

Diagnóza Lynchova syndromu od patologa

Lynch Syndrome – the Pathologist's Diagnosis

Dušek M.^{1,2}, Hadravský L.¹, Černá K.², Stehlík J.², Švajdler M.^{1,2}, Kokošková B.^{1,2}, Dubová M.¹, Michal M.¹, Daum O.^{1,2}

¹Šíklův ústav patologie, LF UK a FN Plzeň

²Bioptická laboratoř, s.r.o., Plzeň

Souhrn

Lynchův syndrom (dříve nazývaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) je nejčastější genetickou příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu. Způsobuje jej zárodečná mutace některého z genů, které jsou zodpovědné za opravy chyb ve struktuře DNA vznikající při její replikaci. V důsledku toho dochází k dysfunkci opravného komplexu způsobující rozvoj nestabilit mikrosatelitů (MSI), která je asociovaná se zvýšením rizika vzniku nádorů, zejména kolorektálního karcinomu. V současné době se odhaduje, že až 5 % kolorektálních karcinomů vzniká v souvislosti s Lynchovým syndromem. Vzhledem k této poměrně vysoké četnosti, absenci premorbidního fenotypu, familiárnímu výskytu a prezentaci maligních nádorů v produkтивním věku je včasná diagnostika Lynchova syndromu důležitá nejen z etického, ale i ekonomického hlediska. Klinická kritéria představovaná zejména revizovanými Bethesda guidelines, která byla navržena pro detekci pacientů vhodných ke genetickému vyšetření možnosti Lynchova syndromu, nejsou však dostatečně senzitivní. Vyšší senzitivity lze dosáhnout aplikací metod moderní patologie. Tato diagnostika je založena na přímém nebo nepřímém průkazu MSI. Mezi metody nepřímého průkazu MSI patří jednak detekce morfologických znaků asociovaných s MSI při histologickém vyšetření vzorků kolorektálních karcinomů, jednak imunohistochemické vyšetření exprese MMR proteinů, které navíc umožní i identifikaci dysfunkčního proteinu. K vyloučení sporadických MSI-H karcinomů způsobených somatickou epigenetickou inaktivací MMR genu z dalšího testování slouží hlavně vyšetření genu *BRAF* a analýza metylace promotoru genu *MLH1*. Podezření na Lynchův syndrom vyplývající z výsledků těchto vyšetření by mělo být na konec potvrzeno detekcí zárodečné mutace některého z MMR genů v periferní krvi pacienta.

Klíčová slova

kolorektální karcinom – Lynchův syndrom – HNPCC – MSI – nestabilita mikrosatelitů

Summary

Lynch syndrome (formerly known as hereditary non-polyposis colorectal cancer) is the most common hereditary colorectal cancer syndrome. The syndrome is caused by a germline mutation of one of the mismatch repair (MMR) genes responsible for DNA replication error repair. Impaired function of the proteins encoded by these genes leads to microsatellite instability (MSI), which is associated with increased incidence of neoplasms: mainly colorectal cancer. According to recent estimates, up to 5% of all colorectal cancers are associated with Lynch syndrome. Due to this relatively high frequency, familial occurrence, absence of premorbid phenotype, and development of malignant tumors at a reproductive age, a correct diagnosis is important not only from an ethical but also from an economical point of view. Unfortunately, clinical means of diagnosis, namely, the revised Bethesda guidelines designed to detect patients suitable for genetic testing for Lynch syndrome, lack sufficient sensitivity. The methods associated with modern pathology are more sensitive than the clinical criteria used to detect patients suspected of having Lynch syndrome. Pathological diagnostics are based on direct or indirect detection of MSI. Indirect methods include analysis of morphological signs associated with MSI in histological samples from colorectal carcinoma patients and immunohistochemical investigation of MMR protein expression. To rule out sporadic cases caused by epigenetic inactivation of an MMR gene, molecular genetic investigation of the *BRAF* gene and methylation analysis of the *MLH1* promoter are performed during diagnostic workup. A suspicion of Lynch syndrome based on the results of the methods mentioned above should be proven by detection of a germline mutation in an MMR gene in peripheral blood leukocytes.

Key words

colorectal cancer – Lynch syndrome – HNPCC – MSI – microsatellite instability

Práce byla realizována za podpory Interní grantové agentury MZ ČR (IGA MZ ČR) pod grantovým číslem IGA NT14227 a s příspěvím SVV 260171/2015.

This work was supported by IGA NT14227 with contribution of SVV 260171/2015.

Autori deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.

