



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Lynchův syndrom u pacientů s uroteliálním
karcinomem horních cest močových: Zkušenosti
jednoho centra

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **ZDRAVOTNÍ LABORANT**

Autor: Karolína Buchová

Vedoucí práce: MUDr. Kristýna Pivovarčíková, Ph.D.

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Lynchův syndrom u pacientů s uroteliálním karcinomem horních cest močových: Zkušenosti jednoho centra“ 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 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 práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 6. 2020

Poděkování

Ráda bych poděkovala MUDr. Kristýně Pivovarčíkové, Ph.D. za odborné vedení a skvělou spolupráci.

Dále bych ráda poděkovala Vladimíře Maxové (úseková vedoucí laborantka Laboratoře speciální diagnostiky, Šiklův ústav patologie FN Plzeň) a Bc. Lence Krausové (vrchní laborantka Šiklova ústavu patologie FN Plzeň) za seznámení s laboratorním prostředím a speciálními histologickými technikami.

Také děkuji své rodině a přátelům za velkou podporu.

Podpořeno programem rozvoje vědních oborů Karlovy univerzity (Projekt Q39) a MZ ČR RVO (Fakultní nemocnice Plzeň – FNPI, 00669806).

Lynchův syndrom u pacientů s uroteliálním karcinomem horních cest močových: Zkušenosti jednoho centra

Abstrakt

Lynchův syndrom (LS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění, které predisponuje postižené jedince k rozvoji malignit různých orgánů (tlustého střeva, dělohy, horního močového traktu atd.) již v mladém/středním věku. Prezentovaná bakalářská práce si klade za cíl shrnout dosavadní znalosti a zkušenosti o LS u pacientů s uroteliálním karcinomem (UC) horních cest močových, stanovit frekvenci výskytu LS u těchto pacientů a navrhnout vhodný diagnostický algoritmus i způsob, jak co nejspolehlivěji vytipovat v běžné populaci suspektní pacienty, kteří by měli podstoupit další genetické testování.

V rámci bakalářské práce byli retrospektivně vyhledáni a opětovně hodnoceni všichni pacienti léčení na urologické klinice FN Plzeň pro UC horních cest močových v období I/2010 – XII/2018. U vybraných případů bylo provedeno imunohistochemické barvení tzv. MMR proteinů (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) a statistické vyhodnocení výsledků.

Celkem bylo v daném období nalezeno 215 vyšetření od 182 pacientů (58 UC močovodu, 119 UC renální pánvičky, 5 UC současně močovodu i renální pánvičky). Imunohistochemicky pak bylo vyšetřeno celkem 121 pacientů (44 UC močovodu, 73 UC renální pánvičky, 4 UC současně močovodu i renální pánvičky). Ztráta exprese některého z MMR proteinů (upozorňující na možnost genetické mutace některého z genů zodpovědných za LS) byla prokázána u 9/121 imunohistochemicky vyšetřených případů. Definitivní vyšetření periferní krve pro průkaz zárodečné mutace daného genu a konečné stanovení diagnózy LS bylo provedeno jen u dvou pacientů (2%). U jednoho pacienta (muž, 71 let) byla definitivně potvrzena zárodečná mutace genu *MSH6* z periferní krve. Druhý pacient (muž, 73 let) na definitivní potvrzení diagnózy z periferní krve toho času čeká (vzhledem anamnéze kolorektálního adenokarcinomu a k nálezu deficitu exprese proteinu *MSH6* nejen v UC, ale právě i v dříve diagnostikovaném kolorektálním adenokarcinomu, se však u tohoto pacienta jedná o suspekci hraničící s jistotou).

Na základě analyzovaných dat doporučujeme u každého pacienta s UC horních cest močových, bez ohledu na věk a jeho anamnézu, rutinní provádění

imunohistochemických barvení MMR proteinů. Tzv. univerzální imunohistochemický screening u pacientů s UC horních cest močových je dobrý a výtěžný způsob, jak vytipovat suspektní pacienty, kteří by měli podstoupit další genetická vyšetření.

Klíčová slova

Horní cesty močové; imunohistochemie; Lynchův syndrom; MMR; uroteliální karcinom

Lynch syndrome in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma: One centre study

Abstract

Lynch syndrome (LS) is an inherited autosomal dominant (AD) disease with predisposition for cancer development in different organs (large intestine, uterus, upper urinary tract, etc.). Typically, young or middle age individuals are affected by cancer. Presented bachelor thesis summarizes the current knowledge about LS in patients with urothelial carcinoma (UC) of the upper urinary tract. We tried to determine the frequency of LS in patients with urothelial carcinoma of the upper urinary tract and design a suitable diagnostic algorithm how to identify suspect patients appropriate for further genetic testing.

In the practical part of the thesis, we searched for all patients treated on Urology department Faculty Hospital in Pilsen for UC of the upper urinary tract in the time period I/2010 - XII/2018. All cases were re-evaluated. Immunohistochemical staining of MMR proteins (MLH1, PMS2, MSH2, MSH6) was performed in selected cases. Obtained data were evaluated statistically.

We found 215 examinations/biopsies from 182 patients (58 UC of the ureter, 119 UC of the renal pelvis, 5 UC of both the ureter and the renal pelvis). 121 patients were examined by immunohistochemistry (44 UC of the ureter, 73 UC of the renal pelvis, 4 UC of both the ureter and the renal pelvis). Lost expression of some MMR protein was demonstrated in 9/121 examined cases. Definitive examination of peripheral blood for detection of germline mutation was performed in only two patients (2%). One patient (male, 71 years) has confirmed germline mutation of *MSH6* gene from peripheral blood. The second patient (male, 73 years) is still waiting for a definitive confirmation of the diagnosis from peripheral blood (patient has a high suspicion for Lynch syndrome, he has personal history of colorectal carcinoma, deficiency of MSH6 protein expression was found in UC of upper urinary tract even in colorectal carcinoma).

Based on here presented data, we recommend routine immunohistochemical staining of MMR proteins in all patients with UC of upper urinary tract, regardless of their age or medical history. Universal immunohistochemical screening

in patients with UC of upper urinary tract is a good and yielding way how to identify suspicious patients for genetic testing of LS.

Key words

Immunohistochemistry; Lynch syndrome; MMR; upper urinary tract, urothelial carcinoma

OBSAH

ÚVOD.....	10
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1.1 Lynchův syndrom.....	11
1.1.1 Molekulárně genetický podklad Lynchova syndromu	11
1.2 Diagnostika Lynchova syndromu	12
1.2.1 Klinická kritéria.....	12
1.2.2 Hodnocení přímo v resekované tkáni	14
1.2.3 Molekulárně genetické vyšetření z periferní krve	16
1.3 Obecná stavba urogenitálního traktu.....	19
1.3.1 Anatomická stavba urogenitálního traktu.....	19
1.4 Histologická stavba vývodných cest močových	20
1.4.1 Horní cesty močové (renální kalichy, renální pánvička, močovod).....	20
1.4.2 Dolní cesty močové (močový měchýř a močová trubice).....	21
1.5 Nádory vývodného močového traktu	23
1.5.1 Histologické typy nádorů vývodného močového traktu – základní přehled	23
1.6 Lynchův syndrom a uroteliální karcinom	24
1.6.1 Péče o pacienty s LS ve vztahu k nádorům močového traktu	26
2 CÍL PRÁCE.....	27
2.1 Hlavní cíl.....	27
2.2 Dílčí cíle	27
3 MATERIÁL A METODIKA	28
3.1 Obecná příprava trvalého preparátu pro histologické hodnocení	28
3.1.1 Fixace a příjem materiálu na pracoviště patologie	29
3.1.2 Makroskopický popis a přikrojení bioptického vzorku.....	30
3.1.3 Odvodnění, projasnění a prosycení tkáně parafínem ve tkáňovém procesoru	30
3.1.4 Vlastní zalévání	31
3.1.5 Krájení parafinových řezů	31
3.1.6 Natahování parafinových řezů na podložní sklo	32
3.1.7 Odparafinování a zavodňování řezů.....	32

3.1.8	Barvení histologických preparátů.....	33
3.2	Imunohistochemie	33
3.2.1	Protilátky	33
3.2.2	Vlastní imunohistochemické barvení	34
3.3	Vlastní hodnocení histologických preparátů	35
4	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ.....	38
4.1	Obecná charakteristika souboru	38
4.2	Pacienti s nádorem renální pánvičky (C65)	41
4.3	Pacienti s nádorem močovodu (C66)	41
4.4	Pacienti s nádorem konkurentně v renální pánvičce i v močovodu	42
4.5	Imunohistochemický průkaz MMR proteinů	42
4.5.1	Pacienti s diagnózou C65	43
4.5.2	Pacienti s diagnózou C66	44
4.5.3	Pacienti se současnou diagnózou C65 a C66	45
4.5.4	Souhrn.....	45
5	DISKUZE	47
6	ZÁVĚR.....	53
7	LITERATURA	55
8	PŘÍLOHY	61
9	SEZNAM ZKRATEK	62

ÚVOD

Lynchův syndrom (LS) se v posledních letech dostává do podvědomí klinických lékařů, ovšem především ve spojení s kolorektálním karcinomem (KRK). I když je syndrom asociován se vznikem dalších malignit v různých orgánech, jsou tyto (včetně neoplázií horních cest močových) často opomíjeny a i literatura se většinou zaměřuje spíše na výzkum LS ve spojení s KRK či karcinomem endometria. Při záchytu uroteliálního karcinomu (UC) v oblasti horních močových cest (tj. ledvinné pánvičky či ureterů) si velká část lékařů obvykle nedává do souvislosti výskyt této neoplázie a riziko přítomnosti LS u pacienta. Přitom po KRK a karcinomu endometria je UC horních cest močových považován za třetí nejčastější manifestaci tohoto onemocnění.

Jelikož je LS autozomálně dominantně dědičný, mohou být (a většinou tak i jsou) postiženi další rodinní příslušníci. Důsledné odhalování genetické zátěže u jednotlivců - probandů, tak má důsledky v rámci celé jeho rodiny a vede k odhalení množství potenciálně rizikových pacientů. Vzhledem k tomu, že UC horních cest močových je v rámci LS často opomíjenou malignitou, na vyšetřování pacientů s tímto nádorem se ze stran LS zapomíná. Proto v posledních letech sílí snahy dostat do podvědomí lékařské veřejnosti tuto asociaci a vypracovat automatizovaný rutinní postup u UC horních cest močových tak, aby vyšetřování odhalilo co možná největší množství suspektních pacientů, kteří mohou být potenciálními nosiči LS. Je pravdou, že vzniku nádorů v rámci LS nedokážeme zabránit žádnou léčbou (primární prevence neexistuje). Proto důležitost znalosti genetické zátěže u pacienta tkví v sekundární prevenci, tedy v pravidelném sledování, v aktivní snaze o záchyt neoplázie u mladších pacientů a odhalení neoplázie v co nejnižším stádiu.

V teoretické části je věnována pozornost horním cestám močovým. Blíže je popsána problematika LS a jeho spojitost právě s horním močovým traktem.

Praktická část popisuje vlastní soubor, se kterým bylo v rámci bakalářské práce pracováno. Nastíněn je způsob histologického zpracování vzorku, jeho hodnocení a postup imunohistochemického barvení pro průkaz přítomnosti či absence MMR proteinů. Výsledky jsou zpracovány základní deskriptivní statistikou, prezentují bazální demografická data. Stěžejní je analýza frekvence ztráty exprese některého z MMR proteinů, vyčleňující suspektní pacienty pro další genetické testování ze stran LS. V rámci bakalářské práce představujeme diagnostický algoritmus LS používaný ŠÚP, který z části vychází právě ze zde prezentovaných dat.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Lynchův syndrom

Lynchův syndrom (LS) je klinicky velmi důležitým autozomálně dominantně dědičným onemocněním. Jeho projevem je vznik rozmanitých malignit, postihujících různé orgány, nejčastěji u pacientů v mladých či středních letech. Neoplázie mohou vznikat z mazových žlázek v kůži (Muir-Torre syndrom), ve vaječnících, v žaludku, v tlustém střevě, v játrech, ve žlučových cestách, v mozku, i v prostatě (Hadravský et al., 2017).

Malignitu, která se však u pacientů s LS vyskytuje nejčastěji, představuje kolorektální karcinom (KRK). U žen s LS relativně často vzniká též karcinom sliznice dělohy - endometriální karcinom (uváděn jako druhý nejčastější typ nádoru u pacientů s LS). Dalším poměrně často se objevujícím typem neoplázie u těchto pacientů je uroteliální karcinom (UC), který vzniká explicitně v horních cestách močových (UUT), tj. postihuje ledvinné pánvičky a močovody.

Lynchův syndrom se odlišuje od jiných familiárních karcinomových syndromů s tzv. premorbidním fenotypem. Na rozdíl od nich je LS u pacienta odhalen teprve až po rozvoji onemocnění – tedy rozvoji nádoru u pacienta. Diagnostikován je analýzou vzniklé nádorové masy nebo po záchytu LS při genetickém testování u členů jeho rodiny. Muir-Torre syndrom (MTS) je výjimkou, vytváří kožní subaceózní tumory a stává se tak fenotypickou variantou LS (Kacerovská et al., 2010; Pai, 2016).

1.1.1 Molekulárně genetický podklad Lynchova syndromu

U LS je s největší pravděpodobností podkladem onemocnění zárodečná inaktivační mutace jednoho či více z DNA mismatch repair (MMR) genů. Následkem je ztráta nebo nedostatečná funkce některého z DNA MMR proteinů: MLH1, PMS2, MSH2, MSH6, PMS1, MSH3, MLH3. Tento proteinový systém by měl správně opravovat chybné párování bází na nově vzniklém vlákně při replikaci DNA.

DNA polymeráza je enzym (protein) účastnící se replikace DNA, pracuje s velkou rychlostí a může tak dát vznik chybné kopii, ve které došlo k adici, eliminaci nebo záměně nukleotidů. DNA MMR proteiny by měly nová vlákna kontrolovat a popřípadě vzniklé chyby napravit – podporují opravu DNA,

aktivují kontrolu buněčného cyklu, popř. spouští apoptózu, která by měla organismus bránit před poškozenou buňkou (Kolář, 2003; Hadravský et al., 2017).

Jestliže však tento systém nepracuje správně, závady na DNA přetrvávají, dalšími replikacemi se hromadí a postupem času se buňka maligně zvrhne. Nejvíce znalostí máme v současné době o proteinech MLH1, PMS2, MSH2, MSH6. Proteiny spolupracují ve dvojicích (např. MLH1/PMS2, MSH2/MSH6), kdy rozlišuje protein hlavní a vedlejší. S touto znalostí je třeba nakládat při hodnocení imunohistochemických barvení ve tkáni, neboť jestliže není přítomen protein hlavní, chybí současně i protein vedlejší, který není potřebný. Naopak, chybí-li protein vedlejší, protein hlavní je zachován (Hadravský et al., 2017).

V rámci LS jsou statisticky nejčastěji postiženy geny pro *MLH1* a *MSH2* (až 80% případů). Typickým znakem zachyceným u 85% nádorů ve spojitosti s LS je mikrosatelitní nestabilita (MSI). Na vině jsou právě defektní MMR geny, které působí nestabilitu krátkých opakujících se sekvencí genomu. Zároveň může být LS vzácně vyvolán germinální metylací promotoru *MLH1*, či germinální inaktivační mutací genu *EPCAM*, vedoucí k inaktivaci *MSH2* (Nynstöm-Lahti et al., 1996; Umar et al., 2004; Pai, 2016).

1.2 Diagnostika Lynchova syndromu

Pro definitivní stanovení diagnózy LS se používá genetické vyšetření z periferní krve. Toto vyšetření u přísně nevylučovaných pacientů by bylo finančně velmi náročné, tedy se provádí pouze u jedinců, kteří splňují určitá definovaná kritéria a jsou označeni za suspektní.

Při hodnocení rizika přítomnosti LS u pacientů vycházíme z různých pomocných kritérií: klinická kritéria, histologická kritéria, univerzální imunohistochemický screening, test mikrosatelitní nestability a dalších (Vasen et al., 1991).

1.2.1 Klinická kritéria

Klinická kritéria se zcela opírají o anamnestické údaje od pacienta. Existují různé klinické klasifikace. První Amsterodamská kritéria (1991) staví na základě osobní a rodinné anamnézy, jsou ryze namířena na KRK. Revidovaná Amsterodamská kritéria (verze II z roku 1999) navíc zohledňují extrakolonické spektrum neoplazií u LS a opět jsou založena na znalosti anamnézy jedince a jeho rodiny. Průkaz LS má díky nim

vysokou (98%) specificitu, ale nízkou (22%) citlivost, (Vasen et al., 1991; Vasen et al., 1999; Green et al., 2009).

Bethesda guidelines (1996) pomáhají identifikovat jedince s KRK, kteří by měli být podrobeni testování na mikrosatelitovou instabilitu (MSI) a molekulárně genetickému vyšetření.

