

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Mikrosatelitní instabilita karcinomů tlustého
střeva a komparace hodnocení dvou pracovišť**

Marie Brachaczková

Vedoucí bakalářské práce: prof. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Pavel Hurník, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2024/2025

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala MUDr. Pavlovi Hurníkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, jeho čas, trpělivost, poskytnutí materiálu a cenné připomínky. Dále bych chtěla poděkovat prof. PharmDr. Petru Nachtigalovi, Ph.D. za vedení mé práce ze strany školy.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

OBSAH

Abstrakt.....	7
Abstract.....	9
1. Úvod	11
2. Zadání – cíl práce.....	12
3. Teoretická část	13
3.1 Tlusté střevo	13
3.1.1 Anatomie	13
3.1.2 Histologie	14
3.2 Neoplázie a syndromy tlustého střeva	15
3.2.1 Epidemiologie kolorektálního karcinomu.....	16
3.3 Klasifikace kolorektálních neoplázií.....	18
3.4 Adenom	21
3.5 Adenokarcinom.....	22
3.6 Sporadický karcinom.....	23
3.7 Hereditární karcinom.....	23
3.7.1 HNPCC – Lynchův syndrom.....	23
3.7.2 Další genetické mutace.....	25
3.8 Mikrosatelitní instabilita = MSI.....	26
3.9 Diagnostika rakoviny tlustého střeva	28
3.9.1 Test okultního krvácení do stolice (TOKS)	29
3.9.2 Screeningová koloskopie	29
3.9.3 Diagnostika Lynchova syndromu.....	30
3.10 Léčba.....	30
3.10.1 Endoskopická léčba.....	31
3.10.2 Chirurgická léčba	31
3.10.3 Onkologická léčba.....	32
4. Metodická část	33
4.1 Základní histologické techniky	33
4.1.1 Odběr, fixace a příjem vzorků.....	33

4.1.2	Přikrojení a další zpracování	33
4.1.3	Barvení preparátů.....	34
4.2	Imunohistochemické metody	36
4.2.1	Protilátky panelu VENTANA MMR IHC	37
4.2.2	Detekční panely	38
4.2.3	Roztoky používané u přístroje VENTANA BMK ULTRA	39
4.2.4	Postup IHC stanovení.....	39
4.3	Molekulárně genetické metody.....	40
4.3.1	Princip stanovení MSI pomocí PCR	40
4.3.2	Postup stanovení MSI pomocí PCR.....	41
4.3.3	Princip stanovení hypermetylace promotoru.....	42
4.3.4	Postup stanovení hypermetylace promotoru	43
4.4	Výsledky	45
5.	Diskuze	52
6.	Závěr	54
	Použitá literatura.....	55
	Seznam obrázků	62
	Seznam tabulek.....	63
	Seznam grafů.....	64
	Přílohy	65

ABSTRAKT

Autor: Marie Brachaczková

Název: Mikrosatelitní instabilita karcinomů tlustého střeva a komparace hodnocení dvou pracovišť

Bakalářská práce

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější nádorová onemocnění a jeho správná diagnostika hraje velmi důležitou roli ve volbě následné léčby. Mikrosatelitní nestabilita je jedním z důležitých markerů, který pomáhá odlišit sporadické karcinomy od hereditárních forem, jako je Lynchův syndrom.

Cílem této práce je seznámit se se stanovením MSI u kolorektálního karcinomu a porovnat statistické výsledky dvou pracovišť.

Teoretická část této práce se zaměřuje na charakteristiku kolorektálního karcinomu, jeho souvislost s mikrosatelitní nestabilitou a diagnostické metody. Metodická část popisuje postupy stanovení. Zaměřuje se na metody, které byly použity, a to základní histologické zpracování vzorků, imunohistochemické vyšetření MSI a následně molekulárně genetické testování MSI pomocí PCR společně se stanovením hypermetylace promotoru genu *MLH1*. Stanovení byla prováděna na vzorcích střevní tkáně pacientů s diagnostikovaným kolorektální karcinomem.

Celkem bylo vyšetřeno 293 pacientů v rámci dvou laboratoří, u kterých se stanovovala mikrosatelitní instabilita. Z toho bylo identifikováno 30 pacientů se ztrátou exprese v MMR (mismatch repair = oprava chybného párování bází), přičemž Lynchův syndrom byl potvrzen u 8 pacientů – a to pouze v jedné z laboratoří. U ostatních byl karcinom diagnostikován jako sporadický. Výsledky poukazují na rozdíly ve stanovení mezi dvěma laboratořemi a současně na výskyt hypermetylace promotoru *MLH1* i u pacientů s Lynchovým syndromem.

Závěr této práce zdůrazňuje důležitost vhodné volby metody pro stanovení MSI a potřebu standardizace laboratorních kroků. Za přínosné by bylo zvážit i doplnění diagnostiky

o vyšetření mutace genu *BRAF*, které může pomoci potvrdit sporadický původ karcinomu.

Klíčová slova: kolorektální karcinom, mikrosatelitní nestabilita, Lynchův syndrom, HNPCC, hypermetylace promotoru, imunohistochemie, molekulární genetika

ABSTRACT

Author: Marie Brachaczková

Title: Microsatellite instability of large intestine cancer carcinoma and comparison of two workplaces

Bachelor thesis

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Study field: Laboratory Diagnostics in Healthcare

Colorectal cancer is one of the most common cancers and its correct diagnosis plays a very important role in the choice of subsequent treatment. Microsatellite instability is one of the important markers that helps to distinguish sporadic carcinomas from hereditary forms such as Lynch syndrome.

The aim of this study is to review the determination of MSI in colorectal cancer and to compare the statistical results of two workplaces.

The theoretical part of this work focuses on the characteristics of colorectal cancer, its association with microsatellite instability and diagnostic methods. The methodological part describes the determination procedures. It focuses on the methods that were used, namely, histological processing of samples, immunohistochemical examination of MSI and then molecular genetic testing of MSI by PCR together with determination of hypermethylation of the MLH1 gene promoter. The determinations were performed on intestinal tissue samples of patients diagnosed with colorectal cancer.

A total of 293 patients were examined in two laboratories for microsatellite instability. Of these, 30 patients were identified with loss of expression in MMR (mismatch repair), and Lynch syndrome was confirmed in 8 patients, and only in one of the laboratories. In the others, the cancer was diagnosed as sporadic. The results highlight the differences in assays between the two laboratories and also the presence of MLH1 promoter hypermethylation in patients with Lynch syndrome.

The conclusion of this paper highlights the importance of the appropriate choice of method for MSI determination and the need for standardization of laboratory steps. It would also be considered beneficial to consider supplementing the diagnostic workup

with BRAF gene mutation testing, which may help to confirm the sporadic origin of the cancer.

Keywords: colorectal cancer, microsatellite instability, Lynch syndrome, HNPCC, promoter hypermethylation, immunohistochemistry, molecular genetics

1. ÚVOD

Karcinomy tlustého střeva patří mezi nejčastější maligní onemocnění v České republice i v Evropě. Kolorektální karcinom, vycházející z epitelových buněk tlustého střeva, může být genetického původu nebo se může rozvinout sporadicky v důsledku působení vnějších a vnitřních faktorů. Klíčovou roli v prevenci a léčbě hraje screening, který umožňuje včasný záchyt onemocnění a tím i lepší prognózu pacientů.

Mikrosatelitní instabilita (MSI) je charakterizována selháním DNA opravných mechanismů. Tyto mechanismy fyziologicky opravují chyby vznikající při replikaci DNA. MSI je přítomna u významného procenta karcinomů tlustého střeva a její analýza má zásadní význam nejen v diagnostice, ale také při volbě následné léčby.

Stanovení MSI je využíváno nejvíce u hereditárních forem kolorektálního karcinomu jako je Lynchův syndrom, kde správná diagnostika pacientů umožňuje jejich cílenou léčbu. Včasné zachycení Lynchova syndromu je důležité také z hlediska rodinné anamnézy, neboť umožňuje sledování ohrožených rodinných příslušníků. V praxi se ke stanovení MSI využívá imunohistochemická metoda, sledující ztrátu exprese genu, dále pro komplexnější a přesnější analýzu se provádí i molekulárně genetické stanovení.

2. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je analyzovat mikrosatelitní nestabilitu (MSI) u kolorektálního karcinomu a porovnat výsledky jejího stanovení mezi dvěma referenčními laboratořemi. Důraz práce je kladen především na metody imunohistochemického a molekulárně genetického stanovení. Mezi dílčí cíle práce patří:

1. Charakterizovat klasifikaci nádorů, jejich diagnostiku a léčbu.
2. Definovat mechanismy vzniku MSI a její souvislost s Lynchovým syndromem a dalšími typy hereditárních a sporadických karcinomů.
3. Naučit se metodiku stanovení MSI pomocí imunohistochemie a molekulární genetiky.
4. Srovnat výsledky dvou referenčních laboratoří a statistické vyhodnocení rozdílů ve stanovení MSI v obou laboratořích.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 *Tlusté střevo*

Tlusté střevo je 1 – 1,5 m dlouhá a 5–8 cm široká, konečná část trávicí trubice navazující na střevo tenké. Jeho hlavní funkcí je skladování a schopnost regulovat zpětné vstřebávání vody a elektrolytů z nestrávené potravy, a tím následně ovlivnit konzistenci stolice. [1]

3.1.1 Anatomie

Tlusté střevo svým průběhem v břišní dutině obkružuje střevo tenké a jako celek se skládá celkem ze 6 částí, a to:

1. Slepé střevo (*caecum*)
2. Vzestupný tračník (*colon ascendens*)
3. Příčný tračník (*colon transversum*)
4. Sestupný tračník (*colon descendens*)
5. Esovitá klička (*sigmoideum*)
6. Konečník (*rectum*)

Slepé střevo je první částí, umístěné v pravé kyčelní jámě, vystupuje z něj červovitý přívěsek (*appendix*), který obsahuje větší množství lymfatické tkáně a má imunologickou funkci. Tračník se skládá ze čtyř částí a je nejdelší částí tlustého střeva. Vzestupný tračník svou zadní plochou srůstá s břišní stěnou a vede po pravé straně směrem pod játra, kde se stáčí doleva a pokračuje jako příčný, který dále pokračuje pod slezinou. Sestupný tračník poté vede směrem dolů do levé kyčelní jámy, kde na něj navazuje esovitá klička vstupující do pánve. Konečník je poslední úsek trávicí trubice probíhající před kostí křížovou, z lidského těla ústí řitním otvorem (*anus*). [2, 3]

Tlusté střevo je rozeznatelné od tenkého, pomocí útvarů, které se nacházejí na stěně tlustého střeva. Jedná se o tzv. *haustra*, *taenia coli*, *appendices omentales*. *Haustra* představují vyklenutí stěny, které je dáno činností kruhové a podélné svaloviny, díky nimž se může posouvat střevní obsah. *Taeniae* jsou zesílené pruhy podélné svaloviny na povrchu, které se nazývají dle toho, na které části tračníku se nachází. Patří zde *taenia mesocolica*, *taenia omentalis* a *taenia libera*. *Appendices omentales* jsou

tukové výčnělky viscerálního peritonea na povrchu střeva. Sliznice tračnicku je bledé barvy

a bez přítomnosti klků; na vnitřním povrchu se nacházejí příčné poloměsíčité slizniční řasy (*plicae semilunares*). [3, 4]

Arteriální zásobení tlustého střeva je zajišťováno především dvěma hlavními větvemi, a to horní a dolní mezenterická artérie. Horní (*a. mesenterica superior*) zásobuje pravou polovinu střeva a skládá se ze tří větví, *arteria ileocolica* zásobující terminální ileum a caecum, *arteria colica dextra* pro *colon ascendens* a *arteria colica media* pro pravou část *colon transversum*. Dolní mezenterická artérie (*a. mesenterica inferior*) zásobuje levou stranu. Mezi její hlavní větve patří *arteria colica sinistra* pro levou část příčného tračnicku a sestupný tračník, *arteria sigmoideae* zásobující esovitý tračník a *arteria rectalis superior*, která zásobuje horní část rektu. Další důležitou tepnou je *arteria iliaca interna*, která se větví do *arteria rectalis media a inferior*, zásobující zbylou část konečníku. [3]

Žilní odtok je zajišťován prostřednictvím portální žíly (*vena portae*). *Vena mesenterica superior* odvádí krev pomocí žilních přítoků z céka, vzestupného a sestupného tračnicku, spojuje se s *vena lienalis* za vzniku *vena portae*. *Vena mesenterica inferior* vede krev ze sestupného tračnicku, esovitého tračnicku a horní části rektu, napojuje se a *vena lienalis*, která se vlévá do portální žíly.

Lymfatický systém střeva hraje zásadní roli pro imunitní funkci a odtok lymfy z trávicího traktu. Mezi lymfatické uzliny zahrnujeme *nodi lymphatici ileocolici*, jejímž cílem je odvádět lymfu z terminálního ilea, caeka, appendixu a začátku *colon ascendens*. Zbylou část *colon ascendens* odvádějí *nodi lymphatici colici dextri*, *nodi lymphatici colici medii* zajišťují drenáž z 2/3 *colon transversum* a *nodi lymphatici colici sinistri* zbytek *colon transversum*, *colon descendens* a *colon sigmoideum*. Odtok lymfy z rektu probíhá díky *nodi mesenterici inferiores*, *nodi lymphatici iliaci interni* a *nodi lymphatici pararectales*. Míza ze všech uzlin se vlévá do *trunci intestinales* a dále do hrudního mízovodu (*ductus thoracicus*). [3]

3.1.2 Histologie

Stěna tlustého střeva je složena ze čtyř vrstev. Luminálně je sliznice (*tunica mucosa*), pod ní se nachází podslizniční vazivo (*tela submucosa*), poté svalovina

(*tunica muscularis*) a nejsvrchnější vrstva je seróza, případně adventicie (*tunica serosa/adventitia*). [4, 5]

Tunica mucosa má hladký povrch a nese klky. S výjimkou anální části tvoří po celé délce hluboké Lieberkühnovy krypty, které jsou vystlané jednovrstevným cylindrickým epitelem, vykazujícím resorpční vlastnosti. Součástí epitelu jsou resorpční buňky (kolonocyty), velké množství buněk pohárkových, enteroendokrinní a také M buňky. [3–5]

Podslizniční vazivo tvoří řídké kolagenní vazivo a obsahuje cévní a nervovou pletěň.

Svalová vrstva se skládá z vnitřní cirkulární a vnější longitudinální vrstvy, mezi kterými se nachází nervová pletěň. Na povrchu v průběhu tlustého střeva tvoří podélná vrstva svaloviny zesílení v podobě tří pruhů nazývajících se taeniae coli. V oblasti rekta je cirkulární vrstva silnější a vytváří vnitřní anální svěrač.

Většina povrchu střeva je kryta serózou, jedná se o vrstvu subserózního vaziva pokrytou mezotelem. V průběhu střeva formuje tukové přívěsky (appendices omentales). Retroperitoneální a subperitoneální část tlustého střeva pokrývá adventicie, tvořená řídkým kolagenním vazivem, která tyto části spojuje s okolními orgány a zadní břišní stěnou. [3–5]

3.2 Neoplázie a syndromy tlustého střeva

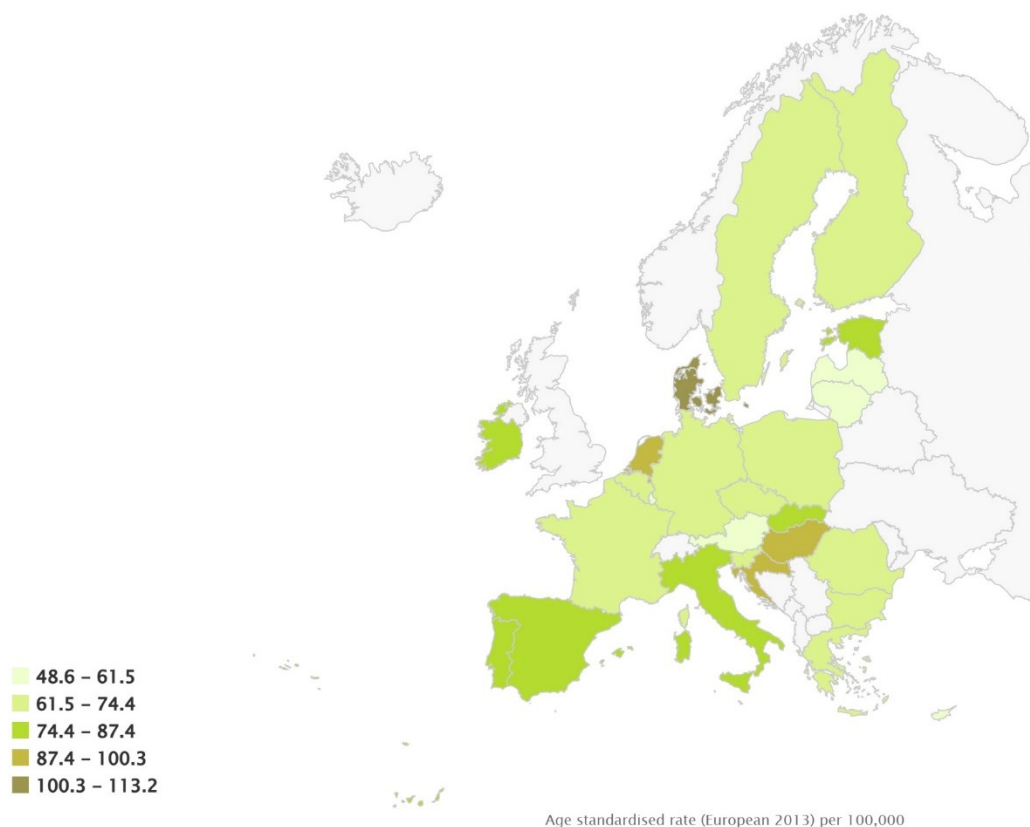
Kolorektální karcinom (CRC) patří mezi zhoubné onemocnění tlustého střeva a konečníku, patří mezi jedno z nejčastějších maligních onemocnění mužů i žen. Jedná se o onemocnění, jehož vývoj může být geneticky podmíněný, ale na jeho vzniku a rozvoji se podílí také řada dalších rizikových faktorů endogenního i exogenního původu.

