEČAS, O., 2000. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3. vydání. Jinočany: H & H. 554 s. ISBN 80-86022-46-3.
38. PAI, R. K., SHADRACH, B. L., CARVER, P., HEALD, B., MOLINE, J., CHURCH, J., KALADY, M. F., BURKE, C. A., PLESEC, T. P., LAI, K. K., GONZALO, D. H., 2014. Immunohistochemistry for annexin A10 can distinguish sporadic from Lynch syndrome-associated microsatellite-unstable colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 38(4), 518-525, doi: 10.1097/PAS.0000000000000148.

39. PATIL, D. T., MA, S., KONISHI, M., CARVER, P. D., PUKAY, M., BEADLING, C., CORLESS, C. L., RUBIN, B. P., 2015. Utility of BRAF V600E mutation-specific immunohistochemistry in detecting BRAF V600E-mutated gastrointestinal stromal tumors. *Am J Clin Pathol.* 144(5), 782-789, doi: 10.1309/AJCPRK3V2EIIUPQZ.
40. PELTOMAKI, P., LOTHE, R. A., AALTONEN, L. A., PYLKKANEN, L., NYSTROM-LAHTI, M., SERUCA, R., DAVID, L., HOLM, R., RYBERG, D., HAUGEN, A., ET AL., 1993. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.* 53(24), 5853-5855, ISSN: 0008-5472.
41. Pracovní postup SUP/002/04. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 04. 2016a
42. Pracovní postup SUP/005/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03. 2014a
43. Pracovní postup SUP/006/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03. 2014b
44. Pracovní postup SUP/007/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03. 2014c
45. Pracovní postup SUP/003/04. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 04. 2016b
46. Pracovní postup SUP/008/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03. 2014d
47. Pracovní postup SUP/015/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03. 2016c
48. Pracovní postup SUP/014/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03. 2016d
49. POVÝŠIL, C., ŠTEINER, I., 2007. *Speciální patologie*. 2. vydání. Praha: Galén - Karolinum. 430 s. ISBN 978-80-246-1442-7.
50. ROSYPAL, S., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., KAILEROVÁ, J., RELICHOVÁ, J., RŮŽIČKOVÁ, V., ŠMARDA, J., ŠTĚPÁN, J., 2001. *Terminologie molekulární biologie. České odborné termíny, definice a anglické ekvivalenty*. Brno: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc. 300 s. ISBN 80-902562-3-6.

51. ROSYPAL, S., 2005. *Úvod do molekulární biologie II*. 4. vydání. Brno: Prof. RNDr. Stanislav Rosypal, DrSc. 280 s. ISBN 80-902562-5-2.
52. SHIA, J., 2008. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn*. 10(4), 293-300, doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031.
53. Standard SOPV/SUP/005/06. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 08. 2016
54. Standard SOP-09. Bioptická laboratoř Plzeň. Zpracoval/a: VANĚČEK, T., Verze 06. 2014a
55. Standard SOP-10. Bioptická laboratoř Plzeň. Zpracoval/a: VANĚČEK, T., Verze 06. 2014b
56. Standard SOP-11. Bioptická laboratoř Plzeň. Zpracoval/a: VANĚČEK, T., Verze 04. 2014c
57. THIBODEAU, S. N., BREN, G., SCHAID, D., 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 260(5109), 816-819, ISSN: 0036-8075.
58. UMAR, A., BOLAND, C. R., TERDIMAN, J. P., SYNGAL, S., DE LA CHAPELLE, A., RUSCHOFF, J., FISHEL, R., LINDOR, N. M., BURGART, L. J., HAMELIN, R., HAMILTON, S. R., HIATT, R. A., JASS, J., LINDBLOM, A., LYNCH, H. T., PELTOMAKI, P., RAMSEY, S. D., RODRIGUEZ-BIGAS, M. A., VASEN, H. F., HAWK, E. T., BARRETT, J. C., FREEDMAN, A. N., SRIVASTAVA, S., 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 96(4), 261-268, ISSN: 1460-2105.
59. VACEK, Z., 1995a. *Histologie a histologická technika 2. díl*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. 184 s. ISBN 80-7013-202-7.
60. VACEK, Z., 1995b. *Histologie a histologická technika 1. díl*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. 332 s. ISBN 80-7013-201-9.
61. VASEN, H. F., MECKLIN, J. P., KHAN, P. M., LYNCH, H. T., 1991. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*. 34(5), 424-425, ISSN: 0012-3706.