Revidovaná Bethesda guidelines (2002), která zohledňují jak klinická kritéria, tak i morfologické znaky nádoru, zachycují sice pacienty s LS s vyšší citlivostí (82%), ale s nižší specifitou (77%) než Amsterodamská kritéria (obzvláště ty, s postižením *MSH6* a *PMS2*), (Umar et al., 2004, Piñol et al., 2005; van der Klift et al., 2005).

Tabulka 1 Amsterodamská kritéria II.

1.	Alespoň tři členové rodiny mají karcinom spadající do spektra LS (KRK, karcinom endometria, tenkého střeva, močových cest)
2.	Alespoň jeden pacient je přímý příbuzný ostatních dvou
3.	Postižení jedinců v nejméně dvou po sobě jdoucích generacích
4.	Průkaz nádorového onemocnění alespoň jednoho z jedinců v rodině před 50. rokem věku
5.	Vyloučení familiární adenomatózní polypky
6.	Karcinom byl potvrzen histopatologickým vyšetřením

(Vasen et al., 1999)

Tabulka 2 Revidovaná Bethesda guidelines.

KRK diagnostikovaný před 50. rokem
Přítomnost synchronizovaného či metachronního KRK či jiného karcinomu ze spektra LS, bez ohledu na věk
KRK s MSI-H histologií u pacienta mladšího 60 let
Alespoň jeden přímý příbuzný s diagnostikovaným KRK nebo jiným karcinomem ze spektra LS před 50. rokem života
Alespoň dva příbuzní prvního či druhého stupně s diagnostikovaným KRK nebo jiným karcinomem ze spektra LS bez ohledu na věk

(Sidransky et al., 1992)

V rámci klinických kritérií je pacient suspektní z přítomnosti LS, jestliže byl LS potvrzen u některého ze členů rodiny. Pokud se u pacienta pouze vyskytl některý z nádorů ze spektra neoplázií asociovaných s LS, nález sice nebude vyvolávat vyšší suspekci z LS, ale pacient by měl být řádně a do hloubky přešetřen (anamnéza, eventuálně univerzální imunohistochemický screening).

1.2.2 Hodnocení přímo v resekované tkáni

K potvrzení či vyvrácení vzniku nádoru na podkladě LS, je zapotřebí řádné vyšetření nádorové tkáně pomocí různých patologických metod.

„Nejprimitivnější“ metodou je histologické/morfologické hodnocení tzv. rysů asociovaných s mikrosatelitní instabilitou (semiPREDICT skóre) v nádorové tkáni patologem. Mezi tyto rysy patří: Přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů (≥ 3 /HPF), peritumorální Crohn-like zánětlivá infiltrace, lymfocyty infiltrující stroma, mucinózní diferenciace tumoru, „signet ring cell“ diferenciace tumoru, medulární subtyp adenokarcinomu, či nediferencovaný karcinom. Rysy se rutinně hodnotí u kolorektálního karcinomu (Hadravský et al., 2017).

Jiným způsobem hodnocení v resekované tkáni je imunohistochemické vyšetření MMR proteinů. To detekuje, zda je exprese MMR proteinů v buňkách zachována či ne. Je zde využíváno specifických protilátek namířených proti některým MMR proteinům (MLH1, MSH2, PMS2 a MSH6). Pozitivita barvení značí přítomnost a funkčnost

detekovaných MMR proteinů (pacient s největší pravděpodobností nemá LS). Negativita barvení je naopak známkou chybění proteinu či poruchy jeho funkce a vzbuzuje suspekci z diagnózy LS (Hadravský et al., 2017).

V rutinní praxi se tak na velké části patologických pracovišť v ČR v současné době užívá univerzální imunohistochemický scening MMR proteinů pro vytipování pacientů, kteří mají být ze stran LS dále vyšetřováni. Imunohistochemické barvení se používá už většinou rutinně u KRK a endometriálních adenokarcinomů.

Další možností je test mikrosatelitní nestability (MSI). Jedná se o genetické vyšetření, které porovnává DNA zdravé (nenádorové) a nádorové tkáně. V testu jsou analyzovány tzv. mikrosatelity, tedy úseky DNA, kde DNA polymeráza při replikaci chybí nejčastěji. Jak již bylo popsáno výše, pokud MMR proteiny tyto vady neodstraní, zůstávají v buňce a kumulují se. V praxi se testuje celkem pět úseků. Mikrosatelitní stabilita (MSS) udává, že nebyly změněny žádné úseky a Lynchův syndrom je tak vyvrácen. Odlišnost jednoho z pěti úseků značí nízkou nestabilitu (MSI-low), pokud se DNA neshoduje ve dvou a více úsecích z pěti, jedná se o vysokou nestabilitu (MSI-high).

Imunohistochemické vyšetření a testování MSI, jsou citlivé komplementární metody, pokud jsou však prováděny společně, mají ještě vyšší citlivost záchytu LS (Boland et al., 1998, Halvarsson et al., 2004, Shia et al., 2009; Funkhouser et al., 2012).

Mezi další testy sloužící k vyloučení LS patří např. molekulárně-genetický průkaz mutace *BRAF* genu – pozitivita *BRAF* v tumoru téměř vždy vylučuje možnost LS. Dalším vyšetřením z resekované tkáně je test hypermethylace promotoru genu *MLH1*, kdy samotná metylace řídí expresi genu *MLH1* a vede tak ve výsledku k absenci hlavního proteinu *MLH1*, ke ztrátě jeho exprese (tedy i ztrátě imunohistochemického barvení proteinu) a zároveň i ke ztrátě exprese vedlejšího proteinu *PMS2* (též ztráta detekovatelná imunohistochemickým barvením). Hypermethylace genu *MLH1* není dědičná, podobá se klinickými znaky LS (a imunofenotypem může LS napodobovat), o LS se však nejedná. Proto je nutné u pacientů s imunohistochemicky zastiženou ztrátou proteinu *MLH1* provést nejdříve průkaz metylace promotoru *MLH1* z resekované tkáně. Až při absenci metylace promotoru *MLH1* je pacient indikován k vyšetření mutace z periferní krve – viz. níže. Přítomnost hypermethylace *MLH1* však přítomnost LS ani zcela nevylučuje (Hadravský et al., 2017).

1.2.3 Molekulárně genetické vyšetření z periferní krve

Cílem genetického vyšetření je stanovit z periferní krve zárodečnou mutaci některého z MMR genů. Vyšetření definitivně potvrzuje výskyt LS u pacienta a uzavírá tak algoritmus jeho diagnostiky. Test je proveden pouze tehdy, jestliže pacient splňuje již zmiňovaná kritéria a je u něj tak vysloveno podezření na výskyt LS. Pacient též samozřejmě musí s provedením vyšetření souhlasit. Pokud je výstupem testu pozitivní výsledek, měli by být kontaktováni a následně vyšetřeni i pacienti rodinní příslušníci, neboť i ti jsou s největší pravděpodobností nosiči LS a tedy mají predispozici k rozvoji malignit (Pitra et al., 2017).

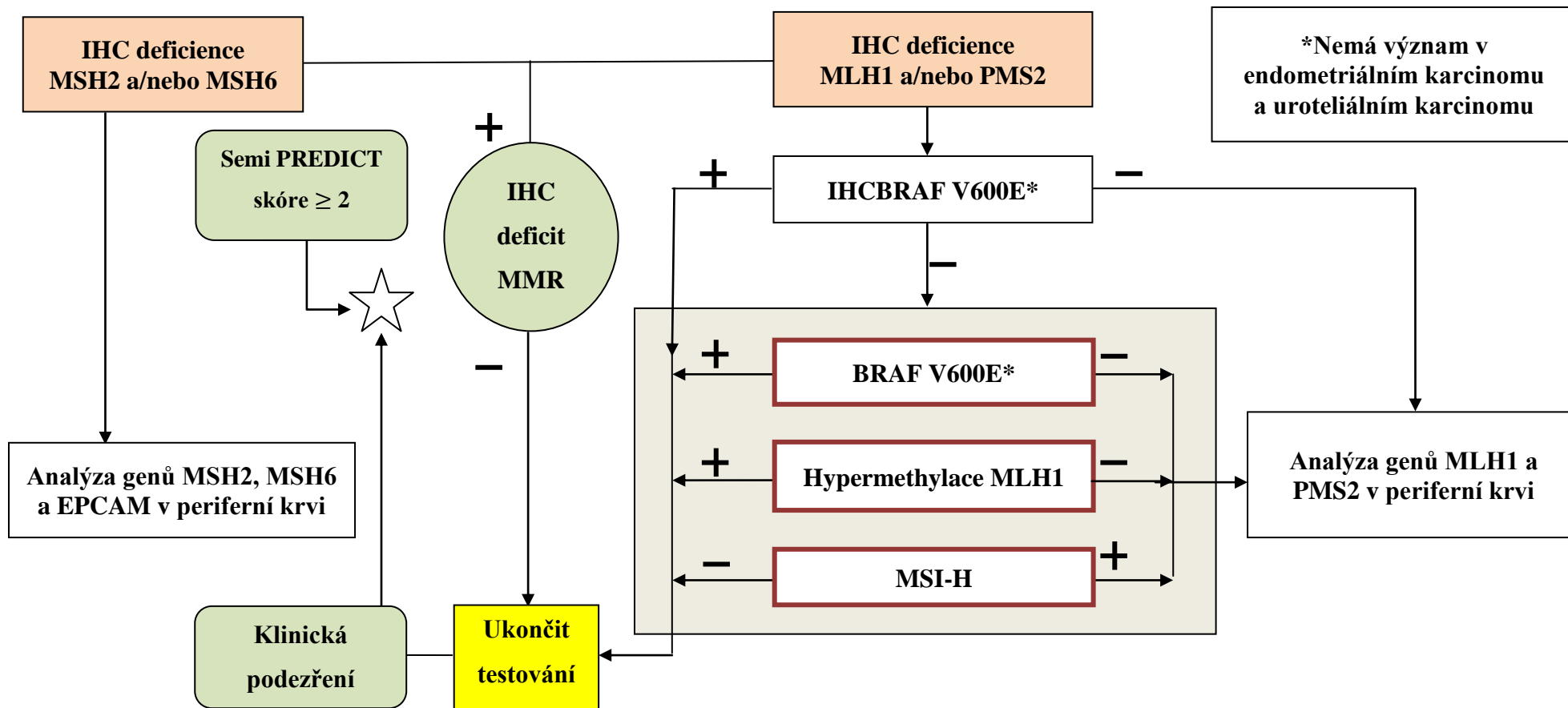


Schéma 1 Algoritmus diagnostiky Lynchova syndromu (Dušek et al., 2016)

- A.** CRC u pacienta < 70 let – bez ohledu na lokalizaci nebo morfologii
- B.** ≥ 70 let, když splňuje revidovaná Bethesda kritéria (anamnéza jiného LS nádoru nebo rodinná anamnéza – Bethesda kritéria)
- C.** Pacientka s karcinomem endometria
- D.** Ostatní – extraokulárnisebaceózní nádory, Ca ovaria s endometroidní složkou, medulární Ca pankreatu, gliomy...

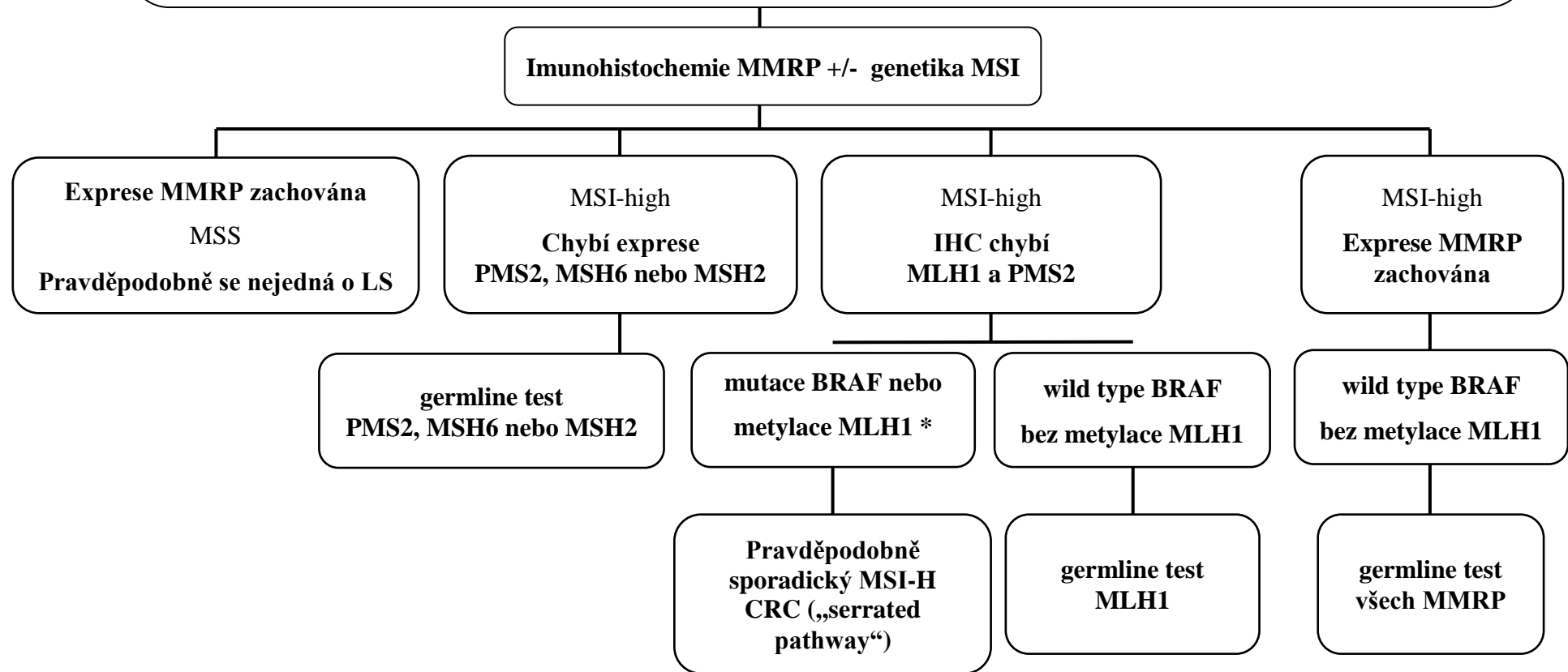


Schéma 2 Způsob rutinního vyšetřování KRK na ŠÚP ve snaze o detekci LS (interní stanovení ŠÚP).

1.3 Obecná stavba urogenitálního traktu

1.3.1 Anatomická stavba urogenitálního traktu

Ledvina je párový orgán (exkreční žláza) uložený v retroperitoneu. Její funkcí je filtrace krve a produkce ultrafiltrátu krevní plazmy (primární moč), který je v systému ledvinných kanálků sekundárně modifikován a vzniká tak moč definitivní (tzv. sekundární moč), která slouží k eliminaci zplodin metabolismu a jiných látek ven z lidského těla. Ledvina se skládá z kůry a dřeňe a je obalena vazivovým pouzdem. Dřeň tvoří velký počet kanálků a krevních cév. V kůře se vyskytují nefrony, které jsou složeny z ledvinových tělísek a z kanálků močových. V centru ledviny se nachází ledvinná pánvička, vybíhající v ledvinné kalichy (renální pánvička a kalichy patří již k vývodným cestám močovým).

Moč produkovaná ledvinami je posléze přijímána ledvinovými kalichy, které jsou začátkem vývodných cest močových. Odtud moč putuje do ledvinné pánvičky, která ji předává močovodům (pravému a levému). Močovody ji převedou do močového měchýře, ve kterém je následně skladována. Odtud je moč vypuzena prostřednictvím močové trubice (nepárová) a vyloučena ven z organismu.

Renální pánvička má přibližně trojúhelníkovitý tvar, její objem je za normálních okolností 3-8 cm³ (při patologických stavech se může mnohonásobně zvětšit) a nachází se v oblasti renálního sinu ledviny (centrální část ledviny, z této oblasti vychází renální hilus). Do pánvičky mezi větvíci se cévami vstupují kalichy a vystupuje z ní močovod. Ledvinové kalichy mají pohárkovitý tvar, jejich volný okraj se pojí s tkání ledviny kolem dřeňové papily (Čihák, 2002).

Močovod (ureter) je přibližně 7 mm silná trubice o délce 30 cm a v prázdném stavu má díky podélným řasám hvězdicovité lumen. Její funkcí je peristaltický transport moči do močového měchýře (Lüllmann-Rauch, 2012).

U močovodu jsou anatomicky popisovány tři části. Prvá část (pars abdominalis) je sestupná v retroperitoneu, napojuje se na druhou část (pars pelvica), která se již vyskytuje v malé pánvi a třetí část (pars intramuralis) probíhá ve stěně močového měchýře.

Močový měchýř je dutý orgán uložený v malé pánvi, který je „skladištěm“ moči. Jeho velikost a tvar závisí především na jeho náplni.

Močová trubice (uretra) se odlišuje v závislosti na pohlaví délkou a výskytem epitelu v jednotlivých částech. Uretra odvádí nahromaděnou moč z močového měchýře ven z organismu. Vyprázdnění močového měchýře je děj ovladatelný vůlí (Čihák, 2002).