Mezi faktory vnějšího prostředí se dá mimo jiné zařadit nedostatek pohybu, kouření, konzumace alkoholu a nevhodné stravovací návyky. Zásadní vliv rozvoje malignity hraje genomová nestabilita, která způsobí trvalou poruchu genetického vybavení buňky tlustého střeva.[4]

3.2.1 Epidemiologie kolorektálního karcinomu

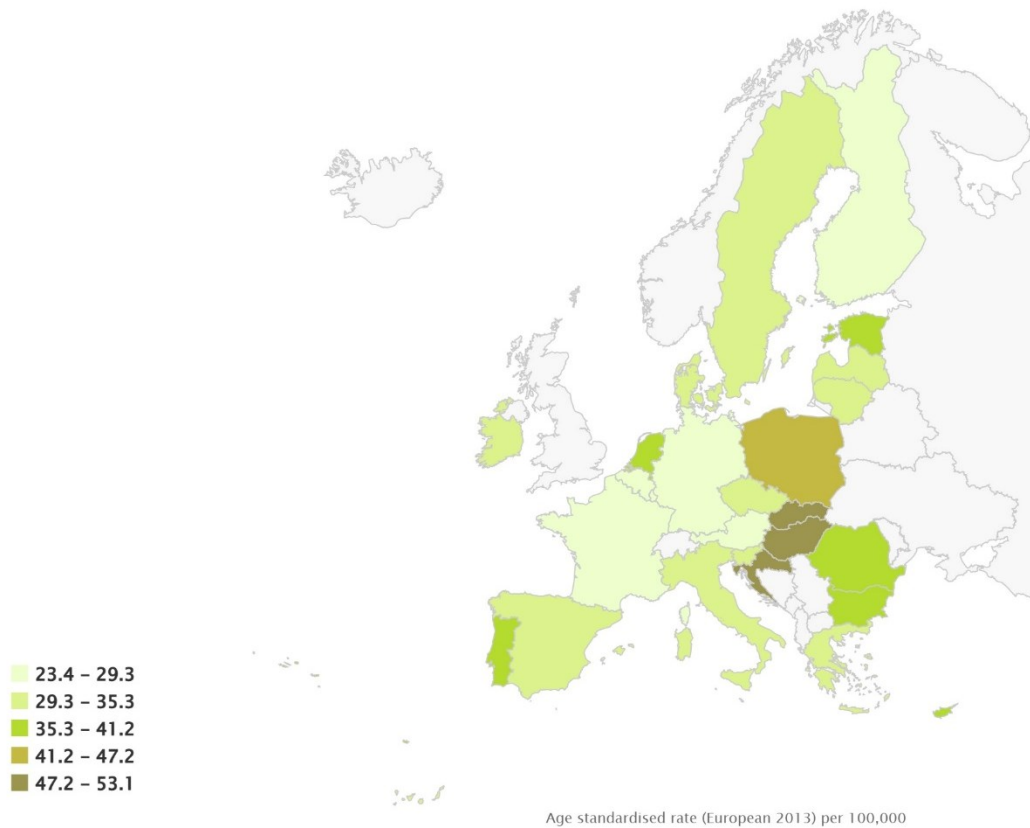
Výskyt kolorektálního karcinomu v Evropských zemích přesahuje až 400 000 případů za rok, z čehož přibližně 200 000 pacientů zemře. Dle databáze ECIS (European Cancer Information System) nejvyšší četnost nemoci v roce 2022 byla v Dánsku v této zemi je 113,2 ASR (age standardised ratio) na 100 000 obyvatel, zatímco v České republice bylo 70,5 ASR na 100 000 obyvatel. (Obrázek 1) [6]

Obrázek 1 Incidence kolorektálního karcinomu v EU 2022 [6]



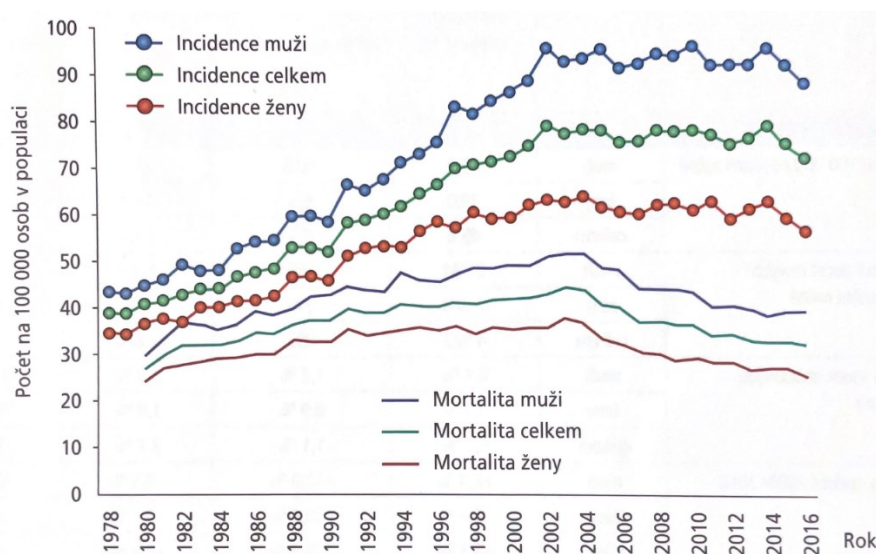
Úmrtnost byla nejvyšší v Řecku s 53,1 ASR, Maďarsku s 51,2 ASR či Slovensku kde bylo 48,8 ASR, v Česku v roce 2022 byl stav 33,4 ASR na 100 000 obyvatel, čím se zařadilo na 11 místo. (Obrázek 2)[6]

Obrázek 2 Mortalita kolorektálního karcinomu v EU 2022[6]



Dle národního onkologického registru (NOR) je ročně v České republice nově diagnostikovaných pacientů s kolorektálním karcinomem kolem 7 700 z čehož přibližně 3 400 pacientů zemře. Na základě výsledků se ukazuje výskyt tohoto onemocnění a následné úmrtí vyšší u mužů než u žen. (Obrázek 3)[7]

Obrázek 3 Incidence a mortalita pro muže a ženy Zdroj: Národní onkologický registr ČR ÚZIS ČR Převzato z: Kolorektální karcinom Petruželka L. (2018)[7]



CRC se může vyskytovat po celé délce tlustého střeva, převážně však se nachází v rektosigmoideální oblasti. [7]

3.3 Klasifikace kolorektálních neoplázií

Pařížská klasifikace povrchových lézí

Pro diagnostiku je důležitý popis, jak neoplázie vypadají. Tuto klasifikaci určuje klinik na základě morfologického vzhledu lézí, které vidí pomocí endoskopického vyšetření. Velikost léze je jeden z důležitých znaků, dle kterého lze usuzovat riziko maligního zvratu. Jako adenom s maligním potenciálem lze označovat tzv. pokročilý adenom, jedná se o lézi vel. 10 mm a větší, s více vilózní částí. Pařížská klasifikace zařazuje léze do čtyř kategorií dle toho, zda zasahují hlouběji než do submucosy (Tabulka 1). [8]

- Polypoidní léze 0-I, dělí se na přisedlé (0-Ip) a stopkaté (0-Is).
- Nepolypoidní typ (0-II) popisuje lézi nižší než 2,5 mm, tato léze může být dále rozdělena na povrchově vyvýšenou (0-IIa), plochou (0-IIb) a povrchově vkleslou (0-IIc).
- Léze vkleslá (0-III)
- Smíšené léze jsou nejčastějším typem, jedná se o povrchově vkleslou lézi s vyvýšenými okraji (0-IIc + 0-IIa) a povrchově vyvýšenou lézi s vkleslinou v centru (0-IIa + 0-IIc).

Tabulka 1 Pařížská klasifikace povrchových lézí. Převzato z: Endoskopická klasifikace neoplázií tlustého střeva a konečníku (2014) [8]

Pařížská klasifikace povrchových lézí		
Typ	Skupina	Morfologie
Polypoidní	0-Ip	Stopkaté
	0-Is	Přisedlé
Nepolypoidní	0-IIa	Povrchově vyvýšené
	0-IIb	Ploché
	0-IIc	Povrchově vkleslé
Nepolypoidní vyhloubené	0-III	Vyhloubené
Smíšené	Př. 0-IIa + 0-IIc	

Hlavním cílem klasifikace je předpovědět riziko submukózní invaze a postižení lymfatických uzlin. U typů 0-IIc dochází poměrně často k invazi do submukózy. [8]

Histopatologický stupeň neboli grade, se určuje při histopatologickém vyšetření a popisuje buněčné změny a schopnost nádoru tvořit struktury podobné původní tkáni (diferenciace) nebo produkovat látky typické pro tuto tkáň. Tento klasifikační systém hodnotí abnormálnost buněk a poskytuje informace o rychlosti růstu a tvorbě metastáz. Čím větší je rozdíl mezi zdravými a nádorovými buňkami (tzn. čím méně jsou diferencované), tím je nádor agresivnější. [9]

Tento klasifikační systém lze rozdělit do 5 stupňů:

1. GX – stupeň diferenciace nelze hodnotit
2. G1 – dobře diferencovaný
3. G2 – středně diferencovaný
4. G3 – nízkce diferencovaný
5. G4 – nediferencovaný

Pro zjednodušení se nádory označují jako low-grade, jedná se o nádory nízkého stupně (G1, G2), rostoucí pomaleji a nádory vysokého stupně neboli high-grade (G3, G4). [9, 10]

TNM/TNM klasifikace

TNM klasifikace je celosvětově uznávaný systém, který slouží k popisu rozsahu nádoru (staging) a určení stádia onemocnění a jeho případné šíření v těle pacienta. Také poskytuje informace pro pacientovu prognózu a pomáhá u hodnocení výsledků léčby. Existují dva typy klasifikace, klinická a patologická. Klinická, označována jako TNM (cTNM), je postavena na základě klinických informací získaných před léčbou (např. zobrazovací vyšetřovací metody, endoskopie). Patologická (pooperační histopatologická klasifikace), označována také jako pTNM, poskytuje doplňující údaje o prognóze. K patologickému hodnocení je nutná resekce primárního nádoru nebo jeho dostatečný sampling – zpracování a dále odstranění mizních uzlin pro průkaz metastáz. [11, 12]

TNM klasifikace je členěna do tří kategorií.

Kategorie T (Tumor) označuje primární nádor, popisuje jeho velikost, invazi a rozšíření. (Tabulka 1)

Tabulka 2 TNM klasifikace, Kategorie T (tumor) [11, 12]

T – primární nádor		
TX	primární nádor nelze hodnotit	
T0	bez známek primárního nádoru	
Tis	karcinom in situ: intraepiteliální nebo invaze do lamina propria mucosae	
T1	nádor postihuje submukózu	
T2	nádor postihuje tunica muscularis propria	
T3	nádor postihuje subserózu nebo se šíří do neperitonealizované perikolické nebo perirektální tkáně	
T4	nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury a/nebo prorůstá na viscerální peritoneum	
T4	a	nádor prorůstá na viscerální peritoneum
	b	nádor přímo postihuje jiné orgány či struktury

N (Node) popisuje postižení regionálních lymfatických uzlin nádorem. (Tabulka 3)

Tabulka 3 TNM klasifikace, Kategorie N (node) [11, 12]

N - Uzliny		
NX	regionální mízní uzliny nelze hodnotit	
N0	regionální mízní uzliny bez metastáz	
N1	metastázy v 1 až 3 regionálních mízních uzlinách	
N1	a	metastáza v 1 regionální mízní uzlině
	b	metastáza ve 2-3 regionálních mízních uzlinách
	c	ložisko nádoru v subseróze nebo neperitonealizované perikolické či perirektální měkké tkáni bez metastázy v regionální mízní uzlině
N2	metastázy ve 4 nebo více regionálních mízních uzlinách	
N2	a	metastázy ve 4-6 regionálních mízních uzlinách
	b	metastázy v 7 a více regionálních mízních uzlicích

M klasifikace (Metastasis) popisuje vzdálené metastázy neboli šíření nádoru do míst mimo původní výskyt nádoru. (Tabulka 4)

Tabulka 4 TNM klasifikace, Kategorie M (metastasis) [11, 12]

M - metastáze		
MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit	
M0	bez vzdálených metastáz	
M1	vzdálené metastázy	
M1	a	Metastázy výskytem omezené na jeden orgán (plíce, játra, vaječník, neregionální uzlina)
	b	Zastížení metastáz ve více než jednom orgánu nebo peritoneu

3.4 Adenom

Adenom je slizniční léze tlustého střeva a konečníku také nazýván jako kolorektální adenom. Jedná se o nezhoubný nádor žlázového epitelu, který však může vyústit do již maligního adenokarcinomu. Adenomy v tlustém střevě se mohou lišit jak svou velikostí, tak i lokalizací. Zatímco menší adenomy se nacházejí po celém tračníku, adenomy větší než 1 cm se převážně nacházejí v distální části tlustého střeva a v rektu. Tyto větší adenomy mají častější riziko přechodu v maligní. [13]

Adenomy se rozdělují do tří typů na základě histologické stavby, a to na tubulární adenom, vilózní a tubulovilózní.

Tubulární adenom patří mezi nejčastější (až 80 %) formu polypózních adenomů, je složený z dysplastických epitelových buněk, které tvoří tubulární strukturu. [14]

Vilózní představují 3-16 % případů, jsou charakteristické uspořádáním buněk tvořící výběžky připomínající prsty. Vilózní adenomy se vyskytují jako přisedlé léze, na rozdíl od tubulárních, které se projevují jako polyp na stopce. [15]

Tubulovilózní adenom je kombinace vilózního a tubulárního adenomu. Dysplastické buňky svým uspořádáním tvoří tubulární i vilózní struktury, kdy má z více než 20 % a méně než 80 % vilózní charakter. [16]

Tyto dysplastické buňky se projevují nadměrnou barvitelností jádra (hyperchromazemie) a mohou být přítomny jak u low-grade, tak u high-grade dysplázie. [13–16]

Podle druhu je můžeme také seřadit dle rizika vzniku malignity, nejvyšší riziko představuje vilózní adenom, poté tubulovilózní a nejnižší tubulární adenom. [17, 18]

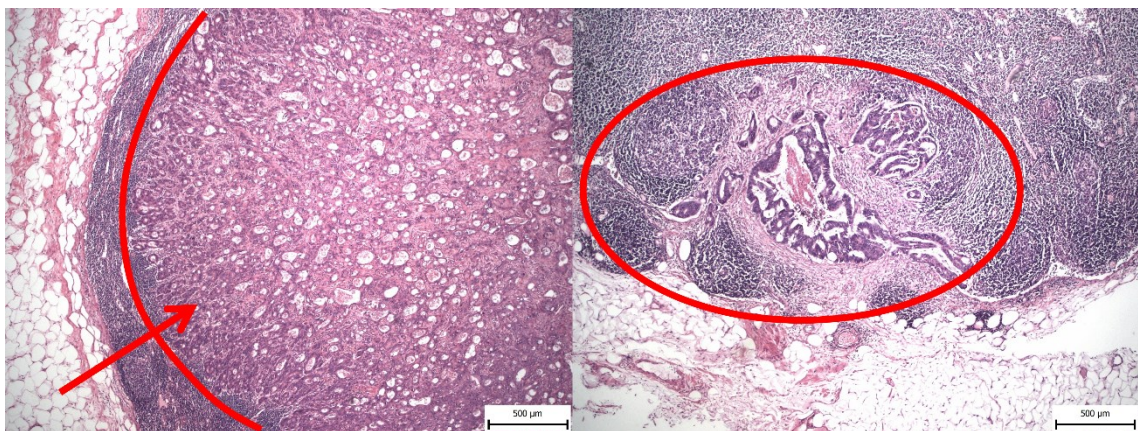
3.5 Adenokarcinom

Adenokarcinom tlustého střeva a konečníku neboli také kolorektální karcinom je zhoubný nádor tvořený žláзовými buňkami a je jedním z nejčastějších maligních nádorů. Projevy karcinomu závisí na jeho přesné lokalizaci a velikosti. Mezi nejčastější patří neprůchodnost střev (*ileus*), které se může projevit nadměrnou plynatostí, kolikovitými bolestmi a změnou vyprazdňovacích návyků. Dalším příznakem může být krvácení do gastrointestinálního traktu, krvácení může být méně často výrazné a makroskopicky zřetelné či mikroskopické, které se vyšetřuje pomocí testu na okultní krvácení ze stolice. Na základě tohoto vyšetření bývá pacient poslán na koloskopii. Karcinom můžeme dělit podle histologické stavby na několik typů:

- Adenokarcinom
- Mucinózní adenokarcinom tvořen z více než 50 % mucinem
- Karcinom z prstenčitých buněk, kdy je mucin nahromaděný intracelulárně
- Vzácné typy karcinomů, mezi které patří např. adenoskvamozní, malobuněčný nebo nediferencovaný karcinom

Kolorektální karcinom nejčastěji metastazuje lymfatickými cestami do lokálních lymfatických uzlin (Obrázek 4). Dále pak do vzdálenějších uzlin a dalších orgánů, hematogenní cestou pak nejčastěji do jater poté plic, případně prorůstá na peritoneum. Karcinomy rekta mohou také prorůstat do dalších okolních orgánů jako je např. močový měchýř nebo děloha. [19]

Obrázek 4 Metastáze karcinomu v lymfatické uzlině, zvětšení 40x



Červeně označeno metastatické ložisko Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem Hurníkem Ph.D.

3.6 Sporadický karcinom

Tento typ karcinomu je u 80–85 % všech kolorektálních karcinomů a vzniká z benigních adenomových polypů a bez dědičné predispozice. Zbývajících 15-20 % případů vzniká prostřednictvím de novo karcinogeneze, kdy nádor vzniká přímo z normální nebo hyperplastické sliznice. [19, 20, 50]

Nejvýznamnějším rizikovým faktorem je věk pacienta, kdy nárůst výskytu tohoto karcinomu se objevuje nejčastěji u pacientů ve věku 50 let a výše. K dalším rizikovým faktorům patří nezdravý životní styl a špatná strava. Nezdravý životní styl zahrnuje nedostatek fyzické aktivity, sedavý způsob života, obezitu a kouření.

Mezi nesprávné stravovací návyky patří nadměrná konzumace červeného masa a živočišných tuků, zároveň však snížený příjem vlákniny. Té bývá přisuzován protektivní faktor, jelikož se předpokládá, že díky vláknině se urychluje průchod potravy trávicím traktem, a tak nedochází k přílišnému působení karcinogenů na střevní sliznici. [19, 20]

3.7 Hereditární karcinom

Jedná se o typ nádoru, který je způsoben dědičnými mutacemi přenášenými z generace na generaci. Na základě těchto mutací se zvyšuje riziko vzniku rakoviny, na rozdíl od sporadického karcinomu, který vzniká náhodně většinou v důsledku vlivů životního prostředí.

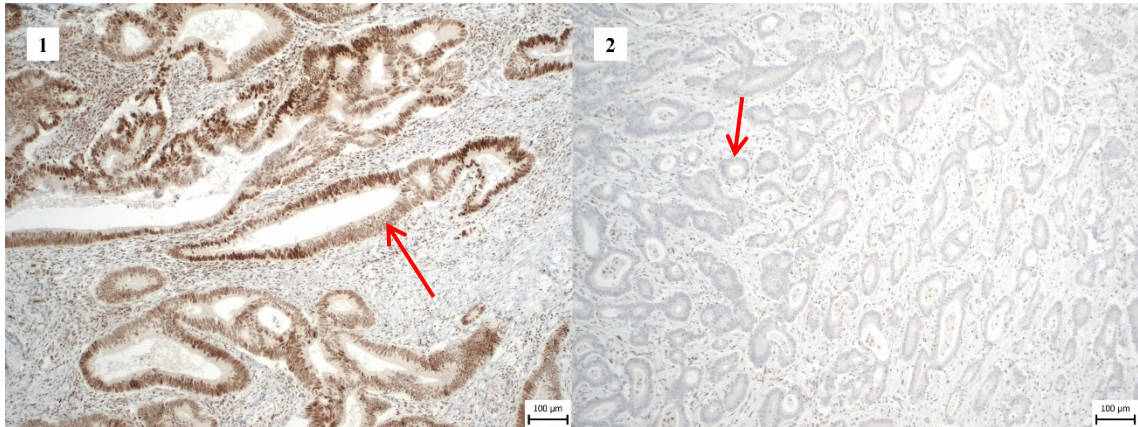
3.7.1 HNPCC – Lynchův syndrom

Hereditární nepolypózní karcinom neboli také Lynchův syndrom patří mezi nejvýznamnější nádorové syndromy s vysokým sklonem ke kolorektálnímu karcinomu (2-5 %). [19, 21]

Příčina vzniku Lynchova syndromu je dána vrozenou mutací v tzv. mutátorových neboli mismatch repair genech (MMR), zejména *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2* (Obrázek 5 a Obrázek 8). Tyto geny kódují proteiny, které mají za úkol detekovat a následně opravit chyby vznikající při replikaci DNA. U jedinců se zárodečnou mutací je tato mutace přítomna ve všech somatických buňkách. Pro vznik nádoru je dostačující, aby došlo k mutaci nebo eliminaci druhé alely daného genu (tzv. ztráta heterozygosity). Důsledkem je, že buňka vytváří nefunkční produkt nebo ho nevytváří vůbec, což vede k zahájení

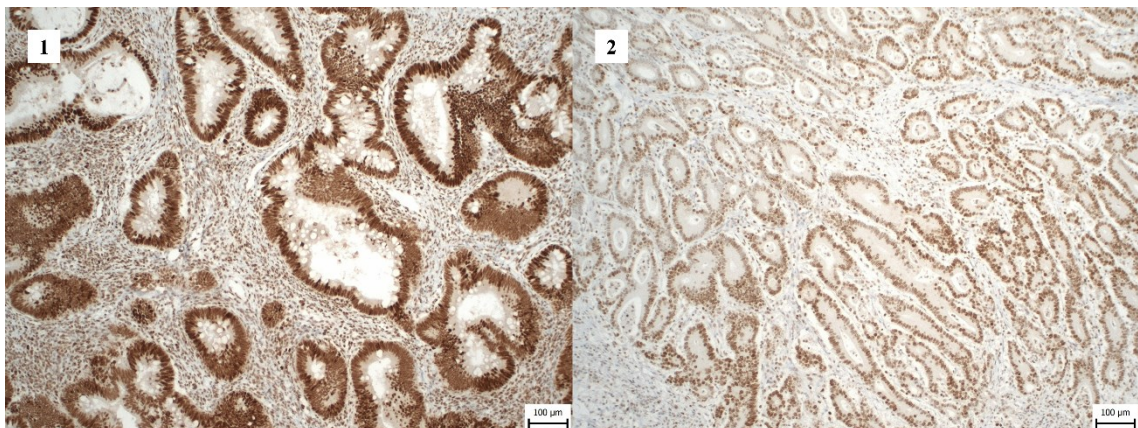
mnohastupňového procesu hromadění poruch základních regulačních mechanismů buněk. Mutace MMR genů vede k zvýšenému výskytu nepolypózních adenomů a rychlejšímu překlenutí adenomu ve zhoubný nádor.

Obrázek 5 *Imunohistochemické stanovení MLH1 u pacientů s LS, zvětšení 100x*



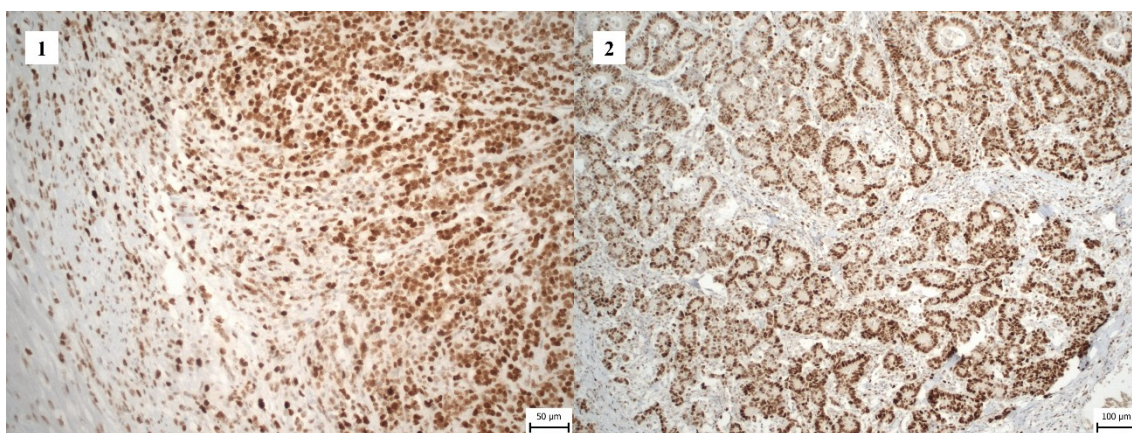
1. Zachovalá exprese genu – jaderná pozitivita (hnědá barva) MLH1, 2. ztráta exprese genu – jaderná exprese negativní (modrá) MLH1 Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem Hurníkem Ph.D.

Obrázek 6 *Imunohistochemické stanovení MSH2 u pacientů s LS, zvětšení 100x*



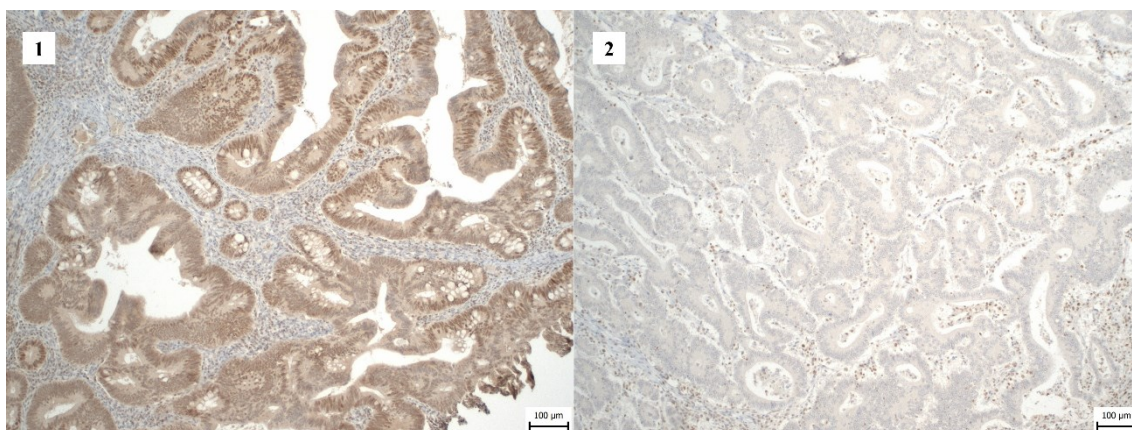
1. Zachovalá exprese genu – jaderná pozitivita (hnědá barva) MSH2, 2. zachovalá exprese genu – jaderná pozitivita (hnědá barva) MSH2 Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem Hurníkem Ph.D.

Obrázek 7 Imunohistochemické stanovení MSH6 u pacientů s LS, zvětšení 200x a 100x



1. Zachovalá exprese genu – jaderná pozitivita (hnědá barva) MSH6, 2. zachovalá exprese genu – jaderná pozitivita (hnědá barva) MSH6 Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem Hurníkem Ph.D.

Obrázek 8 Imunohistochemické stanovení PMS2 u pacientů s LS, zvětšení 100x



1. Zachovalá exprese genu – jaderná pozitivita (hnědá barva) PMS2, 2. ztráta exprese genu – jaderná exprese negativní (modrá) PMS2 Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem Hurníkem Ph.D.

Toto onemocnění se řadí mezi autozomálně dominantní s 50 % rizikem přenosu na další generaci a nositelé této mutace mají až 80 % riziko vzniku kolorektálního karcinomu, který je často diagnostikován již před 50 rokem věku. [19, 21]

3.7.2 Další genetické mutace

Familiární adenomatózní polypóza je autozomálně dominantní dědičné onemocnění způsobené mutací genu *APC* (*adenomatosus polyposis coli*). Jedná se o tumor supresorový gen, tvořící protein APC, který za normálních okolností působí proti vzniku nádorů, v důsledku jeho mutace je však tato funkce narušena. Při tomto onemocnění dochází k tvorbě stovek až tisíců adenomatózních polypů v tlustém střevě nejčastěji ve věku 10-20 let, a vede ke vzniku kolorektálního karcinomu. Jedná

se o adenomy většinou tubulární s dysplazií nízkého stupně, popřípadě se mohou vyskytovat také sesilní nebo propadlé léze. [4,19, 41]

MAP – *Mutuh associated polyposis* je recesivně dědičná forma polypózy vyvolaná bialelickou zárodečnou mutací v *MUTYH* genu. To znamená, že k projevu je nutné, aby mutaci nesly obě alely – jedna od matky a druhá od otce. Tento gen kóduje protein, který má za úkol opravovat oxidační poškození DNA. MAP se nejčastěji projevuje vznikem desítek až sta polypů a bývá diagnostikována přibližně kolem 50. roku života. [4, 42, 43]

Kromě Lynchova syndromu jsou známy i další geneticky podmíněné syndromy spojené se zvýšeným rizikem nádorových onemocnění. Mezi ně patří Peutzův Jeghersův syndrom (PJS) způsobený mutací v genu *STK11* a Cowdenův syndrom, který je důsledkem mutace genu *PTEN*. Obě tato onemocnění jsou charakterizována především přítomností hamartomů, jedná se o benigní ložiska či polypy, které však mohou mít větší tendenci k maligní transformaci. Hamartomy se mohou nacházet na různých částech těla, včetně sliznice trávicího traktu. [4, 44]

3.8 Mikrosatelitní instabilita = MSI

Mikrosatelitní instabilita (Microsatellite instability = MSI) je genetický jev, kdy se v celém genomu objevují změny na nekódujících, krátkých opakujících se sekvencích DNA, nazývaných mikrosatelity. Tyto úseky, tvořené jednou až šesti bázemi, mají přirozeně vyšší náchylnost k mutacím. Při replikaci DNA jsou velmi zranitelné a DNA polymeráza může způsobit změnu jejich délky, což vede k insercím nebo delecím, tedy bodovým mutacím. Tyto mutace spočívají ve vložení nebo odstranění nukleotidů v mikrosatelitech.[22–24]

U zdravého člověka jsou mikrosatelity ve všech buňkách shodné, což se označuje jako mikrosatelitní stabilita (MSS). U jedinců s MSI se však mikrosatelity v nádorových buňkách liší od těch v normálních buňkách. Na základě rozsahu změn lze MSI rozdělit na MSI-H (vysoká nestabilita) a MSI-L (nízká nestabilita).

Přesnost replikace zajišťuje mnoho mechanismů, včetně DNA polymerázy, které snižují pravděpodobnost chyb. Dalším důležitým opravným mechanismem je Mismatch repair systém (MMR), který snižuje míru mutací tím, že dokáže rozpoznat a opravit nesprávně vložené páry bází. V buňkách s mutací genů kódujících MMR dochází

ke zvýšenému výskytu replikačních chyb, což vede ke vzniku mikrosatelitní nestability (MSI).[22–24]

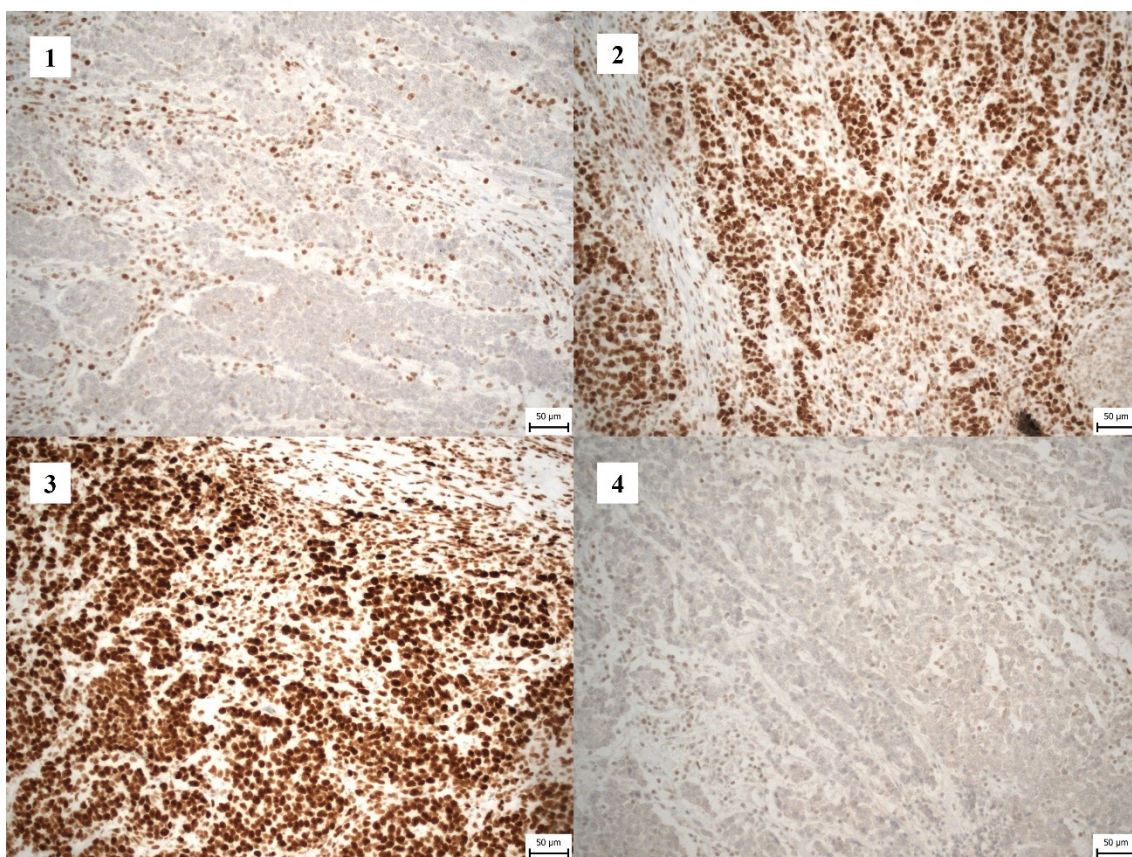
Absence funkčního MMR mechanismu může mít za následek inaktivaci tumor-supresorových genů, což vede ke vzniku sporadického nebo dědičného kolorektálního karcinomu. Dědičná forma, známá jako hereditární nepolypózní kolorektální karcinom neboli Lynchův syndrom, je způsobena právě defekty v MMR.

MMR proteinů existuje velké množství a mezi nejznámější z nich patří čtyři z nich, a to, MSH2, MLH1, MSH6 a PMS2. Tyto proteiny spolu pracují v párech MSH2 s MSH6 a MLH1 s PMS2, kde tvorba těchto komplexů je velice důležitá pro jejich správnou funkci a stabilitu. První z těchto párů rozpoznává chyby v DNA a druhý je opravuje. Pokud by došlo ke ztrátě funkce MLH 1 nebo MSH 2, PMS2 a MSH6 by ztratili svou imunoreaktivitu. V opačném případě, pokud by MLH1 a MSH2 ztratili své partnery mohou se spárovat s jinými proteiny a jejich imunoreaktivita by byla oslabena, ale částečně zachována. Expze těchto proteinů se vyšetřuje při imunohistochemické diagnostice Lynchova syndromu.[26, 27]

Deficit MMR způsobuje bodové mutace, které mohou způsobit posun čtecího rámce při translaci, a to způsobuje tvorbu jiných proteinů, na jejichž koncích se vytvářejí struktury tzv. neoantigeny, které jsou viditelné pro imunitní systém a stimulují imunitní odpověď proti nádorovým buňkám. Na základě toho se u těchto pacientů využívá imunoterapie. [28]

Ztráta expze MLH1 je téměř vždy doprovázena i ztrátou PMS2 (Obrázek 9). U sporadického karcinomu dochází k potlačení expze MLH1 nejčastěji v důsledku hypermetylace promotoru. Tato epigenetická změna vede k přidání metylových skupin (-CH₃) na cytosinové zbytky v oblasti promotoru, což znemožní transkripci genu MLH1 následně způsobí mikrosatelitní instabilitu (MSI). Proto se kromě imunohistochemického stanovení MSI provádí i molekulárně genetická analýzy hypermetylace promotoru MLH1, která se u Lynchova syndromu vyskytuje je výjimečně. [22–25, 29]

Obrázek 9 Imunohistochemické stanovení MSI, Biopsie č.9777, zvětšení 200x



1. Ztráta exprese genu *MLH1*, 2. zachovalá exprese genu *MSH2*, 3. zachovalá exprese genu *MSH6*, 4. ztráta exprese genu, Ztráta exprese – jaderná exprese negativní (modrá), zachovalá exprese – jaderná pozitivita (hnědá) *PMS2* Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem Hurníkem Ph.D.

Další možností, jak odlišit sporadický karcinom od Lynchova syndromu, je analýza mutace genu *BRAF*. Tato mutace je přítomna u některých sporadických nádorů, ale u Lynchova syndromu se téměř nevyskytuje. Pozitivní výsledek jednoho z těchto vyšetření (hypermetylace *MLH1* nebo mutace genu *BRAF*) umožňuje vyloučit Lynchův syndrom potvrdit sporadický původ karcinomu. [22–25, 29]

3.9 Diagnostika rakoviny tlustého střeva

Kolorektální karcinom často vzniká ze střevních polypů, které způsobují problémy až v pozdějších stádiích. Aby byla šance na úplné vyléčení vyšší, je důležité, aby byl polyp, z něhož se může kolorektální karcinom vyvinout, diagnostikován co nejdříve. Na toto mají vysoký vliv preventivní vyšetření, které mohou případný nádor zachytit včas. V České republice již od roku 2014 existuje program screeningu kolorektálního karcinomu, který umožňuje lidem starších 50. let věku využít vyšetření hrazené z veřejného zdravotního pojištění a tím odhalit karcinom včas. Jedná se o test

na okultní krvácení a screeningovou koloskopií. Pokud vyšetřovaný pacient má genetickou predispozici nebo již mu byli diagnostikovány střevní polypy v minulosti, měl by podstupovat vyšetření od 40. roku věku. [30]

3.9.1 Test okultního krvácení do stolice (TOKS)

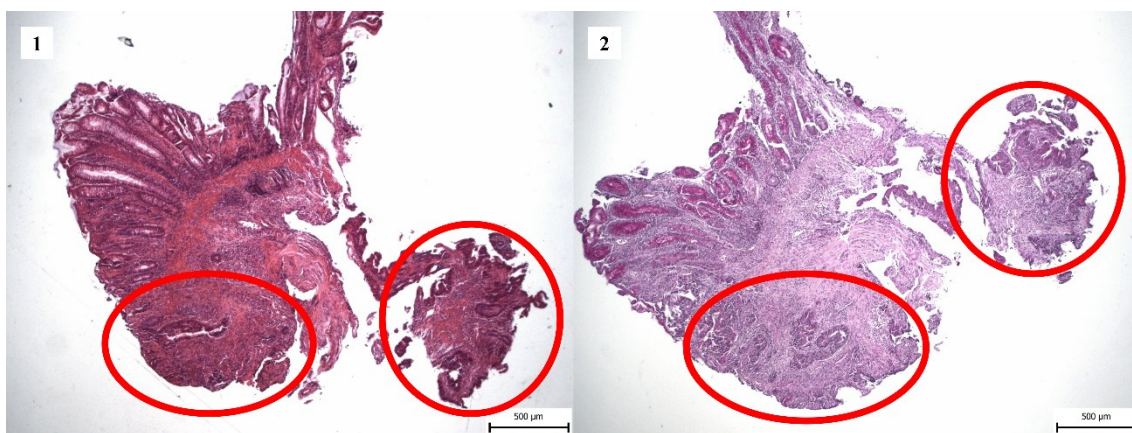
TOKS je jednoduchý a zcela neinvazivní test, základem kterého je odběr vzorku stolice a následné jeho vyšetření v laboratoři na odhalení přítomnosti krve, která může být pouhým okem neviditelná. Pozitivní výsledek testu nemusí poukazovat na kolorektální karcinom, může signalizovat přítomnost pouze střevních polypů a jiná onemocnění, proto pro potvrzení tohoto testu je pacient dále odeslán na screeningovou koloskopií. Tento test existuje také v podobě antigenního testu, který je možné zakoupit v lékárně na volný prodej. [30]

3.9.2 Screeningová koloskopie

Toto vyšetření je mnohem spolehlivější než TOKS a provádí se kvalifikovaným gastroenterologem v ambulanci za použití analgosedace, která zmírní nepříjemné pocity. Během koloskopie je možné odstranit i střevní polypy nebo odebrat podezřelou tkáň, které se dále zasílají na histopatologické vyšetření (Obrázek 10). Před tímto vyšetřením je důležitá důkladná příprava pacienta, aby se zajistilo jeho hladkého průběhu. Tato příprava zahrnuje doporučené postupy dané Evropskou společností gastrointestinální endoskopie. Mezi ně patří například dodržení diety s nízkým obsahem vlákniny den před vyšetřením a podání polyethylenglykolu v plné dávce, která činí 4 l a má za úkol vyprázdnit a očistit střevo.

Koloskopie se provádí rektálně v leže na boku, pomocí ohebného videoendoskopu, který lékaři umožní prohlédnout sliznici tlustého střeva. Doba vyšetření bývá okolo dvaceti minut a po dokončení je třeba minimálně půl hodiny odpočinku. Mezi další možné diagnostické postupy se řadí také zobrazovací metody jako je ultrasonografie, výpočetní tomografie břišní dutiny (CT) nebo rentgen. Tyto zobrazovací metody mohou často odhalit již vzniklé metastáze v dalších orgánech.[30–32]

Obrázek 10 Karcinom zachycený v bioptickém vzorku, zvětšení 40x



1. Základní histologické barvení Hematoxylin-eosin, 2. Speciální barvení PAS, červeně označené oblasti nádorové tkáně Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem Hurníkem Ph.D.

3.9.3 Diagnostika Lynchova syndromu

Diagnostika Lynchova syndromu (LS) spočívá na molekulárně genetickém vyšetření. Genetické vyšetření se dá provést z krve, tato metoda je však nákladná a provádí se pouze u pacientů, kteří mají podezření na Lynchův syndrom. Toto podezření je u jedinců, kteří mají prokázaný LS v rodinné anamnéze.

K vyšetření nádorů a potvrzení spojitosti s LS se využívá:

1. Histologie
2. Imunohistochemické vyšetření DNA MMR proteinů
3. Test mikrosatelitní nestability (MSI)
4. Test hypermetylace promotoru genu *MLH1*
5. Test vyloučení mutace BRAF [33]

3.10 Léčba

Léčba kolorektálního karcinomu je závislá na mnoha faktorech, a to především na stádiu onemocnění, rozšíření, typu nádoru a zdravotním stavu pacienta. Nejčastější možností léčby bývá chirurgický zákrok a mezi další se řadí neoadjuvantní a adjuvantní léčba.

3.10.1 Endoskopická léčba

Pokud je karcinom ve velmi ranném stádiu, může být při screeningové koloskopii často zaměněn za nezhoubný polyp a již odstraněn. Této technice se říká endoskopická polypektomie. Existuje mnoho technik polypektomie, mezi nejčastější z nich patří:

Polypektomie kličkou (EPE) – odstranění stopkatých či plochých polypů vel. 4-9 mm pomocí smyčky za studena (cold snare) či za pomoci elektrokoagulace (hot snare).

Endoskopická mukosní resekce (EMR) – slouží k odstranění léze, nezasahující hluboko do střevní stěny, o velikosti větší než 10 mm pomocí endoskopické kličky. Při této metodě se využívá podpichu léze, nejčastěji fyziologickým roztokem zabarveným methylenovou modří, čímž dojde k odstranění léze od svaloviny.

Endoskopická submukosní resekce (ESD) – resekční metoda pomocí jehlových nožů se speciálně zakončenou špičkou, která brání, aby nůž prošel trávicí stěnou a opět se využívá podpichu. Touto metodou se odstraňují ploché povrchové léze a široce přisedlé polypy velikosti větší než 20 mm, které jsou rozšířené až do submukosy.

Veškerý materiál je poté zaslán na histopatologické vyšetření. Jestliže se poté při histopatologickém vyšetření potvrdí, že se jednalo o zhoubný novotvar, který byl zcela odstraněn, je pacient předán do následné péče a léčba tímto končí. Pokud se při endoskopii narazí na větší polyp, který endoskopicky odstranit nelze, mohou být z léze odstraněny pouze vzorky biopsie na histologii. Takhle velký polyp lze poté odstranit chirurgicky. [34–36]

3.10.2 Chirurgická léčba

Pokud je karcinom ve velmi ranném stádiu, může být při screeningové koloskopii často zaměněn za nezhoubný polyp a již odstraněn. V případě, že ve střevě zůstávají zbytky nádoru, který již prorůstá do hlubších vrstev střevní stěny, musí pacient podstoupit operaci.

Cílem chirurgického zákroku je odstranění celého nádoru, kdy je chirurgem odstraněna postižená část střeva a část okolní zdravé tkáně, která sousedí s nádorem. Této části se říká tzv. bezpečný lem a zajistí, aby v operovaném úseku střeva nezůstaly nádorové buňky. Společně s touto částí se odstraní i nejbližší tuková tkáň s lymfatickými uzlinami, všechny odstraněné části se poté zašlou na histopatologické vyšetření, kde jsou dále vyšetřeny patologem.

Provádí se buď částečná resekce, při níž chirurg odstraní pouze úsek zasažený nádorem a volné konce se sešijí k sobě, nebo se provede vývod z tlustého střeva (kolostomie). Při kompletní resekci tlustého střeva je pacientovi po zákroku vytvořen umělý vývod z tenkého střeva tzv. ileostomie. Cílem každé operace je vždy zachovat co nejdelší zdravý úsek střeva. [37, 38]

3.10.3 Onkologická léčba

Většina pacientů s diagnostikovaným kolorektálním karcinomem podstupují onkologickou léčbu různého druhu, může se jednat o radioterapii, chemoterapii nebo biologickou léčbu. Dle toho, kdy je terapie pacientovi provedena, se může rozdělit na neoadjuvantní a adjuvantní typ. [39]

Neoadjuvantní léčba, jedná se o způsob léčby, která se podává před plánovaným chirurgickým zákrokem, nejčastěji se provádí u karcinomu rekta. Cílem je nádor zmenšit, pokud je příliš rozsáhlý, tím usnadnit průběh operace a dosáhnout provedení méně rozsáhlého výkonu. V neoadjuvantní terapii se používá léčba medikamenty nebo radioterapie, popřípadě jejich kombinace.[39]

Adjuvantní typ léčby následuje po chirurgickém odstranění nádoru, kdy je snaha touto terapií eliminovat mikroskopické metastázy a pozdější rozvoj recidivy. V současnosti je tento typ podáván pacientům u nádoru ve stádiu III, kdy jsou postiženy regionální uzliny. Dále u některých specifických nádorů ve stádiu II, zde uzliny postiženy nejsou, ale jedná se o rozsah nádoru T3 nebo T4 dle TNM klasifikace. [39, 40]

4. METODICKÁ ČÁST

Metodická část této práce popisuje laboratorní postupy použité ke stanovení MSI u kolorektálního karcinomu. Pro diagnostiku MSI byly využity tři hlavní postupy: základní histologické metody, imunohistochemické metody zaměřené na detekci exprese MMR proteinů a molekulárně genetická analýza MSI. Tyto metody se navzájem doplňují a umožňují přesnější diagnostiku. Všechny použité postupy odpovídají standardním operačním postupům (SOP) laboratoře.

4.1 Základní histologické techniky

Histologické zpracování zahrnuje několik po sobě jdoucích kroků, které přispívají ke správné diagnostice. Tento proces zahrnuje fixaci, zpracování v autotechnikonu, zalití do parafínu, řezání na mikrotomu a následné barvení preparátů.

4.1.1 Odběr, fixace a příjem vzorků

Vzorky tkání jsou odebírány biopticky nebo chirurgicky a ihned fixovány v 4% neutrálním pufovaném formaldehydu po dobu minimálně 24 hodin. Fixace slouží k rychlé denaturaci bílkovin protoplazmy buněk a tkání, která má zabránit vlastní autolýze. Fixační roztok musí být šetrný, dobře pronikat do tkání a zároveň zachovat strukturu i barvitelnost buněk. Takto připravené vzorky přicházejí do laboratoře spolu s řádně vyplněným průvodním listem. V laboratoři jsou vzorky zkontrolovány, označeny bioptickým číslem a následně zaevidovány.

4.1.2 Přikrojení a další zpracování

Po dostatečné fixaci jsou vzorky změřeny, popsány a v případě potřeby přikrojeny na vhodnou velikost tak, aby se vešly do plastové komůrky. Aby bylo možné z dodaného materiálu připravit velmi tenké řezy, musí být tkáň zalitá ve vhodném médiu, nejčastěji v parafínu. Před vlastním zalitím je však nutné vzorky odvodnit a projasnit, což se provádí v tkáňovém automatu. Odstranění vody se provádí pomocí postupně stoupajících koncentrací lihobenzínu. Po odvodnění je nutné tkáň zbavit lihobenzínu, jelikož parafín se v lihu nerozpouští. Z tohoto důvodu se dále provádí prosycení látkou, která se dobře mísí s lihobenzínem a zároveň rozpouští parafín. Nejčastěji se v laboratořích používá xylen. Ze xyleny jsou vzorky následně prosyceny v rozehřátém parafínu, který se udržuje

v tekutém stavu při teplotě 56-58°C. Poté probíhá vlastní zalití tkáně do příslušně zvolené kovové komůrky. Po ztuhnutí parafínu vznikne parafinový blok, který lze uchovat pro další použití i několik let. Takto připravené parafinové bloky se řežou na mikrotomech, přístrojích určených k vytváření velmi tenkých řezů. Pomocí nich se nařežou řezy o tloušťce 2µm. Tyto řezy se poté pokládají na vodní hladinu, aby došlo k jejich napnutí, a následně se z vodní hladiny natáhnou na podložní sklo. Skla s natáhnutými řezy se dále vloží do termostatu na 30 min při teplotě 70 °C, kde dochází k odstranění vody a rozpouštění parafínu.

4.1.3 Barvení preparátů

Jelikož je většina tkáňových struktur bezbarvá, je pro jejich pozorování v mikroskopu nutné preparáty obarvit. Před vlastním barvením je potřeba řezy zbavit parafínu, což se provádí pomocí tří po sobě jdoucích lázní xylenu a následně procházejí sestupnou řadou lihobenzínu (96%, 80% a 70%) po dobu 10min.

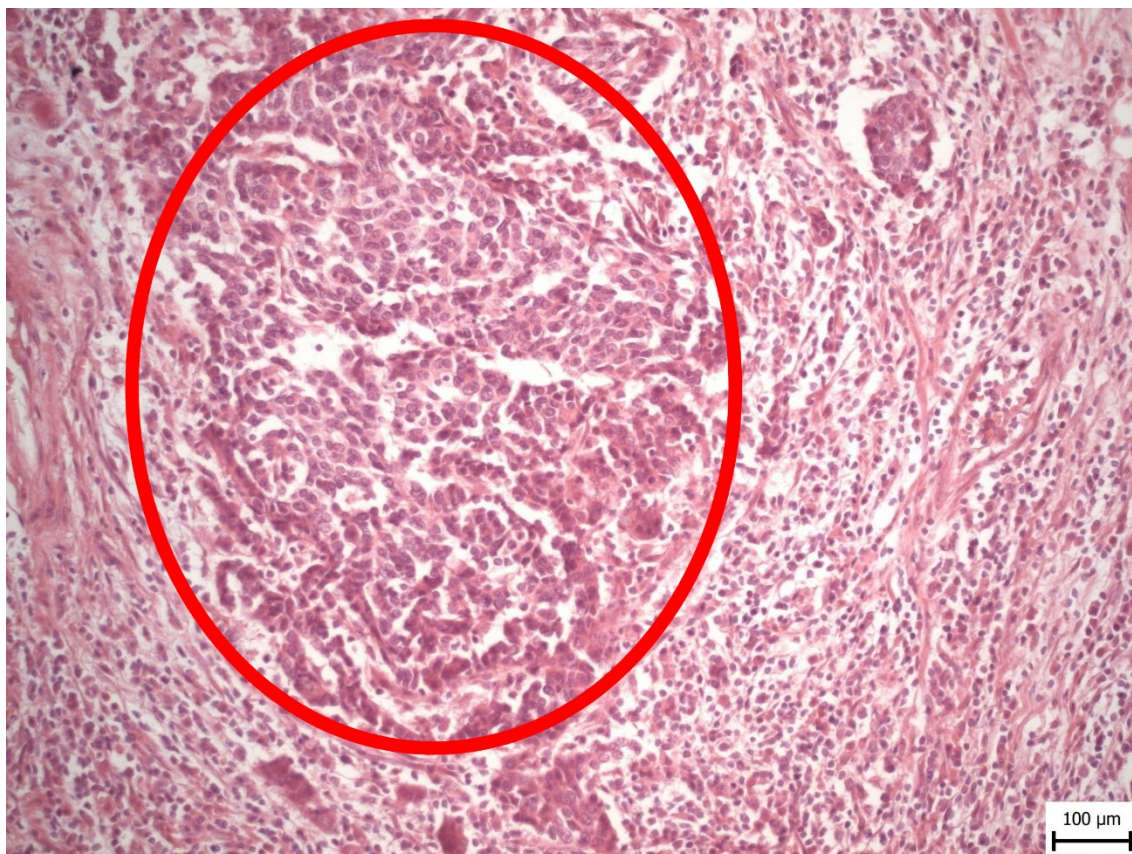
Jako základní barvení, které se provádí u všech preparátů, se používá barvení hematoxylin-eosin (HE). Hematoxylin je bazický roztok, který barví kyselé struktury jako je jádro, modře. Naopak eosin je barvivo kyselé a barví všechny zásadité struktury oranžovo-růžově. (Tabulka 5, Obrázek 11)

Tabulka 5 Základní barvení – Hematoxylin-Eosin

Základní barvení – Hematoxylin-Eosin	
1. Odparafínování v xylenu, sestupná řada alkoholů a oplach v destilované vodě	
2. Mayerův hematoxylin	2-3 min
3. Tekoucí teplá voda (modráni jader)	10 min
4. Oplach v alkoholu	
5. Alkoholický roztok Eosinu	20s – 1 min
6. Oplach alkoholem	

Výsledek barvení: Jádra buněk se barví modře, cytoplasma a ostatní struktury oranžovo-růžově

Obrázek 11 Barvení HE, Biopsie č. 9777, zvětšení 100x



Jádra – modře, cytoplazma a ostatní struktury – oranžovorůžově, červeně označeny nádorové struktury Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem Hurníkem Ph.D.

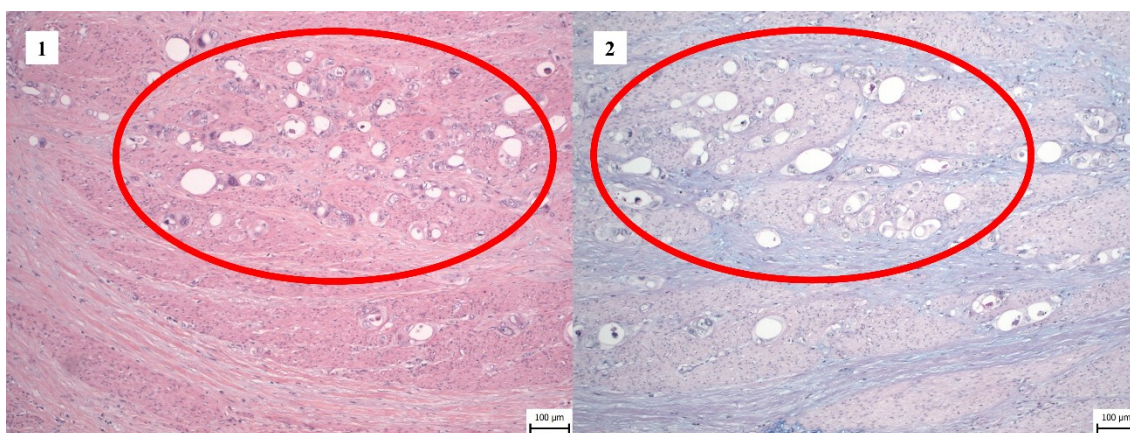
Pro střevní preparáty se v laboratoři ze speciálních barvicích metod nejčastěji používá PAS (Period Acid – Schiff). Tato barvicí metoda se používá k znázornění mukopolysacharidů. (Tabulka 6, Obrázek 12)

Tabulka 6 Speciální barvení – PAS

Speciální barvení - PAS	
1. Odparafinování v xylenu, sestupná řada alkoholů	
2. Kyselina perijódová	1-5 min
3. Oplach vodou	
4. Schiffovo reagens	1-5 min
5. Tekoucí teplá voda	10 min
6. Mayerův hematoxylin	2-3 min
7. Teplá tekoucí voda (modrání jader)	

Výsledek barvení: PAS pozitivní substance (neutrální mukopolysacharidy) barveny purpurově červeně, jádra buněk modře

Obrázek 12 Základní a speciální histologické barvení, zvětšení 100x



1. Barvení Hematoxylin-Eosin Jádra – modře, cytoplazma a ostatní struktury – oranžovorůžově,
2. Speciální barvení PAS, Jádra – modře, PAS pozitivní substance purpurově červeně, červeně
označeny nádorové struktury Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem
Hurníkem Ph.D.

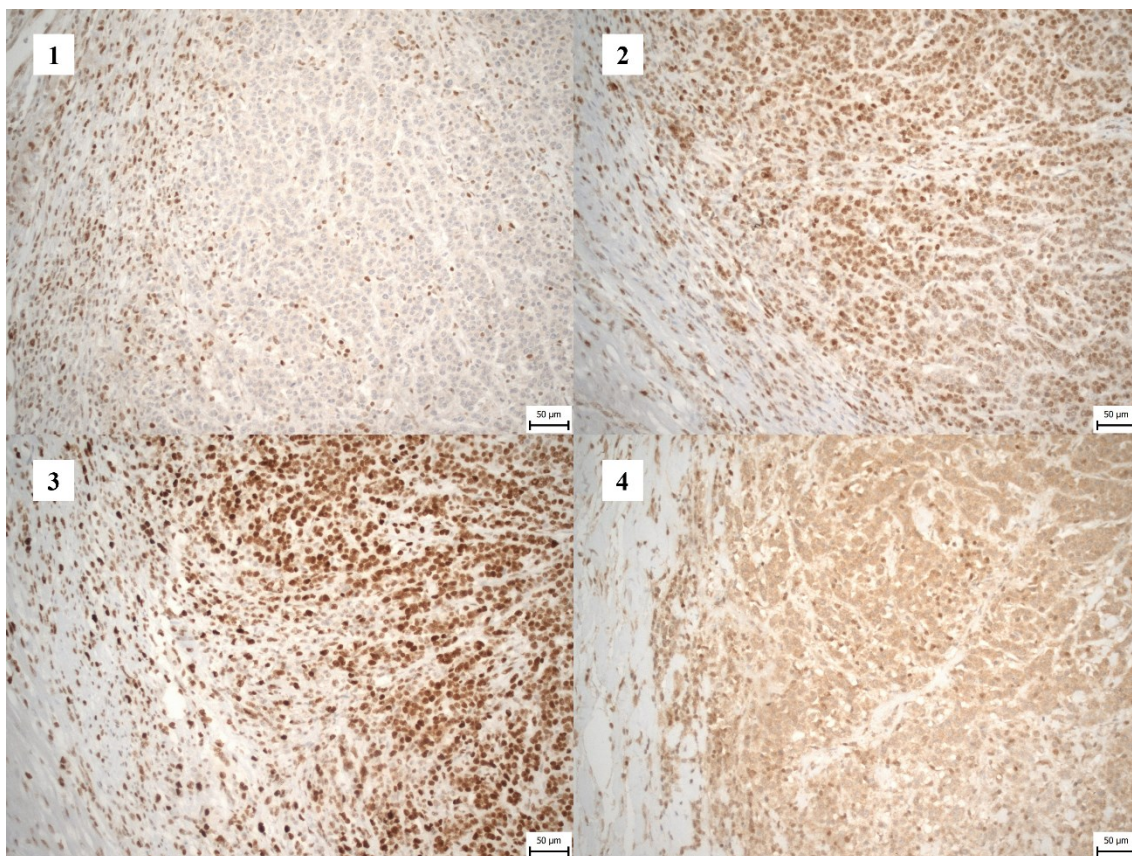
Po vlastním barvení následuje odvodnění v postupně stoupajících koncentracích lihobenzínu, projasnění v acetonu a dvou lázních xylenu. Posledním krokem je montování, které se provádí buď pomocí montovacího automatu za použití fólie anebo ručně. Při ručním montování se jako médium používá solakryl a řez se překryje krycím sklem. Takto zhotovené řezy lze poté uchovávat několik let.

4.2 Imunohistochemické metody

Principem imunohistologických metod je průkaz antigenů (biomarkerů) pomocí specifických primárních protilátek. Pokud dojde k navázání protilátky na antigen je tato reakce považována za pozitivní a projeví se barevným produktem, který lze následně pozorovat v mikroskopu.

V laboratoři se využívá přístroj VENTANA BMK ULTRA, je určen k automatickému barvení vzorků pomocí imunohistochemických či in situ hybridizačních činidel. Pro průkaz MSI slouží panel protilátek VENTANA MMR IHC od firmy Roche. Jedná se o kvalitativní test, který slouží k hodnocení proteinů opravy chybného párování (MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6) z parafinových řezů (**Obrázek 13**). Kombinace těchto protilátek se využívá právě při diagnostice Lynchova syndromu. Pro detekci se dále používají detekční panely od firmy Roche a to OptiView DAB IHC a OptiView Amplification Kit. [45-48]

Obrázek 13 Imunohistochemické stanovení MSI, Biopsie č. 20443, zvětšení 200x, Ventana BMK ULTRA



1. Ztráta exprese genu *MLH1*, 2. zachovalá exprese genu *MSH2*, 3. zachovalá exprese genu *MSH6*, 4. ztráta exprese genu *PMS2*, Ztráta exprese – jaderná exprese negativní (modrá), zachovalá exprese – jaderná pozitivita (hnědá) Zdroj: Vlastní zpracování, snímky poskytnuty MUDr. Pavlem Hurníkem Ph.D.

4.2.1 Protilátky panelu VENTANA MMR IHC

Protilátky obsažené v panelu VENTANA MMR IHC jsou kombinace myších a králičích monoklonálních protilátek. (Tabulka 7) [45, 46]

Tabulka 7 Panel protilátek VENTANA MMR IHC

Protilátka	Druh protilátky	Lokalizace skvrn	Kontrolní tkáň
Anti-MLH1 (M1)	Myš	Jádro	Kolorektální karcinom
Anti-PMS2 (A16-4)	Myš	Jádro	Normální kolorektální buňky
Anti-MSH2 (G219-1129)	Myš	Jádro	Normální kolorektální buňky
Anti-MSH6	Králík	Jádro	Kolorektální karcinom

4.2.2 Detekční panely

Při IHC stanovení MSI se využívá kombinace dvou detekčních panelů, a to OptiView DAB IHC a OptiView Amplification Kit firmy Roche.

OptiView DAB IHC panel (Tabulka 8), je citlivý detekční chromogenní panel, který je schopen detekovat specifické myší a králičí primární protilátky vázané na antigenech tkáně. Primární protilátka je lokalizována protilátkou sekundární, na kterou se dále váže terciární protilátka značená enzymem. Výsledný komplex je následně znázorněn pomocí substrátu peroxidu vodíku a chromogenu 3,3'-diaminobenzidin tetrachloridu (DAB), který vytváří hnědé sraženiny viditelné pod světelným mikroskopem. [47]

Tabulka 8 Panel OptiView DAB IHC

OptiView DAB IHC	
OptiView Peroxidase Inhibitor	3% H ₂ O ₂
OptiView HQ Universal Linker	HQ značené protilátky
OptiView HRP Multimer	Myší monoklonální terciární protilátka
OptiView DAB	0,2 % w/v 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid
OptiView H₂O₂	0,04% H ₂ O ₂
OptiView Copper	síran měďnatý – CuSO ₄ (5,0 g/l)

Pro zvýšení detekce se používá k tomuto panelu i OptiView Amplification Kit (Tabulka 9). Tento systém zesiluje signál IHC barvení prostřednictvím přidaných reagensů, a to HQ hapten konjugátu (Amplifier), substrátu peroxidu vodíku (Amplification 3% H₂O₂) a myší anti-HQ monoklonální protilátky značenou křenovou peroxidázou – HRP (Amplification Multimer). V případě aktivace zesilovacího kroku jsou na sklíčko postupně nanášeny reagensy OptiView Amplifier a OptiView Amplification 3% H₂O₂, které se nanášou po aplikaci OptiView HRP Multimer z DAB detekčního panelu. [48]

Tabulka 9 Panel OptiView Amplification Kit

OptiView Amplification Kit	
OptiView Amplifier	Tyramid + HQ
OptiView Amplification Multimer	Myší monoklonální protilátka anti-HQ značená HRP protilátkou
OptiView Amplification H₂O₂	0,04% H ₂ O ₂

4.2.3 Roztoky používané u přístroje VENTANA BMK ULTRA

V průběhu procesu jsou použity řady roztoků, které napomáhají správnému postupu. Dodané roztoky od firmy Roche dochází buď v podobě koncentrátů, které je potřeba před vlastním použitím naředit dle příslušného ředění, nebo jako předředěné roztoky rovnou k použití.

EZ Prep roztok snižuje povrchové napětí vodného roztoku a napomáhá uvolnění parafínu, a tím provádí deparafinizaci parafínového řezu.

ULTRA LCS je předředěný roztok s funkcí krycí vrstvy, který slouží jako ochranná bariéra mezi vodnými reagensy a okolním vzduchem. Jeho úkolem je zabránit odpařování, čímž udržuje stabilní vhodné prostředí pro IHC metody a hybridizační reakce in situ.

Dalším reagensy je Reaction Buffer, což je pufrovací roztok na bázi TRIS (trihydroxymethylaminomethan) a jeho hlavním úkolem je udržení vodného prostředí. Používá se k oplachu skel mezi jednotlivými kroky barvení.

Posledním používaným roztokem je ULTRA CC1 (*Cell Conditioning Solution*), který díky svému zásaditému pH a působení zvýšené teploty dokáže rozrušit kovalentní vazby vzniklé při fixaci tkáně formalínem. Tyto vazby mohou omezit dostupnost antigenů, což může negativně ovlivnit navázání protilátek. [49]

4.2.4 Postup IHC stanovení

Přístroj VENTANA BMK ULTRA je komplexní systém, který provádí více kroků imunohistochemické analýzy. Pozitivně nabitě sklíčko s natáhnutým parafínovým řezem a příslušnou kontrolou se označí štítkem čárovým kódem. Sklo se následně položí na destičku do přístroje čárovým kódem nahoru, přístroj tento kód naskenuje a podle něj automaticky načte odpovídající protokol uložený v softwaru.

Prvním krokem procesu je sušení při teplotě 65 °C a dále deparafinace tkáňového řezu při 72 °C, společně s roztokem EZ PREP. Tímto procesem dochází k odstranění parafínu a rehydrataci tkáně.

Dalším krokem je tzv. odmaskování antigenu pomocí roztoku CC1 pro snadnější přístup protilátek k antigenu. Následně se aplikuje primární protilátka, která je inkubována při teplotě 37 °C po dobu 24 min. Po této fázi se zapojují oba detekční kity, které jsou na sebe náležitě navázány. Závěrečnou částí procesu je dobarvení a modrání jader pomocí roztoku hematoxylinu. Všechny kroky probíhají v předepsaných teplotních a časových podmínkách, podle doporučení výrobce.

Barvení protilátkami se projevuje hnědým jaderným zbarvením v aktivně proliferujících buňkách. Pokud je ztráta exprese genu, hnědé barvení v preparátu nenacházíme.

4.3 Molekulárně genetické metody

4.3.1 Princip stanovení MSI pomocí PCR

Metody stanovení MSI detekované pomocí PCR a dMMR stanovené pomocí IHC poskytují odlišné informace o nádorových vzorcích. IHC umožňuje zjistit expresi MMR proteinů ve vzorku, zatímco PCR analýza hodnotí funkčnost MMR systému na základě detekce změn v DNA způsobených ztrátou jeho hlavní funkce. Kombinované použití obou metod může výrazně zvýšit přesnost charakterizace nádorů. [52]

Pro diagnostiku MSI se používá OncoMate MSI Dx analysis systém, který využívá metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) a kapilární elektroforéze, jež umožňují porovnání alelických profilů normální a nádorové tkáně téhož pacienta. Přítomnost MSI se prokazuje změnou délky repetitivní sekvencí v nádorové DNA oproti nenádorové.

Systém pracuje s pěti mononukleotidovými repetitivními markery (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 a MONO-27) pro určení MSI a dvěma pentanukleotidovými repetitivními markery (Penta C a Penta D), které slouží k ověření identity vzorků a detekci případné kontaminace. [51, 52]

Proces analýzy začíná izolací DNA ze vzorků fixovaných formalínem a zalitých v parafínu. Následně probíhá PCR amplifikace specifických mikrosatelitních oblastí,

přičemž jsou amplifikované fragmenty fluorescenčně značeny a separovány kapilární elektroforézou. Výsledky jsou analyzovány pomocí softwarových nástrojů GeneMapper®, který umožňuje automatickou klasifikaci genotypů a interpretaci MSI. [51, 52]

Nestabilita markeru je definována detekcí alely, která se liší velikostí alespoň o 2,75 bp (párů bází) oproti alele referenční v nenádorové tkáni. Vzorek nádoru je považován za MSI-H, pokud jsou nestabilní alespoň dva markery. Pokud je stabilita ve všech markerech, nebo dojde k nestabilitě méně než dvou, je vzorek označován jako MSS.

Přesnost analýzy je zajištěna použitím interního standardu pro korekci velikosti fragmentů a kontrolou shody mezi nádorovou a nenádorovou tkání pacienta. [51, 52]

4.3.2 Postup stanovení MSI pomocí PCR

Jednotlivé reagencie z Kitu OncoMate MSI Dx analysis systém se rozmrazí při pokojové teplotě a stočí se v centrifuze. Prvním krokem pro analýzu je příprava PCR master mixu, pomocí tabulky, na základě této tabulky se připraví potřebné množství (Tabulka 10). Před pipetováním je potřeba, aby se všechny reagencie intenzivně vortexovaly po dobu 3 sekund.

Tabulka 10 Příprava PCR Master mixu pro 1 reakci

Reagencie	Objem
Water, Amplification Grade	4 μ l
OncoMate MSI 5X Master Mix	2 μ l
OncoMate MSI Primer Mix	2 μ l
Templátová DNA (0,5 ng)	2 μ l

Připravený Master mix se následně promíchá vortexováním a krátce centrifuguje. Poté se do PCR zkumavek pipetuje 8 μ l této směsi.

Jednotlivé vzorky DNA se centrifugují a umístí do přípravného stojánku. Ke každé zkumavce se přidá 2 μ l DNA a tím se dosáhne celkového objemu 10 μ l. Kontrolní vzorky se ředí na koncentraci 0,5 ng/ μ l pomocí Water Amplification Grade. Po uzavření zkumavek následuje krátká centrifugace, poté jsou vzorky umístěny do termocykleru a je spuštěn příslušný program termocyklování (Tabulka 11).

Tabulka 11 Program termocyklování

Fáze	Počet cyklů	Teplota	Čas
Denaturace	1	96 °C	1 min
Cyklování	29	96 °C	10 s
		58 °C	1 min
		72 °C	30 s
Finální extenze	1	60 °C	10 min
Chlazení	1	4 °C	-

Další fází je fragmentační analýza, před jejím zahájením je potřeba rozmrazit a krátce centrifugovat Hi-Di formamid a velikostní standard Size Standard 500. Smícháním těchto reagentů se připraví denaturační směs, kdy se napipetuje 9,5 µl Hi-Di formamid a 0,5 µl Size Standard 500. Směs se důkladně vortexuje a krátce centrifuguje. Takto připravená směs se rozdělí do připravených zkumavek a přidá se ke každé 1 µl PCR produktu. Vzorky jsou opět vortexovány, krátce centrifugovány a následně přeneseny do termocykleru, kde probíhá denaturační program (Tabulka 12).

Tabulka 12 Denaturační program

Fáze	Počet cyklů	Teplota	Čas
Denaturace	1	95 °C	3 min
Chlazení	1	4 °C	5 min
Chlazení	1	4 °C	-

Po denuraci se obsah mikrozkušavek přeneso do destičky pro genetický analyzátor ABI 3130, a to v pořadí odpovídajícím vzorkům. Destička je následně krátce centrifugována, vložena do analyzátoru a propojena s odpovídajícím protokolem v systému. Analýza se provádí metodou kapilární elektroforézy

4.3.3 Princip stanovení hypermetylace promotoru

Pro vyloučení Lynchova syndromu se provádí molekulárně genetické vyšetření hypermetylace promotoru MLH1 z parafinového řezu. Jedná se o real-time PCR metodu, která je vysoce citlivá, specifická, a umožňuje detekci a kvantifikaci cílových sekvencí DNA. [53-55]

Tato metoda je založena na třech základních krocích, a to extrakci nukleových kyselin, chemické modifikaci DNA bisulfitem a následné amplifikaci specifických sekvencí pomocí fluorescenčně značených sond TaqMan. [53-55]

Modifikace DNA pomocí bisulfitu způsobí přeměnu nemetylovaných cytosinů na uracil, zatímco metylované cytosiny jsou před přeměnou chráněny a zůstávají nezměněné. To umožňuje jejich detekci při PCR. [53-55]

Principem metody je využití TaqMan sondy, která obsahuje fluorescenční barvivo a zhasací molekulu. Tato sonda se během PCR váže na specifickou sekvenci DNA, která je ohraničena primery. Při syntéze nového řetězce DNA polymerázou dojde k degradaci sondy, uvolnění fluoroforu od zhasací molekuly a následně k emisi fluorescence, která je detekována v reálném čase. [53-55]

Pro vyhodnocení analýzy se používá hodnota Ct (tzv. prahový cyklus PCR), tato hodnota představuje počet cyklů PCR, při kterém fluorescence překročí detekční práh. Při vyhodnocení real-time PCR platí, že čím nižší hodnota Ct, tím větší množství cílové sekvence. [53-55]

4.3.4 Postup stanovení hypermetylace promotoru

Pro analýzu se používá MLH1 Methylation Analysis Kit od firmy Genmark (Tabulka 13), tento kit umožňuje detekci metylovaných oblastí DNA. Součástí soupravy je také vnitřní kontrola, která slouží k ověření správnosti reakce.

Tabulka 13 Obsah MLH 1 Methylation Analysis Kit

Reagencie	Obsah
4x MLH1 Primer Probe Mix	Amplifikační a detekční oligonukleotidy, šablona vnitřní kontroly
2x Master Mix	DNA polymeráza + pufr s dNTPs
Voda bez RNázy	Pro negativní kontrolu templátu
Pozitivní kontrola (100% metylovaná DNA)	Směs syntetických sekvencí
Kalibrátor MLH1 (Methylated DNA)	Směs syntetických sekvencí

Příprava reakce probíhá v celkovém objemu 20 μ l na vzorek a tato reakční směs obsahuje 2X Master Mix, specifickou směs primerů a sond pro *MLH1*, a bisulfidově upravenou DNA nebo kontrolní vzorek.

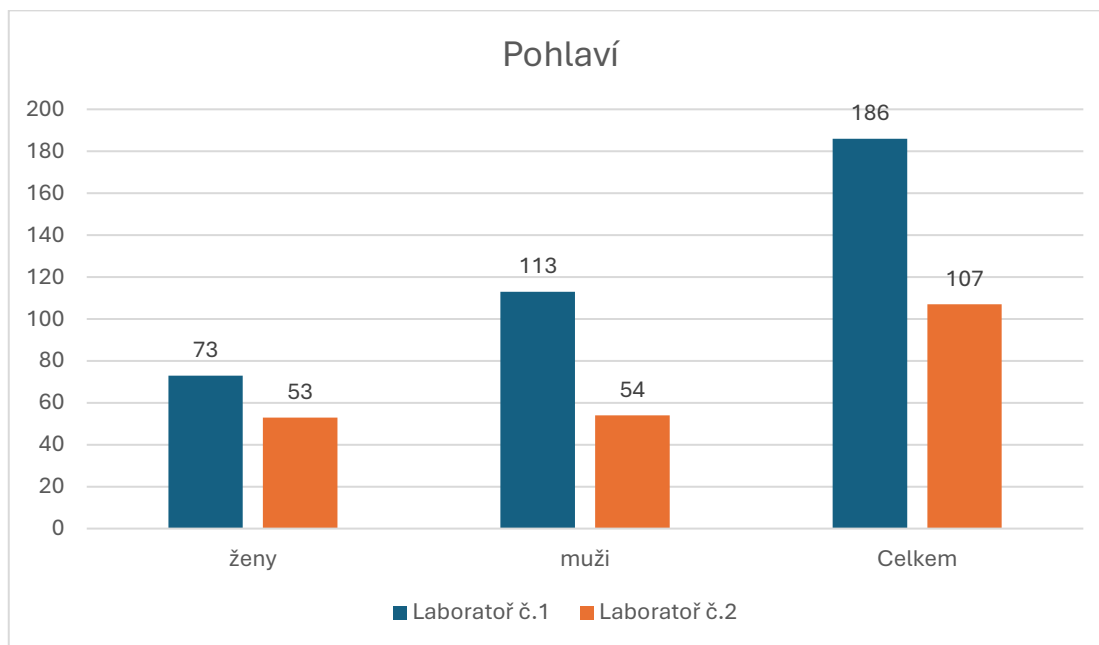
Před vlastním pipetováním jsou všechny složky zcentrifugovány a rozmrazeny při laboratorní teplotě, aby se zajistila jejich homogenita. Směs je následně pipetována do PCR destičky, která se uzavře lepící fólií, poté je krátce centrifugována a umístěná do přístroje pro real-time PCR.

PCR reakce začíná počáteční denaturací vzorku při 95 °C po dobu 15 min. Poté program probíhá ve 45 cyklech amplifikace, přičemž každý cyklus zahrnuje 20sekundovou denaturaci při 95 °C a annealing při 60 °C po dobu 1 min. Fluorescenční signál je během každého cyklu snímán, což umožňuje sledování průběhu reakce v reálném čase.

4.4 Výsledky

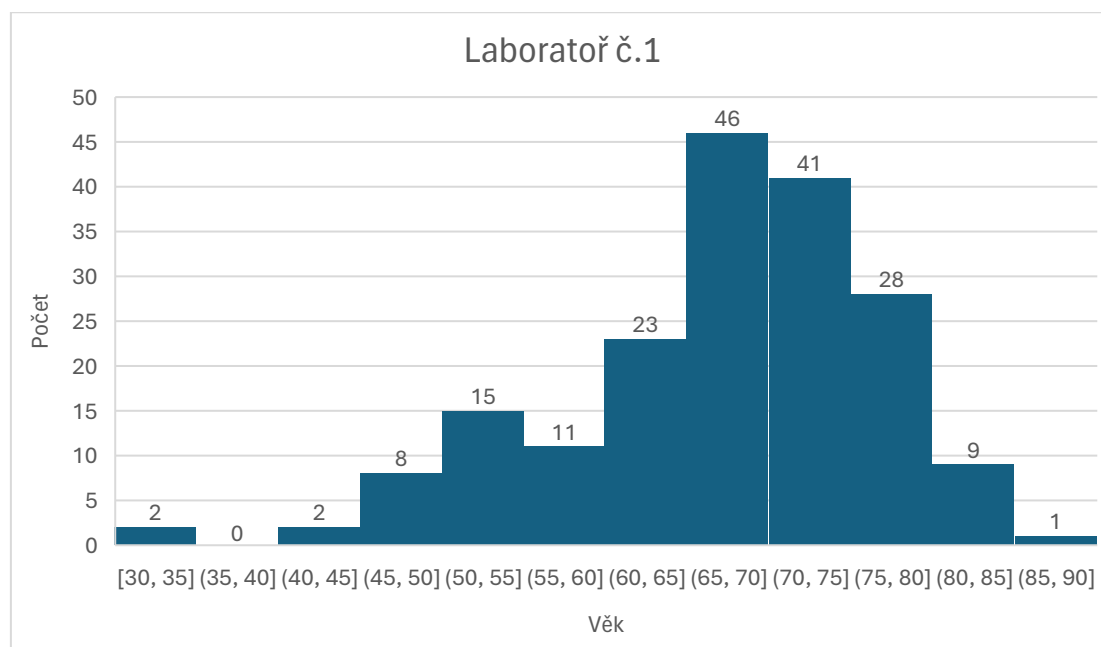
Celkem za rok 2023 bylo v laboratoři č. 1 vyšetřeno MSI u 186 pacientů, z toho bylo 73 žen a 113 mužů. V laboratoři č. 2 bylo vyšetřeno MSI u 107 pacientů, z toho bylo 53 žen a 54 mužů. (Graf 1)

Graf 1 Počet žen a mužů v jednotlivých laboratořích

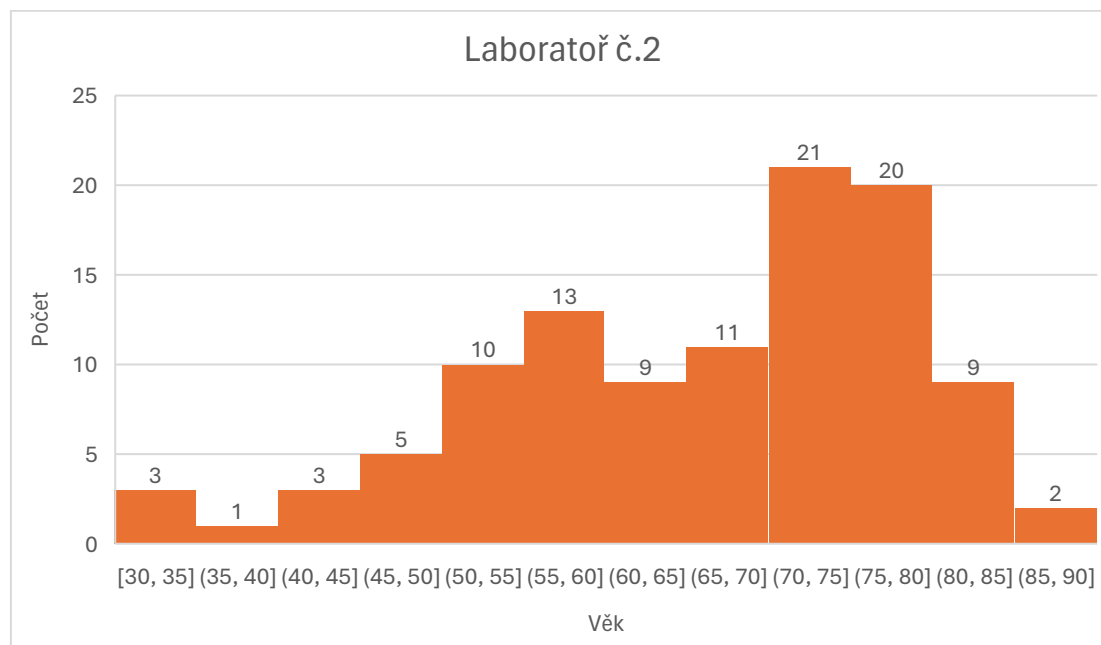


V laboratoři č. 1 je nejvíce osob ve věkové kategorii 65-75 let (Graf 2), zatímco v laboratoři č. 2 je věkové rozložení rovnoměrnější, s větším zastoupením mladších i starších skupin. (Graf 3)

Graf 2 Věkové zastoupení – laboratoř č.1

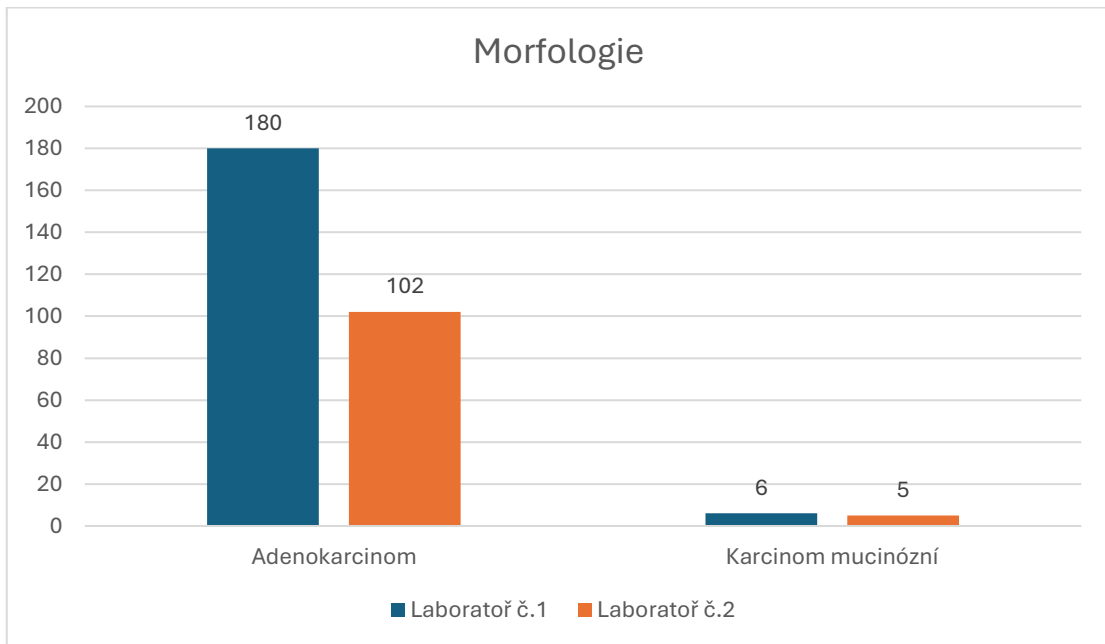


Graf 3 Věkové zastoupení - laboratoř č.2



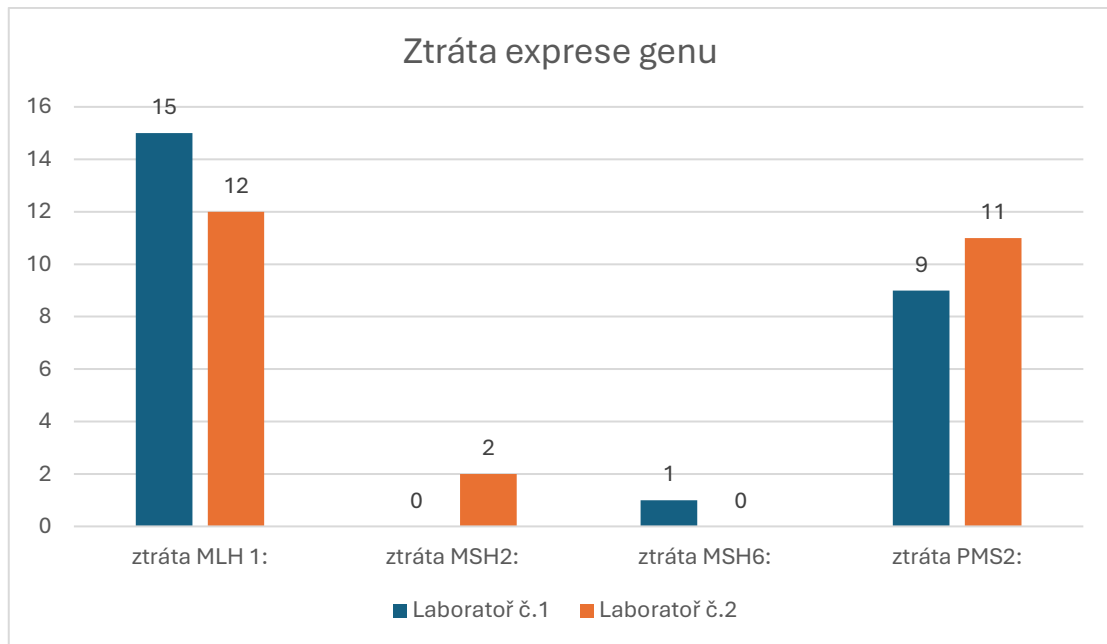
Dle morfologie byly v obou laboratořích nádory klasifikovány jako karcinomy mucinózní a adenokarcinomy, které se vyskytovaly ve většině. V laboratoři č. 1 bylo diagnostikováno 180 adenokarcinomů a 6 mucinózních karcinomů, v laboratoři č.2 se jednalo o 102 adenokarcinomů a 5 mucinózních karcinomů. (Graf 4)

Graf 4 Srovnání počtu adenokarcinomů a mucinózních karcinomů



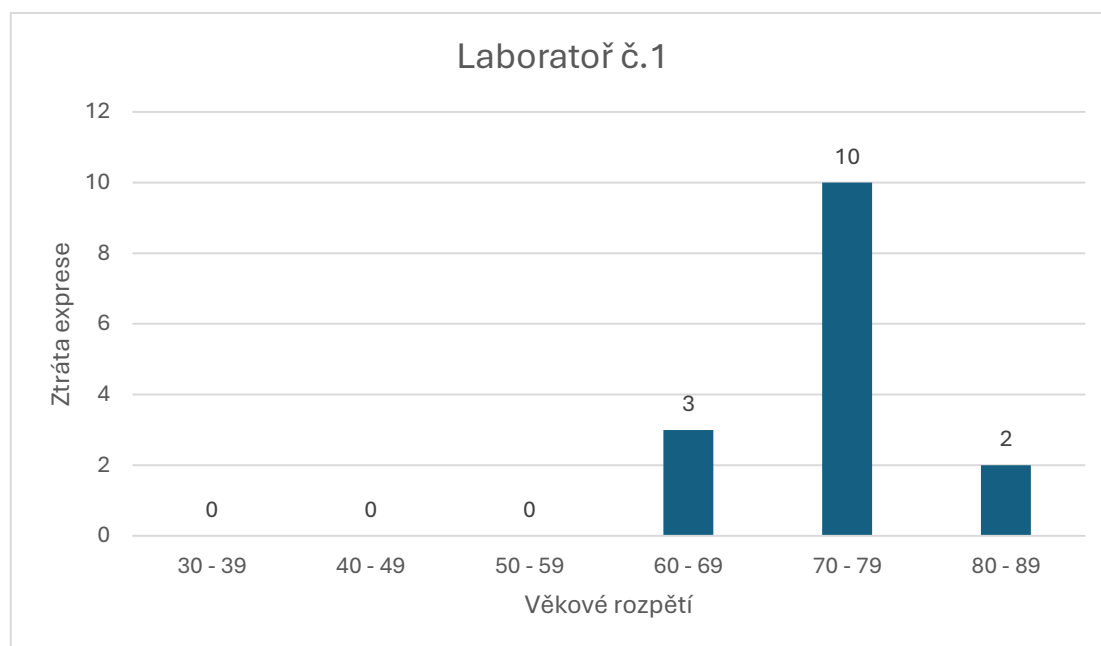
V laboratoři č. 1 byla při IHC vyšetření prokázána nejčastější ztráta exprese genu *MLH1* (15 případů), zatímco v laboratoři č. 2 bylo těchto případů o 3 méně (12 případů). U genu *PMS2* byla situace opačná, více případů bylo zaznamenáno v laboratoři č. 2 (11 případů) oproti laboratoři č. 1, kde bylo 9 případů. Ztráta exprese genu *MSH2* byla zaznamenána pouze v laboratoři č.2 (2 případy), zatímco ztráta *MSH6* byla přítomna jen v laboratoři č.1 (1 případ). (Graf 5)

Graf 5 Porovnání výskytu ztráty exprese u jednotlivých genů

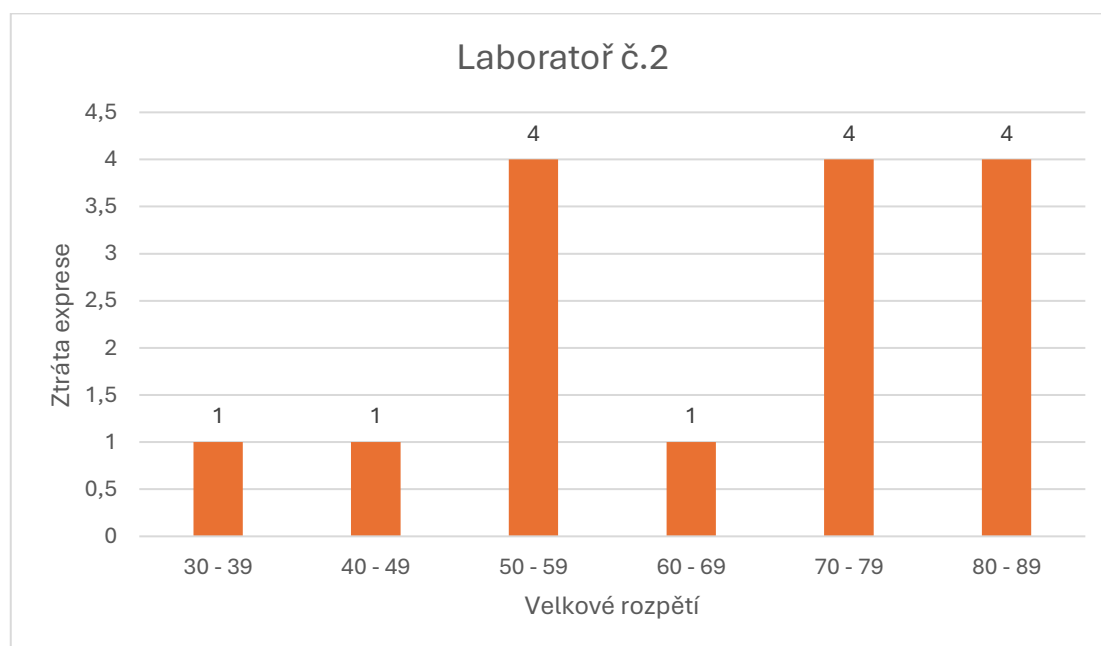


V laboratoři č. 1 se ztráta exprese MMR genu vyskytla převážně ve věkové skupině 70-79 let (10 případů), méně často pak ve skupině 60-69 let (3 případy) a poté ve skupině 80-89 let (2 případy). (Graf 6) V laboratoři č. 2 byla ztráta exprese rozložena rovnoměrněji mezi širší věkové rozmezí, nejčastěji se však vyskytovala ve skupinách 50-59 let, 70-79 let a 80-89 let (po 4 případech), zatímco v mladších věkových kategoriích byla přítomna pouze po 1 případě. (Graf 7)

Graf 6 Závislost výskytu ztráty exprese na věku pacientů – Laboratoř č.1

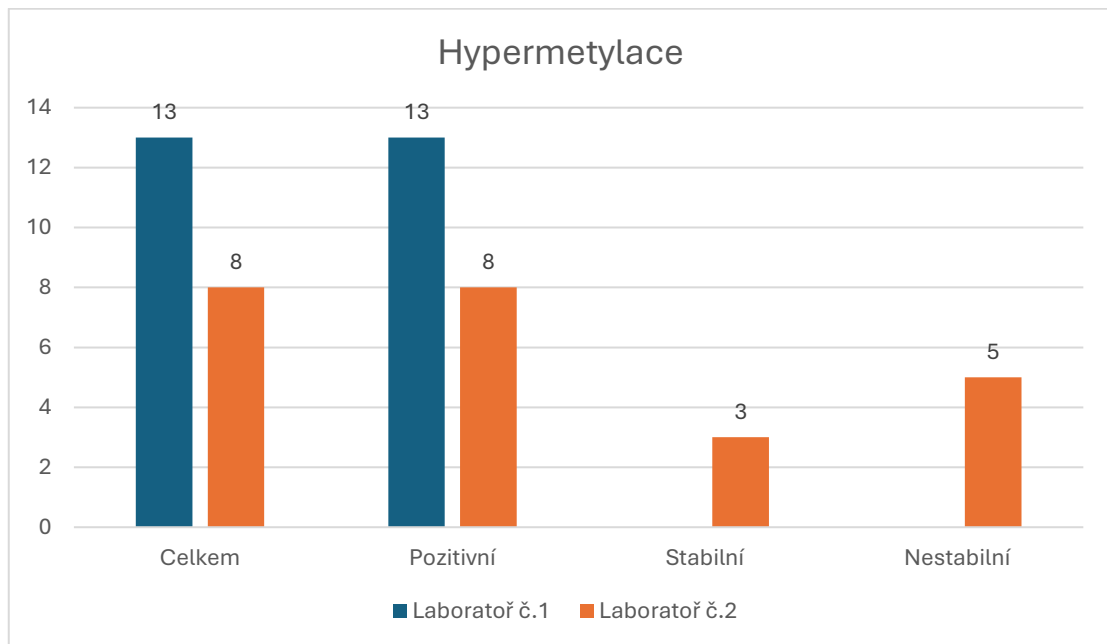


Graf 7 Závislost výskytu ztráty exprese na věku pacientů – Laboratoř č.2



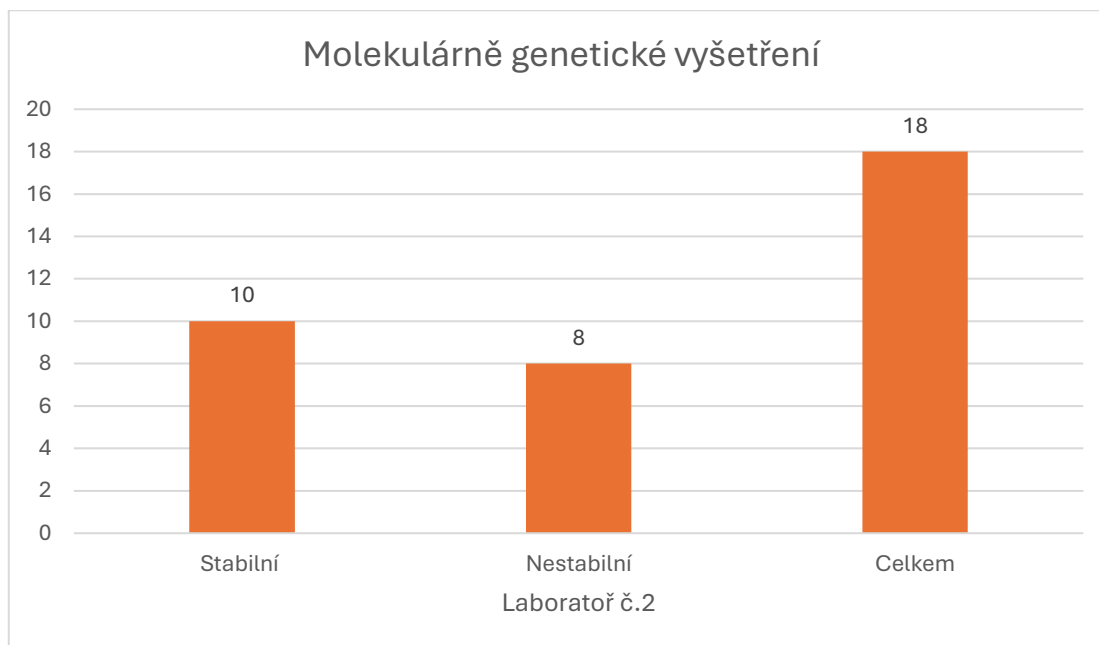
V laboratoři č.1 byla hypermetylace promotoru vyšetřena u 13 pacientů, z toho byla u všech prokázána hypermetylace promotoru. V laboratoři č 2 byla hypermetylace vyšetřena u 8 pacientů, u všech se prokázala hypermetylace. Dále se v laboratoři č. 2 u všech pacientů provedlo molekulárně genetické vyšetření, kde u 3 pacientů byla prokázána stabilita a u 5 pacientů se jednalo o nestabilitu. (Graf 8)

Graf 8 Vyšetření hypermetylace promotoru *MLH1*



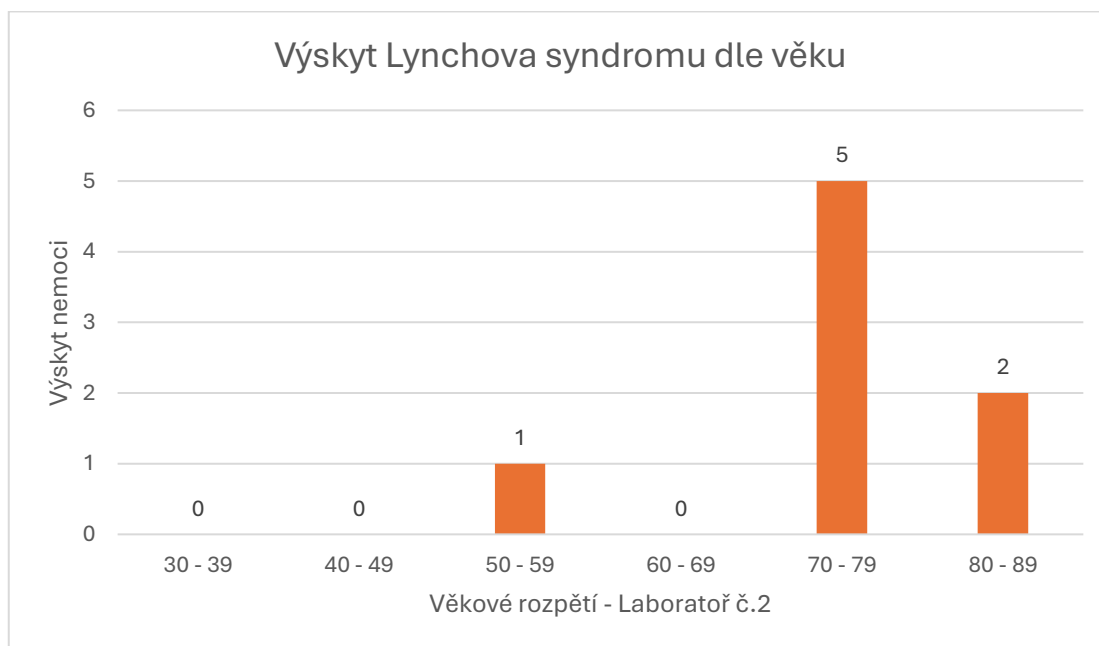
Molekulárně genetické vyšetření se provádělo pouze v laboratoři č. 2, toto vyšetření se provádělo celkem u 18 případů, z toho 10 případů vyšlo jako mikrosatelitně stabilní karcinomy a u 8 případů byla prokázána mikrosatelitní nestabilita. (Graf 9)

Graf 9 Molekulárně genetické vyšetření MSI v laboratoři č.2



Na základě molekulárně genetického vyšetření v laboratoři č. 2 bylo zjištěno, že nejvíce pacientů s Lynchovým syndromem bylo ve věku 70-79 let (5 případů), dále byly 2 případy ve věku 80-89 let a 1 případ v kategorii 50-59 let. (Graf 10)

Graf 10 Závislost výskytu Lynchova syndromu na věku v laboratoři č.2



5. DISKUZE

V posledních letech je kladen stále větší důraz na terapii tzv. „šitou na míru“, a proto se při diagnostice kolorektálního karcinomu stává důležité jak imunohistochemické (IHC), tak molekulárně genetické vyšetření, na základě, kterého se volí specifická léčba. Detekce MSI tak hraje důležitou roli při výběru terapie.

Cílem práce bylo seznámit se s metodikou stanovení MSI pomocí imunohistochemie a molekulární genetiky, a následně srovnat výsledky stanovení MSI u dvou referenčních laboratoří.

Při sběru dat z obou laboratoří bylo patrné, že vyšší zastoupení kolorektálního karcinomu se objevuje častěji u mužů než u žen, což potvrzuje i studie zaměřená na klinické a genetické charakteristiky Lynchova syndromu. [56]

Kolorektální karcinom je jedno z nejčastějších nádorových onemocnění. Dle studie Boland (2010) je popisována MSI u 15 % všech kolorektálních karcinomů, 3 % z nich jsou spojeny s Lynchovým syndromem, zbylých 12 % je způsobeno sporadickou hypermetylací promotoru *MLH1*. Většina kolorektálních karcinomů s MSI ztratila expresi *MLH1* a *PMS2*. Což je v souladu s námi zjištěnými daty, kde v laboratoři č. 1 to bylo 15 pacientů z celkového počtu 186 a v laboratoři č. 2 15 pacientů ze 107. [61]

Při porovnávání MSI metodiky mezi vybranými laboratořemi byly zjištěny odlišné postupy. V případě ztráty exprese *MLH1* detekované pomocí IHC bylo v obou laboratořích následně provedeno molekulárně genetické vyšetření hypermetylace promotoru *MLH1*. Zatímco laboratoř č.1 při pozitivním nálezu hypermetylace klasifikovala nádor jako sporadický, laboratoř č.2 provedla navíc i testování MSI pomocí PCR. Na základě tohoto vyšetření byla hypermetylace detekována jak u nádorů sporadických, tak i u Lynchova syndromu. Tato skutečnost je podpořena také studií Moreira et al. z roku 2015, která uvádí, že hypermetylace promotoru *MLH1* se vyskytuje až u 15 % případů Lynchova syndromu. [57] Z tohoto důvodu by bylo vhodné, po konzultaci s klinickým genetikem, doplnit stanovení MSI také metodou PCR, které je doporučeno i na základě mezinárodní směrnice CAP Bartley et.al. 2022. [63] Pro zlepšení diagnostiky je dále možné stanovení mutace genu *BRAF*, na což také poukazuje studie Moreira et al. z roku 2015 prokazující přítomnost mutace genu *BRAF* u sporadického karcinomu. [57] Dle mezinárodní směrnice CAP Shannon 2018 [64],

kde je uvedeno, že při ztrátě exprese MLH1 a/nebo PMS2 by vyšetření mutace genu *BRAF* mohlo usnadnit rozlišení sporadického karcinomu od Lynchova syndromu.

Ve studii Hampel et al. (2005) [58] byla nejčastěji zjištěna mutace v genu *MSH2*, následované mutacemi v *MLH1*. Zatímco v datech z laboratoře č. 2 byly u pacientů s Lynchovým syndromem zachyceny pouze mutace v genu *MLH1*. Odlišnost mohla být způsobena například velikostí vyšetřovaného souboru, kde u studie Hampel et al. (2005) bylo 23 subjektů s LS, zatímco v laboratoři č. 2 bylo 8 pacientů.

Nejvyšší výskyt Lynchova syndromu v laboratoři č. 2 byl zaznamenán ve věkové kategorii 70-79 let. Výskyt však byl pozorován i u jednoho z mladších pacientů ve věkovém rozmezí 50-59 let v pokročilejším stádiu, kdy byl karcinom klasifikován jako pT3. Studie Durhuus et al. vydána v roce 2021 [59] uvádí, že Lynchův syndrom se může vyskytnout i u pacientů mladších 40 let. Tito jedinci mívají lepší prognózu, ale zároveň bývá nádor zachycen v pokročilejším stádiu. [59]

V laboratoři č. 1 byla zastižena ztráta exprese genu ve vyšším věku, zatímco v laboratoři č. 2 byl věk pacientů rozptýlen ve všech věkových kategoriích od 30-89 let. Podle real-world studie Yamada (2021) [62] bylo potvrzeno, že se ztráta v MMR genech vyskytuje jak u mladších, tak u starších pacientů. U pacientů s Lynchovým syndromem a související mutací *MSH6* je medián věku při diagnóze o deset let vyšší než u nositelů mutace *MLH1* a *MSH2*, na což upozornili v téže studii. [62]

Zastoupení pacientů vyšší věkové kategorie může být způsobeno pozdní diagnostikou, často až po rozvoji klinických příznaků nádorového onemocnění. [60]

6. ZÁVĚR

Tato práce je zaměřena na porovnání metodiky a výsledků stanovení mikrosatelitní instability ve dvou referenčních laboratořích, a to jak pomocí imunohistochemických, tak molekulárně genetických metod.

Na základě získaných dat bylo zjištěno, že přístup k diagnostice se může lišit dle nastavených kroků v jednotlivých laboratořích. Výsledky poukazují na důležitost kombinace imunohistochemického a molekulárně genetického vyšetření, a to především v případech, kde je podezření na Lynchův syndrom. Mohou také podpořit úvahy o sjednocení některých diagnostických postupů.

Zajímavým zjištěním bylo, že u pacientů s LS byla detekována hypermetylace promotoru genu MLH1, která bývá obvykle považována za znak sporadického karcinomu. Toto zjištění poukazuje na to, že samostatná přítomnost hypermetylace nemusí LS jednoznačně vyloučit a potvrzuje tak význam širšího diagnostického postupu.

Pro budoucí výzkum by bylo přínosné analyzovat větší soubor dat a rozšířit vyšetření také o detekci mutaci v genu BRAF, které by mohlo přispět k rozlišení sporadického karcinomu od LS. Na základě toho by bylo vhodné zvážit i využití protilátky pro imunohistochemickou detekci této mutace, kterou společnost Roche nabízí jako součást kitu pro stanovení MSI.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MOUREK JINDŘICH. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů. 2., dopl.vyd.* Praha: Grada, 2012. ISSN 978-80-247-3918_2.
- [2] DYLEVSKÝ IVAN. *Somatologie. Vyd. 2, přeprac. a dopl.* Olomouc: EPAVA, 2000. ISBN 80-86297-05-5.
- [3] HUDÁK RADOVAN a KACHLÍK DAVID. *Memorix anatomie. 5. vydání.* Praha: Triton, 2021. ISBN 978-80-7553-873-4.
- [4] LUKÁŠ KAREL a HOCH JIŘÍ (ED.). *Nemoci střev.* Praha: Grada, 2018. ISBN 978-80-271-0353-9.
- [5] BALKO JAN, TONAR ZBYNĚK a VARGA IVAN. *Memorix histologie. 2. vydání.* Praha: Triton, 2021. ISBN 978-80-7553-874-1.
- [6] *Homepage | ECIS - European Cancer Information System* [online]. [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/en>
- [7] PETRUŽELKA LUBOŠ. *Kolorektální karcinom.* Praha: Farmakon Press, spol. s r.o., 2018. ISBN 978-80-906589-7-4.
- [8] ZAVORAL MIROSLAV, VOJTĚCHOVÁ GABRIELA a SUCHÁNEK ŠTĚPÁN. Endoskopická klasifikace neoplazií tlustého střeva a konečníku. *Vnitřní lékařství 60(7-8)* [online]. 2014, 664–668 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/vnitri-lekarstvi/2014-7-8/endoskopicka-klasifikace-neoplazii-tlusteho-streva-a-konecniku-49423/download?hl=cs>
- [9] *grading | NZIP* [online]. [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/rejstrikovy-pojem/2964>
- [10] *histopatologický stupeň (grade) » Linkos.cz* [online]. [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/histopatologicky-stupen-grade/>
- [11] SOBIN, Sestavili L H a M K GOSPODAROWICZ. UICC-International Union Against Cancer TNM KLASIFIKACE ZHOUBNÝCH NOVOTVARŮ [online]. 2009 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: www.wiley.com/wiley-blackwell.
- [12] *TNM klasifikace » Linkos.cz* [online]. [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/tnm-system-tnm-klasifikace/>
- [13] HORÁK LADISLAV, SKŘIČKA TOMÁŠ, ŠLAUF PETR a ÖRHALMI JULIUS. *Praktická proktologie.* Praha: Grada, 2013. ISBN 978-80-247-8542-4.
- [14] WASSERMAN JASON MD PHD FRCPC. *Tubular adenoma of the large intestine | MyPathologyReport.ca* [online]. 8. duben 2024 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.mypathologyreport.ca/diagnosis-library/tubular-adenoma-colon/>

- [15] WASSERMAN JASON MD PHD FRCPC. *Villous adenoma of the large intestine* | *MyPathologyReport.ca* [online]. 8. duben 2024 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.mypathologyreport.ca/diagnosis-library/villous-adenoma-colon/>
- [16] WASSERMAN JASON MD PHD FRCPC. *Tubulovillous adenoma of the large intestine* | *MyPathologyReport.ca* [online]. 9. duben 2024 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.mypathologyreport.ca/diagnosis-library/tubulovillous-adenoma-colon/>
- [17] POVÝŠIL CTIBOR a ŠTEINER IVO. *Speciální patologie. 2., dopl. a přeprac. vyd.*. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-494-2.
- [18] HAMILTON STANLEY R. a AALTONEN LAURI A. *Digestive system tumours: . 5th edition*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2019. ISBN 978-92-832-4499-8.
- [19] IHNÁT PETER. *Karcinom rektá: od diagnózy po multidisciplinární léčbu*. Praha: Grada, 2021. ISBN 978-80-271-3219-5.
- [20] ZAVORAL MIROSLAV, VOJTĚCHOVÁ GABRIELA a SUCHÁNEK ŠTĚPÁN. Klasifikace kolorektálního karcinomu. *Onkologie 7(4)* [online]. 2013, 172–175 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2013/04/03.pdf>
- [21] ŠTĚPÁNKOVÁ HELENA, KŘEPELOVÁ ANNA a FORETOVÁ LENKA. Hereditární nepolypózní karcinom tlustého střeva (HNPCC, Lynchův syndrom) » *Linkos.cz. Konference: 2011 XVIII. Jihočeské onkologické dny* [online]. 2011 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/hereditarni-nepolypozni-karcinom-tlusteho-streva-hnpcc-lynchuv-syndrom/>
- [22] HORVAT, Matej a Borut STABUC. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Radiology and Oncology* [online]. 2011, **45**(2). ISSN 1581-3207. Dostupné z: [doi:10.2478/v10019-011-0005-8](https://doi.org/10.2478/v10019-011-0005-8)
- [23] BOUBLÍKOVÁ LUDMILA. Mikrosatelitová nestabilita (MSI) a mutace genů RAS u kolorektálního karcinomu. *proLékaře.cz* [online]. 30. leden 2019 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/tema/precizni-medicina/detail/mikrosatelitova-destabilita-msi-a-mutace-genu-ras-u-kolorektalniho-karcinomu-107273>
- [24] BENEDÍKOVÁ ANDREA, SROVNAL JOSEF, VYSLOUŽIL KAMIL, SKALICKÝ PAVEL, CWIERTKA KAREL, RŮŽKOVÁ VĚRA, RADOVÁ LENKA a HAJDÚCH MARIÁN. Význam mikrosatelitní instability u pacientů s kolorektálním karcinomem. *XXXIV. Brněnské onkologické dny a XXIV. Konference pro sestry a laboranty* [online]. 2010 [vid. 2024-11-03]. Dostupné

z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/vyznam-mikrosatelitni-instability-u-pacientu-s-kolorektalnim-karcinomem/>

- [25] HADRAVSKÝ LADISLAV, DAUM ONDŘEJ a MICHAL MICHAL. Etiologie: DNA MMR proteiny. *Lynchův syndrom* [online]. 2. květen 2017 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.lynch.cz/etiologie.php>
- [26] ISMAEL, Nour El Hoda S., Samar A. EL SHEIKH, Suzan M. TALAAT a Eman M. SALEM. Mismatch Repair Proteins and Microsatellite Instability in Colorectal Carcinoma (MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2): Histopathological and Immunohistochemical Study. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences* [online]. 2017, 5(1), 9–13. ISSN 1857-9655. Dostupné z: [doi:10.3889/oamjms.2017.003](https://doi.org/10.3889/oamjms.2017.003)
- [27] DAUM ONDŘEJ, BENEŠ ZDENĚK, HADRAVSKÝ LADISLAV, STEHLÍK JAN, ČERNÁ KATEŘINA, DUŠEK MARTIN, KOKOŠKOVÁ BOHUSLAVA a MICHAL MICHAL. Lynchův syndrom v rukách patologa. *Česko-Slovenská Patologie* 50(1) [online]. 2014, 18–24 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.lynch.cz/doc/Daum.pdf>
- [28] WILLIAMS, Madeleine H., Andreas V. HADJINICOLAOU, Benjamin C NORTON, Rawen KADER a Laurence B. LOVAT. Lynch syndrome: from detection to treatment. *Frontiers in Oncology* [online]. 2023, 13, 1166238 [vid. 2024-11-03]. ISSN 2234943X. Dostupné z: [doi:10.3389/FONC.2023.1166238/BIBTEX](https://doi.org/10.3389/FONC.2023.1166238/BIBTEX)
- [29] URBAN, Teodor, Petra POKORNÁ a Ondřej SLABÝ. Significance of aberrant DNA methylation for cancer diagnostics and therapy. *Klinická onkologie* [online]. 2024, 37(2). ISSN 0862495X. Dostupné z: [doi:10.48095/ccko202488](https://doi.org/10.48095/ccko202488)
- [30] ÚSTAV ZDRAVOTNICKÝCH INFORMACÍ A STATISTIKY ČR. *Rakovina tlustého střeva a konečníku: diagnóza* [online]. 17. srpen 2022 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1309-rakovina-tlusteho-streva-a-konecniku-diagnoza>
- [31] ZÁDOROVÁ ZDENA. Kolonoskopie. Doporučený postup endoskopického vyšetření tlustého střeva. *Gastroent Hepatol 2013; XX–XX (Guidelines)* [online]. 2013 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.cgs-cls.cz/wp-content/uploads/2015/04/guidelines-endoskopicke-vysetreni-tlusteho-streva.pdf>
- [32] HASSAN C ET AL. Příprava střeva před kolonoskopií - guideline Evropské společnosti gastrointestinální endoskopie (ESGE). *Endoskopická sekce České gastroenterologické společnosti* [online]. 21. duben 2014 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.endoskopiste.cz/wp-content/uploads/2016/06/esge-guideline-priprava-streva-pred-kolonoskopii.pdf>

- [33] HADRAVSKÝ LADISLAV, DAUM ONDŘEJ a MICHAL MICHAL. Diagnostika. *Lynchův syndrom* [online]. 2. květen 2017 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.lynch.cz/diagnostika.php>
- [34] BROGYUK NAGYIJA, GREGA TOMÁŠ, ZAVORAL MIROSLAV a SUCHÁNEK ŠTĚPÁN. Novinky v endoskopické terapii kolorektální neoplázie. *Medicína po promoci* [online]. 2019, **20**(3), 210–214 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.tribune.cz/archiv/novinky-v-endoskopicke-terapii-kolorektalni-neoplazie/?articleNavigation=1&titleVolumeContent=1>
- [35] GUPTA, Samir, David LIEBERMAN, Joseph C. ANDERSON, Carol A. BURKE, Jason A. DOMINITZ, Tonya KALTENBACH, Douglas J. ROBERTSON, Aasma SHAUKAT, Sapna SYNGAL a Douglas K. REX. Recommendations for Follow-Up after Colonoscopy and Polypectomy: A Consensus Update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *American Journal of Gastroenterology* [online]. 2020, **115**(3), 415–434 [vid. 2024-11-03]. ISSN 15720241. Dostupné z: doi:10.14309/AJG.0000000000000544
- [36] SEITZ UWE, BOHNACKER SABINE a BINMOELLER KENNETH F. Endoscopic removal of large colon polyps. *UpToDate®* [online]. 18. duben 2024 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: https://www.uptodate-com.ezproxy.is.cuni.cz/contents/endoscopic-removal-of-large-colon-polyps/print?sectionName=PATIENT%20SELECTION&search=colorectal%20carcinom&topicRef=2496&anchor=H2&source=see_link
- [37] ČESKÁ GASTROENTEROLOGICKÁ SPOLEČNOST. Kolorektální karcinom: screening, diagnostika, léčba - Směrnice (guidelines) efektivní léčebně preventivní péče. . *Gastroenterologie a hepatologie, 2013; 67*. 2013.
- [38] *Rakovina tlustého střeva a konečníku: léčba* [online]. 6. březen 2022 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.nzip.cz/clanek/1310-rakovina-tlusteho-streva-a-konecniku-lecba>
- [39] PETRUŽELKA LUBOŠ a GEORGIEV P. Přínos neoadjuvantní a adjuvantní léčby v léčbě kolorektálního karcinomu. *Rozhledy chirurgie roč.91, čl* [online]. 2012, 53–58 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/rozhledy-v-chirurgii/2012-1/prinos-neoadjuvantni-a-adjuvantni-lecby-v-lecbe-kolorektalniho-karcinomu-41945>
- [40] VÍTEK PAVEL a DVOŘÁK JAN. Adjuvantní chemoterapie kolorektálního karcinomu – současné poznatky. *Remedia* [online]. 2012 [vid. 2024-11-03]. Dostupné z: <https://www.remmedia.cz/rubriky/prehledy-nazory-diskuse/adjuvantni-chemoterapie-kolorektalniho-karcinomu-soucasne-poznatky-4669/>
- [41] AOKI, Koji a TAKETO, Makoto M. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. Online. *Journal of Cell Science*. 2007, roč. 120,

č. 19, s. 3327-3335. ISSN 1477 9137.

Dostupné z: <https://doi.org/10.1242/jcs.03485>. [cit. 2025-02-28].

- [42] NIELSEN, Maartje; MORREAU, Hans; VASEN, Hans F.A. a HES, Frederik J. MUTYH-associated polyposis (MAP). Online. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2011, roč. 79, č. 1, s. 1-16. ISSN 10408428. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.05.011>. [cit. 2025-02-28].
- [43] Shilpa Grover, MD, MPH, AGAF, and MD, MPH Elena Stoffel. 2024. "MUTYH-Associated Polyposis." UpToDate®. September 16, 2024.
- [44] PLEVOVÁ, Pavlína. An Update on Inherited Colon Cancer and Gastrointestinal Polyposis. Online. *Klinická Onkologie*. 2019, roč. 32, č. Suppl 2. ISSN 0862495X. Dostupné z: <https://doi.org/10.14735/amko2019S97>. [cit. 2025-02-28].
- [45] "VENTANA MMR RxDx Panel (CE IVD)." Březen 10, 2025. Roche Diagnostics. Online. Dostupné z: <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/tests/ventana-mmr-rxdx-panel-ce-ivd.html>. [cit. 2025-03-10]
- [46] ROCHE. *VENTANA MMR IHC Panel Interpretation Guide for Staining of Colorectal Tissue*. Online. 2019. Dostupné z: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/a83fa2df-3236-ea11-fa90-005056a772fd?countryIsoCode=cz>. [cit. 2025-03-10].
- [47] ROCHE. *OptiView DAB IHC Detection Kit*. Online. ROCHE. Roche Diagnostics. 2024. Dostupné z: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/api/downloads/a83fa2df-3236-ea11-fa90-005056a772fd?countryIsoCode=cz>. [cit. 2025-03-10].
- [48] ROCHE. *OptiView Amplification Kit*. Online. ROCHE. Roche Diagnostics. 2024. Dostupné z: <https://elabdoc-prod.roche.com/eLD/web/cz/cs/products/RTD001076?searchTerm=OptiView%20DAB%20IHC%20Detection%20Kit&catalog=ProductCatalog&orderBy=Relevance&fromResults=true>. [cit. 2025-03-10].
- [49] STRÍTECKÁ, Dana a JEŘÁBKOVÁ, Lucie. *Základní imunohistochemické metody*. Vydání: první. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2018. ISBN 978-80-7013-595-2.
- [50] Lukáš, M., Vítková, I., Bortlík, M. AND Kohoutová, M. Idiopatické střevní záněty a kolorektální karcinom. *Interní Med.*, 2005, vol. 7, iss. 5, p. 250-254.
- [51] "Význam Molekulárního Testování u Karcinomu Kolorekta - PROFI Medicína." n.d. Accessed March 23, 2025. <https://profimedicina.cz/vyznam-molekularniho-testovani-u-karcinomu-kolorekta/>.
- [52] "MSI Analysis System Version 1.2 Protocol." n.d. Accessed March 23, 2025. https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/msi-analysis-system-version-12-protocol/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw4cS-

BhDGARIsABg4_J1IbDHX0bJx_yAmZ2yechniWJwH4eIa4HEL83QFt4xICQA
ZLTe-8p8aAlpREALw_wcB.

- [53] “Rychlokurz Epigenetiky – 2. Část | Baria.” n.d. Accessed March 23, 2025. <https://www.baria.cz/rsc3189751-rychlokurz-epigenetiky-2-cast>.
- [54] “Celá Pravda o Real-Time PCR – 1. Část | Baria.” n.d. Accessed March 23, 2025. <https://www.baria.cz/rsc3191081-cela-pravda-o-real-time-pcr-1-cast>.
- [55] “Genmark - Simple Fast Accurate | GeneMAP™.” n.d. Accessed March 23, 2025. <https://www.genmark.com.tr/product/34/mlh1-methylation-analysis-kit>.
- [56] DUNLOP, M. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. Online. *Human Molecular Genetics*. 1997, roč. 6, č. 1, s. 105-110. ISSN 14602083. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/hmg/6.1.105>. [cit. 2025-04-08].
- [57] MOREIRA, Leticia; MUÑOZ, Jenifer; CUATRECASAS, Míriam; QUINTANILLA, Isabel; LEOZ, Maria Liz et al. Prevalence of somatic mutl homolog 1 promoter hypermethylation in Lynch syndrome colorectal cancer. Online. *Cancer*. 2015, roč. 121, č. 9, s. 1395-1404. ISSN 0008-543X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/cncr.29190>. [cit. 2025-04-08].
- [58] HAMPEL, Heather; FRANKEL, Wendy L.; MARTIN, Edward; ARNOLD, Mark; KHANDUJA, Karamjit et al. Screening for the Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer). Online. *New England Journal of Medicine*. 2005, roč. 352, č. 18, s. 1851-1860. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043146>. [cit. 2025-04-08].
- [59] DURHUUS, Jon Ambæk; THERKILDSEN, Christina; KALLEMOSE, Thomas a NILBERT, Mef. Colorectal cancer in adolescents and young adults with Lynch syndrome: a Danish register-based study. Online. *BMJ Open*. 2021, roč. 11, č. 12. ISSN 2044-6055. Dostupné z: <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-053538>. [cit. 2025-04-08].
- [60] BERNSTEDT, Sophie Walton; BJÖRK, Jan; FRITZELL, Kaisa; SPIGELMAN, Allan D.; BJÖRCK, Erik et al. Room for improvement: One third of Lynch syndrome patients presenting for genetic testing in a highly specialised centre in Stockholm already have cancer. Online. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 2021, roč. 19, č. 1. ISSN 1897-4287. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13053-021-00171-4>. [cit. 2025-04-08].
- [61] BOLAND, C. Richard a GOEL, Ajay. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. Online. *Gastroenterology*. 2010, roč. 138, č. 6, s. 2073-2087.e3. ISSN 00165085. Dostupné z: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>. [cit. 2025-04-10].