62. WARTHIN, A. S., 1913. Heredity with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med.* 12(5), 546-555, ISSN: 0003-9926.

8 PŘÍLOHY

Příloha 1: Obrazová dokumentace



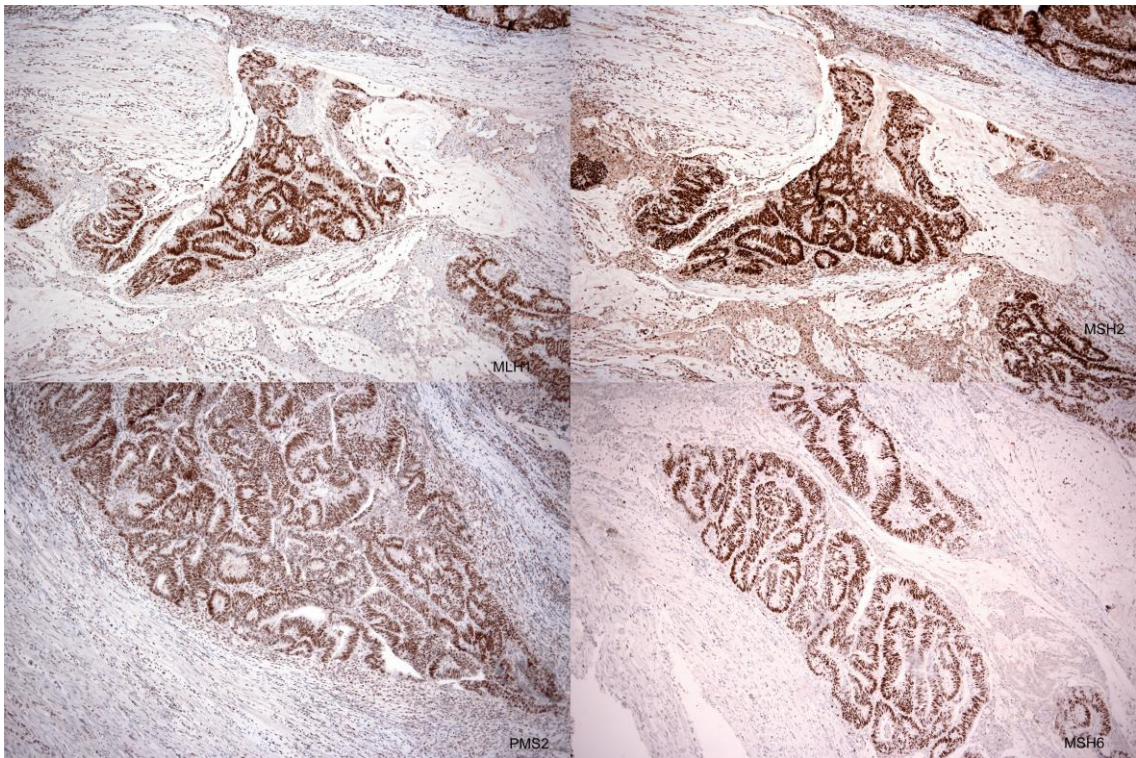
Obrázek 1: Barvicí automat BenchMark ULTRA VENTANA, (vlastní zdroj)