1.4 Histologická stavba vývodných cest močových

Stěna vývodného močového traktu se obecně skládá ze sliznice, svalové vrstvy a adventicie. Od ledvinné pánvičky až po proximální uretru je sliznice pokryta tzv. přechodným typem epitelu (též nazývaný urotel). Vazivová adventicie zajišťuje připevnění odvodných močových cest ke strukturám v jejich okolí a působí tak jako jakési „lepidlo“ (Lüllmann-Rauch, 2012).

1.4.1 Horní cesty močové (renální kalichy, renální pánvička, močovod)

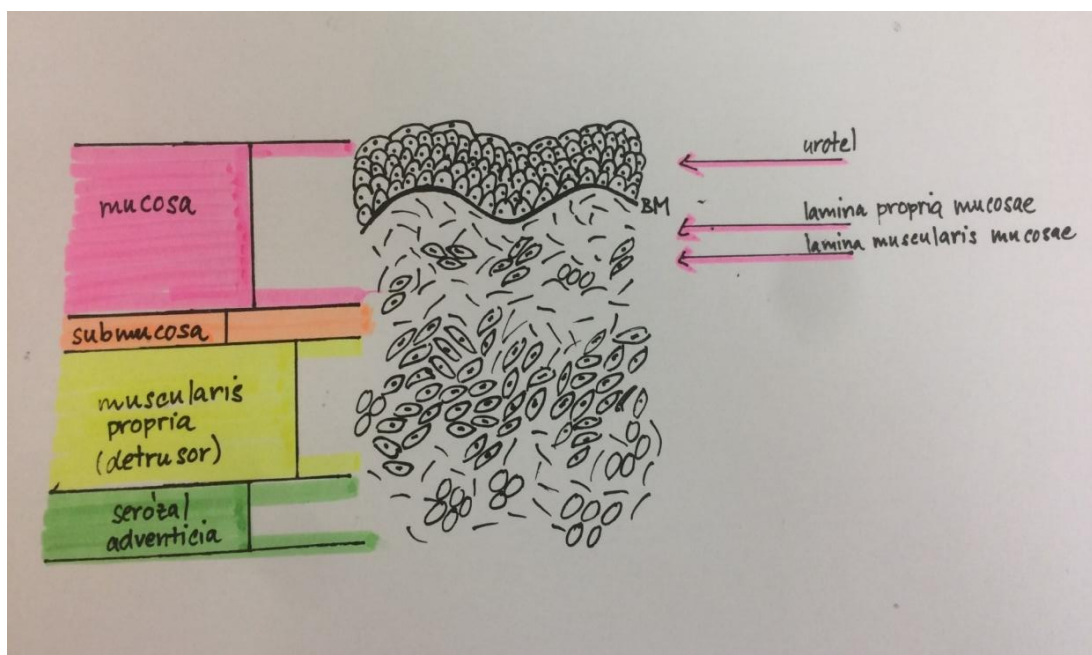
Renální kalichy a pánvička jsou duté útvary s tenkou stěnou, složenou ze sliznice, vazivově-svalové stěny a z povrchového vazivového krytu (adventicie). Sliznice (tunica mucosae), má na svém povrchu přechodný epitel, stejný jako v jiných částech vývodného močového traktu. Epitel odvodných močových cest kalichů vodu ani látku z moče nevstřebává. Vazivově svalová vrstva (tunica muscularis), se nachází pod sliznicí. Tvoří ji vazivo se sítěmi kolagenních i elastických fibril a také spirálově uspořádané pruhy hladkého svalstva. Církulárně je svalovina zesílena na vstupu kalichů do pánvičky i na konci ledvinové pánvičky tam, kde začíná ureter. Svalovina má zde důležitou funkci, kterou je posouvání moče střídavými kontrakcemi z papil do ledvinové pánvičky a z ní do ureteru. Adventicie (tunica adventitia) je poslední vrstvou - jedná se o řídké kolagenní vazivo.

Močovody spojují renální pánvičku s močovým měchýřem, moč se v nich pohybuje pomocí peristaltické vlny. Stěna močovodu má na příčném průřezu hvězdicovitý vzhled a skládá se ze sliznice (mukózy), vágně definované submukózy, svaloviny a adventicie. Sliznice (tunica mucosa) je stejně jako jinde ve vývodném močovém traktu kryta přechodným epitelem (urotel), který nasedá na bazální membránu. Pod epitelem a bazální membránou je uloženo tzv. podslizniční vazivo (lamina propria mucosae), které je tvořeno řídkým kolagenním vazivem, v němž probíhají krevní kapiláry, cévy a nervová vlákna. Podslizniční vazivo je stále ještě součástí mukózy, ale s hloubkou řídne a mění se/přechází v podslizniční vazivo.

Svalovou vrstvu (tunica muscularis) tvoří hladká svalovina smíchaná s vazivem. Skládá se z vnitřní (podélné) a ze zevní (cirkulární) hladkosvalové vrstvy. V pánevním úseku se připojuje ještě třetí zevní vrstva (podélná). Ve skutečnosti vrstvy svaloviny probíhají jako spirály (že jsou cirkulární a podélné určujeme podle strmosti spirál). Zevní podélná vrstva je zesílená svalovými pruhy a smyčkami před tím, než ureter vstoupí do močového měchýře, toto zesílení se nazývá ureterová pochva a představuje pomocný mechanismus, který pomocí stahů brání protékání moče z měchýře zpět do ureteru (tzv. vezikoureterální reflux). Poslední vrstvou je adventicie (tunica adventitia) skládající se z řídkého kolagenního vaziva, pod kterým probíhají cévy k svalové vrstvě stěny ureteru (Čihák, 2002).

1.4.2 Dolní cesty močové (močový měchýř a močová trubice)

Histologická stavba stěny močového měchýře se v jeho různých částech patrně lehce liší. Rozdíly se týkají především popisu přítomnosti lamina propria mucosae a submukózy v jeho různých částech. Proto i histologický popis v různých histologických učebnicích se lehce liší. Obecně je však u stěny močového měchýře většinou popisovaná přítomnost mukózy (sliznice sestávající z urotelu, lamina propria mucosae a lamina muscularis mucosae), submukózy, svalové vrstvy (muscularis propria/detrusor) a poslední vrstvu stěny představuje adventicie (fokálně, při vertexu močového měchýře a na zadní stěně je seróza). Schéma stavby stěny močového měchýře je zobrazeno na obrázku 1. Systém svaloviny (muscularis propria) má v močovém měchýři velmi složitou stavbu. Ve stěně měchýře se vyskytují autonomní gangliové buňky a nervy (Lüllmann-Rauch, 2012).



Obrázek 1 Histologická stavba močového měchýře (vlastní zdroj)

Stavba močové trubice (uretra) se liší u mužů a žen. Přechodný epitel se zde nachází pouze v počátečním úseku uretry. Ženská uretra má délku přibližně 4 cm. Počátek je kryt urotelem, zbytek uretry pokrývá nerohovějící dlaždicový epitel. Lamina propria je široká a vyskytuje se v ní hustá žilní pletěň. Svalovina močové trubice souvisí se svalovinou močového měchýře, její cirkulární části fungují jako svěrač. Mužská uretra je ve svém průběhu rozdělena na pars intramuralis, pars prostatica, pars membranacea a pars spongiosa. Pars membranacea je obklopena příčně pruhovaným svěračem. Urotelová výstelka sahá až k vyústění ductuli ejaculatorii, odtud pokračuje vícevrstevný cylindrický epitel, který je ve fossa navicularis vystřídán vrstevnatým nerohovějícím dlaždicovým epitelem (Lüllmann-Rauch, 2012).

1.5 Nádory vývodného močového traktu

Ve vývodném močovém traktu se mohou nacházet benigní i maligní nádory vycházející ze všech histologicky zastoupených složek. Úplně nejčastější jsou však nádory maligní, vycházející z urotelu (tj. uroteliální karcinom). Z rizikových faktorů majících největší podíl na vzniku uroteliálního karcinomu je nejvýznamnější kouření (Uroweb, ©2020).

1.5.1 Histologické typy nádorů vývodného močového traktu – základní přehled

Uroteliální karcinom je nádor vycházející z přechodného epitelu močových cest (urotelu), charakterizovaný přítomností cytologických a architektonických změn/atypií. Rozšíření urotelu, ztráta polarity a koheze buněk, výskyt mitóz v horních vrstvách a především tvorba papilárních struktur s tenkými fibrovaskulárními septy jsou atypie architektonické. Naproti tomu zvětšení jader, nepravidelnost jaderných kontur, zhrubnutí chromatinu, hyperchromázie, posun nukleoplazmového poměru ve prospěch jádra, anizocytózy (nepravidelnosti velikosti buněk), anizokaryózy (nepravidelnosti velikosti jader) a četnější mitózy (včetně mitóz atypických) jsou cytologické atypie.

V rámci uroteliálních neoplázií jsou rozlišovány dvě hlavní skupiny - uroteliální neinvazivní léze a infiltrativní uroteliální karcinom. Ve skupině neinvazivních lézí jsou rozlišovány uroteliální ploché léze a papilární neoplázie. Mezi papilární neoplazie patří jednak vzácný uroteliální papilom, dále papilární uroteliální neoplázie nízkého maligního potenciálu (PUNLMP) a především, z těchto lézí nejčastější, papilární uroteliální karcinom (low-grade nebo high-grade). Uroteliální ploché léze rozlišujeme různé (uroteliální dysplázie, uroteliální hyperplázie), nejvýznamnější v této skupině je však uroteliální high-grade plochá léze – uroteliální *carcinoma in situ* (CIS). Invazivní/infiltrativní uroteliální karcinom je charakterizován invazivním růstem přes bazální membránu a může mít velké množství divergentních diferenciací a subtypů (Povýšil a Šteiner, 2007).

Méně obvyklé karcinomy především močového měchýře vznikají na podkladě metaplazie urotelu (tj. fenotypické změny, kdy je původní přechodný typ epitelu nahrazen epitelem jiným - nejčastěji mnohvrstevným dlaždicovým epitelem či epitelem intestinálního typu) nebo neoplastickým zvratem různých jiných složek stěny. Tyto nádory jsou však výrazně vzácnější než uroteliální karcinom. Například spinocelulární (dlaždicobuněčný) karcinom se může vyskytnout

při poškození urotelu dlouhotrvajícím zánětem (typicky v endemických oblastech při infekci *Schistosomiasis spp.*) s rozvojem reaktivních změn, hyperplazie, metaplazie, dysplazie a s následným vznikem spinocelulárního karcinomu. Další vzácný nádor, adenokarcinom, vychází z intestinální metaplazie urotelu a následného dysplastického zvratu. Diferenciálně diagnosticky je zapotřebí vždy vyloučit adenokarcinom jiné primární lokalizace (prostaty, střeva). Neepitelové nádory močového měchýře (též někdy nazývané měkkotkáňové) jsou vzácné a lze je odvodit od struktur tvořících stěnu měchýře.

Nádory mimovezikálních oddílů vývodných cest močových (pánvičky, ureteru, uretry) se v zásadě neliší od nádorů močového měchýře ani histologickým spektrem ani biologickým chováním. Mají limitovaný prostor, proto jsou většinou symptomatické - projevují se hematurií a obstrukcemi (Povýšil a Šteiner, 2007).

1.6 Lynchův syndrom a uroteliální karcinom

V rámci urologických malignit má LS souvislost hlavně s UC horního močového traktu (UUT), tj. renální pánvičky (včetně kalichových systémů) a močovodu. V této lokalizaci je při sporadickém výskytu UC výrazně vzácnější než v močovém měchýři. U pacientů s LS se však frekvence výskytu UC v oblasti UUT zvyšuje. V rámci LS je v literatuře nejčastěji skloňována souvislost s KRK, vzácněji pak s nádory endometria. Přitom se často zapomíná na spojitost tohoto syndromu s UUT, kde výskyt rozhodně není vzácný - v literatuře udávaný výskyt UC v UUT u pacientů s LS má široké rozmezí (2,9-28%), (Pitra et al., 2017).

Ve sporadických případech UC v oblasti UUT je tumor častěji přítomen v pánvičce než v močovodu. U pacientů s LS je však situace obrácená - zvyšuje se frekvence výskytu UC v močovodu. U UC UUT pacientů s LS pak molekulárně geneticky bývá nejčastěji zaznamenána mutace postihující gen *MSH2* (Lynch et al., 1990; Visser et al., 2012; Joost et al., 2015; Pradere et al., 2017).

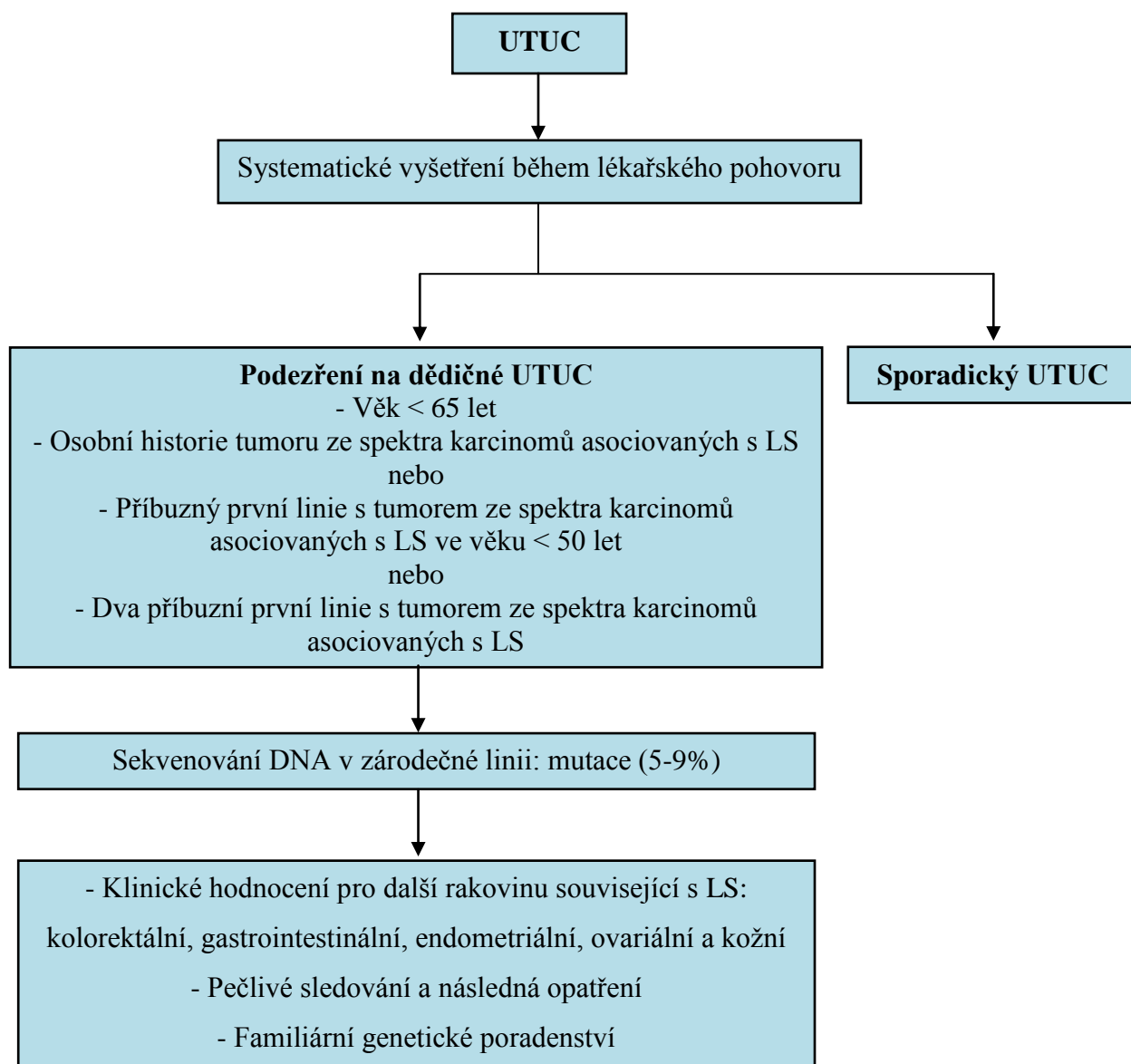


Schéma 3 Algoritmus doporučený Evropskou Asociací Urologů (EAU) a jejich doporučenými postupy pro selekci pacientů s UC UUT suspektních z asociace s LS – schéma pro výběr pacientů vhodných pro genetické testování (Audenet et al., 2012; Pradere et al., 2017) – tento.

1.6.1 Péče o pacienty s LS ve vztahu k nádorům močového traktu

Bohužel péče o pacienty s LS není jasně dána a v klinické urologické praxi neexistuje speciální dispenzární program ani léčebné doporučené postupy pro management pacientů s diagnózou LS. Časná detekce karcinomu však představuje jeden z nejdůležitějších faktorů prognózy, a proto je důležité diagnostikovat pacienty v časných stádiích nádorového postižení (schéma 3). Vzhledem k tomu, že diagnóza LS znamená vysokou pravděpodobnost rozvoje karcinomu, měli by tito pacienti systematicky a pravidelně podstupovat kontrolní vyšetření. V současnosti je však pouze na uvážení urologa a jeho znalostech ohledně LS jak často, jak intenzivně a jakým způsobem bude pacienta vyšetřovat/sledovat.