Šíklův ústav patologie

LF UK a FN Plzeň

Dr. E. Beneše 13

305 99 Plzeň

e-mail: daum@fnplzen.cz

Obdrženo/Submitted: 9. 6. 2015

Přijato/Accepted: 20. 3. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2016180>

Lynchův syndrom – definice

Lynchův syndrom (LS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku maligních nádorů, patří tedy mezi familiární karcinomové syndromy. Nejčastějším karcinomem vznikajícím při LS je kolorektální karcinom (colorectal cancer – CRC), je však zvýšené riziko vzniku i dalších malignit, zejména karcinomů endometria, tenkého střeva, ovaria, ledvinové pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže. Na podkladě LS vzniká podle současných odhadů až 5 % CRC. Fakt, že je dosud do značné míry přehlížen, zejména v porovnání s méně častou familiární adenomatouzní polypózou (FAP), která je zodpovědná pouze za 1 % CRC, je způsoben tím, že karcinomy při LS nevznikají v terénu polypózy (definované jako > 100 polypů), což však neznamená, že nemohou být přítomny žádné polypy. Absence polypózy nebo jiného premorbidního fenotypu, tedy benigních změn, které by umožňovaly diagnostikovat tento syndrom ještě před vznikem maligního tumoru (jako je tomu třeba v případě FAP nebo neurofibromatózy 1. typu) výrazně ztěžuje jeho včasné klinickou diagnostiku. Na rozdíl od familiárních karcinomových syndromů s premorbidním fenotypem tak může být LS diagnostikován prakticky až při nálezu maligního tumoru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného probanda. Výjimkou z tohoto pravidla je fenotypická varianta LS projevující se vznikem kožních sebaeozných nádorů, označovaná jako Muir-Torreho syndrom (MTS) [1].

Základní klinické charakteristiky syndromu karcinomové rodiny byly definovány dr. Lynchem takto [2]:

1. zvýšená incidence adenokarcinomů, zejména kolorektálních a endometriálních,
2. zvýšené riziko multiplicity nádorů,
3. autozomálně dominantní dědičnost,
4. vznik karcinomů v mladším věku.

Ačkoli byl LS dlouhou dobu znám spíše pod pojmem hereditární nepolyposní kolorektální karcinom (hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC) [3], v současné době se od tohoto označení upouští a preferuje se

eponymon Lynchův syndrom, a to jednak z důvodu možnosti výskytu extra-kolonických malignit, jednak kvůli příliš zakořeněné asociaci diagnózy HNPCC s Amsterdamskými kritérii, která je ve světle dnešních poznatků již neudržitelná, a konečně i jako vyjádření úcty otci Lynchova syndromu.

V současnosti je tedy diagnóza LS založena především na molekulárně genetickém vyšetření (viz následující kapitolu), přičemž pro případy splňující Amsterdamská kritéria, ale bez prokazatelného genetického poškození definujícího LS, se doporučuje termín familiární kolorektální karcinom typu X [4].

Molekulární biologie LS

Detailně je molekulárně biologický podklad LS popsán v textu určeném primárně patologům [5], pro pochopení dále uváděných diagnostických algoritmu je zde však třeba alespoň stručně vysvětlit základní pojmy.

MMR (mismatch repair)

MMR (neboli mismatch repair) proteiny jsou odpovědné za opravy v DNA vznikajících při replikaci (replication error repair – RER). Nejdůležitější z nich se spojují do funkčních heterodimerů MLH1-PMS2 a MSH2-MSH6. Naprostá většina případů LS je způsobena zárodečnou mutací genů kódujících tyto proteiny, tedy tzv. mismatch repair (MMR) genů [6,7]. Inaktivace obou alel některého z MMR genů vede k dysfunkci celého komplexu a ke vzniku tzv. MSI-H tumorů, tedy nádorů charakteristických vysokým stupněm tzv. instability mikrosatelitů (microsatellite instability – MSI) [8,9].

Mikrosateliity

Mikrosateliity jsou v genomu hojně se vyskytující úseky DNA tvořené několikanásobným opakováním jednoho až čtyř, vzácněji i více nukleotidů. Tyto krátké repetitivní sekvence jsou snadno zranielné při replikaci DNA, protože DNA polymeráza v oblasti repeatic „sklouzává“ a v důsledku toho dochází ke vzniku delších či kratších úseků. Ve „zdravé“ buňce s funkčním MMR systémem jsou však tyto alterace ihned detekovány a opraveny.

MSI

Délky jednotlivých mikrosateliitů (tedy počty opakování těchto sekvencí) jsou u zdravých jedinců ve všech buňkách stejné (mezi jedinci se však liší). Pokud ovšem nedochází ke korekcí chyb vznikajících při replikaci, potom může délka mikrosateliitů v rámci jednoho jedince kolísat, což je stav označovaný jako nestabilita mikrosateliitů (MSI). MSI není však jednoznačně daným stavem, který by přímo způsoboval vznik nádorů. Jde spíše o semikvantitativní vyjádření genetického poškození DNA uvedeným mechanizmem. Stanovení stupně MSI je tedy arbitrární a spočívá ve stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů, přičemž na základě počtu postižených markerů se rozlišují stavy (hlavně nádory) se stabilními mikrosateliity (microsatellite stable – MSS), s nízkým stupněm instability (microsatellite instability, low – MSI-L) a s vysokým stupněm instability mikrosateliitů (microsatellite instability, high – MSI-H) [10].

MSI-H tumory

Tumory s MSI-H vznikají dvěma různými mechanizmy, a to buď jako sporadicke nádory vyvolané genetickými a/nebo epigenetickými změnami v somatické buňce, nebo jako familiárně se vyskytující nádory v rámci LS způsobené zárodečnou mutací některého z MMR genů. Teprve tehdy, je-li u osob nesoucích jednu zárodečně mutovanou alelu MMR genu během jejich života inaktivována i alela druhá, dochází ke vzniku maligních tumorů. Přičinou této inaktivace může být somatická mutace v druhé alele genu, ztráta heterozygotity (LOH) nebo metylace promotoru, jak tomu bývá u genu *MLH1* [11].

Nejčastěji postiženými geny při LS jsou *MLH1* a *MSH2* (dohromady více než 80 %) [12], dále následuje *MSH6* (10 %), a zbylé případy představují vzácná zárodečná postižení dalších MMR genů (*PMS2*, *PMS1*, *MSH3*, *MLH3*).

Vzácně mohou dysfunkci MMR proteinů a tím pádem i LS způsobovat komplikovanější mechanizmy, jako zárodečná hypermetylace promotoru genu *MLH1* vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci [13,14] nebo zárodečné delece 3' konce genu *EPCAM* (*TACSTD1*), které

zase vedou k epigenetické inaktivaci *MSH2* [15,16].

Variabilita klinických projevů LS

Klasický typ LS se prezentuje především CRC vznikajícím v tlustém střevě bez polypózy (tedy hereditárnímu ne-polypóznímu CRC). Mohou však být přítomny i extrakolonické malignity, a to relativně častěji u pacientů se zárodečnou mutací v *MSH2* než *MLH1* [17]. Mutace v *MSH6* jsou zodpovědné za poněkud atypické prezentace LS, neboť mají jednak nízkou penetranci, dále jsou 6krát častěji asociovány s karcinomy endometria než s nádory kolorektu, a navíc jsou u těchto pacientů CRC (v porovnání s LS způsobeným mutacemi jiných MMR genů) častěji levostranné. Důležité také je, že mutace v *MSH6* nevedou vždy k MSI-H, pravděpodobně díky tvorbě alternativního heterodimeru MSH2-MSH3, což může negativně ovlivnit jejich diagnostiku [18,19]. V některých případech je kombinace klinických znaků natolik výrazná, že dala vznik novým klinickým syndromům, které ve skutečnosti představují pouze varianty LS.

Muir-Torreho syndrom

MTS zahrnuje kombinaci nejméně jednoho kožního nádoru se sebaceózní differenciací a minimálně jednoho viscerálního tumoru. Již v roce 1981 dr. Henry Lynch poukázal na společnou možnou etiologii MTS a LS, když identifikoval pacienty s fenotypem MTS v rodině postižené LS [20]. MTS jako varianta LS je unikátní v tom, že jako jediná představuje premorbidní fenotyp, tedy vykazuje znaky umožňující diagnózu LS ještě před rozvojem CRC.

Kožní léze asociované s MTS jsou detailně popsány v textech určených primárně patologům [1] a gastroenterologům [21], obecně lze shrnout, že mnohočetné kožní nádory se sebaceózní differenciací vyskytující se u jedinců před 50. rokem života nebo postihující tělní partie mimo obličeji jsou silným indikátorem MTS [22].

Turcotův syndrom 1. typu

Turcotův syndrom (TS) je klasicky charakterizován společným výskytem nádorů mozku a CRC. Podtyp označovaný

jako TS 1. typu je blíže specifikován vazbou mozkového nádoru (hlavně gliomu) s CRC bez polypózy, přičemž může být také způsoben zárodečnou mutací některého z MMR genů, mutace byly detekovány zejména v *MLH1* a *PMS2* [23]. Za těchto podmínek se TS 1. typu jeví ve většině případů jako fenotypická varianta LS, zejména u dětských a mladistvých pacientů pak ještě spíše bývá součástí syndromu bialelického mismatch repair deficitu.

Syndrom bialelického mismatch repair deficitu

Syndrom bialelického mismatch repair deficitu (biallelic mismatch repair deficiency – BMMR-D, také constitutional mismatch repair deficiency – CMMRD) je velmi vzácně se vyskytující zárodečná bialelická mutace genů MMR. Vzhledem k tomu, že jde o onemocnění dědičné autozomálně recessivně, vyskytuje se zejména jako následek incestu. Tento stav je charakteristický fenotypickým obrazem připomínajícím neurofibromatózu 1. typu, zejména skvrnami café-au-lait, vznikem CRC již v mladém věku (průměrný věk v době diagnózy 16 let), mozkovými nádory, především glioblastomy vznikajícími již v prvních dvou dekadách života, a hematologickými malignitami (hlavně T lymfomy) [24,25].