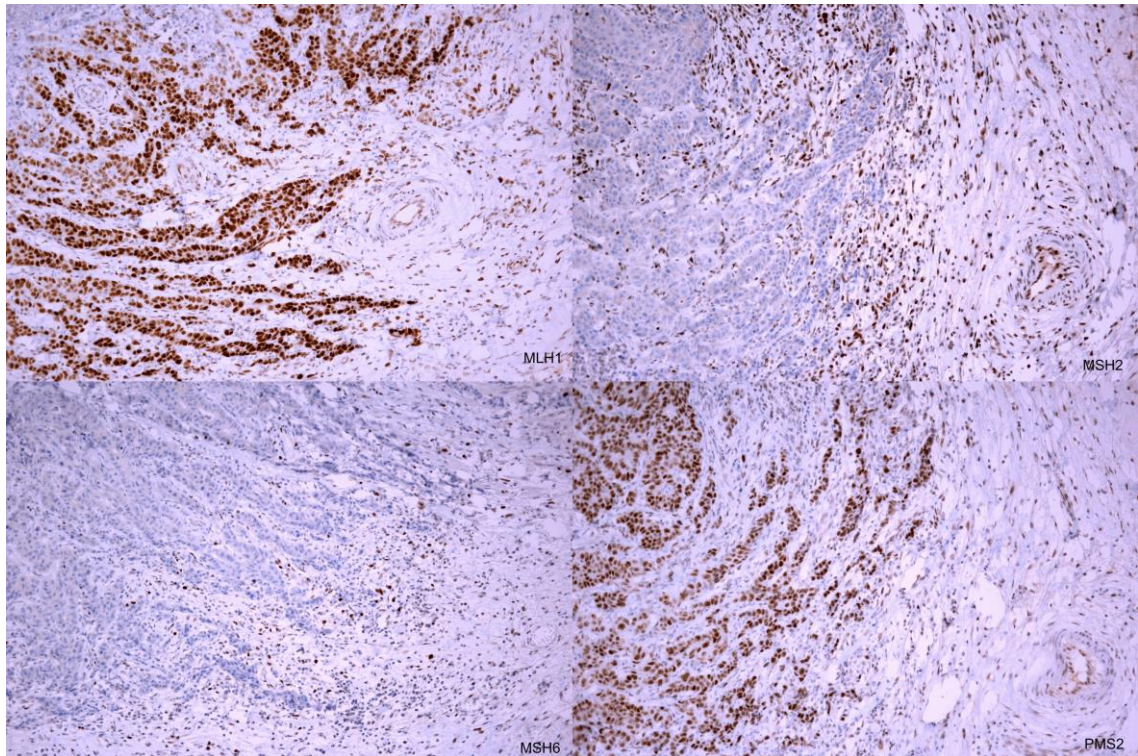
Obrázek 2: Universal DAB Detection Kit, Hematoxylin II, Bluing reagent, (vlastní zdroj)



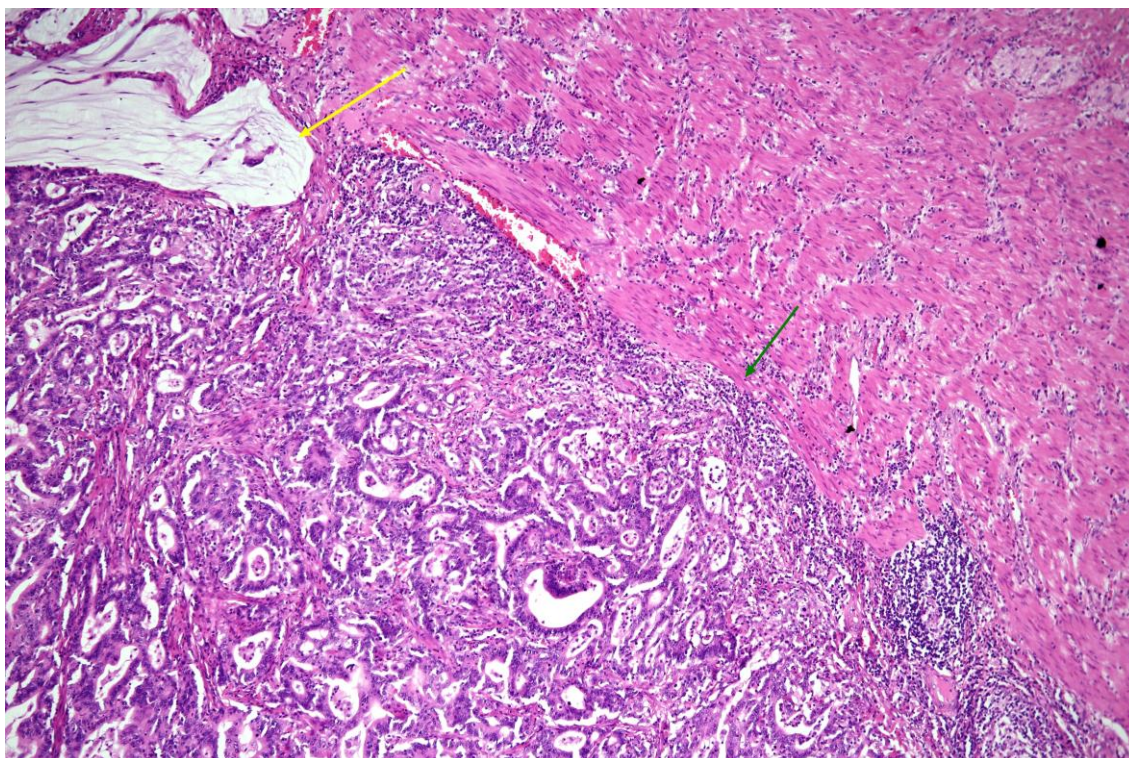
Obrázek 3: Umístění zásobních roztoků v BenchMark ULTRA, (vlastní zdroj)