Pacienty s LS lze z hlediska klinického rozdělit do dvou lehce odlišných skupin. První skupina zahrnuje pacienty s diagnózou LS, toho času v anamnéze bez diagnostikovaného karcinomu močového traktu. Pacienti spadající do této skupiny by měli vyhledávat urologickou péči, z důvodu včasného zachytu UC (tzv. sekundární prevence). Do druhé skupiny jsou řazeni pacienti s diagnózou LS a již i s anamnézou UC UUT. U těchto pacientů je nutná urologická pravidelná dispenzarizace, k včasné detekci rekurence UC. Evropská Asociace Urologů (EAU) a jejich doporučené postupy u pacientů s LS nedoporučují výrazně odlišný postup od běžné populace sporadických karcinomů (Joost et al., 2015; Rouprêt et al., 2018).

V podstatě tyto pacienty neodlišují od ostatních, tedy neberou v potaz jejich zvýšené riziko rozvoje karcinomu.

2 CÍL PRÁCE

2.1 Hlavní cíl

Vyhodnotit a posoudit využití imunohistochemického vyšetření resekované tkáně při detekci pacientů vhodných k dalšímu testování stran LS.

2.2 Dílčí cíle

- 1.** Určit limitace imunohistochemického barvení ve screeningu LS.
- 2.** Stanovit frekvenci výskytu LS u pacientů s UC horních cest močových.
- 3.** Navrhnout vhodný a výhodný diagnostický algoritmus.

3 MATERIÁL A METODIKA

Retrospektivně byli vyhledáni a opětovně hodnoceni všichni pacienti léčení na Urologické klinice FN Plzeň pro UC horních cest močových v období I/2010 – XII/2018. Pro vyhledání pacientů byl využit nemocniční informační systém FN Plzeň (WinMedicalc), všechny případy byly opětovně zrevidovány – hodnocen byl kompletně celý soubor pacientů stran dostupných klinických údajů, dále byl přehodnocen vlastní patologický nález (opětovné čtení histologického materiálu ze zachovaných histologických preparátů) a hodnoceno bylo i provedení imunohistochemických barvení (barvení MMR proteinů - MLH1, PMS2, MSH2, MSH6). Získaná data byla následně statisticky zpracována (základní deskriptivní statistika).

V roce 2018 vešlo v platnost obecné nařízení o ochraně osobních údajů (General Data Protection Regulation/GDPR). Cílem nařízení je chránit zájmy občanů proti neoprávněnému zacházení s jejich osobními daty. V rámci bakalářské práce bylo pracováno s osobními daty pacientů, jejich lékařskými zprávami a histologickým materiálem. S ohledem na ochranu osobních údajů pacientů FN Plzeň muselo být požádáno o souhlas s poskytnutím informací potřebných k vypracování bakalářské práce (povolení ke sběru dat je doloženo jako součást této práce – viz. přílohy).

3.1 Obecná příprava trvalého preparátu pro histologické hodnocení

Základem pro adekvátní histologické hodnocení je zhotovení kvalitního trvalého preparátu, resp. tkáňového parafinového bloku (FFPE), který může být dlouhodobě archivován a v budoucnu použit k dalším vyšetřením, či studiím.

Cesta odebraného vzorku/biopsie začíná okamžitou fixací po vyjmutí z těla pacienta, pokračuje přes centrální příjem patologické laboratoře, kde vzorek získá identifikační číslo. Následně je zde vzorek makroskopicky popsán lékařem a přikrojen do tkáňových kazet. Materiál v tkáňové kazetě pak po pokračující fixaci směřuje k odvodnění, projasnění a prosycení, následně k zalití parafinových bločků. Posléze je materiál krájen, natahován na sklíčko, barven a montován. Na konci vzniká histologický preparát, odhalující tajemství mikroskopických struktur tkáně při pohledu do světelného mikroskopu. Histologické hodnocení provádí lékař s příslušnou specializovanou způsobilostí (patolog).

3.1.1 *Fixace a příjem materiálu na pracoviště patologie*

Je procesem, při němž dojde k denuraci bílkovin a šetrně se usmrtí živé struktury buněk a tkání. Zejména se musí zamezit autolýze (samonatravení) tkáně, kterou způsobují štěpící enzymy normálně přítomné ve tkáních (Lichnovský et al., 2007).

Základem optimální fixace materiálu k histologickému vyšetření, je zachování normální struktury tkáně (umožňující jejich řádné barvení) a nepozměněná antigenicita bílkovin (pro imunohistochemické vyšetření). Pro případy molekulárně genetického vyšetření by nemělo fixací dojít ani k porušení nukleových kyselin (Vacek, 1995).

Tekutinou zajišťující uchování vzorku, se kterou histologické laboratoře pracují nejvíce, je formol. Má skvělé konzervační a fixační vlastnosti, dobrý průnik do tkání a jeho dostupnost je zcela bezproblémová. Vyrábí se z 40% roztoku formaldehydu. Pro účely fixace musí být dále 10x naředěn vodou, výsledný formol je pak tedy 4% vodný roztok formaldehydu. Fixační tekutina by měla být v dostatečném množství, resp. objemu (mělo by být použito množství fixační tekutiny asi 50x větší, než je velikost vzorku tkáně), (Vacek, 1995; Lichnovský et al., 2007).

Fixace by měla být započata co nejdříve po odběru biopsie z těla pacienta, ponořením vzorku do dostatečného množství/objemu formolu (nikoliv pouhým přelitím). Pro fixaci musí být vybrána adekvátní vyhovující nádoba - nevhodné jsou nádoby s úzkým hrdlem, z kterých vzorek nelze jednoduše vyjmout, ani nádoby, v nichž není umožněno fixační tekutině prostupovat do vzorku ze všech stran. Za výběr vhodné nádoby a dostatečného množství dodaného fixativa odpovídá určený střední zdravotnický personál operačních sálů. Nádoba s resekovaným vzorkem musí být následně zřetelně a čitelně označena jménem pacienta a jeho rodným číslem. Takto označený vzorek ponořený ve fixační tekutině, společně s odpovídajícím průvodním listem k bioptickému vyšetření, je transportován na pracoviště patologie k dalšímu zpracování.

Na příjmu patologického oddělení jsou pak všechny náležitosti zkontrolovány (shoduje-li se počet vzorků/nádobek s počty na průvodce, zda je nádoba dobře označena, shodují-li se iniciály pacienta na nádobě a na průvodním listu k bioptickému materiálu a zda jsou na průvodním listu k bioptickému materiálu všechny potřebné údaje – tj. jméno a datum narození pacienta, o jaký druh tkáně se jedná, datum a čas odběru, oddělení a jméno lékaře, který provedl odběr, předběžná diagnóza, požadavky

na speciální vyšetření, interval mezi odběrem a fixací), (Lichnovský et al., 2007).

V případě nejasností je materiál vrácen na pracoviště odběru k nápravě a dořešení. Pokud je vše v pořádku, materiálu je přiděleno číslo v číselné řadě patologické laboratoře, materiál je zapsán do knihy příjmů a v elektronickém nemocničním systému je zapsán pod přiřazené číslo. Materiál je v laboratoři dále procesován pouze pod tímto číslem (jméno pacienta, či jeho rodné číslo se při zpracovávání v laboratoři nepoužívá).

3.1.2 Makroskopický popis a přikrojení bioptického vzorku

Makropopis je prováděn lékařem, který prohlédne materiál a následně jej popíše. Přikrojení vzorku je individuální, řídí se typem tkáně/resekátu (nádor pánvičky, močovodu, močového měchýře), typem provedeného chirurgického výkonu a rozsahem nádorového postižení.

Důležité je vyšetřit okraje resekátu (resekční okraj) a uvést jaký je vztah resekčních okrajů k nádoru. Při popisu tumoru jsou hodnoceny rozměry, makroskopický vzhled, struktura, vzdálenost od okrajů, prorůstání (do jaké hloubky nádor infiltroval stěnu orgánu a do kterých orgánů v jeho okolí prorostl). Z nádoru se odebírá reprezentativní počet bloků podle velikosti a makroskopického vzhledu tumoru, počet je vždy modifikován konkrétní situací. Dále se rutinně odebírají i bloky z míst mimo tumor, jejichž případné změny je nutné popsat. Tento makroskopicky zhodnocený a přikrojený materiál je vložený do tkáňových kazetek. Ty jsou opět vloženy do nádoby s formolem, kde čekají na další postupy zpracování (POSTUP, 2016a).

Délka dalšího setrvání zablokovaného materiálu ve fixační tekutině se liší podle charakteru tkáně a podle předpokládaných nároků na délku fixace (jedná se o empirické hodnocení tkáně laborantkou), většinou v délce 1-3 dny.

3.1.3 Odvodnění, projasnění a prosycení tkáně parafínem ve tkáňovém procesoru

Po profixování materiálu formaldehydem je nutné tkáň zbavit vody, proto ji postupně protáhneme odvodňovací řadou alkoholů o navyšující se koncentraci: 70%, 80%, 96% (Lichnovský et al., 2007).

Do třetí lázně, kde má etanol koncentraci 96% je potřeba bločky s tkání ponořit ještě dvakrát. Postup odvodnění je zakončen ponořením bloček do acetonu. Dále je důležité vystavit tkáň kapalině, jenž rozpustí parafin a vytáhne z tkáně alkohol. Jedná se o proces projasnění a nejlépe jej docílíme vložением tkáně do jedné lázně acetonu a dvou lázní xylenu. Nakonec prosytíme tkáň tekutým parafinem ve třech lázních o teplotě 56-58°C. Tyto postupy (odvodňující, projasňující a prosycující) provádějí přístroje (tkáňové procesory), které pracují při zvýšené teplotě, často za použití vakua (Vacek, 1995).

3.1.4 Vlastní zalévání

Z výše popsaného procesoru běžícího nejčastěji přes noc, získáme ráno odvodněné a projasněné tkáň uložené v tkáňových kazetách. Protože tkáň v kazetkách prosytil parafin, vyskládáme je na vyhřátou desku, abychom tak zabránili jejich tuhnutí. Zvolíme vhodnou velikost kovové vaničky podle rozměrů tkáně. Prostřednictvím zalévací linky napustíme do vaničky trochu parafinu. Pinzetou do ní vložíme tkáň z vyhřívané desky a přikryjeme ji kazetkou. Doplníme vaničku parafinem a pak celou formu necháme ztuhnout na chladicí desce. Po několika minutách můžeme vyjmout z kovové formy hotový parafinový tkáňový bloček. Ten je dále uchován v mrazničce (za účelem takového zchladnutí, aby byl co nejvhodnější ke krájení histologických řezů mikrotomem), (POSTUP, 2014a).

3.1.5 Krájení parafinových řezů

Ke krájení řezů se používá sáňkový nebo rotační mikrotom. Sáňkový mikrotom (který se na ŠÚP používá ke krájení většiny bioptických vzorků s výjimkou tzv. histotopogramů, využívaných při zpracování resekátů prostat) se skládá z podstavce, v jehož kluzkých plochách se pohybují sáně. Na sáních je upevněn držák pro žiletku, který umožňuje nastavit sklon žiletky. Mikrometrickým šroubem se nastaví požadovaná tloušťka řezů. Na ŠÚP se standardně krájí 3 µm tenké řezy na hematoxylin-eosin (HE), a 1 µm tenké řezy pro imunohistochemická barvení (Vacek, 1995; POSTUP, 2014b).

3.1.6 Natahování parafinových řezů na podložní sklo

Z mikrotomu přeneseme několik řezů nejprve na hladinu studené vodní lázně, kde proběhne jeho úprava za pomoci pátradel. Vybere se nepoškozený řez/řezy, vypadající reprezentativně a prostřednictvím podložního skla je přeneseme na hladinu teplé vodní lázně (47-49°C), aby se řez mohl vlivem tepla vyšponovat. Řez poté přichytíme na sklíčko a necháme ho oschnout v termostatu (při teplotě 56°C). Po prosušení preparátu je možné jej odparafinovat a věnovat se dalším krokům (POSTUP, 2014b).

K úspěšnému natažení preparátu je nutné vybrat správné podložní sklo. To se volí podle toho, jak je materiál problematický a jakou metodou bude dále postupováno (co se bude barvit). Někdy je tak třeba použít sklo od výrobce opatřené adhezivní vrstvou, k němuž materiál přiléhá mnohem více než k obyčejnému podložnímu sklu, ze kterého by při dalších postupech řez mohl sklouznout – tzv. uplavat. Důležité je vždy označit sklíčko náležitým číslem bločku a neustále shodu těchto čísel kontrolovat tak, aby nedošlo k záměně. Sklíčko s preparátem označujeme ještě zkratkou metody, ve které bude v dalších krocích histologický preparát obarven. Až po zajištění těchto úkonů můžeme přejít k vlastnímu natahování ve vodní lázni.

3.1.7 Odparafinování a zavodňování řezů

Po osušení preparátu je nezbytné ho zbavit parafinu. Pokud by byl parafin ponechán, řezy by se neobarvily, neboť k barvení se používají vodné roztoky barviv. Xylen je tekutina, která donutí parafin opustit prostory řezu. Abychom řez skutečně očistili od parafinu, ponoříme sklíčko s preparátem do tří xylenových lázní. Xylen též není mísitelný s vodou, je tedy zapotřebí, aby preparát následně prošel sestupnou alkoholovou řadou, která jej zavodní (rehydratace).

V běžném provozu se ke všem těmto krokům využívá barvicí automat (Vacek, 1995; POSTUP, 2014c).

3.1.8 Barvení histologických preparátů

K tomu abychom mohli mikroskopicky vyšetřovat tkáň, musíme tkáňové řezy nabarvit. Základní barvení pro histologické vyšetření je hematoxylin-eosin (HE). Po obarvení řezů přichází na řadu montování preparátů. Cílem je vytvořit trvalý preparát, který může být archivován neomezenou dobu (POSTUP, 2014d; Balko et al., 2016).

Montování preparátů na ŠÚP provádí automat za použití látky Pertex (má vysoký index lomu světla, je rozpustný v xylenu).

3.2 Imunohistochemie

Mezi antigenem a pro něj specifickou protilátkou dochází k vzájemnému působení, této reakce je využíváno v rutinní diagnostice. Všechny reakce k detekci proteinu (antigenu) potřebují příslušnou protilátku. Definitivní výsledek (imunokomplex) pak může být ve tkáni vizualizován a hodnocen ve světelném mikroskopu. K detekci tkáňových antigenů aplikujeme monoklonální nebo polyklonální protilátky (Lichnovský et al., 2007; Mescher, 2018).

3.2.1 Protilátky

Protilátky jsou glykoproteiny, na jejichž molekule se nachází vazebné místo, které se pojí s pro něj specifickým epitopem antigenu za vzniku imunokomplexu (Lichnovský et al., 2007).

Protilátky rozlišujeme polyklonální a monoklonální. V praxi se však častěji používají imunohistochemické protilátky monoklonální, neboť pomocí monoklonálních protilátek je průkaz proteinu selektivnější než u protilátek polyklonálních. Zvyšuje se tím většinou specifická barvení (Lukáš et al., 1997; Mescher, 2018).

V rámci naší studie byly použity monoklonální protilátky k detekci MMR proteinů: MLH1 (MutL Protein Homolog 1, M1, RTU, Ventana), MSH2 (MutS Protein Homolog 2, G219-1129, RTU, Ventana), MSH6 (MutS Protein Homolog 6, 44, RTU, Ventana) a PMS2 (Postmeiotic Segregation Increased 2, EPR3947, RTU, Ventana). Imunohistochemická analýza byla provedena pomocí Ventana Bench Mark ULTRA (Ventana Medical System, Inc., Tucson, Arizona).

3.2.2 *Vlastní imunohistochemické barvení*

Imunohistochemické barvení je možné provést manuálně, Šiklův ústav patologie však rutinně využívá automat Ventana Bench Mark ULTRA od firmy Roche (POSTUP, 2016c).

Tabulka 3 Reagencie použité při barvení v automatu.

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

Tabulka 4 Zásobní roztoky v tomto automatu.

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

Automat Bench Mark ULTRA VENTANA je ovládán vlastním počítačem řídicím všechny kroky imunohistochemického barvení. Sklíčko s preparátem označíme štítkem s čárovým kódem podle požadovaného imunohistochemického barvení. Automat prostřednictvím kamery zaznamená štítek, načte ho a navolí si chemikálie a protilátky, které pro dané barvení použije. Reagencie a zásobní roztoky (z tabulky 3 a 4) si přístroj sám zvolí a vypočítá jejich potřebné množství k barvení. Přístroj může fungovat v režimu automatu (skla vložíme a na konci procesu vyjmeme, během procesu se o běh nestaráme), nebo s ním můžeme pracovat jako s poloautomatem, kdy protilátku aplikuje do příslušné barvicí jednotky obsluhující personál, po zaznění zvukového signálu a rozsvícení oranžové diody na příslušné zásuvce přístroje. Po ukončení barvení (přístroj hlásí zvukovým signálem a zeleně rozsvícenou diodou) se vyjme preparát a zbaví se mastného povlaku z reagentů opláchnutím v teplé vodě se saponátem. Následuje odvodnění a montování preparátu (POSTUP, 2016d).