Z diagnostického hlediska je důležité, že imunohistochemicky stanovený deficit MMR proteinu má vyšší senzitivitu než vyšetření MSI [26], přičemž tento imunohistochemický test lze provést i v nenádorové tkáni, např. v kožní biopsii [27].

Možnosti diagnostiky LS

Tradiční klinická diagnostika LS

Ke klinické diagnostice HNPCC primárně sloužila Amsterdamská kritéria [28], která byla pro zvýšení senzitivity, zejména s přihlédnutím k možnosti prezentace syndromu extrakolonickou malignitou, v roce 1998 revidována na Amsterdamská kritéria II [29]. Ale protože se zlatým standardem diagnózy LS stalo molekulárně genetické vyšetření, v popředí zájmu se ocitl záhyt co největšího množství pacientů pro toto vyšetření, nikoli samotná klinická diagnóza LS.

K identifikaci pacientů s CRC, u kterých by měla být vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (MSI), případně provedeno molekulárně genetické vyšetření, byla v roce 1996 vypracována a v roce 2002 revidována tzv. Bethesda guidelines (BG, resp. RBG), která berou v potaz nejen klinická kritéria, ale (v případě RBG) i morfologické znaky tumoru [30]. Bohužel ani tato širší kritéria nezachytí všechny případy LS [31], zejména v případě postižení *MSH6* a *PMS2* [32–36]. Podle současných odhadů až 25 % pacientů s LS není zachyceno systémem kritérií RBG. Jednou z velkých slabin jak Amsterdamských kritérií, tak (R)RBG je důraz na údaje získané rodinou anamnézou, které mohou trpět značnými nedostatky, ať už kvůli nedostatečné informovanosti pacienta, nezájmu vyšetřujícího lékaře, časté nejistotě ohledně biologického otcovství nebo i nízké penetrance zárodečné mutace (zejména v případě genu *MSH6*).

Moderní patologická diagnostika LS

Mezi hlavní argumenty pro současné snahy o zavedení senzitivnějšího systému depistáže, byť i za cenu snížení specificity, které je v tomto případě možné familiární tendence ke vzniku maligních nádorů ospravedlnitelné jak z hlediska etického, tak ekonomického, patří tato fakta:

1. falešná negativita v případě LS nemá za následek nerozpoznání tohoto syndromu pouze u vyšetřovaného pacienta, ale i u jeho případných příbuzných;
2. přibližně 1 ze 660 lidí je nositelem germinální mutace některého z MMR genů [37];
3. riziko vzniku CRC u LS je 60–80 % [38,39];
4. k progresi z adenomu do karcinomu pravděpodobně dochází během 2–3 let, na rozdíl od 8–10 let u sporadickejších případů [40,41];
5. průměrný věk v době diagnózy je 45 let, tedy asi o 20 let méně než u sporadickejšího CRC, navíc se zvýšeným rizikem synchronního a metachronního CRC [40].

V současné době jsou k dispozici tři základní modely vyhledávání pacientů s podezřením na LS, přičemž všechny mají

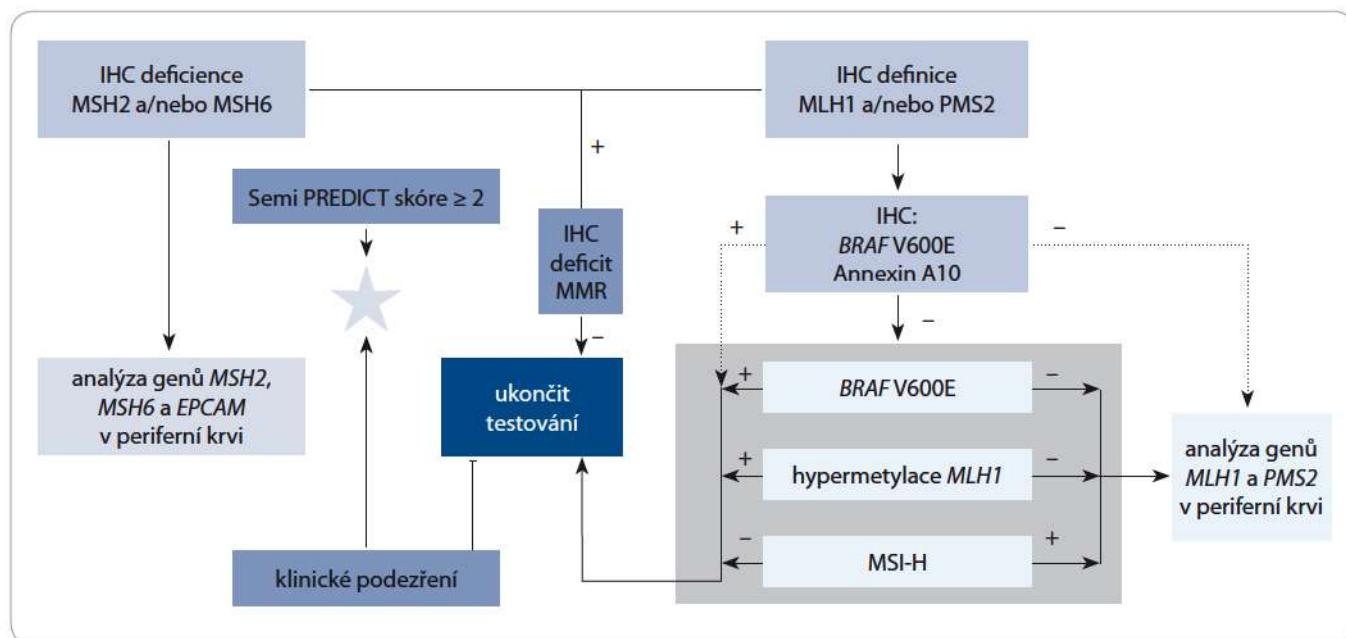


Schéma 1. Management diagnostiky LS.

Na pracovištích vyššího typu zapojených do depistáže LS diagnostika začíná vyšetřením všech CRC monoklonálními protilátkami proti jednotlivým MMR proteinům (hvězda). V případě průkazu deficience MSH2 a/nebo MSH6 je kontaktován klinik s požadavkem na zaslání nesrážlivé periferní krve spolu s Informovaným souhlasem pacienta k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů. Je-li prokázána deficience proteinů MLH1 a/nebo PMS2, následuje komplex vyšetření obsažený v šedém obdélníku, jehož cílem je vyloučit z dalšího vyšetřování případy sporadických MSI-H karcinomů, případně MSS karcinomy s falešnou negativitou IHC průkazu MMR proteinů. Volitelně lze místo této molekulárně genetických metod (nebo spolu s nimi) k vyloučení sporadického MSI-H karcinomu využít IHC vyšetření exprese annexinu A10 a/nebo mutované formy proteinu BRAF (bílý obdélník a přerušované šípky). Pouze MSI-H tumory bez mutace genu *BRAF*, hypermetylace promotoru *MLH1* a případně bez exprese annexinu A10 jsou indikovány k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů (opět je nutné získat vzorek periferní krve a Informovaný souhlas).

Není-li místní pracoviště patologie vybaveno laboratoří disponující možností imunohistochemických a molekulárně genetických vyšetření uvedených výše, měl by patolog provést histologické vyšetření znaků „MSI-H histologie“ podle modelu PREDICT. V případě suspektního Semi PREDICT skóre pak odeslat vzorek karcinomu (a optimálně i nenádorové tkáně pro možnost komparace) na specializované pracoviště provádějící výše uvedená imunohistochemická a molekulárně genetická vyšetření. Alternativně může být indikací k tomuto odeslání na specializované pracoviště žádost gastroenterologa či onkologa v případě klinické suspekce na LS (např. na podkladě RBG). Klinické podezření na hereditární podklad onemocnění může být stimulem i pro další pokračování vyšetřování pacientů, u nichž byl LS běžným algoritmem vyloučen (např. může být dále vyšetřována možnost MAP).

společné, že detekují MSI-H tumory, a to bud' přímo (tedy molekulárně genetickým stanovením MSI), nebo zprostředkováně. Do této druhé skupiny patří jednak imunohistochemická detekce MMR proteinů, jednak histologický průkaz morfologických znaků asociovaných s MSI.

V každém z modelů diagnostikujících MSI-H tumory je ale nutné před samotnou finančně nákladnou detekcí germinalních mutací MMR genů vyloučit možnost sporadických forem, protože čtyři z pěti MSI-H CRC jsou sporadické nádory způsobené zdaleka nejčastěji metylací promotoru *MLH1*. V současné době umožňuje rozlišení sporadických a LS asociovaných MSI-H karcinomů hlavně zapojení dvou metod molekulární pa-

tologie do managementu CRC. První z nich je analýza genu *BRAF*, konkrétně průkaz substituce V600E, která je přítomna až u 1/2 sporadických MSI-H CRC, ale (témař) nikdy u LS. Mutovaný protein navíc může být v nádoru prokázán i monoklonální protilátkou [42]. Druhou metodu představuje průkaz hypermetylace promotoru *MLH1*, která je markérem sporadických MSI-H CRC, a naopak až na výjimky nebývá přítomna u LS [43]. Nověji je také k dispozici protilátká proti annexinu A10 umožňující odlišit sporadické MSI-H karcinomy od LS [44].

1. Stanovení MSI

Rozlišení tumorů na MSS, MSI-L a MSI-H na základě stanovení nestability mezi-

národně kodifikovaných markerů se samozřejmě v diagnostice LS využívalo již dříve, ale cíleně, u pacientů splňujících BG (resp. RBG). Některé laboratoře zavedly plošné vyšetření všech CRC touto metodou k depistáži LS.

Mezi nevýhody tohoto systému patří výrazný nárůst zátěže laboratoř mo-lekulární genetiky, absence informace o tom, který z MMR genů je postižen, a konečně i fakt, že (navzdory obecnému přesvědčení) ne všechny LS asociované nádory musí vykazovat MSI-H (zejména jde o pacienty s germinální mutací genu *MSH6*). Praktické využití plošného vyšet-řování MSI narází též na nezbytnost po-rovnání stavu markerů ve tkáni nádoru s nenádorovou tkání. To vyžaduje bud-

přítomnost nenádorové tkáně v materiálu (např. chirurgický okraj střevního resekátu), nebo odběr periferní krve pacienta (zejména v případě endoskopicky získaných vzorků).

2. Imunohistochemická detekce MMR proteinů

Na našem pracovišti používáme jako vstupní vyšetření pro zařazení pacienta do diagnostického managementu LS imunohistochemické vyšetření exprese hlavních MMR proteinů (tedy MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6) u všech CRC a karcinomů endometria.

Senzitivita imunohistochemického vyšetření MMR proteinů a stanovení MSI je srovnatelná [45]. V současné době jsou obě metody (stanovení MSI a imunohistochemické vyšetření) vnímány jako komplementární, protože v kombinaci mají vyšší senzitivitu než při samostatném použití [46,47]. Také Jeruzalémská kritéria, podle nichž by měly být imunohistochemicky vyšetřeny všechny CRC u pacientů mladších 70 let, považují imunohistochemii za vhodnou vstupní diagnostickou metodu [48]. Argumenty pro upřednostnění imunohistochemického vyšetření jako iniciální diagnostické metody jsou tyto:

1. vyšší záchyt případů s mutací *MSH6*, které mohou uniknout při detekci MSI pomocí PCR, protože *MSH2* může také tvořit komplex s *MSH3* a tím pádem nemusí nutně vést ke stavu MSI-H [45,49];
2. imunohistochemická detekce MMR proteinů, na rozdíl od stanovení MSI, umožňuje určit postižený gen pro molekulárně genetické vyšetření, což výrazně sníží náklady při následné detekci případné zárodečné mutace;
3. při iniciálním vyšetření není zapotřebí kontrolní nenádorová tkáň;
4. imunohistochemické vyšetření odhalí i případy BMMR-D, které se často ne-projeví nestabilitou mikrosatelitů.

Další kroky diagnostického managementu založeného na iniciální imunohistochemické detekci MMR proteinů demonstreuje schéma 1.

3. Histologická detekce morfologických znaků asociovaných s MSI-H

Pro většinu pracovišť patologie, která vyšetřují biopatické vzorky karcinomů

Tab. 1. Model PREDICT.

Znak	Skóre
lokalizace v pravém tračníku	1,6
disekující mucin (jakékoli množství)	1,6
věk < 50 let	1,3
tumor infiltrující lymfocyty (TIL)	1,3
peritumorální lymfoidní les	0,7
plazmocyty tvoří > 25 % stromálních leukocytů	0,7

PREDICT skóre: maximální možné skóre: 7,8; suspekce na MSI-H: skóre ≥ 2,5

Semi PREDICT skóre: přítomny 2 a více znaků → MSI-H suspektní

tlustého střeva, endometria a dalších nádorů, však nejsou výše uvedené diagnostické metody přímo dostupné. I tato pracoviště se však mohou podílet na depistáži LS, a to detekcí histologických znaků charakteristických pro CRC s vysokým stupněm instability mikrosatelitů, tedy takzvané „MSI-H histologii“, která samotná má vyšší senzitivitu než souhrn zbývajících čtyř kritérií RBG [50].

Z různých studií, jejichž cílem bylo nalézt racionální histologický algoritmus detekce MSI-H karcinomů [51], se v současné době jako nejužitečnější model jeví Model PREDICT (Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors) [50], zejména ve své zjednodušené formě jako Semi PREDICT skóre (tab. 1). Histologickými znaky, na nichž je tento model založen, jsou: přítomnost mucinu disekujícího stroma v jakémkoli množství, přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů (TIL), peritumorální lymfoidní les a zastoupení plazmatických buněk mezi leukocyty ve stromatu převyšující 25 %. Detailněji je morfologie MSI-H CRC popsána v článku určeném patologům [5].

Mezi výhody histologického vyšetření patří i možnost levného, rychlého a jednoduchého vyloučení sporadických MSI-H karcinomů podmíněných většinou somatickou metylací promotoru genu *MLH1*. Zatímco tyto vznikají ze „sesilních serrated adenomů“ (do češtiny někdy překládaných do ještě horší formy „přisedlé pilovité adenomy“), prekurzorovou lézí karcinomů v terénu LS je „konvenční“ (tubulární, tubulovilozní nebo vilozní) adenom. Jsou-li tedy v pe-

riferii tumoru zbytky prekurzorového sesilního serrated adenomu, jde s největší pravděpodobností o sporadický MSI-H karcinom [52]. Nicméně tento jednoduchý diagnostický znak vyloučující LS nemusí být vždy dostupný, ať již z důvodu nedostatečného samplingu, nebo destrukce původního adenomu pokročilým adenokarcinomem.

Histologické vyšetření samo o sobě samozřejmě nemůže vést k diagnóze LS, může pouze vést k suspekci, která by měla vést k odeslání vzorku nádoru (a případně i nenádorové tkáně) na pracoviště patologie vyššího typu zabývající se diagnostikou LS. Zde pak následují kroky popsané ve schématu 1.

Problémy s algoritmy – suspektní LS a Lynch-like syndrom

Tyto dva termíny se obsahově částečně překrývají, bohužel jsou dnes některými autory používány jako synonyma, ač se jejich význam liší.

Termín „suspektní Lynchův syndrom“ (SLS) se dříve používal pro případy, kdy se nepodařilo prokázat molekulární podklad LS u pacienta splňujícího Amsterdamská kritéria a/nebo (R)RBG. Zjednodušeně řečeno, většinou se jedná o familiárně se vyskytující často více-četné karcinomy, zejména CRC, které nevznikají v terénu polypózy. Vysvětlení je samozřejmě řada, od environmentálních vlivů až po jiné familiární karcinomové syndromy, zejména tzv. *MUTYH* asociovanou polypózu (MAP), která se jednak nemusí prezentovat polypózou, jednak CRC vznikající při bialelické mutaci genu *MUTYH* může být také MSI-H [53].

Pojem „Lynch-like syndrom“ (LLS) je užší a lépe definovaný. Do této skupiny patří případy CRC, které vykazují známky dysfunkce MMR systému, tedy imuno-histochemicky detekovaný deficit některého z MMR proteinů a/nebo průkaz MSI-H, spolu s vyloučením možnosti sporadického MSI-H tumoru průkazem absence mutace genu *BRAF* a hypermetylace promotoru genu *MLH1*, ale u nichž byly molekulárně genetickým vyšetřením periferní krve vyloučeny zárodečné mutace MMR genů a 3' konce genu *EPCAM*. Kromě možnosti falešně pozitivních výsledků imunohistochemického vyšetření na jedné straně a existencí mutací nedetekovaných současnými metodami může být tento fenomén vysvětlen dvěma stavů prokázanými v posledních dvou letech: somatickým mozaicizmem [54] a somatickými bialelickými mutacemi MMR genů, jejichž možnost se dříve popírala [54–57].

Závěr

LS je familiární karcinomový syndrom způsobený zárodečnou mutací některého z genů, jehož proteinový produkt se účastní opravy chyb v DNA vzniklých při replikaci. Vzhledem k tomu, že výskyt LS v populaci se nyní odhaduje až na 5 % a vede ke vzniku maligních nádorů již v produktivním věku, sílí v současné době tlak na zvýšení senzitivity jeho detekce.

Efektivní algoritmus diagnostiky LS by měl být vysoce senzitivní, dostatečně specifický, (relativně) levný a logisticky jednoduchý. Z hlediska senzitivity a specifity se ukázalo zcela nedostatečným spoléhat se na klinická kritéria (zejména rodinnou anamnézu). Proto se současné postupy zaměřují na detekci MSI-H tumorů, a to buď přímo, zprostředkován pomocí imunohistochemie, nebo na základě histologického průkazu morfologických znaků specifických pro MSI-H karcinomy.

Prestože se již podařilo i v našich podmínkách zavést účinný algoritmus pro diagnostiku LS, nefunguje dosud dostatečně systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli organizovat další průběh vyšetření rodiny nemocného s LS. Na vině je do značné míry předávání pacienta po kolektomii mezi chirur-

gem, praktickým lékařem a onkologem, během kterého „zapadne“ žádost labaratoře molekulární genetiky o periferní krev, která je nezbytná k definitivnímu průkazu LS. K optimalizaci diagnostiky LS je tedy nezbytné zainteresovat do diagnostiky LS i klinického lékaře, bez jejichž aktivní účasti není možná ani kompletní diagnostika pacienta ani další vyšetření jeho rodinných příslušníků.

Literatura

- Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K et al. Muir-Torre syndrom – fenotypická varianta Lynchova syndromu. *Cesk Patol* 2010; 46(4): 86–94.
- Lynch HT, Krush AJ. Cancer family „G“ revisited: 1895–1970. *Cancer* 1971; 27(6): 1505–1511.
- Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15(3–4): 209–213.
- Lindor NM, Rabe K, Petersen GM et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293(16): 1979–1985.
- Daum O, Beneš Z, Hadravský L et al. Lynchův syndrom v rukách patologa. *Cesk Patol* 2014; 50(1): 18–24.
- Fishel R, Lescrore MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75(5): 1027–1038.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75(6): 1215–1225.
- Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53(24): 5853–5855.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109): 816–819.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(22): 5248–5257.
- Kruse R, Rutten A, Hosseini-Malayeri HR et al. Second hit* in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463–465.
- Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6): 763–769.
- Gazzoli I, Loda M, Garber J et al. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the *MLH1* gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925–3928.
- Hitchens MP, Wong JJ, Suthers G et al. Inheritance of a cancer-associated *MLH1* germ-line epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697–705.
- Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL et al. Heritable somatic methylation and inactivation of *MSH2* in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of *TACSTD1*. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112–117. doi: 10.1038/ng.283.
- Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al. Deletions removing the last exon of *TACSTD1* constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197–203. doi: 10.1002/humu.20942.
- Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J et al. Phenotype comparison of *MLH1* and *MSH2* mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044–2051. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0301.
- Hampel H, Frankel W, Panesu J et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810–7817.
- Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al. Molecular and clinical characteristics of *MSH6* variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 26–37.
- Lynch HT, Fusaro RM, Roberts L et al. Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the Cancer Family Syndrome. *Br J Dermatol* 1985; 113(3): 295–301.
- Kokošková B, Daum O, Beneš Z et al. Moderní diagnostika Lynchova syndromu. *Gastroenterol Hepatol* 2014; 68(2): 157–165.
- Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(1): 90–104.
- De Rosa M, Fasano C, Panariello L et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the *PMS2* gene. *Oncogene* 2000; 19(13): 1719–1723.
- Gallinger S, Aronson M, Shayan K et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous *MLH1* mutation. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 576–585.
- Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 323–333.
- Bakry D, Aronson M, Durno C et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014; 50(5): 987–996. doi: 10.1016/j.ejca.2013.12.005.
- Durno CA, Sherman PM, Aronson M et al. Phenotypic and genotypic characterisation of biallelic mismatch repair deficiency (BMMR-D) syndrome. *Eur J Cancer* 2015; 51(8): 977–983. doi: 10.1016/j.ejca.2015.02.008.
- Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424–425.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453–1456.
- Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261–268.
- Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851–1860.
- Liu T, Yan H, Kuismanen S et al. The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798–7802.
- van der Klift H, Wijnen J, Wagner A et al. 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 Cancer* 2005; 44(2): 123–138.
- Dovrat S, Figer A, Fidder HH et al. Mutational analysis of hMSH6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291–294.

- 35.** Hegde MR, Chong B, Blazo ME et al. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689–4693.
- 36.** Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312–322.
- 37.** de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005; 4(3): 233–237.
- 38.** Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489–498.
- 39.** Quehenberger F, Vasan HF, van Houwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; 42(6): 491–496.
- 40.** Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801–818.
- 41.** Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783–786.
- 42.** Kuan SF, Navina S, Cressman KL et al. Immunohistochemical detection of BRAF V600E mutant protein using the VE1 antibody in colorectal carcinoma is highly concordant with molecular testing but requires rigorous antibody optimization. *Hum Pathol* 2014; 45(3): 464–472. doi: 10.1016/j.humpath.2013.10.026.
- 43.** Domingo E, Laiho P, Olikainen M et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41(9): 664–668.
- 44.** Pai RK, Shadrach BL, Carver P et al. Immunohistochemistry for annexin A10 can distinguish sporadic from Lynch syndrome-associated microsatellite-unstable colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2014; 38(4): 518–525. doi: 10.1097/PAS.0000000000000148.
- 45.** Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293–300. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031.
- 46.** Funkhouser WK Jr, Lubin IM, Monzon FA et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14(2): 91–103. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.001
- 47.** Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E et al. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444(2): 135–141.
- 48.** Boland CR, Shike M. Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(7): 2197e1–2197e7. doi: 10.1053/j.gastro.2010.04.024.
- 49.** Boland CR, Koi M, Chang DK et al. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7(1): 41–52.
- 50.** Hyde A, Fontaine D, Stuckless S et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(12): 1820–1829. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f6a912.
- 51.** Roman R, Verdu M, Calvo M et al. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* 2010; 456(5): 533–541. doi: 10.1007/s00428-010-0896-6.
- 52.** Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113–130.
- 53.** Castillejo A, Vargas G, Castillejo MI et al. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *Eur J Cancer* 2014; 50(13): 2241–2250. doi: 10.1016/j.ejca.2014.05.022.
- 54.** Sourouille I, Coulet F, Lefevre JH et al. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam Cancer* 2013; 12(1): 27–33. doi: 10.1007/s10689-012-9568-9.
- 55.** Geurts-Giele WR, Leenen CH, Dubbink HJ et al. Somatic aberrations of mismatch repair genes as a cause of microsatellite-unstable cancers. *J Pathol* 2014; 234(4): 548–559. doi: 10.1002/path.4419.
- 56.** Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* 2014; 146(3): 643–646. doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.002.
- 57.** Haraldsdottir S, Hampel H, Tomsic J et al. Colon and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology* 2014; 147(6): 1308–1316. doi: 10.1053/j.gastro.2014.08.041.