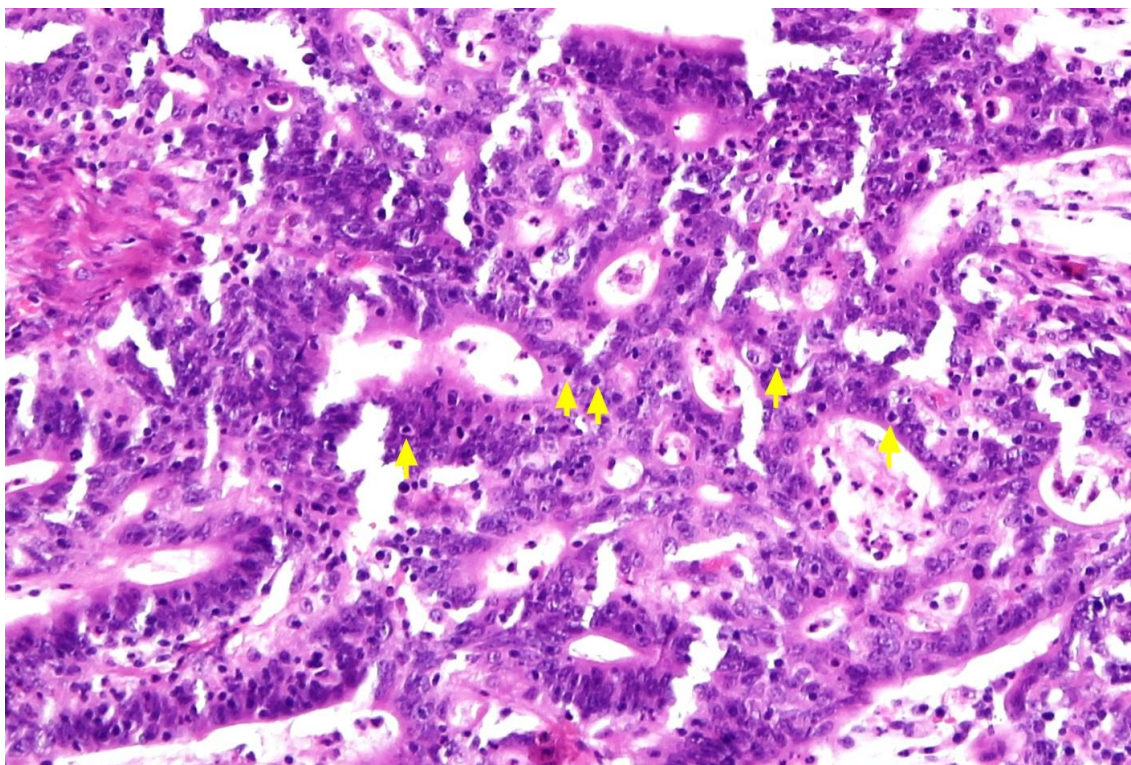
Obrázek 4: V MMR-pozitivních tumorech je exprese všech 4 proteinů zachována (vlastní zdroj, MMR-pozitivní případ č. 9)



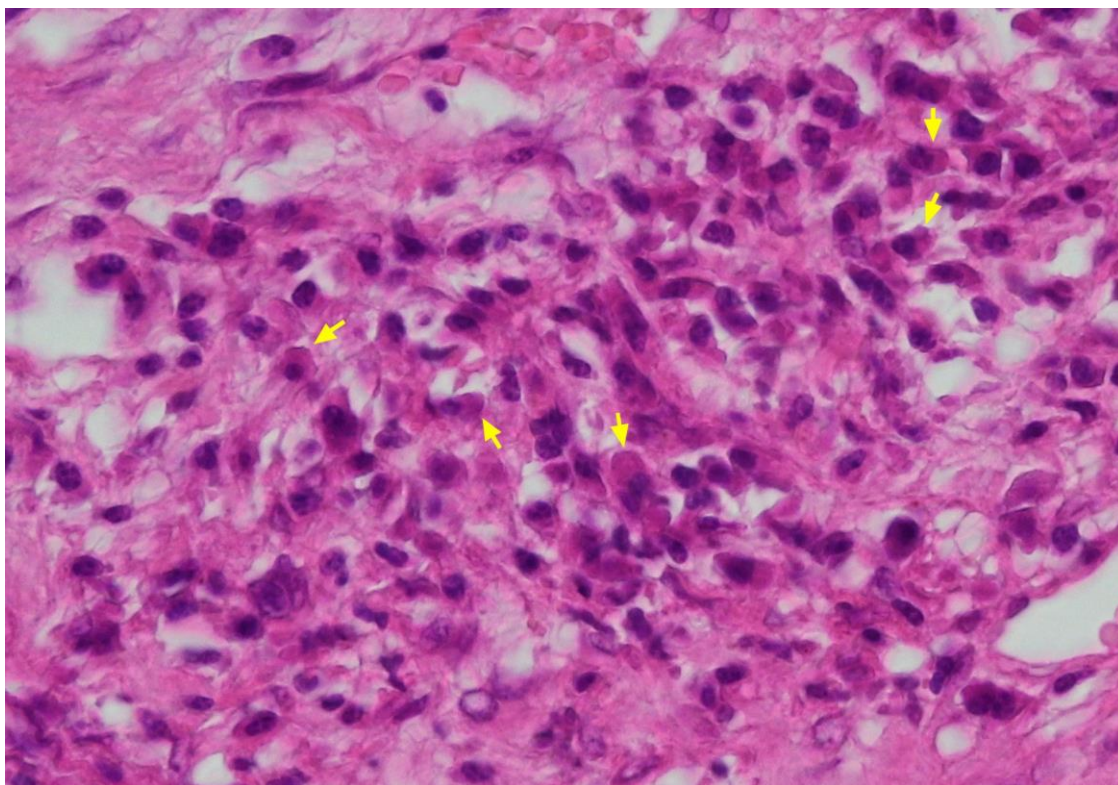
Obrázek 5: V MMR-deficientních nádorech je průkaz alespoň jednoho MMR proteinu negativní, zde konkrétně MSH2 a MSH6 (vlastní zdroj, MMR-deficientní případ č. 21)



Obrázek 6: Mucin disekující stroma (žlutá šipka) a peritumorální lymfoidní lem (zelená šipka svědčící pro MSI-H tumor (vlastní zdroj, MMR-deficientní případ č. 4, HE, zvětšení 40x).



Obrázek 7: Lymfocyty infiltruující nádor (několik označeno žlutými šipkami) jako znak MSI-H tumoru (vlastní zdroj, MMR-deficientní případ č. 6, HE, zvětšení 200x)



Obrázek 8: Plasmatické buňky (několik označeno žlutými šipkami) tvoří podstatnou část populace leukocytů v tomto MSI-H tumoru (vlastní zdroj, MMR-deficientní případ č. 12, HE, zvětšení 400x)

Příloha 2: Tabulky

Tabulka 4: MMR-pozitivní tumory

No.	Semi PREDICT	IHC deficit	MSI	BRAF V600E	MLH1M	pohlaví	věk
1	3	0	neg.	neg.	neg.	žena	45
2	2	0	neg.	neg.	neg.	muž	82
3	2	0	neg.	neg.	neg.	muž	84
4	2	0	neg.	neg.	neg.	muž	63
5	5	0	neg.	neg.	neg.	muž	62
6	2	0	neg.	neg.	neg.	žena	71
7	2	0	neg.	neg.	neg.	muž	65
8	2	0	neg.	neg.	neg.	muž	70
9	1	0	neg.	neg.	neg.	muž	68
10	4	0	neg.	neg.	neg.	muž	64
11	0	0	neg.	neg.	neg.	žena	53
12	1	0	neg.	neg.	neg.	žena	81
13	0	0	neg.	neg.	neg.	muž	70
14	4	0	neg.	neg.	neg.	muž	77
15	0	0	neg.	neg.	neg.	muž	53
16	2	0	neg.	neg.	neg.	žena	63
17	3	0	neg.	neg.	neg.	muž	58
18	1	0	neg.	neg.	neg.	muž	78
19	1	0	neg.	neg.	neg.	muž	69
20	1	0	neg.	neg.	neg.	žena	60
21	1	0	neg.	neg.	neg.	žena	69
22	2	0	neg.	neg.	neg.	muž	81
23	1	0	neg.	neg.	neg.	žena	61
24	1	0	neg.	neg.	neg.	muž	69
25	0	0	neg.	neg.	neg.	muž	81

(vlastní zdroj)

Tabulka 5: MMR-deficientní tumory

No.	Semi PREDICT	IHC deficit	MSI	BRAF V600E	MLH1M	MMR mutace	pohlaví	věk
1	2	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	žena	80
2	3	MLH1 a PMS2	poz.	neg.	poz.	NV	žena	63
3	3	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	žena	86
4	5	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	žena	68
5	3	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	muž	70
6	3	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	žena	74
7	3	MLH1 a PMS2	poz.	neg.	poz.	NV	žena	79
8	2	MLH1 a PMS2	neg.	poz.	poz.	NV	muž	78
9	2	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	žena	71
10	3	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	muž	77
11	3	MLH1 a PMS2	poz.	neg.	poz.	NV	žena	42
12	1	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	žena	64
13	2	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	muž	75
14	0	MLH1 a PMS2	poz.	neg.	poz.	NV	žena	63
15	3	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	muž	63
16	3	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	žena	90
17	2	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	žena	82
18	1	MLH1 a PMS2	poz.	neg.	poz.	NV	žena	75
19	2	MLH1 a PMS2	poz.	poz.	poz.	NV	žena	68
20	1	MLH1 a PMS2	poz.	neg.	poz.	NV	žena	80
21	4	MSH2 a MSH6	neg.	neg.	neg.	MSH2	muž	60
22	3	MSH6	poz.	neg.	neg.	MSH6	žena	52
23	3	MSH6	poz.	neg.	poz.	MSH6	žena	42
24	5	MLH1 a PMS2	neg.	neg.	neg.	MLH1	žena	60
25	2	MSH2 a MSH6	NV	NV	NV	MSH2	žena	44

(vlastní zdroj)

Příloha 3: Pracovní protokoly BenchMark ULTRA Ventana

Souhrn protokolů Procedura: U ultraView DAB (v1.02.0018) BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module FN Plzen, alej Svobody Plzen

Č protokolu	Název protokolu	Datum vytvoření
135	BRAF SPR	03.12.2012

- 1 Sušení [Zvoleno]
- 2 Zahřát skla na [75 st. C] a inkubovat po dobu [4 minuty] (Sušení)
- 3 Odparafinování [Zvoleno]
- 4 Ohřát sklička na [72 st. C] z Střední teploty (Odparafinování)
- 5 Kondicionování buněk [Zvoleno]
- 6 ULTRA Conditioner #1 [Zvoleno]
- 7 Zahřát skla na [95 st. C] a inkubovat po dobu 8 minut (Kondicionér buněk č.1)
- 8 20 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 9 36 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 10 52 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 11 Teploty inkubace protilátky [Zvoleno]
- 12 Zahřát skla na [37 st. C] a inkubovat po dobu 4 minuty (Protilátka)
- 13 Titrace [Zvoleno]
- 14 Hand Apply (Primární protilátka), and Incubate for [0 h 20 min]
- 15 ultraWash [Zvoleno]
- 16 Jádrové barvení [Zvoleno]
- 17 Aplikovat jednu kapku [HEMATOXYLIN II] (Jádrové barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [4 minuty]
- 18 Po jádrovém barvení [Zvoleno]
- 19 Aplikovat jednu kapku [BLUING REAGENT] (Po jádrovém barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [4 minuty]

* jedna kapka je jedna dávka reagentie
FN Plzen, alej Svobody Plzen
VSS v12.3 Build 0055

Vytisknuto 20.03.2017 12:54:20
Strana 1 z 1

Protokol 1: Pracovní protokol IHC BRAF (vlastní zdroj)

Souhrn protokolů
Procedura: U ultraView DAB (v1.02.0018)
BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module
FN Plzeň, alej Svobody Plzeň

Č. protokolu	Název protokolu	Datum vytvoření
29	MSH6 aVM	29.04.2014

- 1 Sušení [Zvoleno]
- 2 Zahřát skla na [72 st. C] a inkubovat po dobu [4 minuty] (Sušení)
- 3 Odparafinování [Zvoleno]
- 4 Ohřát sklíčka na [72 st. C] z Střední teploty (Odparafinování)
- 5 Kondicionování buněk [Zvoleno]
- 6 ULTRA Conditioner #1 [Zvoleno]
- 7 Zahřát skla na [95 st. C] a inkubovat po dobu 8 minut (Kondicionér buněk č.1)
- 8 20 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 9 36 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 10 52 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 11 Teploty inkubace protilátky [Zvoleno]
- 12 Zahřát skla na [37 st. C] a inkubovat po dobu 4 minuty (Protilátka)
- 13 Protilátka [Zvoleno]
- 14 Aplikovat jednu kapku [anti-MSH6 (44)] (Protilátka), zakrýt a inkubovat po dobu [0 h 40 min]
- 15 Amplifikace [Zvoleno]
- 16 Amp myší protilátky [Zvoleno]
- 17 Jádrové barvení [Zvoleno]
- 18 Aplikovat jednu kapku [HEMATOXYLIN II] (Jádrové barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [8 minut]
- 19 Po jádrovém barvení [Zvoleno]
- 20 Aplikovat jednu kapku [BLUING REAGENT] (Po jádrovém barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [4 minuty]

* jedna kapka je jedna dávka reagensie
 FN Plzeň, alej Svobody Plzeň
 VSS v12.3 Build 0055

Vytisknuto 20.03.2017 12:52:47
 Strana 1 z 1

Protokol 2: Pracovní protokol IHC MSH6 (vlastní zdroj)

Souhrn protokolů
Procedura: U ultraView DAB (v1.02.0018)
BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module
FN Plzeň, alej Svobody Plzeň

Č. protokolu	Název protokolu	Datum vytvoření
30	PMS2 aVM	29.04.2014

- 1 Sušení [Zvoleno]
- 2 Zahřát skla na [72 st. C] a inkubovat po dobu [4 minuty] (Sušení)
- 3 Odparafinování [Zvoleno]
- 4 Ohřát sklíčka na [72 st. C] z Střední teploty (Odparafinování)
- 5 Kondicionování buněk [Zvoleno]
- 6 ULTRA Conditioner #1 [Zvoleno]
- 7 Zahřát skla na [95 st. C] a inkubovat po dobu 8 minut (Kondicionér buněk č.1)
- 8 20 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 9 36 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 10 52 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 11 64 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 12 76 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 13 Teploty inkubace protilátky [Zvoleno]
- 14 Zahřát skla na [37 st. C] a inkubovat po dobu 4 minuty (Protilátka)
- 15 Protilátka [Zvoleno]
- 16 Aplikovat jednu kapku [PMS2 (EPR3947)] (Protilátka), zakrýt a inkubovat po dobu [0 h 40 min]
- 17 Amplifikace [Zvoleno]
- 18 Ampule králíčí protilátky [Zvoleno]
- 19 Jádrové barvení [Zvoleno]
- 20 Aplikovat jednu kapku [HEMATOXYLIN II] (Jádrové barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [8 minut]
- 21 Po jádrovém barvení [Zvoleno]
- 22 Aplikovat jednu kapku [BLUING REAGENT] (Po jádrovém barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [4 minuty]

* jedna kapka je jedna dávka reagensie
 FN Plzeň, alej Svobody Plzeň
 VSS v12.3 Build 0055

Vytisknuto 20.03.2017 12:52:54
 Strana 1 z 1

Protokol 3: Pracovní protokol IHC PMS2 (vlastní zdroj)

Souhrn protokolů
Procedura: U ultraView DAB (v1.02.0018)
BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module
FN Plzeň, alej Svobody Plzeň

Č. protokolu	Název protokolu	Datum vytvoření
31	MLH1 aVM	29.04.2014

- 1 Sušení [Zvoleno]
- 2 Zahřát skla na [72 st. C] a inkubovat po dobu [4 minuty] (Sušení)
- 3 Odparafinování [Zvoleno]
- 4 Ohřát sklička na [72 st. C] z Střední teploty (Odparafinování)
- 5 Kondicionování buněk [Zvoleno]
- 6 ULTRA Conditioner #1 [Zvoleno]
- 7 Zahřát skla na [95 st. C] a inkubovat po dobu 8 minut (Kondicionér buněk č.1)
- 8 20 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 9 36 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 10 52 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 11 64 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 12 Teploty inkubace protilátky [Zvoleno]
- 13 Zahřát skla na [37 st. C] a inkubovat po dobu 4 minuty (Protilátka)
- 14 Protilátka [Zvoleno]
- 15 Aplikovat jednu kapku [MLH-1 (M1)] (Protilátka), zakrýt a inkubovat po dobu [0 h 40 min]
- 16 Amplifikace [Zvoleno]
- 17 Amp myší protilátky [Zvoleno]
- 18 Jádrové barvení [Zvoleno]
- 19 Aplikovat jednu kapku [HEMATOXYLIN II] (Jádrové barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [8 minut]
- 20 Po jádrovém barvení [Zvoleno]
- 21 Aplikovat jednu kapku [BLUING REAGENT] (Po jádrovém barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [4 minuty]

* jedna kapka je jedna dávka reagensie
 FN Plzeň, alej Svobody Plzeň
 VSS v12.3 Build 0055

Vytisknuto 20.03.2017 12:53:02
 Strana 1 z 1

Protokol 4: Pracovní protokol IHC MLH1 (vlastní zdroj)

Souhrn protokolů
Procedura: U ultraView DAB (v1.02.0018)
BenchMark ULTRA IHC/ISH Staining Module
FN Plzen, alej Svobody Plzen

Č protokolu	Název protokolu	Datum vytvoření
32	MSH2 aVM	29.04.2014

- 1 Sušení [Zvoleno]
- 2 Zahřát skla na [72 st. C] a inkubovat po dobu [4 minuty] (Sušení)
- 3 Odparafinování [Zvoleno]
- 4 Ohřát sklíčka na [72 st. C] z Střední teploty (Odparafinování)
- 5 Kondicionování buněk [Zvoleno]
- 6 ULTRA Conditioner #1 [Zvoleno]
- 7 Zahřát skla na [95 st. C] a inkubovat po dobu 8 minut (Kondicionér buněk č.1)
- 8 20 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 9 36 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 10 52 minut při použití lahve ULTRA CC1 [Zvoleno]
- 11 Teploty inkubace protilátky [Zvoleno]
- 12 Zahřát skla na [37 st. C] a inkubovat po dobu 4 minuty (Protilátka)
- 13 Protilátka [Zvoleno]
- 14 Aplikovat jednu kapku [MSH-2] (Protilátka), zakrýt a inkubovat po dobu [0 h 40 min]
- 15 Amplifikace [Zvoleno]
- 16 Amp myši protilátky [Zvoleno]
- 17 Jádrové barvení [Zvoleno]
- 18 Aplikovat jednu kapku [HEMATOXYLIN II] (Jádrové barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [8 minut]
- 19 Po jádrovém barvení [Zvoleno]
- 20 Aplikovat jednu kapku [BLUING REAGENT] (Po jádrovém barvení), zakrýt a inkubovat po dobu [4 minuty]

* jedna kapka je jedna dávka reagensie
 FN Plzen, alej Svobody Plzen
 VSS v12.3 Build 0055

Vytisknuto 20.03.2017 12:53:08
 Strana 1 z 1

Protokol 5: Pracovní protokol IHC MSH2 (vlastní zdroj)

9 SEZNAM ZKRATEK

BRAF – Rapidly Accelerated Fibrosarcoma homolog B
CMMRD – Constitutional Mismatch Repair Deficiency
CRC – Colorectal Cancer (Kolorektální karcinom)
DAB – Diaminobenzidin
DNA – Deoxyribonucleic Acid
EPCAM – Epithelial Cell Adhesion Molecule
FAP – Familiární adenomatózní polypóza
HNPCC – Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer
IHC – Immunohistochemistry (Imunohistochemie)
MMR – Mismatch Repair
MPLA – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MSI – Microsatellite Instability
MSI-H – Microsatellite Instability-High
MSI-L – Microsatellite Instability-Low
MSS – Microsatellite Stable
MLH1 – Mut L Homolog 1
MSH2 – Mut S Homolog 2
MSH3 – Mut S Homolog 3
MSH6 – Mut S Homolog 6
MTS – Muir-Torreho syndrom
NCI – National Cancer Institute
LS – Lynchův syndrom
PMS2 – Postmeiotic Segregation Increased 2
PCR – Polymerase Chain Reaction (Polymerázová řetězová reakce)
RNA – Ribonucleic Acid
RBG – Revidovaná Bethesda guidelines
SOP – Standardní operační postup
SUP – Šiklův ústav patologie
TIL – Tumor infiltrující lymfocyty