Konkrétně pro imunochemické vyšetření v naší studii byly mikrotomem ukrojené 1 µm tenké řezy nejprve odparafinovány a rehydratovány v jednom kroku a to již v přístroji Bench Mark ULTRA Ventana. Sklíčka byla pokryta Tris-EDTA puřrem

(pH 8,6), pak následovalo jejich zahřátí na 95°C po dobu 64 minut, aby se odmaskoval antigen. Na sklíčka bylo nanášeno 100 µl primární protilátky proti MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2. Poté se sklíčka inkubovala 40 minut při 37°C. Pro odstranění reagentů byla následně sklíčka opláchnuta TBS (Tris-bufferedsaline). Detekci umožnila inkubace s 200 µl DAB (3,3-diaminobenzidine) substrate/chromogen po dobu 3 minut. Jestli bylo barvení kvalitní, ověřila odpovídající vnější kontrola i vnitřní kontrola (nenádorové lymfocyty), (Dušek et al., 2018).

3.3 Vlastní hodnocení histologických preparátů

Při hodnocení byl všechen archivní materiál nejprve zrevidován patologem (MUDr. K. Pivovarčíková, Ph.D.), ověřena byla správnost diagnózy a všechny případy byly zaklasifikovány podle jednotného gradovacího a stagovacího systému. Pro grading UC byla použita WHO klasifikace tumorů močového traktu a mužského genitálu (WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs) z roku 1973 (Mostofi et al., 1973), dle aktuálních doporučených postupů Evropské asociace urologů (EAU), (Uroweb, ©2020).

UC byl klasifikován podle stupně diferenciaci na dobře diferencovaný (grade 1/G1), středně diferencovaný (grade 2/G2) a špatně diferencovaný (grade 3/G3).

Staging malignit byl proveden dle aktuálního 8. vydání TNM klasifikace zhoubných novotvarů (Union for International Cancer Control/UICC) z roku 2017 (Brierley et al., 2017) – přesné znění klasifikace (tab. 5) – převzato.

Tabulka 5 TNM klasifikace

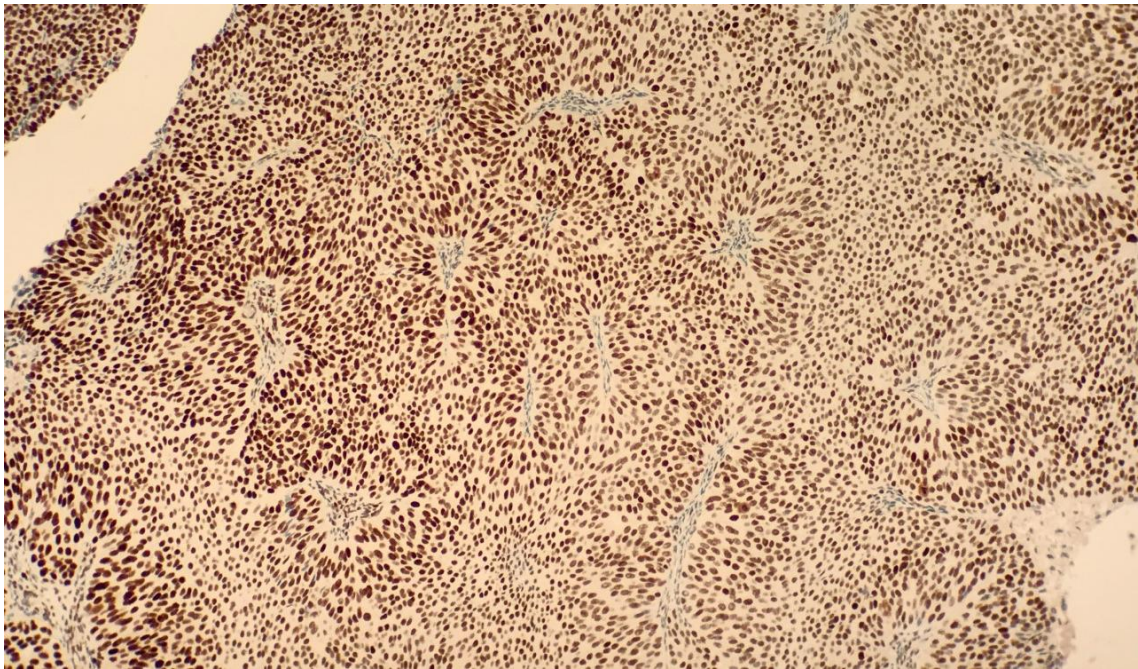
T – primární tumor	
TX	Primární tumor nelze hodnotit
T0	Bez známek primárního nádoru
Ta	Neinvazivní papilární karcinom
Tis	Karcinom in situ
T1	Nádor postihuje subepiteliální vazivo
T2	Nádor postihuje svalovinu
T3	Ledvinná pánvička: nádor se šíří přes svalovinu do peripelvického tuku nebo parenchymu ledviny Močovod: nádor se šíří přes svalovinu do periureterální tukové tkáně

T4	Tumor postihuje okolní orgány nebo se šíří ledvinou do perirenálního tuku
N – regionální lymfatické uzliny	
NX	Regionální lymfatické uzliny nelze hodnotit
N0	Regionální lymfatické uzliny bez metastáz
N1	Metastáza v 1 lymfatické uzlině do 2 cm včetně v největším rozměru
N2	Metastáza v 1 lymfatické uzlině větší než 2 cm, nebo metastázy ve dvou a více uzlinách
M – vzdálené metastázy	
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastázy

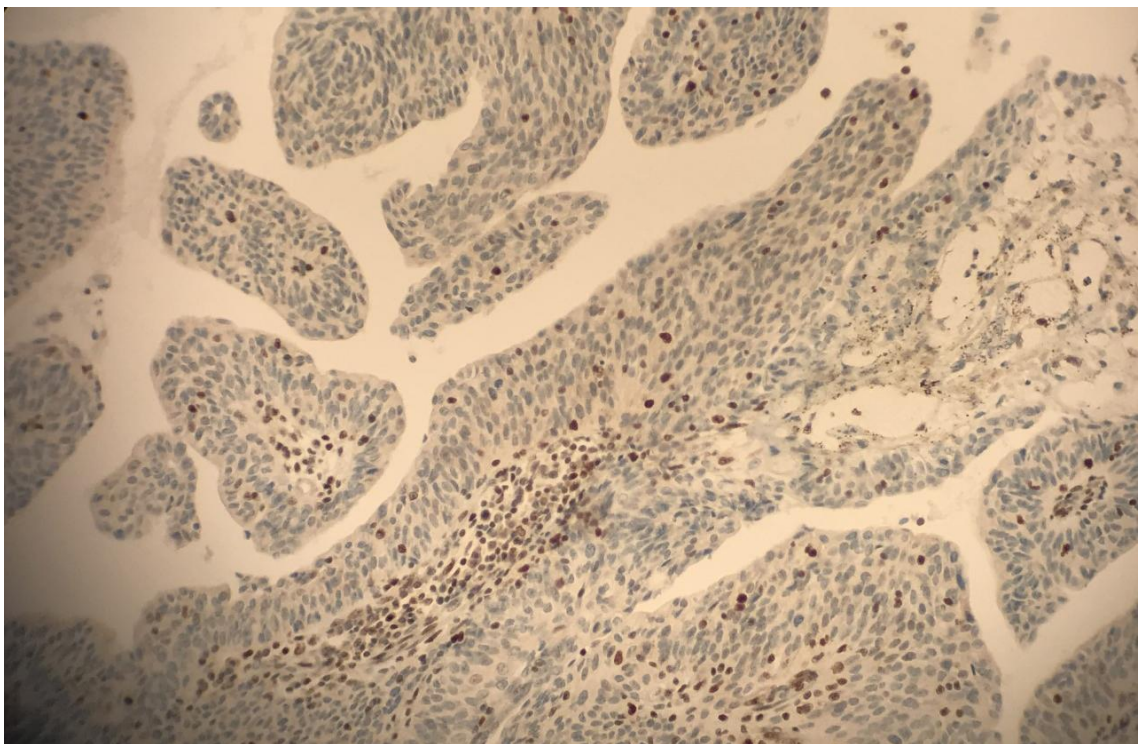
(Brierley et al., 2017)

Následně bylo zkontrolováno dřívější provedení imunohistochemických barvení MMR proteinů. U pacientů, u nichž vyšetření dříve nebylo provedeno, byl v případě dostupnosti kvalitního reprezentativního materiálu vybrán vhodný FFPE a barvení bylo provedeno až nyní. Za reprezentativní byl považován materiál, který nebyl rozsáhle nekrotický či arteficiálně rozsáhle termicky zhmožděný odběrem, byl dostupný v dostatečném množství (vyřazeny byly vykrájené případy) a v klasickém histologickém barvení HE nenesl výraznější známky autolytických změn.

Imunohistochemické barvení bylo hodnoceno dvěma nezávislými badateli (Karolína Buchová a MUDr. Kristýna Pivovarčíková, Ph.D.). Za pozitivní bylo považováno barvení v oblasti jádra nádorových buněk (viz obrázek 2). Negativní výsledek vykazoval absenci jaderného barvení v nádorových buňkách a však při současné pozitivní vnitřní kontrole v jádrech lymfocytů (viz obrázek 3).



Obrázek 2 Ukázka pozitivního barvení MMR proteinů (v tomto případě konkrétně MSH6), pouze jaderné barvení je považováno za pozitivní (vlastní zdroj).



Obrázek 3 Ukázka negativního barvení MMR proteinů (v tomto případě konkrétně ztráta exprese MSH2). Jádra nádorových buněk jsou v barvení kompletně negativní, v materiálu však vidíme pozitivně reagující jádra tumor-infiltrujících nenádorových lymfocytů (tzv. pozitivní vnitřní kontrola – známka správně proběhlé imunohistochemické reakce), (vlastní zdroj).

4 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

Retrospektivně byly vyhledány a opětovně hodnoceny všechny případy uroteliálního karcinomu horních cest močových (tj. uroteliální karcinom močové pánvičky a močovodu), které byly léčeny na urologické klinice FN Plzeň v období I/2010 – XII/2018. K vlastnímu vyhledávání byl využit nemocniční informační systém FN Plzeň (WinMedicalc). Hledáno bylo pomocí vyhledávače diagnóz (dle mezinárodní klasifikace nemocí diagnózy C65 a C66). Všechny vyhledané položky byly následně manuálně zrevidovány, pacienti nesplňující zahrnující kritéria (uroteliální karcinom horního močového traktu) byli ze studie vyřazeni.

4.1 Obecná charakteristika souboru

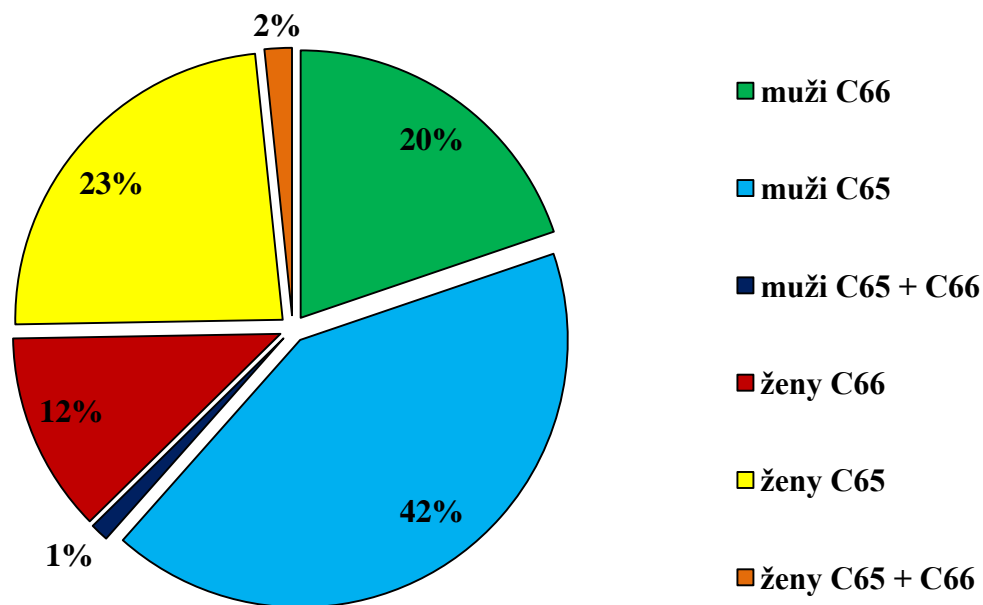
Celkem bylo v elektronickém nemocničním systému nalezeno 215 vyšetření od 182 pacientů splňujících výše jmenovaná kritéria – při revizi byla u všech pacientů v histologickém materiálu ověřena diagnóza UC, nádor byl přítomen v horních cestách močových.

Tabulka 6 Shrnutí jednotlivých diagnóz UC u obou pohlaví.

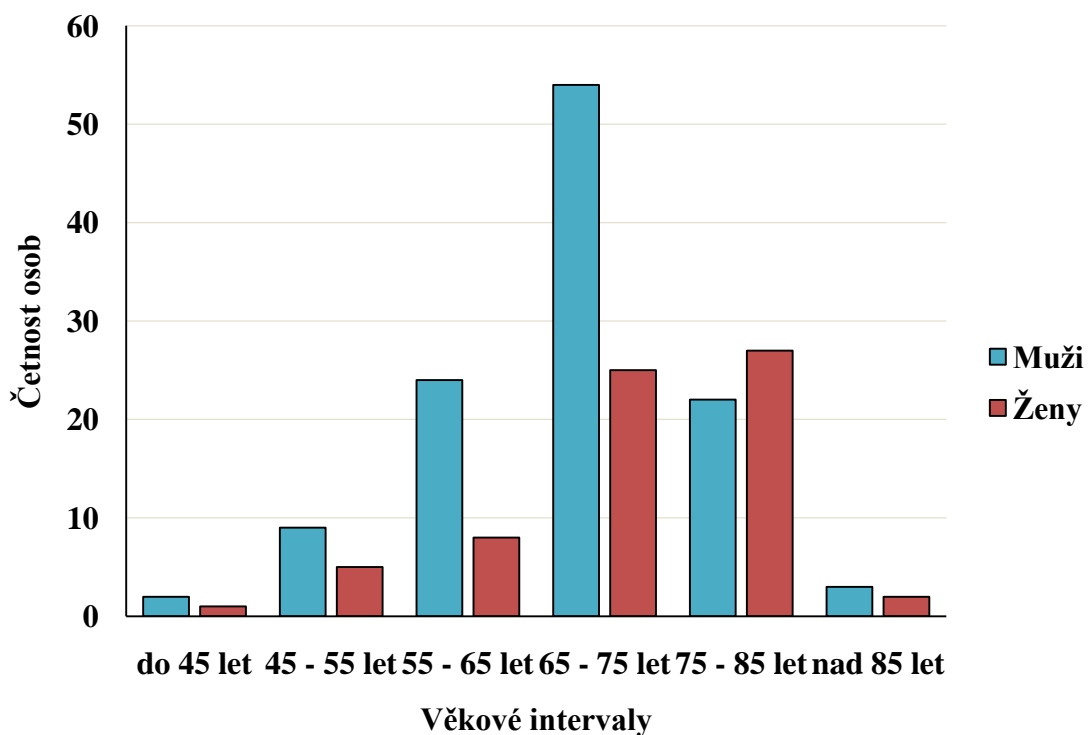
Diagnóza	Pohlaví		
	Muži	Ženy	Dohromady
C66	36	22	58
C65	76	43	119
Současná diagnóza C65 + C66	2	3	5
Celkem	114	68	182

(vlastní zdroj)

Jednalo se vesměs o starší pacienty, věkový průměr byl 70 let (medián 72 let). V souboru byla zaznamenána výrazná převaha pacientů mužů, kterých bylo v souboru celkem 114, žen bylo celkem 68 (tab. 6). Ženy v souboru byly při stanovení diagnózy UC UUT v průměru jen nepodstatně starší než muži- u žen byl věkový průměr v době stanovení diagnózy 72 let (medián 73 let); u mužů pak byl vypočítán věkový průměr 69 let (medián 70 let). Věková distribuce pacientů je znázorněna přehledně v grafu 2.



Graf 1 Zastoupení všech UC UUT v souboru, členěných na základě MKN diagnóz a pohlaví (vlastní zdroj).



Graf 2 Četnost všech pacientů s UC v horním močovém traktu dle věkových intervalů (vlastní zdroj).