- [62] YAMADA, Atsushi; MATSUOKA, Yui; MINAMIGUCHI, Sachiko; YAMAMOTO, Yoshihiro ; KONDO, Tomohiro a kol. Reálný výsledek univerzálního screeningu Lynchova syndromu u japonských pacientů s kolorektálním karcinomem zdůrazňuje význam cílení na pacienty s onemocněním v mladém věku. Online. *Molekulární a klinická onkologie* . 2021, roč. 15, č. 6. ISSN 2049-9450. Dostupné z: <https://doi.org/10.3892/mco.2021.2409> . [cit. 2025-04-10].
- [63] BARTLEY, Angela N.; MILLS, Anne M.; KONNICK, Eric; OVERMAN, Michael; VENTURA, Christina B. et al. Mismatch Repair and Microsatellite Instability Testing for Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: Guideline From the College of American Pathologists in Collaboration With the Association for Molecular Pathology and Fight Colorectal Cancer. Online. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2022, roč. 146, č. 10, s. 1194-1210. ISSN 1543-2165. Dostupné z: <https://doi.org/10.5858/arpa.2021-0632-CP>. [cit. 2025-04-28].
- [64] SHANNON MCCALL, Jones, RICHARD, Brown; PERROTTA, Peter L.; BLOND, Barbara a LONG, Thomas (ed.). Biomarkers in Colorectal Cancer: BRAF Testing as a Follow Up to Microsatellite Instability in the Exclusion of Lynch Syndrome: Version: 3.0. Online. In: © 2023 *College of American Pathologists (CAP)*. September 2018. Dostupné z: https://documents.cap.org/documents/BRAF_FullModule.pdf. [cit. 2025-04-28].

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Incidence kolorektálního karcinomu v EU 2022	16
Obrázek 2 Mortalita kolorektálního karcinomu v EU 2022.....	17
Obrázek 3 Incidence a mortalita pro muže a ženy	17
Obrázek 4 Metastáze karcinomu v lymfatické uzlině, zvětšení 40x	22
Obrázek 5 Imunohistochemické stanovení MLH1 u pacientů s LS, zvětšení 100x.....	24
Obrázek 6 Imunohistochemické stanovení MSH2 u pacientů s LS, zvětšení 100x	24
Obrázek 7 Imunohistochemické stanovení MSH6 u pacientů s LS, zvětšení 100x	25
Obrázek 8 Imunohistochemické stanovení PMS2 u pacientů s LS, zvětšení 100x.....	25
Obrázek 9 Imunohistochemické stanovení MSI, Biopsie č.9777, zvětšení 200x	28
Obrázek 10 Karcinom zachycený v bioptickém vzorku, zvětšení 40x	30
Obrázek 11 Barvení HE, Biopsie č. 9777, zvětšení 200x	35
Obrázek 12 Základní a speciální histologické barvení, zvětšení 100x.....	36
Obrázek 13 Imunohistochemické stanovení MSI, Biopsie č. 20443, zvětšení 200x	37

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Pařížská klasifikace povrchových lézí.....	18
Tabulka 2 TNM klasifikace, Kategorie T (tumor).....	20
Tabulka 3 TNM klasifikace, Kategorie N (node).....	20
Tabulka 4 TNM klasifikace, Kategorie M (metastasis).....	21
Tabulka 5 Základní barvení - Hematoxylin-Eosin	34
Tabulka 6 Speciální barvení - PAS.....	35
Tabulka 7 Panel protilátek VENTANA MMR IHC	37
Tabulka 8 Panel OptiView DAB IHC	38
Tabulka 9 Panel OptiView Amplification Kit	39
Tabulka 10 Příprava PCR Master mixu pro 1 reakci.....	41
Tabulka 11 Program termocyklování	42
Tabulka 12 Denaturační program	42
Tabulka 13 Obsah MLH 1 Methylation Analysis Kit.....	43

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Počet žen a mužů v jednotlivých laboratořích.....	45
Graf 2 Věkové zastoupení - laboratoř č.1	46
Graf 3 Věkové zastoupení - laboratoř č.2	46
Graf 4 Srovnání počtu adenokarcinomů a mucinózních karcinomů.....	47
Graf 5 Porovnání výskytu ztráty exprese u jednotlivých genů.....	48
Graf 6 Závislost výskytu ztráty exprese na věku pacientů – Laboratoř č.1	49
Graf 7 Závislost výskytu ztráty exprese na věku pacientů – Laboratoř č.2.....	49
Graf 8 Vyšetření hypermetylace promotoru	50
Graf 9 Molekulárně genetické vyšetření MSI v laboratoři č.2	51
Graf 10 Závislost výskytu Lynchova syndromu na věku v laboratoři č.2.....	51

PŘÍLOHY

LABORATOŘ Č.1

A = adenokarcinom KMUC = karcinom mucinózní LS = Lynchův syndrom
 (-) = ztáta exprese genu (+) = zachovalá exprese genu

Č.blo	Pohlaví	Rok nar.	Věk	M1	MLH-1	MSH2	MSH6	PMS2	Hypermethylace	Závěr
40	M	1949	74	A	+	+	+	+		
717	M	1969	54	A	+	+	+	+		
920	Ž	1955	68	A	+	+	+	+		
921	M	1955	68	A	+	+	+	+		
1241	Ž	1947	76	A	+	+	+	+		
1499	Ž	1942	81	A	+	+	+	+		
1500	M	1942	81	A	+	+	+	+		
1871	Ž	1957	66	A	+	+	+	+		
2188	Ž	1960	63	A	+	+	+	+		
2846	M	1955	68	A	+	+	+	+		
3525	M	1946	77	A	+	+	+	+		
5627	Ž	1955	68	A	+	+	+	+		
5629	Ž	1949	74	A	+	+	+	+		
6049	M	1953	70	A	+	+	+	+		
6195	Ž	1943	80	A	+	+	+	+		
6648	M	1962	61	A	+	+	+	+		
6919	M	1944	79	A	+	+	+	+		
6921	M	1955	68	A	+	+	+	+		
7569	M	1970	53	A	+	+	+	+		
8226	M	1959	64	A	+	+	+	+		
8227	Ž	1937	86	A	+	+	+	+		
8397	Ž	1943	80	A	+	+	+	+		
8620	M	1959	64	A	+	+	+	+		
9077	M	1964	59	A	+	+	+	+		
9078	M	1967	56	A	+	+	+	+		
9079	M	1962	61	A	+	+	+	+		
9535	Ž	1956	67	A	+	+	+	+		
9536	Ž	1951	72	A	+	+	+	+		
9537	M	1946	77	A	+	+	+	+		
9777	Ž	1945	78	A	-	+	+	-	Neprovedeno	
10497	Ž	1948	75	A	+	+	+	+		
10498	M	1952	71	A	+	+	+	+		
10499	M	1947	76	A	+	+	+	+		
10500	M	1969	54	A	+	+	+	+		
10980	Ž	1961	62	A	+	+	+	+		
12595	M	1953	70	A	+	+	+	+		
12782	M	1992	31	A	+	+	+	+		
12988	M	1970	53	A	+	+	+	+		
14283	M	1951	72	A	+	+	+	+		
14284	M	1953	70	A	-	+	+	-	Neprovedeno	sporadický
14696	M	1953	70	A	+	+	+	+		
15130	Ž	1945	78	A	+	+	+	+		
15131	Ž	1960	63	A	+	+	+	+		

15926	M	1953	70	A	+	+	+	+		
16527	M	1977	46	A	+	+	+	+		
16684	M	1955	68	A	+	+	+	+		
16686	M	1948	75	A	+	+	+	+		
17093	M	1968	55	A	+	+	+	+		
17331	Ž	1957	66	A	+	+	+	+		
17786	M	1960	63	A	+	+	+	+		
18192	M	1978	45	A	+	+	+	+		
19998	M	1949	74	A	+	+	+	+		
19999	Ž	1953	70	A	+	+	+	+		
20198	M	1942	81	A	+	+	+	+		
20199	M	1960	63	A	+	+	+	+		
20440	Ž	1978	45	A	+	+	+	+		
20442	Ž	1962	61	A	+	+	+	+		
20443	M	1948	75	A	-	+	+	-	MLH1	sporadický
20627	Ž	1954	69	A	-	+	-	-	MLH1	sporadický
21008	Ž	1966	57	KMUC	+	+	+	+		
21482	M	1956	67	A	+	+	+	+		
21717	Ž	1958	65	A	+	+	+	+		
21720	Ž	1972	51	A	+	+	+	+		
22496	M	1968	55	A	+	+	+	+		
22500	Ž	1951	72	A	+	+	+	+		
23145	M	1951	72	A	+	+	+	+		
23146	M	1942	81	A	+	+	+	+		
23402	M	1949	74	A	+	+	+	+		
23912	Ž	1962	61	A	+	+	+	+		
23913	M	1944	79	A	+	+	+	+		
23914	M	1959	64	A	+	+	+	+		
24187	M	1950	73	A	+	+	+	+		
24476	Ž	1952	71	A		+	+	+		
24477	Ž	1958	65	A	-	+	+	-	MLH1	sporadický
24537	M	1961	62	A	+	+	+	+		
24899	M	1960	63	A	+	+	+	+		
24970	Ž	1953	70	A	-	+	+	+	MLH1	sporadický
25150	M	1950	73	A	+	+	+	+		
25300	Ž	1943	80	A	+	+	+	+		
25302	Ž	1953	70	A	+	+	+	+		
25306	M	1974	49	A	+	+	+	+		
25307	Ž	1955	68	A	+	+	+	+		
25308	M	1948	75	A	+	+	+	+		
25648	Ž	1964	59	KMUC	+	+	+	+		
25649	M	1955	68	A	+	+	+	+		
25650	M	1950	73	A	-	+	+	-	MLH1	sporadický
25805	M	1971	52	A	+	+	+	+		
25806	M	1948	75	KMUC	+	+	+	+		
25808	M	1948	75	KMUC	+	+	+	+		
25935	M	1945	78	A	+	+	+	+		

25942	M	1960	63	A	+	+	+	+		
26349	M	1952	71	A	+	+	+	+		
26350	Ž	1955	68	A	+	+	+	+		
26546	Ž	1953	70	A	-	+	+	-	MLH1	sporadický
27058	Ž	1954	69	A	+	+	+	+		
27062	Ž	1953	70	A	+	+	+	+		
27219	M	1948	75	A	+	+	+	+		
27294	M	1951	72	A	+	+	+	+		
27579	M	1955	68	KMUC	+	+	+	+		
27915	M	1955	68	A	+	+	+	+		
28183	M	1968	55	A	+	+	+	+		
28269	M	1973	50	A	+	+	+	+		
28796	M	1948	75	A	+	+	+	+		
29199	M	1955	68	A	+	+	+	+		
29205	Ž	1949	74	A	+	+	+	+		
29206	M	1953	70	A	+	+	+	+		
29374	M	1942	81	A	+	+	+	+		
29571	Ž	1959	64	A	+	+	+	+		
29689	M	1953	70	A	+	+	+	+		
29693	M	1953	70	A	+	+	+	+		
29694	M	1944	79	A	+	+	+	+		
29695	Ž	1964	59	A	+	+	+	+		
29696	M	1962	61	A	+	+	+	+		
29900	Ž	1944	79	A	+	+	+	+		
29901	M	1964	59	KMUC	+	+	+	+		
29985	Ž	1977	46	A	+	+	+	+		
30444	M	1941	82	A	+	+	+	+		
30445	Ž	1950	73	A	+	+	+	+		
30544	Ž	1948	75	A	-	+	+	+	MLH1	sporadický
30545	M	1949	74	A	+	+	+	+		
30546	M	1945	78	A	+	+	+	+		
30671	M	1956	67	A	+	+	+	+		
30881	Ž	1951	72	A	+	+	+	+		
30885	M	1954	69	A	+	+	+	+		
30971	Ž	1954	69	A	+	+	+	+		
31097	Ž	1953	70	A	+	+	+	+		
31307	Ž	1945	78	A	-	+	+	+	MLH1	sporadický
31925	M	1973	50	A	+	+	+	+		
31926	M	1947	76	A	+	+	+	+		
32221	M	1952	71	A	+	+	+	+		
32557	M	1961	62	A	+	+	+	+		
32771	M	1955	68	A	+	+	+	+		
32772	M	1950	73	A	+	+	+	+		
32773	M	1969	54	A	+	+	+	+		
32774	M	1960	63	A	+	+	+	+		
33313	Ž	1949	74	A	+	+	+	+		
33314	M	1964	59	A	+	+	+	+		

33316	Ž	1955	68	A	+	+	+	+		
34036	Ž	1957	66	A	+	+	+	+		
34224	M	1974	49	A	+	+	+	+		
34625	Ž	1965	58	A	+	+	+	+		
34792	Ž	1963	60	A	+	+	+	+		
34793	M	1950	73	A	+	+	+	+		
35637	Ž	1945	78	A	+	+	+	+		
35638	M	1948	75	A	-	+	+	+	MLH1	sporadický
35784	Ž	1993	30	A	+	+	+	+		
35785	M	1952	71	A	+	+	+	+		
35944	M	1961	62	A	-	+	+	-	MLH1	sporadický
36251	Ž	1953	70	A	+	+	+	+		
36252	M	1947	76	A	+	+	+	+		
36253	M	1972	51	A	+	+	+	+		
36437	M	1964	59	A	+	+	+	+		
36438	M	1948	75	A	+	+	+	+		
37008	M	1951	72	A	+	+	+	+		
37245	M	1974	49	A	+	+	+	+		
37272	M	1947	76	A	+	+	+	+		
37663	Ž	1951	72	A	+	+	+	+		
38121	Ž	1939	84	A	+	+	+	+		
38122	M	1969	54	A	+	+	+	+		
38387	M	1962	61	A	+	+	+	+		
38677	Ž	1954	69	A	+	+	+	+		
38857	M	1971	52	A	+	+	+	+		
38961	Ž	1945	78	A	-	+	+	+	MLH1	sporadický
38963	Ž	1950	73	A	+	+	+	+		
39262	M	1950	73	A	+	+	+	+		
39263	Ž	1940	83	A	-	+	+	+	MLH1	sporadický
39939	Ž	1953	70	A	+	+	+	+		
39940	Ž	1956	67	A	+	+	+	+		
40139	Ž	1945	78	A	+	+	+	+		
40302	M	1970	53	A	+	+	+	+		
40809	M	1954	69	A	+	+	+	+		
40811	M	1956	67	A	+	+	+	+		
40931	Ž	1967	56	A	+	+	+	+		
40932	Ž	1954	69	A	+	+	+	+		
40933	M	1947	76	A	+	+	+	+		
41104	Ž	1947	76	A	+	+	+	+		
41105	Ž	1947	76	A	+	+	+	+		
41764	M	1941	82	A	-	+	+	-	MLH1	sporadický
42673	Ž	1956	67	A	+	+	+	+		
42675	Ž	1975	48	A	+	+	+	+		
43165	M	1951	72	A	+	+	+	+		
43734	M	1944	79	A	+	+	+	+		
43940	M	1947	76	A	+	+	+	+		
44112	Ž	1968	55	A	+	+	+	+		

44113	M	1949	74	A	+	+	+	+
44116	M	1945	78	A	+	+	+	+

LABORATOŘ Č.2

A = adenokarcinom KMUC = karcinom mucinózní LS = Lynchův syndrom
 (-) = ztáta exprese genu (+) = zachovalá exprese genu

Č.blo	Pohlaví	Rok nar.	Věk	M1	MLH-1	MSH2	MSH6	PMS2	Hypermethylace	MSI dle PCR
116	M	1986	37	A	+	+	+	+		
198	M	1962	61	KMUC	+	+	+	+		
370	M	1963	60	A	+	+	+	+		
544	Ž	1972	51	A	+	+	+	+		
572	M	1971	52	A	+	+	+	+		
639	Ž	1975	48	A	-	+	+	-	ne	sporadický
1115	Ž	1935	88	A	-	+	+	-	MLH1	sporadický
1342	Ž	1993	30	A	+	+	+	+		
1484	M	1972	51	A	+	+	+	+		
1933	M	1955	68	A	+	+	+	+		
2044	M	1964	59	A	+	+	+	+		
2326	M	1947	76	A	+	+	+	+		
2498	Ž	1971	52	KMUC	+	+	+	+		
2871	M	1948	75	A	+	+	+	+		
2961	Ž	1969	54	A	+	+	+	+		
3155	Ž	1951	72	A	+	+	+	+		
3323	Ž	1956	67	A	-	+	+	-	MLH1 v 30-60%	sporadický
3420	Ž	1949	74	A	+	+	+	+		
4189	M	1944	79	A	+	+	+	+		
4243	Ž	1947	76	A	+	+	+	+		
4671	Ž	1967	56	KMUC	+	-	+	-	ne	LS
4675	Ž	1946	77	A	+	+	+	+		
5413	M	1945	78	A	+	+	+	+		
5417	Ž	1954	69	A	+	+	+	+		
5591	Ž	1948	75	A	+	+	+	+		
5751	Ž	1951	72	A	+	+	+	+		
5924	M	1969	54	KMUC	+	+	+	+		
6072	M	1939	84	A	-	-	+	-	MLH1 v 30-90%	sporadický
6441	M	1951	72	A	+	+	+	+		
6825	M	1966	57	A	+	+	+	+		
6920	Ž	1946	77	A	+	+	+	+		
7040	M	1960	63	A	+	+	+	+		
7419	Ž	1941	82	A	-	+	+	-	MLH1 v 10-30%	LS
7711	M	1962	61	A	+	+	+	+		
7943	M	1950	73	A	+	+	+	+		
7946	M	1948	75	A	+	+	+	+		
8169	M	1944	79	A	+	+	+	+		
8173	M	1955	68	A	+	+	+	+		
8176	Ž	1948	75	A	+	+	+	+		
8522	Ž	1946	77	A	+	+	+	+		
8796	Ž	1969	54	A	+	+	+	+		
8878	M	1966	57	A	+	+	+	+		

9048	M	1976	47	A	+	+	+	+		
9383	M	1945	78	A	+	+	+	+		
9681	M	1948	75	A	-	+	+	-	ne	LS
9896	M	1953	70	A	+	slabá	+	slabá	ne	LS
10065	M	1948	75	A	+	+	+	+		
10068	M	1944	79	A	+	+	+	+		
10698	Ž	1959	64	A	+	+	+	+		
10803	Ž	1991	32	A	+	+	+	+		
11405	Ž	1949	74	A	+	+	+	+		
11523	Ž	1962	61	A	+	+	+	+		
11604	Ž	1989	34	A	-	+	+	+		
11881	Ž	1966	57	A	+	+	+	+		
11954	Ž	1949	74	A	-	+	+	-	MLH1 10-20%	LS
12077	Ž	1945	78	A	+	+	+	+		
12219	Ž	1971	52	A	-	+	+	+	neprovedeno	sporadický
12418	M	1955	68	A	+	+	+	+		
13066	Ž	1940	83	A	+	+	+	+		
13073	Ž	1946	77	A	-	+	+	-	MLH1 15-25%	LS
13209	Ž	1946	77	A	+	+	+	+	neprovedeno	sporadický
13212	M	1964	59	A	+	+	+	+		
13317	Ž	1965	58	A	-	+	+	+	ne	sporadický
13342	Ž	1965	58	A	+	+	+	+		
13396	Ž	1940	83	A	+	+	+	+		
13400	M	1947	76	A	-	+	+	-	MLH1 30-40%	LS
14033	M	1950	73	A	+	+	+	+		
14052	Ž	1943	80	A	+	+	+	+		
14247	M	1966	57	A	-	+	+	-		nekvální vz
14390	M	1967	56	A	+	+	+	+		
14842	M	1963	60	A	+	+	+	+		sporadický
15272	M	1973	50	A	+	+	+	+		
15565	Ž	1980	43	A	+	+	+	+		sporadický
15701	M	1947	76	A	+	+	+	+		
15704	Ž	1951	72	A	+	+	+	+		
15708	M	1950	73	A	+	+	+	+		
16290	M	1968	55	A	+	+	+	+		
16293	Ž	1947	76	A	+	+	+	+		
16459	M	1951	72	A	+	+	+	+		sporadický
16889	M	1958	65	A	+	+	+	+		
16892	Ž	1961	62	A	+	+	+	+		
17043	M	1958	65	A	+	+	+	+		
17274	Ž	1979	44	A	+	+	+	+		
17450	M	1956	67	A	+	+	+	+		
17547	Ž	1942	81	A	+	+	+	-	MLH1 15-30%	LS
17551	M	1947	76	A	+	+	+	+		
17713	Ž	1948	75	A	+	+	+	+		
18441	Ž	1955	68	A	+	+	+	+		
18536	M	1965	58	A	+	+	+	+		

18608	M	1935	88	A	+	+	+	+
18611	M	1977	46	A	+	+	+	+
18708	Ž	1960	63	A	+	+	+	+
18906	Ž	1946	77	A	+	+	+	+
19155	Ž	1942	81	A	+	+	+	+
19415	Ž	1953	70	A	+	+	+	+
19420	Ž	1973	50	A	+	+	+	+
19521	Ž	1956	67	A	+	+	+	+
19610	M	1968	55	A	+	+	+	+
19885	M	1944	79	A	+	+	+	+
19893	M	1980	43	A	+	+	+	+
20310	M	1939	84	A	+	+	+	+
20450	M	1941	82	A	+	+	+	+
20524	Ž	1952	71	A	+	+	+	+
20654	M	1942	81	A	+	+	+	+
20814	Ž	1952	71	KMUC	+	+	+	+
20899	Ž	1954	69	A	+	+	+	+
21029	M	1952	71	A	+	+	+	+