Případy byly stratifikovány dle diferenciacie tumoru – gradu UC (data shrnuta v tabulce 7). Použita byla WHO klasifikace tumorů močového traktu a mužského genitálu z roku 1973 (viz. výše – materiál a metody). Ve 38 případech se jednalo o UC dobře diferencovaný (WHO grade 1), v 98 o UC středně diferencovaný (WHO grade 2), ve 45 případech o UC špatně diferencovaný (grade 3).

Tabulka 7 Rozdělení pacientů do skupin dle gradu UC (WHO 1973).

Diagnóza pacientů	GRADE		
	UC, G1	UC, G2	UC, G3
C65	18	64	33
C66	20	27	9
Současně C65 + C66	0	7	3
Celkem	38	98	45

(vlastní zdroj)

Případy byly klasifikovány i na podkladě stage onemocnění (tab. 8). Pro stanovení stage UC bylo použito aktuální 8. vydání TNM klasifikace zhoubných novotvarů z roku 2017 (viz. výše). Stage onemocnění byl ve 42 případech pTa, ve 45 pT1, ve 20 případech pT2, u 59 pacientů pT3 a u 7 pacientů pT4. U celkem 18 pacientů nádor napadl i lymfatické uzliny (u pěti pacientů pN1, u třinácti pacientů pN2). Dva pacienti měli histologicky potvrzené metastázy (pM1). V některých případech nebylo možné grade a stage UC u pacienta stanovit – v těchto případech se v převážné většině jednalo o velmi drobný materiál z punkce pod CT kontrolou, kde bylo možno pouze potvrdit uroteliální origo léze a stanovit maligní diagnózu, blíže se však ke grade a stage onemocnění v tomto limitovaném vzorku nebylo možné vyjádřit.

Tabulka 8 Rozdělení pacientů do skupin dle stage onemocnění.

Diagnóza pacientů	STAGE								
	pTa	pT1	pT2	pT3	pT4	pTis	pN1	pN2	pM1
C65	21	22	8	51	6	6	4	12	2
C66	20	18	9	7	1	0	1	1	0
Současně C65 + C66	1	5	3	1	0	0	0	0	0
Celkem	42	45	20	59	7	6	5	13	2

(vlastní zdroj)

4.2 Pacienti s nádorem renální pánvičky (C65)

Při členění pacientů dle jednotlivých MKN diagnóz bylo v tomto období zachyceno celkem 119 pacientů, kteří mohli být označeni za pacienty s nádorovým postižením UC pouze v oblasti renální pánvičky (tedy stratifikováni MKN diagnózou C65). V tomto souboru bylo zaznamenáno celkem 43 žen a 76 mužů (graf 1). Věkové rozmezí pacientů se pohybovalo od 32 do 88 let (průměr 70 let, medián 71 let).

V 18 případech se jednalo o UC dobře diferencovaný (grade 1), v 64 o UC středně diferencovaný (grade 2) a ve 33 případech o špatně diferencovaný UC (grade 3). U čtyř případů nebylo možné grade UC stanovit (dostupný byl jen velmi drobný a arteficiálně poškozený nereprezentativní vzorek, hodnocení gradu onemocnění z tohoto vzorku by bylo zavádějící, nemusel by odpovídat zbytku nádorové masy, proto neprovedeno).

Stage onemocnění odpovídal pTa v 21 případech, pT1 ve 22 případech, pT2 v 8 případech, pT3 v 51 případech a pT4 v 6 případech. Z toho u několika případů byla současně zastižena i přítomnost uroteliálního carcinoma in situ/CIS (6 případů), či postižení lymfatických uzlin nádorem (4 případy s pN1, 12 případů s pN2) a ve dvou případech byla histologicky potvrzena i přítomnost vzdálených metastáz (pM1).

4.3 Pacienti s nádorem močovodu (C66)

U 58 pacientů byl diagnostikován uroteliální karcinom v oblasti močovodu (odpovídá MKN diagnóze C66). Tumor byl v této podskupině zaznamenán u 22 žen a 36 mužů (graf 1). Pacienti byli ve věku 49-92 let (průměr 70 let, medián 72 let).

Grade UC odpovídal ve 20 případech dobře diferencovanému UC (grade 1), ve 27 případech středně diferencovanému UC (grade 2) a v 9 případech šlo o špatně diferencovaný UC (grade 3). U dvou případů opět nebylo možné grade onemocnění zhodnotit.

Stage onemocnění v převážné většině případů odpovídal tzv. svalovinu neinfiltrujícímú nádoru - 20 případů bylo pTa, 18 případů bylo pT1. V menším procentu případů se jednalo o výrazně pokročilé onemocnění (9 případů se stage pT2, 7 případů se stage pT3 a jeden pacient s onemocněním pT4). Lymfatické uzliny byly postiženy nádorem u dvou pacientů (u jednoho pacienta pN1 a u jednoho pN2).

4.4 Pacienti s nádorem konkurentně v renální pánvičce i v močovodu

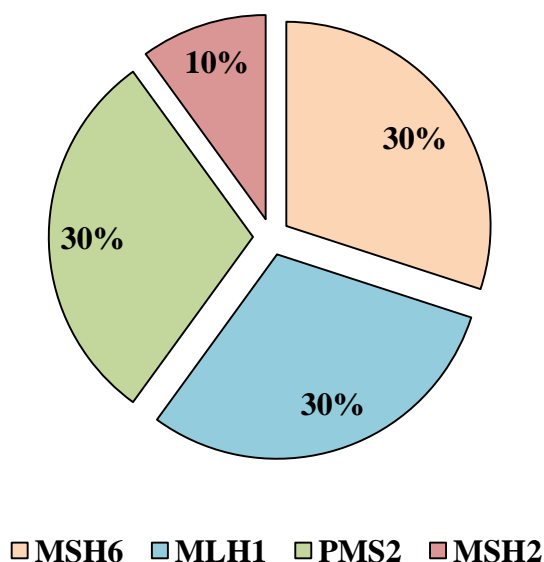
U pěti pacientů byl zachycen současně (konkurentně) UC renální pánvičky i UC močovodu (C65 + C66). Pacienti byli dva muži a tři ženy (graf 1), věkové rozmezí 65-85 let (průměr i medián 79 let).

Nádory v oblasti pánvičky odpovídaly středně diferencovanému (grade 2) UC u tří pacientů, u dvou pacientů byl tumor špatně diferencován (grade 3). V oblasti močovodu pak celkem čtyři pacienti měli UC středně diferencovaný (grade 2) a jeden pacient měl UC špatně diferencovaný (grade 3).

Stage u UC renální pánvičky byl u jednoho pacienta pTa, u tří pT1 a jeden pacient měl stage pT3. U tumoru močovodu měli dva pacienti stage pT1 a tři pT2.

4.5 Imunohistochemický průkaz MMR proteinů

Imunohistochemický průkaz MMR proteinů byl proveden celkem u 121/182 pacientů (66%) – přesněji u 73/119 pacientů s tumorem v pánvičce (C65), u 44/58 pacientů s UC v močovodu (C66) a u čtyř pacientů současně s diagnózou C65 i C66. V celkem devíti případech byla zaznamenána ztráta barvení některého z MMR proteinů (graf 3).



Graf 3 Ztráty exprese některého z MMR proteinů, které byly zachyceny celkem u devíti pacientů, graf znázorňuje frekvence ztráty exprese v rámci jednotlivých MMR proteinů (vlastní zdroj).

4.5.1 Pacienti s diagnózou C65

U pacientů s diagnózou C65 (UC renální pánvičky) bylo imunohistochemické vyšetření provedeno u 73 pacientů, z toho bylo 26 žen a 47 mužů, věkového rozmezí mezi 43-86 lety (průměr 69 let, medián 71 let). Ztráta exprese některého z MMR proteinů byla zjištěna u 5 pacientů (2x ztráta MLH1, 1x ztráta MSH6 a 3x ztráta PMS2) – bližší specifikace viz tabulka 9.

Tabulka 9 Pacienti s UC renální pánvičky (C65) s prokázanou ztrátou některého z MMR proteinů.

Pacient	Pohlaví	Věk	Stage	Grade	Lokalizace	MMR proteiny
1.	muž	83	pTa	UC, G2	horní kalich levé ledviny (mnohočetný tumor)	ztráta proteinu PMS2
2.	muž	76	pT1	UC, G1	pánvička pravé ledviny	ztráta proteinu PMS2
3.	muž	70	pTa	UC, G1	horní kalich pravé ledviny	ztráta proteinu MLH1
4.	muž	73	pT1	UC, G2	pánvička levé ledviny	ztráta proteinu MSH6
5.	žena	65	pT1	UC, G2	pánvička pravé ledviny	ztráta proteinů MLH1 a PMS2

(vlastní zdroj)

Jeden z pacientů, u kterého byla zachycena ztráta proteinu MSH6 je i z hlediska své osobní anamnézy velmi suspektní z LS. U tohoto pacienta byl kromě UC renální pánvičky se ztrátou exprese MSH6 (UC diagnostikován v XI/2018), diagnostikován a resekován i KRK (VI/2002, tj. ve věku pacienta 57 let), u kterého byla dodatečným vyšetřením též imunohistochemicky prokázána ztráta proteinu MSH6. Nález je tak vysoce suspektní z diagnózy LS (suspekce hraničící s jistotou – proto je i v našem souboru dále považován za pacienta s diagnózou LS). Pacient ovšem na definitivní formální potvrzení diagnózy genetickým vyšetřením z periferní krve (k potvrzení germinální mutace) t.č. čeká (pacient absolvoval konzultaci u klinického genetika s odběrem krve, výsledky vyšetření však nejsou v době odevzdání bakalářské práce k dispozici).

U ostatních čtyř pacientů s diagnózou C65 a ztrátou některého MMR proteinu dovyšetření neproběhlo. Tři pacienti byli předáni do péče spádového pracoviště a tím ztraceni pro náš následující follow-up (někteří z nich s největší pravděpodobností již zemřeli). U žádného z těchto tří pacientů nebyl nalezen v záznamech ŠÚP údaj o jiném

histologickém vyšetření (tedy o anamnéze tumoru), ale po podrobném prozkoumání dokumentace a anamnézy jednoho z pacientů bylo klinickým lékařem (urolog) zjištěno, že tento pacient (muž, 76 let, ztráta PMS2) má v anamnéze diagnózu KRK z polypektomie. Resekční výkon a histologické vyšetření ale bylo provedeno na jiném pracovišti než FN Plzeň, nemáme tak k dispozici bližší informace (např. jestli bylo provedeno imunohistochemické vyšetření MMR proteinů a s jakým výsledkem) ani materiál k dodatečnému testování. Bylo by tak vhodné tohoto pacienta kontaktovat, informovat a doporučit mu další vyšetření. Pouze jeden z těchto pacientů (muž, 70 let, ztráta MLH1) je dle elektronického systému dále ošetřován ve FN Plzeň. V rámci ŠÚP byl vyšetřován nejen pro zde v souboru prezentovaný UC močové pánvičky, ale též pro feochromocytom nadledviny a UC močového měchýře. Ač se nejedná o tumory typicky asociované s LS, tento pacient bude urologem kontaktován a konzultována s ním bude jeho osobní a rodinná anamnéza. Pokud urolog u pacienta na základě vzájemné diskuze usoudí, že by bylo vhodné pacienta dále vyšetřit a pacient nebude vyšetření odmítat, je potřeba nejdříve z nádorové tkáně provést detekci metylace promotoru *MLH1*. Pokud genetické vyšetření z resekované tkáně metylaci *MLH1* neprokáže, je pacient suspektní ze strany LS a mělo by být dále provedeno genetické vyšetření z periferní krve k průkazu germinální mutace.

4.5.2 *Pacienti s diagnózou C66*

Z celkového souboru 44 pacientů s diagnózou C66, u nichž bylo provedeno vyšetření MMR proteinů, bylo 15 žen a 29 mužů. Věkové rozmezí pacientů se pohybovalo v rozmezí 49-86 let (průměr 69 let, medián 72 let).

U pacientů s diagnózou C66 (UC močovodu) byla ztráta exprese některého z MMR proteinů zaznamenána u 3 pacientů (2x se jednalo o ztrátu MSH6 a 1x o ztrátu MLH1) – data shrnuta v tabulce 10.

Tabulka 10 Pacienti s UC močovodu (C66) s prokázanou ztrátou některého z MMR proteinů.

Pacient	Pohlaví	Věk	Stage	Grade	Lokalizace	MMR proteiny
1.	muž	71	pT1	UC, G2	pravý ureter	ztráta proteinu MSH6
2.	muž	81	pT1	UC, G2	levý ureter	ztráta proteinu MSH6
3.	žena	81	pTa	UC, G3	levý ureter	ztráta proteinu MLH1

(vlastní zdroj)

Následné dovyšetření bylo možné pouze u jednoho z těchto pacientů (muž, 71 let, ztráta MSH6) - pán byl indikován ke genetickému vyšetření mutace genu *MSH6* z periferní krve, na jehož základě byla potvrzena diagnóza LS. U pacienta byla prokázána zárodečná mutace *MSH6*, jednalo se o frameshift duplikaci c.741dupA (p.Arg248ThrfsTer8) v exonu 4 genu *MSH6*. Tato duplikace má za následek vznik předčasného STOP kodonu zhruba ve 20% délky sekvence proteinu MSH6. Tento nálezn je klasifikován jako patogenní.

Dva ostatní pacienti nebyli dovyšetřeni, v nemocničním systému jsou t.č. vedeni jako zemřelí. U žádného z těchto pacientů ŠÚP neeviduje jiné histologické vyšetření (tedy ani výskyt jiného nádoru).

4.5.3 *Pacienti se současnou diagnózou C65 a C66*

U pacientů se současnou diagnózou C65 a C66 (simultánní duplexní tumor) bylo vyšetření MMR proteinů provedeno u čtyř pacientů (u 3 žen, 1 muže, věkové rozmezí 65-83 let, průměr 78 let, medián 82 let). Ztráta exprese některého z MMR proteinů byla zjištěna v jednom případě (ztráta MSH2), více v tabulce 11.

Tabulka 11 Pacientka se současnou diagnózou C65 a C66 se ztrátou některého z MMR proteinů.

Pacient	Pohlaví	Věk	Stage	Grade	Lokalizace	MMR proteiny
1.	žena	82	pT1 pánvička pT1 močovod	UC, G2 pánvička UC, G2 močovod	tumor močového a renální pánvičky vpravo	ztráta proteinu MSH2

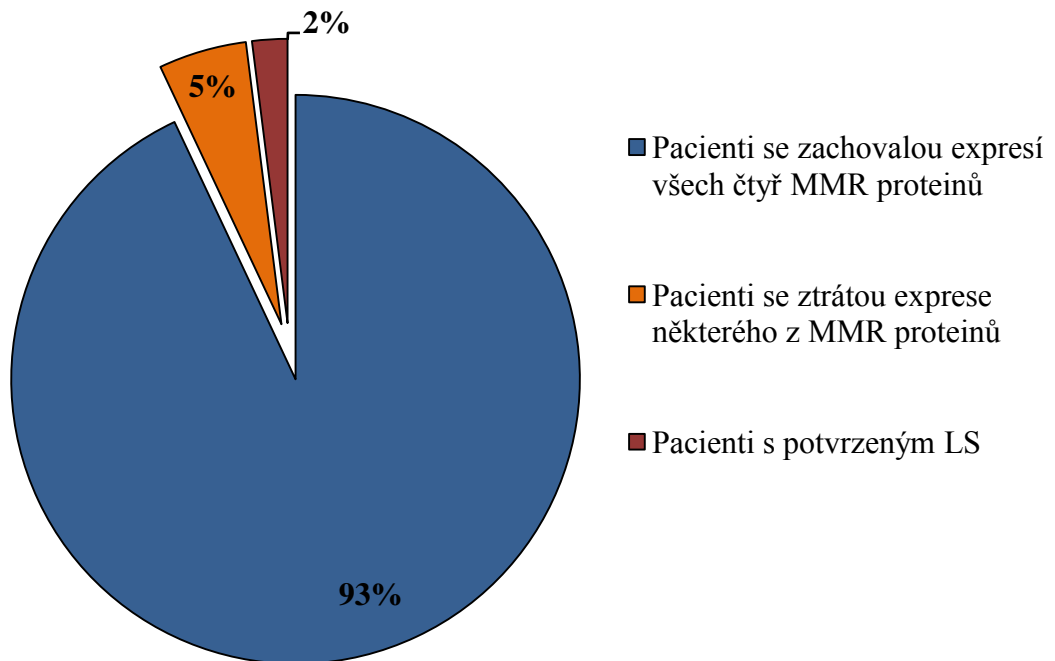
(vlastní zdroj)

Pacientka je v nemocničním systému vedena jako zemřelá, v záznamech ŠÚP nebylo u pacientky dohledáno žádné jiné histologické vyšetření, tedy pro nás u pacientky není známa žádná jiná neoplazie v anamnéze.

4.5.4 *Souhrn*

Pokud tedy shrneme naše výsledky, u 9/121 pacientů (7%) vyšetřených pomocí imunohistochemie byla prokázána ztráta některého z MMR proteinů. Pouze u dvou pacientů byla možnost je dále dovyšetřit, jeden má potvrzenou diagnózu LS, druhý na oficiální přiřčení diagnózy LS aktuálně čeká (graf 4).

Oba pacienti jsou ve věku nad 70 let (71 let a 73 let). Uroteliální karcinom byl v těchto případech grade 2 u pacienta s tumorem močového a grade 2 u pacienta s UC renální pánvičky. Stage onemocnění byl u obou pacientů pT1.



Graf 4 Procentuální vyjádření exprese MMR proteinů u 121 pacientů vyšetřených v našem souboru (vlastní zdroj).

5 DISKUZE

Karcinom močového měchýře patří k relativně častým nádorovým onemocněním v populaci, s převahou mužských pacientů - je celosvětově sedmou nejčastější malignitou u mužů a třináctou u žen. V rámci České republiky se jedná se o třetí nejčastější malignitu mužů, přičemž nejvíce pacientů s diagnózou UC močového měchýře je udáváno ve věkovém rozmezí 70 – 74 let (medián 69 let), (Mužík et al., ©2019).

Nádory močového měchýře představují celkově mezi 90-95% nádorů vývodného močového traktu (Uroweb, ©2020).

Karcinom UUT je tak v porovnání s UC močového měchýře onemocněním velmi vzácným, tvoří jen cca 5-10% UC (Siegel et al., 2019).

Celkově mezi UC napříč celým močovým traktem převažují nádory sporadické, tj. bez genetické predispozice „nedědičné“. Nejvýznamnějším rizikovým faktorem pro rozvoj sporadického UC je kouření cigaret, výrazně méně se pak v incidenci sporadického UC uplatňují i jiné noxy jako např. expozice aromatickým aminům, polycyklickým aromatickým uhlovodíkům (nejčastěji se jedná o pracovní expozice), či ionizujícímu záření.

Vrozená genetická predispozice pro rozvoj UC stojí za výrazně menším množstvím UC. V rámci vrozených syndromů nejčastěji spojovaných s nádory vývodného močového traktu (nikoliv ledviny) je třeba zmínit Lynchův syndrom a hereditární retinoblastom. Hereditární retinoblastom je však asociován s jiným typem malignity než uroteliálním karcinomem – u postižených pacientů může docházet ke vzniku leiomyosarkomu močového měchýře a to častěji po předchozím ozáření či léčbě cyklofosfamidem (Moch et al., 2016).

Mutace v MMR genech definující Lynchův syndrom, se dle literatury vyskytují u cca 9% pacientů s UC v UUT a cca u 1% pacientů s UC močového měchýře (Ju et al., 2018).

LS je tak onemocněním s relativně vysokou frekvencí výskytu u urologických malignit, proto i doporučené postupy EAU podporují screening všech pacientů s UC UUT mladších 65 let (Audenet et al., 2012; Pradere et al., 2017).

Pokud až u 9% pacientů s UC v UUT byl prokázán dědičný výskyt predispozice k rozvoji UC, mělo by tak u pacientů s tumorem v UUT být vždy aktivně pomýšleno na možnost genetického podkladu. Cílené aktivní hledání těchto pacientů potencuje

i fakt, že UC UUT je relativně vzácným typem malignity. Na velkém ústavu FN Plzeň bylo za posledních osm let průměrně každý rok vyšetřeno cca 23 pacientů s UC UUT. Jedná se tak o počty vyšetření v řádu několika desítek ročně, kde i ve vytíženém provozu patologické laboratoře ŠÚP (provádějící ročně přes 20 000 vyšetření) by u těchto raritních případů měl lékař dostávající do ruky materiál od pacienta s údajem na průvodním listu k bioptickému vyšetření „nádor horních cest močových“ vždy upozornět a dále indikovat vyšetření, která pomohou dědičnou predispozici odhalit – v rámci vyšetřování resekovaného materiálu pak nejčastěji imunohistochemické vyšetření exprese MMR proteinů. Imunohistochemické vyšetření samozřejmě není zadarmo a v konečném součtu prodražuje patologické vyšetření, ale i přes finanční náročnost převažují výhody. Jen na podkladě dostupných studií si můžeme snadno spočítat, že při 9% frekvenci výskytu LS u UC UUT a při průměrné roční frekvenci cca 23 pacientů s UC UUT vyšetřovaných na ŠÚP, je statisticky vysoce pravděpodobné, že při důsledném vyšetřování těchto biopsií bude ročně odhalen alespoň jeden pacient, resp. jeho jedna „nádorová“ rodina (LS je AD dědičné onemocnění), jejíž příslušníci mají nejen zvýšené riziko rozvoje UC, ale i statisticky častějšího kolorektálního karcinomu, či nádorů endometria (a řady méně častých nádorů). Celkem čtyři imunohistochemická barvení tak dokážou vytipovat pacienty, u kterých je vhodné provést další vyšetření za účelem detekce germinální mutace (vyšetření z periferní krve), která definitivně potvrdí diagnózu LS. Lehce zvýšená finanční náročnost na biopsii podle nás nepřevýší výrazné výhody záchytu pacientů s LS (a jejich rodinných příslušníků), neboť je známým faktem, že vždy je jednodušší, levnější a pro pacienta méně mutilující prevence nádorového onemocnění, než řešení následků rozsáhlého a možná i metastatického onemocnění.

Klasicky se udává, že LS se projevuje vznikem nádorů v mladém a středním věku. Naším dvěma pacientům s UC UUT a na základě něj diagnostikovaným LS však bylo v době diagnózy UC a LS 71 a 73 let. Jeden z pacientů (muž, 71 let) neměl ve své osobní anamnéze žádnou jinou nádorovou diagnózu. Druhý pacient (muž 73 let) měl pozitivní osobní anamnézu z hlediska dříve diagnostikovaného KRK (ten byl u pána diagnostikován o 16 let dříve než UC UUT, tedy ve věku 57 let). Stejně tak všichni zbylí pacienti, u kterých jsme imunohistochemicky prokázali ztrátu některého z MMR proteinů (a jsou tedy indikováni k dalšímu vyšetření pro potvrzení či vyvrácení diagnózy LS), byli starší 65 let. V našem souboru, žádný pacient pod 65 let neměl ztrátu exprese některého z MMR proteinů. To je sice s největší pravděpodobností dáno

výraznou převahou starších pacientů v souboru (pacientů s věkem menším nebo rovno 65 let bylo 49, pacientů s věkem nad 65 bylo 133), ale vzhledem ke kompletní absenci pacientů pod 65 let (0/49) mezi pacienty se ztrátou exprese MMR proteinů nesdílíme názor s doporučeními EAU, které doporučují provádět imunohistochemický screening u pacientů jen do věku 65 let. Podle našich zkušeností a na podkladě jasných dat z našeho souboru můžeme doporučit screening absolutně všech pacientů s UC UUT bez věkového omezení.

V rámci Plzeňských patologických pracovišť (ŠÚP a Bioptická laboratoř, s.r.o.) došlo již v minulosti k rutinnímu zavedení systému depistáže LS do patologické praxe, bohužel prozatím pouze u KRK a endometriálního karcinomu. V úvodu se jednalo o depistáž KRK postavenou na posuzování morfoloických znaků asociovaných s nestabilitou mikrosatelitů (tzv. MSI-H morfologie, viz. teoretická část práce). Později byly všechny KRK (a posléze i endometriální karcinomy) vyšetřovány imunohistochemicky panelem MMR proteinů (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2). Závěrem těchto snah byla diagnóza LS u 24 pacientů (ve 20 případech se jednalo o pacienty s KRK, ve 3 případech o pacientky s endometriálním karcinomem a jedna pacientka s adenokarcinomem duodena). Selektivně, pouze v rámci ŠÚP pak při tomto způsobu depistáže bylo odhaleno celkem 10 pacientů (frekvence výskytu LS v celém souboru na ŠÚP vyšetřovaných pacientů tak byla 0,71%) s ověřenou diagnózou LS (vyšetření periferní krve) a dalších 10 pacientů suspektních z diagnózy LS (avšak nedovyšetřených, tj. bez prokázané germinální mutace z periferní krve). Hloubková studie pracovníků ŠÚP pak v konečném hodnocení prokázala vyšší úspěšnost a výtěžnost univerzálního imunohistochemického screeningu LS u KRK a endometriálního karcinomu v porovnání s užitím výběrových depistážních metod, které jsou založené na klinických a morfoloických znacích. Univerzální imunohistochemický screening shledali více efektivní nejen díky vyšší citlivosti imunohistochemického stanovení oproti relativně subjektivním morfoloickým kritériím, ale také díky automatizaci procesu a zvýšení adherence k depistáži přímo u patologů (Dušek et al, 2018).

Kromě imunohistochemického screeningu rutinně aplikovaného na KRK a endometroidní karcinom by však mělo pracoviště přidat na seznam i rutinní provádění barvení MMR proteinů na všechny UC UUT, které jsou na pracovišti vyšetřovány.

Limitace naší snahy o účinnou diagnostiku LS vidíme jasně hned v několika problémech. Ten nejzákladnější spočívá ve faktu, že pacient, u kterého patolog

při zavedeném rutinním imunohistochemického screeningu sice diagnostikuje ztrátu exprese některého z MMR proteinů, je z diagnózy LS suspektní, nemusí však být vždy nosičem mutace genu. K potvrzení diagnózy LS tedy musí být dále vyšetřen - vždy je nutné genetické vyšetření periferní krve probanda s průkazem zárodečné mutace genu. Pokud nedojde k tomuto definitivnímu kroku, je celý systém rutinního imunohistochemického screeningu zcela zbytečným vyhazováním peněz. Ztráta exprese imunohistochemického barvení totiž může být vzácně podmíněna i jinými změnami než LS, a to zejména nejružnějšími artefakty - barvení může být ovlivněno fixací materiálu, přítomností nekrotické tkáně, limitovaného množství nádorových struktur, výrazným zhmožděním materiálu odběrem atd. Zároveň, i jiné genetické změny než mutace mohou vyvolat ztrátu exprese proteinu (ztráta exprese MLH1 může být podmíněna metylací promotoru *MLH1*, tato změna však většinou nebývá asociována s LS). Pacienta s imunohistochemicky prokázanou ztrátou exprese MMR proteinu tak nelze brát jako pacienta s LS. To potvrzuje i recentní studie s relativně velkým souborem pacientů (celkem 115 UUTUC), která prokázala, že u 13,9% pacientů pozitivně vyšetřených a potenciálně podezřelých na LS, byla definitivně diagnóza LS syndromu potvrzena u méně než poloviny (přesně pak u 5,2% těchto případů), (Metcalf et al., 2018).

Dále by mělo být zdůrazněno, že to, že imunohistochemická barvení neprokáží ztrátu exprese žádného z vyšetřovaných MMR proteinů též není absolutní záruka toho, že pacient nemůže trpět LS. Některé genetické změny asociované s LS mohou totiž vést ke změně v genomu pouze do té míry, že postižený gen vytváří inkompletní protein (který je defektní či nefunkční), protein má však zachovaný epitop a tedy i exprese daného proteinu je imunohistochemicky zachovaná (imunohistochemické barvení je pozitivní). Proto u pacientů se silným klinickým podezřením na LS (pozitivní osobní a rodinná anamnéza - Amsterodamská kritéria, Bethesda guidelines, viz. teoretický úvod), by testování z periferní krve mělo být provedeno bez ohledu na výsledky imunohistochemických barvení MMR proteinů v nádorové tkáni.

Celé kolečko diagnostiky LS tak není pouze o snaze patologické laboratoře, ale především o nastavení systému spolupráce mezi patologi a klinickými lékaři, kde základem je především edukovaný klinický lékař. Pokud patolog poskytne klinickému lékaři informaci o provedení imunohistochemických barvení MMR proteinů a jejich výsledcích, musí být klinický lékař schopen tyto informace interpretovat a vyvodit z nich příčinné důsledky, tzn. kontaktovat pacienta vysvětlit mu problematiku

a pozvat ho k osobní návštěvě nejlépe na oddělení klinické genetiky, kde je kromě genetické konzultace s analýzou rodokmenu proveden i odběr periferní krve a vyšetření na přítomnost vrozené mutace. Na stranu druhou, pouze snaživý patolog a edukovaný klinický lékař též nejsou zárukou zvýšené frekvence záchytu pacientů s LS a jejich rodin. Je totiž na pacientovi zda se rozhodne, že chce vyšetření podstoupit. Pacient má právo další vyšetřování odmítnout a možná někteří nadměrně úzkostní pacienti ani raději nemusí chtít vědět, že jsou ve zvýšeném riziku, či že jsou nosiči genetické zátěže. Zároveň, v praxi se setkáváme i s problémem, že ne vždy je snadné pacienta kontaktovat. Ve velkých krajských a fakultních nemocnicích podstupují často chirurgickou léčbu (a tedy i histologickou diagnostiku) pacienti, kteří jsou v péči některého z menších spádových center a do fakultní či krajské nemocnice přicházejí pouze na operační výkon, po kterém jsou na doléčení a následné sledování opět vráceni do příslušného menšího spádového centra či do rukou ambulantního specialisty. Tito pacienti jsou tak pro nás „ztraceni“ pro následné sledování a není ani jednoduché je kontaktovat.

Přesuneme-li se do období po potvrzení diagnózy LS, ani tam není situace zcela přímočará a jednoznačná. U pacienta s potvrzeným LS totiž vyvstává důležitá otázka – co pro pacienta může lékař vlastně udělat? Základem je u těchto pacientů sekundární prevence, tedy snaha o včasnou diagnostiku nádorového onemocnění, neboť jeho vznik bohužel ovlivnit nemůžeme. Zde se opět do popředí dostává edukovaný klinický lékař, který by měl vědět, co diagnóza LS přesně znamená a na co by se měl soustředit. LS je v podvědomí klinických lékařů totiž asociován především s KRK, většina ostatních malignit souvisejících s LS je ale často opomíjena (a to především UC UUT). V rámci urologických malignit by pak urolog měl přizpůsobit dispenzární péči faktu, že u pacientů s LS vzniká UC především v UUT a tedy opakované cystoskopie močového měchýře nejsou nejvhodnějším dispenzárním algoritmem - u těchto pacientů by měl být pravidelně vyšetřován i horní močový trakt. Též by měl urolog myslet na to, že pacient s LS může stejně tak jako UC mít i KRK či jiný tumor a pravidelně se ho dotazovat, zda je sledován i jinými specialisty a stejně tak jeho rodina.

Též ze zkušeností urologů FN Plzeň víme, že potvrzená diagnóza LS je jedna věc, předání této informace v rámci lékařské komunity i ostatním ošetřujícím lékařům pacienta je věc druhá a bohužel toto není samozřejmostí. Pokud pacient není dostatečně edukován o LS a jasně instruován a motivován, sám často aktivně informaci o diagnóze LS ošetřujícím lékařům nesděljuje. Celá situace ohledně LS je pak spíše o tom, zda lékař

sám aktivně na diagnózu u pacienta pomýšlí, pátrá v dokumentaci a elektronických systémech (zda a s jakým výsledkem bylo vyšetření provedeno), a či je pacient schopen na jasně daný dotaz validně odpovědět.

6 ZÁVĚR

U každého pacienta s UC UUT doporučujeme bez ohledu na věk a jeho anamnézu rutinní provádění imunohistochemických barvení MMR proteinů. Tento „univerzální imunohistochemický screening“ vede k automatizaci a vyšší adhezenci procesu diagnostiky LS a tedy věříme i k větší výtěžnosti v odhalování postižených pacientů a jejich rodin.

Na základě analyzovaných dat v tomto souboru navrhujeme pro zefektivnění diagnostiky LS u pacientů s UC UUT modifikovaný diagnostický algoritmus (schéma 4), který byl přijat do rutinního užívání ŠÚP FN Plzeň.

Agresivní diagnostika LS patologem však má cenu pouze za předpokladu spolupráce s edukovaným ošetřujícím lékařem pacienta, který ví, co daná diagnóza znamená, co pacientovi hrozí a jak s jeho diagnózou dále nakládat.

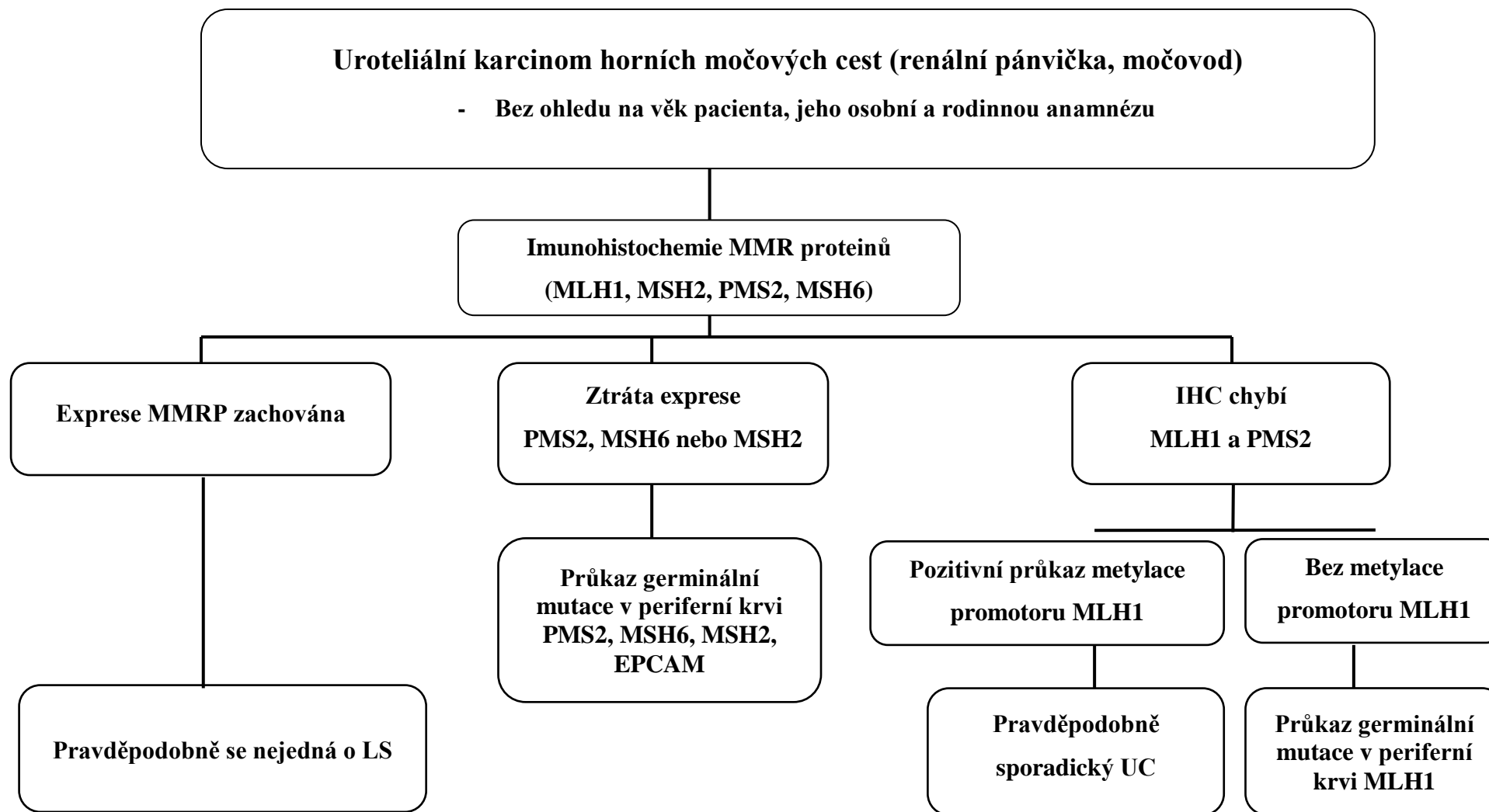


Schéma 4 Navržený modifikovaný diagnostický algoritmus LS pro pacienty s UC UUT (vlastní zdroj).

7 LITERATURA

AUDENET, F., COLIN, P., YATES, D. R., OUZZANE, A., PIGNOT, G., LONG, J. A., SOULIE M., PHÉ, V., BENSADOUN, H., GUY, L., RUFFION, A., VALERI, A., CORMIER, L., DROUPY, S., DE LA TAILLE, A., SAINT, F., FAÏS, P. O., HOULGATTE, A., CUSSENOT, O., ROUPRÊT, M., 2012. A proportion of hereditary upper urinary tract urothelial carcinomas are misclassified as sporadic according to a multi-institutional database analysis: proposal of patient-specific risk identification tool. *BJU international*. 110(11 Pt B): E583-589. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2012.11298.x.

BALKO, J., TONAR, Z., VARGA, I., et al., 2016. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton. 529 s. ISBN: 978-80-7553-009-7.

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 Research*. 58(22): 5248-5257. PMID: 9823339

BRIERLEY, J., GOSPODAROWICZ, M. K., WITTEKIND, CH., 2017. *TNM classification of malignit tumours*. 8. Hoboken: NJ: John Wiley&Sons. ISBN: 9781119263562.

ČIHÁK, R., 2002. *Anatomie 2*. 2. Praha: Grada. ISBN: 80-247-0143-X.

DUŠEK, M., HADRAVSKÝ, L., ČERNÁ, K., STEHLÍK, J., ŠVAJDLER, M., KOKOŠKOVÁ, B., DUBOVÁ, M., MICHAL, M., DAUM, O., 2016. Diagnóza Lynchova syndromu od patologa. *Klinická Onkologie*. 29(3): 180-186. DOI:10.14735/amko2016180.

DUŠEK, M., HADRAVSKÝ, L., STEHLÍK, J., ČERNÁ, K., ČURČÍKOVÁ, R., ŠVAJDLER, M., ŠAŠKOVÁ, B., DUBOVÁ, M., MICHAL, M., JIRÁSEK, T., DAUM, O., 2018. Výsledky morfológické depistáže Lynchova syndromu v období 2013-2016. *Česko-slovenská patologie*. 54(2), 86-92. ISSN: 1210-7875; 1805-4498 (elektronická verze).

FUNKHOUSER, W. K., LUBIN, I. M., MONZON, F. A., ZEHNB AUER, B. A., EVANS, J. P., OGINO, S., NOWAK, J. A., 2012. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 14(2): 91-103. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.001.

GREEN, R. C., PARFREY, P. S., WOODS, M. O., YOUNGHUSBAND, H. B., 2009. Prediction of Lynch syndrome in consecutive patients with colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 101(5): 331-340. DOI: 10.1093/jnci/djn499.

HADRAVSKÝ, L., DAUM, O., MICHAL, M., *Lynchův syndrom* [online]. Plzeň: Bioptická laboratoř, ©2010-2020, poslední aktualizace 2. 5. 2017 [cit. 2020-05-28]. Dostupné z: <http://www.lynch.cz/>

HALVARSSON, B., LINDBLOM, A., RAMBECH, E., LAGERSTEDT, K., NILBERT, M., 2004. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Archiv*. 444(2): 135-141. DOI: 10.1007/s00428-003-0922-z.

JOOST, P., THERKILDSEN, C., DOMINGUEZ-VALENTIN, M., JÖNSSON, M., NILBERT, M., 2015. Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of MSH2 Mutations. *Urology*. 86(6): 1212-1217. DOI: 10.1016/j.urology.2015.08.018.

JU, J. Y., MILLS, A. M., MAHADEVAN, M. S., FAN, J., CULP, S. H., THOMAS, M. H., CATHRO, H. P., 2018. Universal Lynch Syndrome Screening Should be Performed in All Upper Tract Urothelial Carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology*. 42(11): 1549-1555. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001141.

KACEROVSKÁ, D., KAZAKOV, D. V., ČERNÁ, K., HADRAVSKÝ, L., MICHAL, M. JR., DOSTÁL, J., SKÁLOVÁ, A., MICHAL, M., 2010. Muir-Torre syndrom - fenotypická varianta Lynchova syndromu. *Česko-slovenská patologie*. 46(4): 86-94. ISSN: 1210-7875; 1805-4498 (elektronická verze).

KOLÁŘ, Z., a kol., 2003. *Molekulární patologie nádorů*. 1. Olomouc: Epava. ISBN: 80-86297-15-2.

LICHNOVSKÝ, V., MALÍNSKÝ, J., MALÍNSKÁ, Z., 2007. *Přehled histologie člověka v obrazech 1. díl*. 1. Olomouc: Univerzita Palackého Olomouc. ISBN: 978-80-244-1769-1.

LUKÁŠ, Z., DRÁBEROVÁ, E., FEIT, J., VOJTĚŠEK, B., 1997. *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice*. 1. Brno: Masarykova univerzita. ISBN: 80-210-0620-X.

LÜLLMANN-RAUCH, R., 2012. *Histologie*. 3. Praha: Grada. ISBN: 978-80-247-3729-4.

LYNCH, H. T., ENS, J. A., LYNCH, J. F., 1990. The Lynch syndrome II and urological malignancies. *Journal of Urology*. 143(1): 24-28. DOI: 10.1016/s0022-5347(17)39853-1.

MESCHER, L. A., 2018. *Junqueirovy základy histologie*. 1. Praha: Galén. ISBN: 978-80-7492-324-1.

METCALFE, M. J., PETROS, F. G., RAO, P., MORK, M. E., XIAO, L., BROADDUS, R. R., MATIN, S. F., 2018. Universal Point of Care Testing for Lynch Syndrome in Patients with Carcinoma. *The Journal of urology*. 199(1): 60-65. DOI: 10.1016/j.juro.2017.08.002.

MOCH, H., HUMPREY, A. P., 2016. *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs*. 4. Lyon: International Agency for Research on Cancer. ISBN: 978-92-832-2437-2.

MOSTOFI, F. K., SOBIN, L. H., TORLONI, H., 1973. *Histological classification of tumors – Histologic typing of urinary bladder tumors*. Geneva, Switzerland. ISBN: 9241760109

MUŽÍK J., DUŠEK, L., BABJUK, M., KUBÁSEK, M., FÍNEK, J., PETRUŽELKA, L., *Uroweb – webový portál pro analýzu a vizualizaci epidemiologie, diagnostiky a léčby urologických malignit* [online]. Brno: Masarykova univerzita, ©2019. [cit. 2019-10-25]. Dostupný z WWW: <http://www.uroweb.cz>. ISSN: 1804-6371. Verze 1.6d.

NYNSTRÖM-LAHTI, M., WU, Y., MOISIO, A. L., HOFSTRA, R. M., OSINGA, J., MECKLIN, J. P., JÄRVINEN, H. J., LEISTI, J., BUYS, C. H., DE LA CHAPELLE, A.

PELTOMÄKI, P., 1996. DNA Mismatch Repair Gene Mutations in 55 Kindreds With Verified or Putative Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer. *Human Molecular Genetics*. 5(6): 763-769. DOI:10.1093/hmg/5.6.763.

PAI, R. K., 2016. A Practical Approach to the Evaluation of Gastrointestinal Tract Carcinomas for Lynch Syndrome. *The American Journal of Surgical Pathology*. 40(4): e17-34. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000620.

PIÑOL, V., CASTELLS, A., ANDREU M., CASTELLVÍ-BEL, S., ALENDA, C., LLOR, X., XICOLA, R. M., RODRÍGUEZ-MORANTA, F., PAYÁ, A., JOVER, R., BESSA, X., 2005. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *The Journal of the American Medical Association*. 293(16): 1986-1994. DOI: 10.1001/jama.293.16.1986.

PITRA, T., PIVOVARČÍKOVÁ, K., SEDLÁČKOVÁ, H., HES, O., HORA, M., DAUM, O., 2017. Lynchův syndrom v rukách urologa. *Česká urologie*. 21(4), 272-279.

POVÝŠIL, C., ŠTEINER, I., 2007. *Speciální patologie*. 2. vydání. Praha: Galén – Karolinum. 430s. ISBN: 978-80-246-1442-7.

Pracovní postup SUP/005/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03.2014a.

Pracovní postup SUP/006/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03.2014b.

Pracovní postup SUP/007/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03.2014c.

Pracovní postup SUP/008/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03.2014d.

Pracovní postup SUP/002/04. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 04. 2016a.

Pracovní postup SUP/015/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03.2016c.

Pracovní postup SUP/014/03. Šiklův ústav patologie FN Plzeň. Zpracoval/a: DAUM, O., Verze 03.2016d.

PRADERE, B., LOTAN, Y., ROUPRÊT, M., 2017. Lynch syndrome in upper urinary tract urothelial carcinoma: significance, screening, and surveillance. *Current Opinion in Urology*. 27(1): 48-55. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000340.

ROUPRÊT, M., BABJUK, M., COMPÉRAT, E., ZIGEUNER, R., SYLVESTER, R. J., BURGER, M., COWAN, N. C., GONTERO, P., VAN RHIJN, B. W. G., MOSTAFID, A. H., PALOU, J., SHARIAT, S. F., 2018. European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: 2017 Update. *European Urology*. 73(1): 111-122. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.07.036.

SIEGEL, R. L., MILLER, K. D., JEMAL, A., 2019. Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 69: 7-34. DOI:10.3322/caac.21551.

SHIA, J., TANG, L. H., VAKIANI, E., GUILLEM, J. G., STADLER, Z. K., SOSLOW, R. A., KATABI, N., WEISER M. R., PATY, P. B., TEMPLE, L. K., NASH, G. M., WONG, W. D., OFFIT, K., KLIMSTRA, D. S., 2009. Immunohistochemistry as First-line Screening for Detecting Colorectal Cancer Patients at Risk for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: A 2-antibody Panel May be as Predictive as a 4-antibody Panel. *The American Journal of Surgical Pathology*. 33(11): 1639-1645. DOI: 10.1097/PAS.0b013e3181b15aa2.

SIDRANSKY, D., FROST, P., VON ESCHENBACH, A., OYASU, R., et al., 1992. Clonal origin of bladder cancer. *The New England Journal of Medicine*. 326(11): 737-740. DOI: 10.1056/NEJM199203123261104.

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., BARRET, J. C., FREEDMAN, A. N., SRIVASTAVA, S., 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*. 96(4): 261-268. ISSN: 1460-2105.

Uroweb: Upper Urinary Tract Urothelial Cell Carcinoma [online]. EAU Guidelines Office, Arnhem, The Netherlands: European Association of Urology, ©2020 [cit. 2020-05-28]. Dostupné z: <https://uroweb.org/guideline/upper-urinary-tract-urothelial-cell-carcinoma/>

VACEK, Z., 1995. *Histologie a histologická technika. Díl 2. 1.* Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN: 80-7013-202-7.

VAN DER KLIFT, H., WIJNEN, J., WAGNER A., VERKILEN, P., TOPS, C., OTWAY, R., KOHONEN-CORISH, M., VASEN, H., OLIANI, C., BARANA, D., MOLLER, P., DELOZIER-BLANCHET, C., HUTTLER, P., FOULKES, W., LYNCH, H., BURN, J., MÖSLEIN, G., FODDE, R., 2005. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes, Chromosomes and Cancer*. 44(2), 123-138. DOI: 10.1002/gcc.20219.

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). *Diseases of the Colon & Rectum*. 34(5): 424-425, ISSN: 0012-3706.

VASEN, H. F., WATSON, P., MECKLIN, J. P., LYNCH, H. T., 1999. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 116(6): 1453-1456. DOI: 10.1016/s0016-5085(99)70510-x.

VISSER, O., ADOLFSSON, J., ROSSI, S., VERNE, J., GATTA, G., MAFFEZZINI, M., FRANKS, K. N., 2012. Incidence and survival of rare urogenital cancers in Europe. *European Journal of Cancer*. 48(4): 456-464. DOI: 10.1016/j.ejca.2011.10.031.

8 PŘÍLOHY



FAKULTNÍ NEMOCNICE PLZEŇ

Útvar náměstka pro ošetrovatelskou péči

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň - Bory
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň - Lochotín
IČO 00669806 tel.: 377 401 111, 377 103 111

Vážená paní

Karolína Buchová

Studentka oboru Zdravotní laborant

Zdravotně sociální fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se získáváním / zpracováním anonymizovaných informací o laboratorních metodách, používaných na pracovišti *Šiklova ústavu patologie (ŠÚP) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Lynchův syndrom u pacientů s uroteliálním karcinomem horních cest močových: zkušenosti jednoho centra*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka ŠÚP souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. **Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.**
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být zcela anonymizovány.
- Sběr informací budete provádět pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je ***Pivovarčíková Kristýna, MUDr. Ph.D., lékařka ŠÚP FN Plzeň.***

Po zpracování Vámi zjištěných údajů **poskytnete** zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel. 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

5. 3. 2019

9 SEZNAM ZKRATEK

AD	Autosomal dominant
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CIS	Carcinoma In Situ
CRC	Colorectal Cancer
DAB	Diaminobenzidine
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EPCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule
EAU	Evropská Asociace Urologů
FFPE	Formalin Fixed Parafin Embedded blocks
G1	Grade 1
G2	Grade 2
G3	Grade 3
GDPR	General Data Protection Regulation
HE	Hematoxylin Eosin
HPF	High Power microscopical Fields
IHC	Immunohistochemistry (imunohistochemie)
KRK	Kolorektální Karcinom
LS	Lynchův Syndrom
MKN	Mezinárodní Klasifikace Nemocí
MLH1	Mut L Homolog 1
MLH3	Mut L Homolog 3
MMR	Mismatch Repair
MMRP	Mismatch Repair Protein
MSH2	Mut S Homolog 2
MSH3	Mut S Homolog 3
MSH6	Mut S Homolog 6
MSI	Microsatellite Instability
MSI-H	Microsatellite Instability – High
MSS	Microsatellite Stable
MTS	Muir-Torreho Syndrom
PMS1	Postmeiotic Segregation Increased 1

PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 2
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potentia
ŠÚP	Šiklův Ústav Patologie
TBS	Tris-bufferedsaline
TNM	Tumor, Node, Metastases
UICC	Union for International Cancer Control
UC	Urothelial Carcinoma (uroteliální karcinom)
UUT	Upper Urinary Tract (horní močový trakt)
UUTUC	Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma