

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni

Šiklův patologicko anatomický ústav



Korelace morfologických a molekulárně genetických vlastností vybraných nádorů

Radek Šíma

Doktorská dizertační práce

Plzeň 2010

Obor: patologie

Školitel: Prof. MUDr. Alena Skálová, CSc.

Předmluva

Doktorská dizertační práce je shrnutím autorovy publikační činnosti v oblasti molekulární biologie nádorů a jiných onemocnění. Spis je členěn do tří částí.

První část se zabývá výskytem mutací genu CYLD u pacientů s Brooke Spieglerovým syndromem. Práce reviduje všechny doposud publikované mutace genu CYLD. Experimentální část projektu byla zaměřena na identifikaci nových zárodečných mutací genu CYLD. Dále byly studovány mnohočetné neoplázie pacientů s Brooke Spieglerovým syndromem s cílem odhalit sekundární genetické události vedoucí k tvorbě neoplázií.

Druhá část dizertační práce je věnována popisu nové jednotky nádoru slinných žlaz, tzv. sekrečního karcinomu slinných žlaz analogického karcinomu prsu, kde molekulárně biologické techniky významně přispěly k odlišení této nádorové jednotky od jakýchkoliv doposud známých nádorů slinných žlaz.

Třetí oddíl představuje souhrn dalších autorových publikací souvisejících s tématem dizertační práce. Tato část demonstruje uplatnění molekulárně biologických metod ve všech oblastech moderní patologie i dalších odvětvích medicíny.

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval své školitelce Prof. MUDr. Aleně Skálové, CSc. za odborné vedení a cenné připomínky při vypracování této dizertační práce. Dále bych chtěl poděkovat všem kolegyním a kolegům ze Šiklova patologicko anatomického ústavu za možnost podílet se na řešení zajímavých výzkumných projektů. Bez nich by tato práce nikdy nemohla vzniknout.

Prohlášení autora

Autor dizertační práce "**Korelace morfologických a molekulárně genetických vlastností vybraných nádorů**" souhlasí s jejím půjčováním dle zavedených pravidel.

V Plzni 15.3.2010

Radek Šíma

Obsah

1. Brooke-Spieglerův syndrom: Popis nových zárodečných mutací genu CYLD...	4
1.1. Úvod.....	4
1.1.1. Gen CYLD a jeho produkt.....	4
1.1.2. CYLD - negativní regulátor NF- κ B a JNK signálních drah.....	4
1.1.3. Role genu CYLD v tumorigenezi.....	5
1.1.4. Asociace genu CYLD s lidskými genetickými onemocněními.....	6
1.2. Cíle práce.....	7
1.3. Materiál a metody.....	8
1.3.1. Detekce zárodečných mutací.....	8
1.3.2. Detekce sekundárních somatických změn.....	8
1.4. Výsledky.....	12
1.4.1. Klinickopatologická data.....	12
1.4.2. Molekulárně biologická data.....	12
1.5. Diskuze.....	17
1.6. Závěr.....	19
1.7. Seznam použité literatury.....	19
2. Sekreční karcinom slinných žláz analogický karcinomu prsu nesoucí fúzní gen ETV6-NTRK3.....	24
2.1. Úvod.....	24
2.2. Cíle práce.....	25
2.3. Materiál a metody.....	26
2.3.1. Histochemie a imunohistochemie.....	26
2.3.2. Molekulární genetika.....	28
2.3.2.1. RT-PCR.....	28
2.3.2.2. FISH.....	28
2.3.2.3. Interpretace FISH.....	29
2.4. Výsledky.....	30
2.4.1. Klinická data a <i>follow up</i>	30
2.4.2. Histopatologické a imunohistochemické nálezy.....	32
2.4.3. Molekulárně genetické nálezy.....	36
2.5. Diskuze.....	38
2.6. Závěr.....	41
2.7. Literatura.....	42
3. Příloha - Souhrn dalších publikací autora dizertační práce.....	45

1. Brooke-Spieglerův syndrom: Popis nových zárodečných mutací genu CYLD u 10 pacientů z 8 rodin

1.1. Úvod

1.1.1. Gen CYLD a jeho produkt

Gen CYLD kóduje evolučně konzervovaný protein o velikosti 120 kDa (956 aminokyselin), který patří do proteinové rodiny DUB. Stejně jako další členové této rodiny enzymů nese protein CYLD na svém C-konci katalytickou doménu složenou ze dvou konzervovaných subdomén obsahujících aktivní cystein a aktivní histidin, které tvoří katalytickou kapsu. Protein CYLD dále obsahuje tři CAP-Gly motivy, u kterých se předpokládá, že se podílejí na vazbě k mikrotubulům (1). Přesto zůstává nejisté, zda protein CYLD interaguje s mikrotubuly přímo. Většina mutací nalézáných u genu CYLD patří do skupiny posunových, nebo nonsense mutací, které vedou ke zkrácení proteinu a vyřazení katalytické domény z funkce (2, 3). U genu CYLD bylo popsáno pouze malé množství missense mutací. Všechny, kromě jedné, postihují esenciální aminokyseliny v katalytické doméně.

1.1.2. CYLD – negativní regulátor NF- κ B a JNK signálních drah

NF- κ B signální kaskáda hraje klíčovou úlohu v přirozené a získané imunitě, zánětu a karcinogenezi. NF- κ B je transkripční faktor složený z několika podjednotek. Je lokalizovaný v cytoplasmě klidových buněk a je reprimovaný inhibítozem I κ B. Po stimulaci je I κ B fosforylován I κ B kinázou (IKK). Tato modifikace indukuje polyubiquitinaci I κ B a jeho degradaci v proteasomu, což umožní přesun NF- κ B do jádra, kde reguluje expresi svých cílových genů (4). Řada signálních drah indukovaných prozánětlivými cytokiny (IL-1 β , TNF- α), složkami vnější membrány bakterií (LPS, LPA), virovým genetickým materiálem a z něho odvozenými proteiny (dsRNA, latentní membránový protein 1 viru Epstein-Barrův) a různými typy stresových faktorů může aktivovat IKK (5). Kináza IKK se skládá ze tří velkých podjednotek. Podjednotky IKK-1/ α a IKK-2/ β mají katalytickou aktivitu a jsou si strukturně podobné, kdežto třetí podjednotka NEMO (NF- κ B Essentials modulátor)/IKK γ má regulační funkci. Podjednotka NEMO je ve většině případů absolutně nezbytná pro aktivaci IKK, ale je postradatelná pro určitou malou skupinu stimulů, které přímo ovlivňují IKK-1/ α prostřednictvím kinázy NIK (NF- κ B inducing kinase). (6).

Molekulární mechanismus NEMO dependentní aktivace IKK zůstával donedávna poměrně těžko pochopitelný. Nyní se zdá, že vyžaduje komplex polyubiquitinových modifikací, které však nevedou k degradaci v proteasomu. Klíčovými účastníky těchto procesů jsou členové proteinové rodiny TRAF (TNF receptor associated factor). Tyto proteiny mají ubiquitin ligázovou aktivitu (E3) a působí společně s Ubc13/Uev1a, což je dimerický, ubiquitin konjugující enzym (E2). Tento komplex modifikuje substráty pomocí K63 polyubiquitinace. Mezi substráty patří samotné proteiny z rodiny

TRAF, dále TAB2 (TAK1-binding protein 2) a TAB3 podjednotky IKK kinázy TAK (TGF- β activated kinase) a NEMO. TAB2, TAB3 a NEMO mají rovněž ve své struktuře ubiquitin vázající domény s afinitou ke K63 pospojovaným polyubiquitinovým řetězcům. Ubiquitinace obou TAK komponent a NEMO může tedy vyústit v aktivaci IKK (7).

Role proteinu CYLD v NF- κ B signalizační kaskádě byla objevena čtyřmi různými skupinami využívajícími tři různé strategie. První skupina Brummelkamp a kol. (8) použila shRNA knihovnu zasahující nejrůznější členy lidské proteinové rodiny DUB. Bylo prokázáno, že pouze shRNA specificky zasahující CYLD mRNA byly jedinými, které byly schopné signifikantně ovlivnit aktivaci NF- κ B signální dráhy pomocí TNF- α u HeLa buněk. V této studii vedla inhibice CYLD ke zvýšení signalizace dráhy NF- κ B. Další dvě skupiny Kovalenko a kol. (9) a Trompouki a kol. (10) použili tzv. *two hybrid* test k identifikaci nových proteinů interagujících s NEMO. Zjistili, že vazebnou afinitu k NEMO má právě protein CYLD. Interakce těchto dvou proteinů se účastní sekvence bohatá na prolin v N-terminální části NEMO a třetí CAP-Gly motiv proteinu CYLD. Čtvrtá skupina Regamey a kol. (11) hledala vazebné partnery proteinu CYLD a identifikovala TRIP (TRAF interacting protein), který byl již dříve popsán jako regulátor aktivace NF- κ B signální dráhy (12).

Ve všech těchto studiích bylo prokázáno, že overexprese CYLD negativně reguluje NF- κ B aktivaci po stimulaci nejrůznějšími faktory, mezi něž patří např. IL-1, TNF- α a LPS, ale ne NIK, což naznačuje, že tento protein z rodiny DUB nejspíše reprezentuje negativní regulátor NF- κ B signální dráhy.

1.1.3. Role genu CYLD v tumorigenezi

Byly publikovány dvě studie týkající se tumor supresorové funkce CYLD a tumorigeneze, které ukázaly, že inaktivace CYLD postihuje buněčnou proliferaci a transformaci. Pokud byly CYLD *knock-out* myši ošetřeny azoxymethanem/dextran sulfátem sodným (kombinace DNA alkylačního činidla a látky indukující zánět), byl pozorován chronický střevní zánět společně se zvýšenou tvorbou nádorů. U většiny myší se vyvinuly střevní adenokarcinomy, které byly i navzdory léčbě letální. Ačkoliv to nebylo prokázáno přímo, tato tumorigeneze může být důsledkem zvýšené NF- κ B aktivity (13).

V další studii byla zjišťována role genu CYLD v epidermis. Jejím cílem bylo získat informace o buněčných a molekulárních abnormalitách charakterizujících lidské patologie způsobené mutacemi genu CYLD. U CYLD *-/-* myší se neobjevily žádné abnormality epidermis, ani se u nich spontánně nevyvinuly žádné nádory. Ale pokud byla jejich kůže ošetřena 7,12-dimethylbenzanthracenem a 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetátem (látky iniciující vznik nádorů), vyvinuly se u nich kožní papilomy, které byly četnější a větší v porovnání s jejich výskytem u normálních (*wild type*) myší (14).

1.1.4. Asociace genu CYLD s lidskými genetickými onemocněními

Brooke-Spieglerův syndrom (BSS) (OMIM# 605041) je dědičné, autozomálně dominantní onemocnění charakterizované rozvojem mnohočetných adnexálních kožních neoplázií, jako jsou: spiradenomy, cylindromy, spiradenocylindromy a trichoepiteliomy (= kribriformní trichoblastomy podle poslední WHO klasifikace kožních nádorů). Penetrance onemocnění je vysoká, existují velké rozdíly v klinické prezentaci onemocnění mezi jednotlivými pacienty. Kožní léze se u pacientů začínají zpravidla objevovat v časně dospělosti a častěji se vyskytují u žen. Cylindromy se typicky vyskytují ve kštici a mohou narůst do obřích rozměrů (tzv. turbanový tumor). Mnohočetné trichoepiteliomy bývají převážně lokalizovány na obličeji (15-18).

Kromě kůže mohou morfologicky podobné neoplázie vznikat také ve slinných žlázách, nebo jiných orgánech, ale tyto jsou extrémně vzácné (19-23). Vzácně se mohou jinak benigní nádory u BSS maligně změnit (24, 25).

Familiální cylindromatóza (FC) (OMIM# 132700) je vzácné dědičné nádorové onemocnění, které je charakterizované tvorbou benigních nádorů nazývaných cylindromy na vlasatých/ochlupených částech těla, převážně na hlavě (16). Předpokládá se, že cylindromy vznikají transformací folikulo-sebaceózních apokrinních jednotek, které dávají vznik vlasům (chlupům) a s nimi asociovaným žlázám.

Dalším genetickým onemocněním, které sdílí podobnosti s familiální cylindromatózou, je mnohočetný familiální trichoepiteliom (MFT) (OMIM# 601606). MFT je rovněž způsoben mutacemi genu CYLD (26-30). Mutace genu CYLD nalézané u MFT se neliší od těch způsobujících cylindromatózu.

Je známo, že u některých pacientů s cylindromatózou se mohou rovněž vyskytovat trichoepiteliomy, benigní nádory vznikající z vlasových folikulů, a že postižení jedinci jedné rodiny mohou reprezentovat různé fenotypy se smíšenými typy nádorů (31).

1.2. Cíle práce

1. nalézt nové zárodečné mutace genu CYLD u pacientů s BSS
2. prostudovat různé (mnohočetné) neoplázie od stejných pacientů a identifikovat spektrum sekundárních genetických událostí vedoucích k tvorbě neoplázií
3. revidovat všechny publikované mutace genu CYLD u BSS a příbuzných onemocnění (mnohočetné familiální trichoepiteliomy)
4. korelovat genetický nález (typ mutace) s histologickým typem nádoru

1.3. Materiál a metody

1.3.1. Detekce zárodečných mutací

Do studie bylo zařazeno deset pacientů s BSS pocházejících z osmi rodin. Ze dvou rodin se podařilo získat po dvou pacientkách v příbuzenském vztahu matka-dcera. K identifikaci zárodečných mutací byla u všech případů dostupná buď periferní krev, nebo nenádorová tkáň.

Analýza zárodečných mutací genu CYLD byla provedena následovně. Genomová DNA z lymfocytů periferní krve, nebo z nenádorové tkáně byla naizolována pomocí NucleoSpin Tissue Kit (Macherey Nagel, Duren, Germany) přesně podle pokynů výrobce. Exony 1-20 genu CYLD byly amplifikovány pomocí PCR za použití primerů uvedených v Tabulce 1.1. Primery byly navrženy s využitím Primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)(34) a referenční sekvence (GenBank# NG_012061). Složení PCR reakce bylo následující: 12,5 µl HotStart Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Hilden, Germany), 10 pmol každého primeru, 100 ng templátové DNA. Reakční směs byla doplněna destilovanou vodou do objemu 25 µl. Amplifikační program se skládal z počáteční denaturace při 95°C po dobu 15 minut, následovalo 40 cyklů zahrnujících denaturaci při 95°C po dobu 1 minuty, annealing při teplotě uvedené v Tabulce 1.1 po dobu 1 minuty a syntézu při 72°C po dobu 1 minuty. Program byl zakončen finální inkubací při 72°C po dobu 7 minut.

Úspěšně amplifikované PCR produkty byly purifikovány pomocí Montage PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore, Billerica, USA). Přečištěné PCR produkty byly poté z obou stran osekvenovány pomocí Big Dye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) a analyzovány na automatickém genetickém analyzátoru ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) při konstantním napětí 13.2 kV po dobu 20 minut. Získané sekvence byly porovnány s databází GenBank.

1.3.2. Detekce sekundárních somatických změn

Dále bylo analyzováno 19 formalínem fixovaných, v parafínu zalitých vzorků nádorů získaných od 9 pacientů za účelem zjištění přítomnosti somatických mutací. Detekce mutací byla provedena stejným způsobem jak je uvedeno výše.

Zároveň byla u těchto vzorků provedena analýza ztrát heterozygotnosti (LOH) chromozomální oblasti 16q. LOH analýza byla provedena pomocí PCR a fragmentační analýzy. Z databáze UniSTS (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=unists>) byly vybrány STR markery D16S304, D16S308, D16S419, D16S476 a D16S541 lokalizované na chromozomovém raménku 16q a marker D16S407 lokalizovaný na chromozomovém raménku 16p. Sekvence příslušných primerů a jejich annealingové teploty jsou uvedeny v Tabulce 1.2. Podmínky a složení PCR reakce byly stejné jako u genu CYLD. Úspěšně amplifikované PCR produkty byly smíchány s Gene Scan-500LIZ Size Standard (Applied

Biosystems) a analyzovány na automatickém genetickém analyzátoru ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems).

Vzorek byl považován za LOH pozitivní, pokud byl poměr intenzity signálů dvou alel u vzorku nádorové tkáně dělený poměrem intenzity signálů dvou alel u vzorku zdravé tkáně >2 , nebo $<0,5$.

Všechny nalezené mutace (zárodečné i somatické), resp. LOH byly potvrzeny dvojitým opakováním zahrnujícím novou izolaci DNA, PCR a sekvenování, resp. LOH analýzu. Vyhodnocení sekvencí a výsledků LOH analýzy bylo provedeno pomocí softwaru Sequencing Analysis v. 5.2, GeneMapper v. 3.2 (Applied Biosystems) a BioEdit v 7.0.9.0 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

K vyloučení možnosti, že abnormality genu CYLD by mohli představovat polymorfismy (benigní mutace) spíše než mutace asociované se vznikem nádorů (maligní mutace), byly stejným způsobem otestovány vzorky DNA z periferní krve od 110 náhodně vybraných, zdravých, nepříbuzných jedinců.

U jednoho případu (Případ 5) (viz výsledky) byla provedena predikce vlivu mutace na funkci proteinu za použití PolyPhen software (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>).

Jeden případ (Případ 8) byl již dříve publikován, ovšem bez molekulárně biologických dat (35).

Za použití databáze PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) a křížových odkazů v jednotlivých článcích byly zrevidovány všechny publikace pojednávající o zárodečných a/nebo somatických mutacích genu CYLD u BSS. V případech, kde bylo podezření, že příslušná mutace byla zapsána nesprávně, byli kontaktováni korespondující autoři těchto článků (3, 31, 32, 33) se žádostí o vysvětlení. Pokud nebyla zaslána žádná odpověď (všechny případy s výjimkou Dr. Lianga a jeho článku (33)), byly do Obrázku 1.1 zahrnuty názvy těchto mutací v původní podobě, ale ke každé je připojen komentář.

Tabulka 1.1. Sekvence a annealingové teploty primerů použitých k analýze mutací genu CYLD

Exon ¹	Název primeru ²	Sekvence primeru 5'→3'	Teplota annealingu (°C)
exon 4	CYLD e4.1 CYLD e4.2A	TTCCTTCGGTACTTTAAGGAG TGCTTTTTCACTAGGCATTTTG	55
exon 4	CYLD e4.3 CYLD e4.4	TTTCATTTATCTCTACAACATCCTTTT CAGCGTTACAGACAAACAAACA	55
exon 4	CYLD e4.5 CYLD e4.6	GGGTCCTCTGAAGCGTACAA GCAACCTCATGCAGTTCTCTT	55
exon 4	CYLD e4.7 CYLD e4.8	CAGACACACATGAACACAAACAA AATAGACGTGGGCTGTCCTG	62
exon 5	CYLD e5.1 CYLD e5.2	TCGACCTGCATTGTGTCC CCCCTTTTCTATGGATCGT	55
exon 5	CYLD e5.3 CYLD e5.4	ATCACAAAGATATTTAATCCAAAA TGATGACACTGCATTGGAAA	52
exon 6	CYLD e6.1 CYLD e6.2	AAAAATAAAGTTTGCCTTATAAATG ACATTTTCATTGAGGAGGATT	50
exon 7	CYLD alt e6-7.1 CYLD alt e6-7.2	GCAGTGTGAAAAGTTCTTCC TCTTTTCCTTGTGTTTAAAATG	50
exon 8	CYLD e7.1 CYLD e7.2	GCAAGTTAGGCATTATGCAA TTCTATAAGAATTTGCCTTTATCTTT	50
exon 9	CYLD e8.1 CYLD e8.2	TCTGATGAGTTAGAAAAGAAAGGA TTAAATGAAACTTTTCTTGTTCC	50
exon 10	CYLD e9.1 CYLD e9.2	ATTGGGCATCTTGGTGAGAC GAGTCAATATCCTTGAATACATTTCTG	55
exon 10	CYLD e9.3 CYLD e9.4	AGCCAATGAGCCCACTTCTA GACCACCGAGAACAGATTCC	55
exon 10	CYLD e9.5 CYLD e9.6	GCGAAATCTGCACAAAACCT CATGCCTCCTGGGAACTC	62
exon 11	CYLD e10.1 CYLD e10.2	TTAAGTAAACAAAAAGCATCC ATGCATATTGAAGCATTTCT	52
exon 12	CYLD e11.1 CYLD e11.2N2	CTCCAAGCCTTCTTTTTCCA AACCAAAGCCTACTTTCCACTT	57
exon 12	CYLD e11.3 CYLD e11.4	CCTGCCTCATGGCACTATCT TTTTCAGCATTTGGAGGCTA	55
exon 13	CYLD e12.1 CYLD e12.2	CCATGTAAAGGCAAAATAGCAA TGAAAAATATGTTTACAGCATGAAGA	55
exon 14	CYLD e13.1 CYLD e13.2	TATGCTCTTCAGTTATTTTAAACG AAAAAGAAATATGTGATTAAGATGTG	52
exon 15	CYLD e14.1 CYLD e14.2	CATGTCTGTTGAATAATGGCAGT TGATTTAAAAATTTTGCCTGTGA	55

exon 16	CYLD e15.1 CYLD e15.2	TTTCACATAAAATACCACAGGTGA AAGCATTTGATAAATAGGTTGTATG	50
exon 17	CYLD e16.1N1 CYLD e16.2N1	ACCAACAAAACAACTAAAA CTTTGATTCTAAAAATATCTGTC	50
exon 18	CYLD e17.1 CYLD e17.2	CTGTTCAACAAAAGTTTATCCATT AAAGTCCTCTTAACTTCCCTTCC	55
exon 19	CYLD e18.1 CYLD e18.2	GCAACATAGTGGCTTGTCTTCT CCTCGGCCTAATGACATTCT	55
exon 19	CYLD e18.3N1 CYLD e18.4N1	CCACTACAACTGTCCCACT GAGTTATTTGCTGTTCTCTGC	50
exon 20	CYLD e19.1 CYLD e19.2	CACAGCCTTGGATTCTCCTG TCACTGGCAAAGGGTTTAGA	55
exon 20	CYLD e19.3 CYLD e19.4	GCCTTCAGTTTCTTGCCTTT ACCCATGCCAGAAGTAG	55

1 – číslování podle referenční sekvence GenBank # NG_012061)

2 – číslování podle Zheng *et al.*(28), "alt e" znamená "alternativní exon"

Tabulka 1.2. Sekvence a annealingové teploty primerů použitých k LOH analýze.

Název primeru	Sekvence primeru 5'→3'	Teplota annealingu (°C)
D16S304F D16S304R	GTCAGTGCAATGGAGGTAAGAAAAAAG GATCAGATGAGATAGGGCATATTCATGG	55
D16S308F D16S308R	CAGCCAGGGTAGTAAGGCTAGACCT TGGGTGGCAGAGTGAGACCCTGTCT	55
D16S419F D16S419R	ATTTTAAAGGAATGTAAAGNACACA GACGTTAGACCAGGAGTCAG	55
D16S476F D16S476R	TTGCACTCCACTCTGGGCA TTGCCTTGGCTTTCTGTTGG	60
D16S541F D16S541R	CCACACCAGCGTTTTTCTAA CACACTTTACACACACCTATACCC	55
D16S407F D16S407R	CTCGCGCTGGGTACAGTTAT AGATCAGAGGAGTGGGTTCC	55

Forward primery jsou značené fluorescenčním barvivem 6-FAM.

1.4. Výsledky

1.4.1. Klinickopatologická data

Soubor pacientů se skládal z osmi žen a dvou mužů ve věku od 22 do 66 let (Tabulka 1.3). Všichni pacienti byli postiženi mnohočetnými, různě velkými papulami a uzlíky lokalizovanými především v pokožce hlavy (Obrázek 1.2 A-C). K histopatologickému prozkoumání bylo k dispozici celkem 38 nádorů ve složení 16 cylindromů, 11 spiradenomů, 7 spiradenocylindromů a 4 trichoepiteliomy (kribriformní trichoblastomy). Navíc, malá trichoblastomatózní ohniska byla identifikována u 1 z 11 spiradenomů a u 2 ze 16 cylindromů.

1.4.2. Molekulárně biologická data

V souboru pacientů bylo nalezeno osm nových, dříve nepopsaných zárodečných mutací (Tabulka 1.3; Obrázek 1.1, červené písmo; Obrázek 1.3). Sekvenováním DNA od 110 náhodně vybraných, zdravých, nepříbuzných jedinců nebyla nalezena žádná z těchto sekvenčních variant.

Dále bylo analyzováno celkem 19 formalínem fixovaných, v parafínu zalitých vzorků nádorových tkání získaných od 9 pacientů. U devíti z nich byly odhaleny somatické sekvenční mutace, u zbývajících deseti byl prokázán LOH (Tabulka 1.3). U Případu 5 nebylo možné analýzu provést z důvodu silného poškození DNA formalínovou fixací.

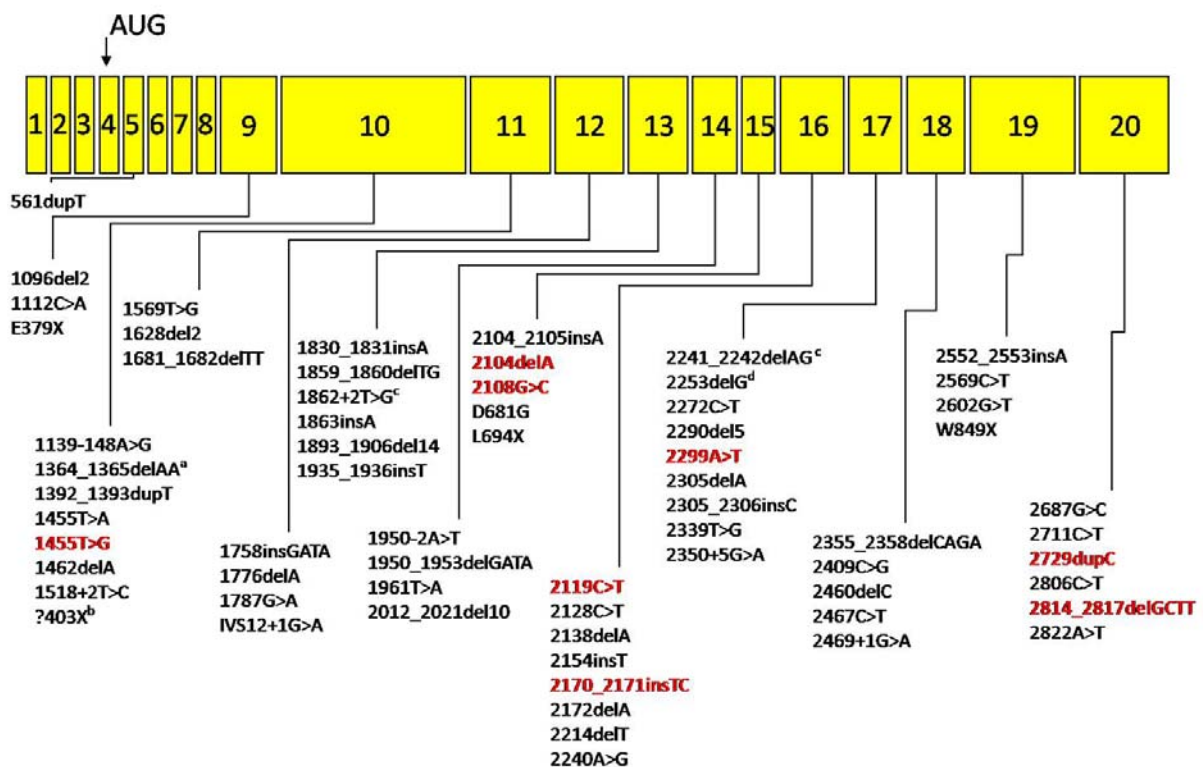
Zjištěné mutace (zárodečné i somatické) byly substituce, delece, inserce a duplikace. Všechny kromě jedné vedly ke vzniku předčasného stop-kodonu (Tabulka 1.3). Příklad s aminokyselinovou substitucí (Případ 5) byl analyzován pomocí PolyPhen softwaru, který předpověděl pravděpodobný škodlivý efekt této mutace na strukturu a funkci proteinu. U případů u kterých byl detekován LOH byla zároveň přítomna hemizygotní zárodečná sekvenční mutace.

U čtyřech případů (Případy 1, 2, 7, 9) byly nalezeny u různých nádorů téhož pacienta různé somatické mutace (Tabulka 1.3). U Případu 1 nesl každý ze tří spiradenocylindromů různou somatickou mutaci (změnu). U prvního byl prokázán LOH, druhý nesl duplikaci a u třetího byla nalezena substituce. U Případu 2 byl u jednoho spiradenocylindromu prokázán LOH a u druhého duplikace. U případu 7 byla u jednoho cylindromu nalezena substituce, u druhého byla odhalena inserce. U případu 9 byl u dvou ze tří cylindromů nalezen LOH, kdežto u třetího byla prokázána substituce. Ve všech těchto případech vedla sekvenční somatická mutace ke zkrácenému proteinu.

Obrázek 1.1. Doposud publikované zárodečné mutace genu CYLD a jejich distribuce napříč jednotlivými exony. Nové mutace identifikované v této studii jsou vypsány červenou barvou. Exony 1-8 nejsou znázorněny ve skutečném měřítku. Názvy mutací jsou zapsány tak, jak je publikovali jejich autoři, i když některé z nich neodpovídají dnešní nomenklatuře. Navíc, původní zápis některých mutací je zřejmě zcela chybný:

- a) Mutace c.1364_1365delAA lokalizovaná skupinou Liang a kol. (32) do exonu 15 by správně měla ležet v exonu 10.
- b) Mutace N403X popsaná skupinou Almeida a kol. (3) je v obrázku zapsána jako ?403X, protože v pozici 403 se u proteinu CYLD nachází aminokyselina glutamin (Q)*.
- c) Mutace c.1862+2T>G a c.2241_2242delAG publikované skupinou Liang a kol. (33) jsou zřejmě zapsány nesprávně. Pozice 1862 je lokalizována v exonu 13, ne na hranici exonu a intronu*. Správný zápis má zřejmě být c.1826+2T>G a mutace přísluší k exonu 12. Co se týče mutace c.2241_2242delAG, v pozicích 2241 a 2242 kódující sekvence genu CYLD neleží dinukleotid AG, ale GG*. Navíc, pozice 2241 leží na konci exonu 16, kdežto pozice 2242 leží na začátku exonu 17. Správný zápis mutace má zřejmě být c.2240_2241delAG a mutace by měla být umístěna v exonu 16 (tato doměnka byla potvrzena osobní emailovou komunikací s Dr. Liangem).
- d) Mutace c.2253delG publikovaná skupinou Poblete-Gutierrez a kol. (31) je zřejmě také špatně zapsaná, jelikož v pozici 2253 se nenachází G, ale T*. Nejbližší G je na pozici 2252*, správný zápis mutace by tedy zřejmě měl být c.2252delG.

*podle referenční sekvence GenBank# NG_012061



Tabulka 1.3. Hlavní klinicko patologické údaje a výsledky molekulárně biologických studií u pacientů s Brooke-Spieglerovým syndromem

Případy	Pohlaví Věk	Klinický projev	Nádory dostupné k histologickému vyšetření	Nádory dostupné ke genetickému vyšetření	zárodečná mutace		somatická mutace (změna)	
					c.DNA	Protein	c.DNA	Protein
Případ 1	Ž/69	Více než 50 nádorů vyskytujících se na celém povrchu těla	3 spiradenocylindromy	SC	1455T>G	Y485X*	1736_1739dupTGGA	E580DfsX36
				SC	1455T>G	Y485X*	LOH	
				SC	1455T>G	Y485X*	1794C>A	Y598X
Případ 2	Ž/37	Více než 20 nádorů vyskytujících se ve kštici, na krku a v pubické oblasti	2 spiradenocylindromy 1 cylindrom	C	1455T>G	Y485X*	LOH	
				SC	1455T>G	Y485X*	LOH	
				SC	1455T>G	Y485X*	1540dupA	T514NfsX29
Případ 3	Ž/42	Více než 20 nádorů ve kštici	3 cylindromy	C	2104delA	I702X	1112C>A	S371X
Případ 4	Ž/22	Mnohočetné nádory ve kštici	1 cylindrom	C	2104delA	I702X	2467C>T	Q823X
Případ 5	M/34	Mnohočetné, 1 až 2 cm velké nádory ve kštici, na trupu a vnějším zvukovodu, některé léze bolestivé	2 cylindromy 1 trichoepiteliom	NA	2108G>C	R703T	NA	NA
Případ 6	Ž/67	Mnohočetné nádory ve kštici, na trupu a končetinách přítomné po mnoho let	3 cylindromy 1 trichoepiteliom 2 spiradenomy	C	2119C>T	Q707X	2806C>T	R936X
				S	2119C>T	Q707X	LOH	
				S	2119C>T	Q707X	LOH	
Případ 7	Ž/66	Mnohočetné nádory ve kštici, první léze se objevila ve 46 letech	2 cylindromy 1 spiradenom	C	2170_2171insTC	K724ifsX12	2713C>T	Q905X
				C	2170_2171insTC	K724ifsX12	2046_2047insAGATCCG	E683RfsX43
Případ 8	Ž/44	Mnohočetné velké nádory na čele, ve kštici, na obličeji, uších, horních končetinách a hrudi, první léze se objevila v 18 letech	8 spiradenomů 2 trichoepiteliomy	S	2299A>T	K767X	LOH	
Případ 9	Ž/63	Mnohočetné nádory ve kštici	4 cylindromy	C	2729dupC	E911RfsX31	LOH	
				C	2729dupC	E911RfsX31	2107A>T	R703X
				C	2729dupC	E911RfsX31	LOH	
Případ 10	M/47	Mnohočetné papuly a nádory ve kštici	2 spiradenocylindromy	SC	2814_2817delGCTT	L939VfsX13	LOH	
				SC	2814_2817delGCTT	L939VfsX13	LOH	

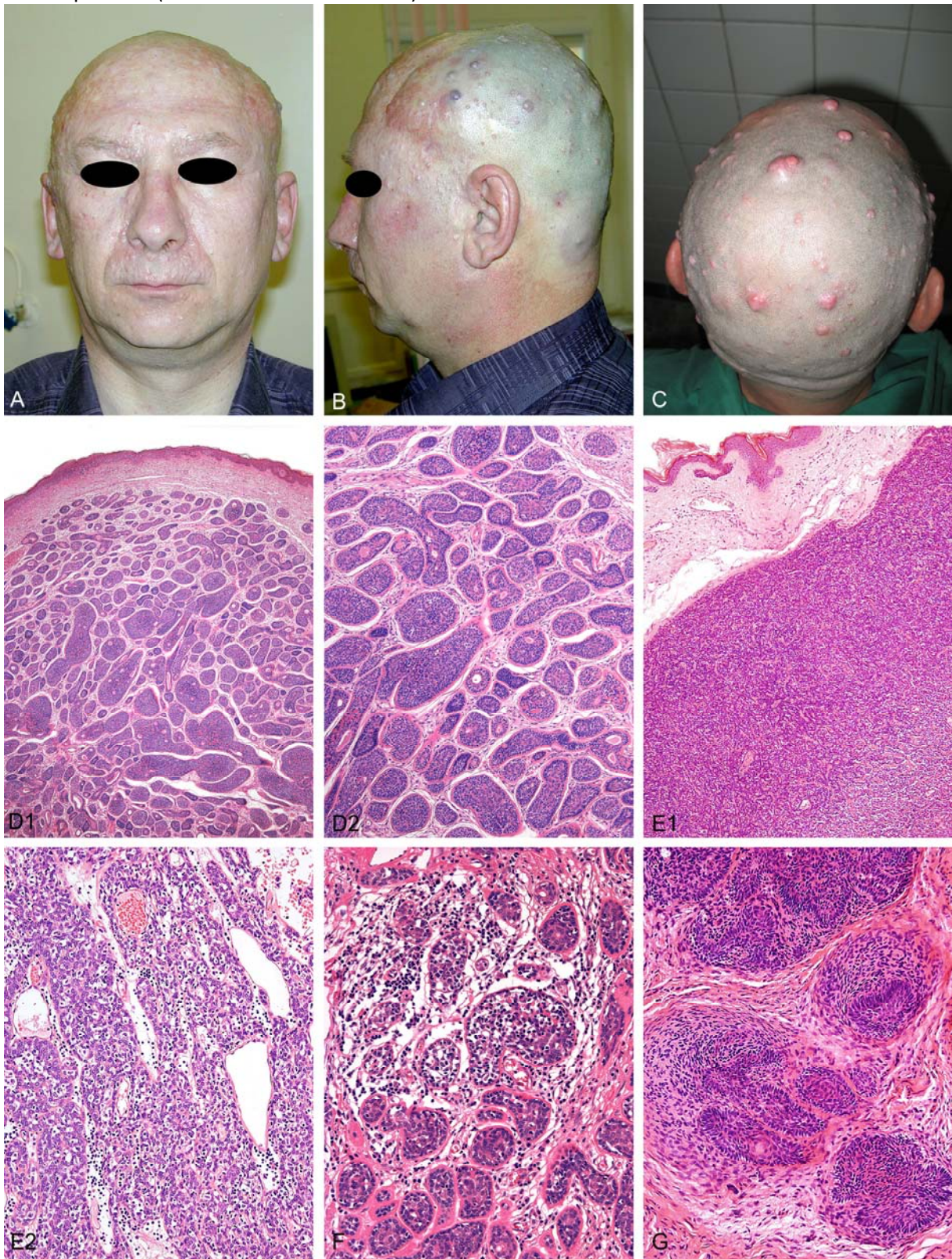
Případy 1 a 2 jsou v příbuzenském vztahu matka - dcera, stejně tak i případy 3 a 4.

Mutace na úrovni proteinu je odvozena od isoformy 1 mRNA.

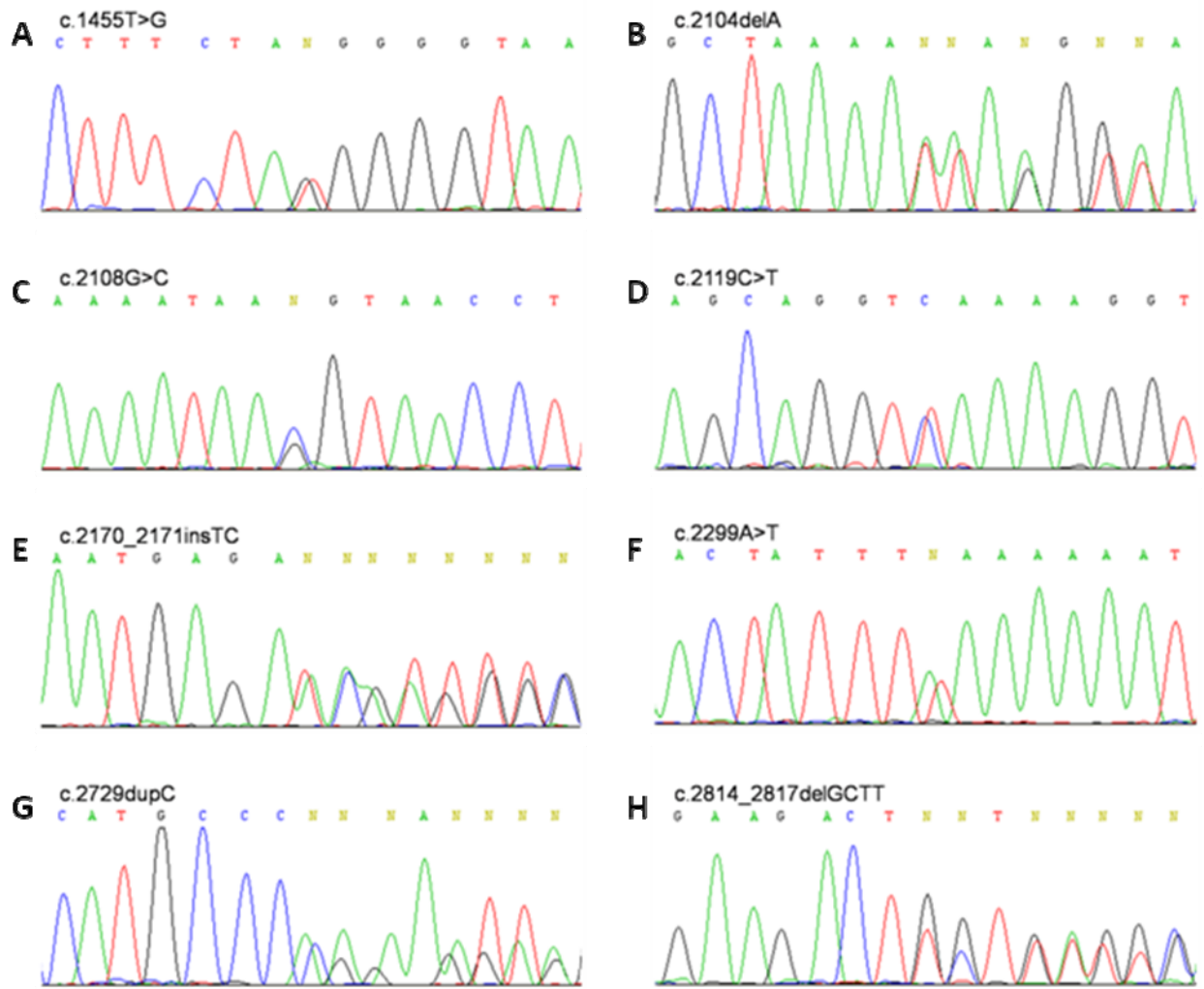
* Tato mutace je známá na proteinové úrovni, ale zde je důsledkem jiné nukleotidové záměny, než dříve publikovaná mutace (2).

Vysvětlivky: C cylindrom, LOH loss of heterozygosity (ztráta heterozygotnosti), M muž, NA nelze analyzovat, S spiradenom, SC spiradenocylindrom, Ž žena

Obrázek 1.2. A-C, Mnohočetné noduly postihující hlavu (Případ 9). D1-D2, Cylindrom. E1, Spiradenom. E2, Spiradenocylindrom (spiradenoma-like). F, Spiradenocylindrom (cylindroma-like). G, Trichoepiteliom (kribriformní trichoblastom).



Obrázek 1.3. Sekvenogramy osmi nových zárodečných mutací. **A**, c.1455T>G. **B**, c.2104delA. **C**, c.2108G>C. **D**, c.2119C>T. **E**, c.2170_2171insTC. **F**, c.2299A>T. **G**, c.2729dupC. **H**, c.2814_2817delGCTT.



1.5. Diskuze

Mutace genu CYLD bývají spojovány s FC, MFT a BSS. Gen CYLD je tvořen dvaceti exony, z nichž první tři nejsou translatovány. Exony 3 a 7 podléhají alternativnímu splicingu (16). Gen kóduje cytoplasmatický deubiquitační protein, který reguluje několik signálních drah. Protein je složen ze tří CAP-GLY (cytoskeletal-associated protein-glycine-conserved) domén, NEMO a TRAF-2 vazebných domén, fosforylační domény a katalytické domény (36, 37).

Tato studie přináší informace o osmi nových zárodečných mutacích genu CYLD u pacientů s BSS, čímž je rozšířen seznam známých zárodečných mutací genu CYLD na 66 (Obrázek 1.1). Všechny nalezené mutace, kromě jedné, vedou k vytvoření předčasného stop-kodonu a tedy ke zkrácení proteinu, což je nejčastější typ mutací nalézáných u genu CYLD (3, 32, 38, 39). Substituční mutace u případu 5 byla analyzována pomocí Polyphen softwaru za účelem zjištění, zda tato záměna skutečně představuje mutaci spojenou se vznikem nádoru. Tato analýza, společně s výsledky sekvenování u 110 zdravých, nepříbuzných jedinců, prokázala kauzální roli této mutace pro vznik nádoru. Zajímavé je, že jedna z mutací identifikovaných v této sérii, p.Y485X (Případy 1 a 2, Tabulka 1.3), známá to mutace na proteinové úrovni, vznikla z jiné nukleotidové záměny (c.1455T>G), než tomu bylo u vzorku kolektivu Bignell a kol., kde stejná mutace vznikla nukleotidovou záměnou c.1455T>A (16).

Naprostá většina doposud popsaných mutací genu CYLD zasahuje centrální a c-terminální oblasti NEMO vazebné a katalytické domény (exony 9-20) (3, 16, 26-33, 38, 40-46). Jediná mutace ležící před hranicí devátého exonu byla popsána v roce 2009 u pacienta se sporadickou mutací genu CYLD. Mutace byla nalezena v exonu 5 (c.561dupT) a vedla k posunu čtecího rámce a vzniku předčasného stop kodonu (47). Další mutace popsaná v N-terminální oblasti (S265X) byla nalezena u mnohočetného myelomu (48). Mutace nalezené v naší sérii pacientů s BSS jsou v souladu s dříve publikovanými daty a všechny leží za hranicí exonu 9.

V souladu s Knudsonovou teorií vyžaduje tumor supresorový gen dva zásahy (49), aby byl inaktivován a došlo ke vzniku nádoru. Ačkoliv první zásahy – zárodečné mutace – byly u BSS a příbuzných lézí hojně studovány, druhé zásahy – somatické změny – byly analyzovány pouze vzácně a informace o spektru somatických změn u různých neoplázií stejného pacienta jsou prakticky neznámé. Pouze několik málo badatelů analyzovalo jeden nádor u jednoho pacienta a identifikovalo LOH, nebo mutaci (15, 16, 27, 43). Z dat prezentovaných Bignellem a kol. se lze domnívat, že jeden, nebo dva pacienti v jejich souboru měli ve svých jednotlivých nádorech mix somatických sekvenčních mutací a LOH, ale nebylo zde specifikováno, zda byly testované nádory stejného histologického typu nebo ne (16).

V této studii byla testována pomocí sekvenování a LOH analýzy série 19 nádorů od 9 pacientů. Analýza somatických mutací přinesla několik zajímavých nálezů. Za prvé, druhý zásah může být u BSS

reprezentován buď LOH, nebo mutacemi vedoucími ke změně v nukleotidové sekvenci. Za druhé, mnohočetné nádory stejného histologického typu (např. cylindromy) mohou mít u stejného pacienta různé somatické mutace (Případy 1, 2, 7, 9, Tabulka 1.3). Tyto nálezy naznačují, že mnohočetné nádory u jednotlivých pacientů s BSS vznikají nezávisle, samostatnou somatickou změnou (druhým zásahem) genu CYLD. Pokud je nám známo, naše práce představuje první popis tohoto fenoménu u genu CYLD. Podobný proces byl popsán u několika málo dalších tumor supresorových genů, jakými jsou např. BHD a NF-1 (50, 51).

Z morfologického hlediska naše studie potvrdila dříve publikované práce popisující výskyt různých typů adnexálních nádorů u BSS. Ačkoliv původně byly u pacientů s BSS popisovány cylindromy a obličejové trichoepiteliomy, do dnešních dnů byly u těchto pacientů nalezeny i další typy nádorů, jakými jsou např. spiradenomy, spiradenocylindromy a jejich maligní analogy (17, 35, 46).

I když jsme neprováděli přesnou statistickou analýzu, je z našich dat evidentní, že zde není žádná korelace genotypu a fenotypu ve smyslu, že jednotlivé typy nádorů nejsou spojeny s nálezem specifické zárodečné, nebo somatické změny (mutace), což je v souladu s dříve publikovanými daty.

Bowen a kol. upozornili ve své práci na neexistující korelaci mezi přítomností mutace genu CYLD a specifickým fenotypem nádoru u šesti nepříbuzných jedinců (3x BSS, 2x MFT, 1x FC). Identifikovali pět mutací zkracujících protein, u jednoho pacienta s MFT nenalezli žádnou mutaci genu CYLD (40).

Byla rovněž popsána variabilita exprese onemocnění mezi jednotlivými rodinami, ale i mezi jednotlivými členy postižených rodin nesoucích stejnou mutaci. Oiso a kol. popsali dva příslušníky jedné rodiny nesoucí mutaci c.2272C>T u kterých se vyvinuly 4, resp. 5 cylindromů, v průměru menších než 3 cm (52). Oproti tomu Zhang a kol. (39) popsali pacienta se stejnou mutací, ale tento byl silně postižen stovkami splývajících cylindromů.

Nápadná fenotypová diverzita byla popsána u rodiny s mutací c.2252delG. Někteří členové této rodiny byli postiženi pouze malými nádory, jejichž výskyt byl omezen v nasolabiální oblasti, u dalších členů se nádory vyskytovaly navíc ještě v pokožce hlavy a jeden příslušník rodiny byl postižen mnohočetnými velkými cylindromy po celém těle a turbanovým tumorem na hlavě (31).

Blake a Toro zjišťovali u šesti missense mutací genu CYLD (missense mutace se u genu CYLD vyskytují relativně vzácně), zda jsou asociovány se specifickým fenotypem (53). Zjistili, že čtyři ze šesti (67%) missense mutací byly popsány výhradně u MFT. Ze zbývajících dvou mutací se jedna (p.D681G) vyskytla v rodině se třemi postiženými jedinci, jedenáct ze dvanácti nádorů získaných od těchto pacientů byly trichoepiteliomy a jeden byl solitární spiradenom (3). Další missense mutace (p.E747G) byla popsána u dvou rodin. V první rodině Tureckého původu bylo 13 postižených jedinců, u všech se vyskytly mnohočetné trichoepiteliomy (41). U jednoho člena rodiny se navíc vyskytly izolované populární cylindromy, ale ne klasický turbanový tumor.

Na základě těchto pozorování se zdá, že missense mutace jsou spojeny s výskytem trichoepiteliomů a s mírnějším fenotypem.

1.6. Závěr

Bylo identifikováno 8 nových zárodečných mutací (substituce, delece a inserce/duplikace), z nichž všechny, kromě jedné, vedly ke vzniku předčasného stop-kodonu. V jednom případě byla nalezena substituční mutace, která nevedla k předčasnému stop-kodonu, ale bylo předpovězeno, že rovněž vede k poruše funkce proteinu a je tedy kauzální pro vznik nádoru.

Jako první jsme demonstrovali, že somatické změny (LOH, nebo sekvenční mutace) se mohou lišit mezi mnohočetnými nádory vyskytujícími se u jednoho pacienta. A to i v případě, že jsou stejného histologického typu.

Výsledky této studie byly použity k přípravě publikace přijaté do tisku v *Diagnostic Molecular Pathology* (Sima R., Vanecek T., Kacerovska D., Trubac P., Cribier B., Rutten A., Vazmitel M., Spagnolo DV., Litvik R., Vantuchova Y., Wyers W., Pearce RL., Pearn J., Michal M., Kazakov DV., Brooke-Spiegler syndrome: report of 10 patients from 8 families with novel germline mutations. Evidence of diverse somatic mutations in the same patient regardless of tumor type.).

1.7. Seznam použité literatury

1. Riehemann K, Sorg C. Sequence homologies between four cytoskeleton-associated proteins. *Trends Biochem Sci.* 1993 Mar;18(3):82-3.
2. Courtois G, Gilmore TD. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene.* 2006 Oct 30;25(51):6831-43.
3. Almeida S, Maillard C, Itin P, Hohl D, Huber M. Five new CYLD mutations in skin appendage tumors and evidence that aspartic acid 681 in CYLD is essential for deubiquitinase activity. *J Invest Dermatol.* 2008 Mar;128(3):587-93.
4. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:621-63.
5. Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 2004 Sep 15;18(18):2195-224.
6. Pomerantz JL, Baltimore D. Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell.* 2002 Oct;10(4):693-5.
7. Sebban H, Yamaoka S, Courtois G. Posttranslational modifications of NEMO and its partners in NF-kappaB signaling. *Trends Cell Biol.* 2006 Nov;16(11):569-77.
8. Brummelkamp TR, Nijman SM, Dirac AM, Bernards R. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature.* 2003 Aug 14;424(6950):797-801.

9. Kovalenko A, Chable-Bessia C, Cantarella G, Israël A, Wallach D, Courtois G. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*. 2003 Aug 14;424(6950):801-5.
10. Trompouki E, Hatzivassiliou E, Tschirritzis T, Farmer H, Ashworth A, Mosialos G. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature*. 2003 Aug 14;424(6950):793-6.
11. Regamey A, Hohl D, Liu JW, Roger T, Kogerman P, Toftgard R, Huber M. The tumor suppressor CYLD interacts with TRIP and regulates negatively nuclear factor kappaB activation by tumor necrosis factor. *J Exp Med*. 2003 Dec 15;198(12):1959-64.
12. Lee SY, Lee SY, Choi Y. TRAF-interacting protein (TRIP): a novel component of the tumor necrosis factor receptor (TNFR)- and CD30-TRAF signaling complexes that inhibits TRAF2-mediated NF-kappaB activation. *J Exp Med*. 1997 Apr 7;185(7):1275-85.
13. Zhang J, Stirling B, Temmerman ST, Ma CA, Fuss IJ, Derry JM, Jain A. Impaired regulation of NF-kappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. *J Clin Invest*. 2006 Nov;116(11):3042-9.
14. Massoumi R, Chmielarska K, Hennecke K, Pfeifer A, Fässler R. Cyld inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell*. 2006 May 19;125(4):665-77.
15. Leonard N, Chaggar R, Jones C, Takahashi M, Nikitopoulou A, Lakhani SR. Loss of heterozygosity at cylindromatosis gene locus, CYLD, in sporadic skin adnexal tumours. *J Clin Pathol*. 2001 Sep;54(9):689-92.
16. Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, Green H, Brown C, Biggs PJ, Lakhani SR, Jones C, Hansen J, Blair E, Hofmann B, Siebert R, Turner G, Evans DG, Schrandt-Stumpel C, Beemer FA, van Den Ouweland A, Halley D, Delpech B, Cleveland MG, Leigh I, Leisti J, Rasmussen S. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet*. 2000 Jun;25(2):160-5.
17. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin AE. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press: Lyon 2006. 2006.
18. Kazakov DV, Soukup R, Mukensnabl P, Boudova L, Michal M. Brooke-Spiegler syndrome: report of a case with combined lesions containing cylindromatous, spiradenomatous, trichoblastomatous, and sebaceous differentiation. *Am J Dermatopathol*. 2005 Feb;27(1):27-33.
19. Pingitore R, Campani D. Salivary gland involvement in a case of dermal eccrine cylindroma of the scalp (turban tumor). Report of a case with lung metastases. *Tumori*. 1984 Aug 31;70(4):385-8.

20. Rockerbie N, Solomon AR, Woo TY, Beals TF, Ellis CN. Malignant dermal cylindroma in a patient with multiple dermal cylindromas, trichoepitheliomas, and bilateral dermal analogue tumors of the parotid gland. *Am J Dermatopathol.* 1989 Aug;11(4):353-9.
21. Antonescu CR, Terzakis JA. Multiple malignant cylindromas of skin in association with basal cell adenocarcinoma with adenoid cystic features of minor salivary gland. *J Cutan Pathol.* 1997 Aug;24(7):449-53.
22. Kostler E, Schonlebe J, Mentzel T, Haroske G, Wollina U. Psoriasis and Brooke-Spiegler syndrome with multiple malignancies. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005 May;19(3):380-1.
23. Nonaka D, Rosai J, Spagnolo D, Fiaccavento S, Bisceglia M. Cylindroma of the breast of skin adnexal type: a study of 4 cases. *Am J Surg Pathol.* 2004 Aug;28(8):1070-5.
24. Argenyi ZB, Nguyen AV, Balogh K, Sears JK, Whitaker DC. Malignant eccrine spiradenoma. A clinicopathologic study. *Am J Dermatopathol.* 1992 Oct;14(5):381-90.
25. Kazakov DV, Zelger B, Rütten A, Vazmitel M, Spagnolo DV, Kacerovska D, Vanecek T, Grossmann P, Sima R, Grayson W, Calonje E, Koren J, Mukensnabl P, Danis D, Michal M. Morphologic diversity of malignant neoplasms arising in preexisting spiradenoma, cylindroma and spiradenocylindroma based on the study of 24 cases, sporadic or occurring in the setting of Brooke-Spiegler syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2009 May;33(5):705-19.
26. Espana A, Garcia-Amigot F, Aguado L, Garcia-Foncillas J. A novel missense mutation in the CYLD gene in a Spanish family with multiple familial trichoepithelioma. *Arch Dermatol.* 2007 Sep;143(9):1209-10.
27. Salhi A, Bornholdt D, Oeffner F, Malik S, Heid E, Happle R, Grzeschik KH. Multiple familial trichoepithelioma caused by mutations in the cylindromatosis tumor suppressor gene. *Cancer Res.* 2004 Aug 1;64(15):5113-7.
28. Zheng G, Hu L, Huang W, et al. CYLD mutation causes multiple familial trichoepithelioma in three Chinese families. *Hum Mutat* 2004;23:400.
29. Zuo YG, Xu Y, Wang B, Liu YH, Qu T, Fang K, Ho MG. A novel mutation of CYLD in a Chinese family with multiple familial trichoepithelioma and no CYLD protein expression in the tumour tissue. *Br J Dermatol.* 2007 Oct;157(4):818-21.
30. Zhang XJ, Liang YH, He PP, Yang S, Wang HY, Chen JJ, Yuan WT, Xu SJ, Cui Y, Huang W. Identification of the cylindromatosis tumor-suppressor gene responsible for multiple familial trichoepithelioma. *J Invest Dermatol.* 2004 Mar;122(3):658-64.
31. Poblete Gutiérrez P, Eggermann T, Höller D, Jugert FK, Beermann T, Grussendorf-Conen EI, Zerres K, Merk HF, Frank J. Phenotype diversity in familial cylindromatosis: a frameshift mutation in the

- tumor suppressor gene CYLD underlies different tumors of skin appendages. *J Invest Dermatol.* 2002 Aug;119(2):527-31.
32. Liang YH, Sun CS, Ye XY, Zhang W, Yang S, Zhang XJ. Novel substitution and frameshift mutations of CYLD in two Chinese families with multiple familial trichoepithelioma. *Br J Dermatol.* 2008 May;158(5):1156-8.
 33. Liang YH, Gao M, Sun LD, Liu LJ, Cui Y, Yang S, Fan X, Wang J, Xiao FL, Zhang XJ. Two novel CYLD gene mutations in Chinese families with trichoepithelioma and a literature review of 16 families with trichoepithelioma reported in China. *Br J Dermatol.* 2005 Dec;153(6):1213-5.
 34. Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, eds. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Totowa, NJ: Humana Press; 2000:365–386.
 35. Weyers W, Nilles M, Eckert F, Schill WB. Spiradenomas in Brooke-Spiegler syndrome. *Am J Dermatopathol.* 1993 Apr;15(2):156-61.
 36. Massoumi R, Paus R. Cylindromatosis and the CYLD gene: new lessons on the molecular principles of epithelial growth control. *Bioessays.* 2007 Dec;29(12):1203-14.
 37. Courtois G. Tumor suppressor CYLD: negative regulation of NF-kappaB signaling and more. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Apr;65(7-8):1123-32.
 38. Saggar S, Chernoff KA, Lodha S, Horev L, Kohl S, Honjo RS, Brandt HR, Hartmann K, Celebi JT. CYLD mutations in familial skin appendage tumours. *J Med Genet.* 2008 May;45(5):298-302.
 39. Zhang G, Huang Y, Yan K, Li W, Fan X, Liang Y, Sun L, Li H, Zhang S, Gao M, Du W, Yang S, Liu J, Zhang X. Diverse phenotype of Brooke-Spiegler syndrome associated with a nonsense mutation in the CYLD tumor suppressor gene. *Exp Dermatol.* 2006 Dec;15(12):966-70.
 40. Bowen S, Gill M, Lee DA, Fisher G, Geronemus RG, Vazquez ME, Celebi JT. Mutations in the CYLD gene in Brooke-Spiegler syndrome, familial cylindromatosis, and multiple familial trichoepithelioma: lack of genotype-phenotype correlation. *J Invest Dermatol.* 2005 May;124(5):919-20.
 41. Hu G, Onder M, Gill M, Aksakal B, Oztas M, Gürer MA, Celebi JT. A novel missense mutation in CYLD in a family with Brooke-Spiegler syndrome. *J Invest Dermatol.* 2003 Oct;121(4):732-4.
 42. Ly H, Black MM, Robson A. Case of the Brooke-Spiegler syndrome. *Australas J Dermatol.* 2004 Nov;45(4):220-2.
 43. Heinritz W, Grunewald S, Strenge S, Schütz A, Froster UG, Glander HJ, Paasch U, Simon JC. A case of Brooke-Spiegler syndrome with a new mutation in the CYLD gene. *Br J Dermatol.* 2006 May;154(5):992-4.

44. Lv HL, Huang YJ, Zhou D, Du YF, Zhao XY, Liang YH, Quan C, Zhang H, Zhou FS, Gao M, Zhou L, Yang S, Zhang XJ. A novel missense mutation of CYLD gene in a Chinese family with multiple familial trichoepithelioma. *J Dermatol Sci*. 2008 May;50(2):143-6.
45. Huang TM, Chao SC, Lee JY. A novel splicing mutation of the CYLD gene in a Taiwanese family with multiple familial trichoepithelioma. *Clin Exp Dermatol*. 2009 Jan;34(1):77-80.
46. Kazakov DV, Thoma-Uszynski S, Vanecek T, Kacerovska D, Grossmann P, Michal M. A case of Brooke-Spiegler syndrome with a novel germline deep intronic mutation in the CYLD gene leading to intronic exonization, diverse somatic mutations and unusual histology. *Am J Dermatopathol*. 2009 Aug 7. [Epub ahead of print]
47. Nasti S, Pastorino L, Bruno W, Gargiulo S, Battistuzzi L, Zavattaro E, Leigheb G, De Francesco V, Tulli A, Mari F, Scarrà GB, Ghiorzo P. Five novel germline function-impairing mutations of CYLD in Italian patients with multiple cylindromas. *Clin Genet*. 2009 Nov;76(5):481-5.
48. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, Van Wier S, Tiedemann R, Shi CX, Sebag M, Braggio E, Henry T, Zhu YX, Fogle H, Price-Troska T, Ahmann G, Mancini C, Brents LA, Kumar S, Greipp P, Dispenzieri A, Bryant B, Mulligan G, Bruhn L, Barrett M, Valdez R, Trent J, Stewart AK, Carpten J, Bergsagel PL. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2007 Aug;12(2):131-44.
49. Knudson AG, Jr. Introduction to the genetics of primary renal tumors in children. *Med Pediatr Oncol*. 1993;21(3):193-8.
50. Vocke CD, Yang Y, Pavlovich CP, Schmidt LS, Nickerson ML, Torres-Cabala CA, Merino MJ, Walther MM, Zbar B, Linehan WM. High frequency of somatic frameshift BHD gene mutations in Birt-Hogg-Dube-associated renal tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2005 Jun 15;97(12):931-5.
51. Eisenbarth I, Beyer K, Krone W, Assum G. Toward a survey of somatic mutation of the NF1 gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1. *Am J Hum Genet*. 2000 Feb;66(2):393-401.
52. Oiso N, Mizuno N, Fukai K, Nakagawa K, Ishii M. Mild phenotype of familial cylindromatosis associated with an R758X nonsense mutation in the CYLD tumour suppressor gene. *Br J Dermatol*. 2004 Nov;151(5):1084-6.
53. Blake PW, Toro JR. Update of cylindromatosis gene (CYLD) mutations in Brooke-Spiegler syndrome: novel insights into the role of deubiquitination in cell signaling. *Hum Mutat*. 2009 Jul;30(7):1025-36.

2. Sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu nesoucí fúzní gen ETV6-NTRK3. Doposud nepopsaná jednotka nádoru slinných žlaz

2.1. Úvod

Sekreční karcinom, známý také jako juvenilní karcinom prsu, je vzácnou variantou duktálního karcinomu prsu, původně popsaného McDivitem a Stewartem u pacientů ve věku 3-15 let (21). Onemocnění většinou postihuje mladší pacienty, ačkoliv určité procento případů sekrečního karcinomu se vyskytuje také u starších pacientů obou pohlaví (1, 25). Histologicky je sekreční karcinom tvořen ohraničenými noduly složenými z uniformních neoplastických epiteliálních buněk uspořádaných do mikrocystických, tubulárních a solidních růstových struktur. Nádorové buňky mají *low grade* jádra s vesikulárním chromatinem a objemnou, světle růžovou, granulární, nebo vakuolizovanou cytoplasmu. V mikrocystických a tubulárních prostorech je přítomna hojná, pěníťá sekrece. Imunohistochemicky jsou sekreční karcinomy často negativní v reakci s protilátkami proti estrogenovému a progesteronovému receptorům a proti HER-2/neu a jsou často pozitivní s protilátkami proti proteinu S-100, EGFR a vimentinu (10).

Acinický karcinom prsu (AciCC) byl poprvé popsán skupinou Roncaroli a kol. v roce 1996 (24). Histologicky je AciCC prsu složen z buněk uspořádaných do mikrocystických, solidních a mikroglandulárních struktur podobajících se AciCC slinných žlaz a mammární mikroglandulární adenóze (9). V nedávné studii popsali Hirokawa a kol. (15) podobnost imunohistochemických a klinickopatologických znaků pozorovaných u sekrečního karcinomu prsu a AciCC slinných žlaz. Na základě těchto nálezů vyslovili hypotézu, že sekreční karcinom prsu a AciCC slinných žlaz mohou být identickými jednotkami.

V nedávné době bylo prokázáno, že sekreční karcinom prsu nese balancovanou chromozomální translokaci t(12;15)(p13;q25), která vede ke vzniku fúzního produktu složeného z genu ETV6 ležícího na chromozomu 12 a genu NTRK3 ležícího na chromozomu 15 (31). Fúzní gen ETV6-NTRK3 kóduje chimerickou tyrozin kinázu, u které byla prokázána transformační aktivita v epiteliálních a myoepiteliálních buňkách myší mléčné žlázy (19). Tato translokace se zdá být mezi prsními nádory specifická pouze pro sekreční karcinom.

V průběhu naší konzultační praxe jsme narazili na zvláštní, doposud neznámý karcinom slinných žlaz charakterizovaný morfológickými a imunohistochemickými vlastnostmi připomínajícími sekreční karcinom prsu. Z našeho archivu nádorů slinných žlaz jsme získali celkem 16 případů, které byly dříve klasifikovány jako: neobvyklá varianta AciCC slinných žlaz, nebo jako blíže nespecifikovaný cystadenokarcinom. Nádory jsou tvořeny mikrocystickými a solidními oblastmi s hojným, vakuolizovaným, koloidním, PAS-pozitivním sekrečním materiálem vyplňujícím mikrocystické

prostory. Navrhujeme pro tuto skupinu nádorů označení sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu (Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands = MASC).

2.2. Cíle práce

1. prostudovat přítomnost translokace $t(12;15)(p13;q25)$ ETV-NTRK3 u souboru nádorů slinných žlaz se sekreční morfologií (14 případů), prsních sekrečních karcinomů (3 případy) a u 16 případů MASC
2. zjistit, zda jsou MASC a AcicC odlišnými jednotkami
3. pokud ano, navrhnout jejich samostatné zařazení v klasifikaci salivárních nádorů

2.3. Materiál a metody

Soubor byl tvořen 16 případy neobvyklého karcinomu slinných žlaz morfologicky připomínajícího sekreční karcinom prsu. Většina vzorků představovala konzultační případy vybrané z více než 3000 případů uložených v archivu salivárních nádorů Prof. Skálové a Prof. Michala. Prohledání nádorových registrů Fingerlandova ústavu patologie Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci králové, Ústavu patologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Haartman Institute Department of Pathology University of Helsinki a Department of Pathology, University Health Network, University of Toronto přineslo dalších 7 případů. Za účelem porovnání bylo do histologické a imunohistochemické studie zařazeno dalších 30 případů nádorů slinných žlaz se sekrečními rysy, zahrnujících AciCC (12 případů), *low grade* a *high grade* mukoepidermoidní karcinom (6 případů), adenoidní cystický karcinom (4 případy), *low grade* kribriformní cystadenokarcinom (1 případ), salivární duktální karcinom (2 případy), adenokarcinom blíže nespecifikovaný (3 případy) a pleomorfní adenom (2 případy).

Molekulárně biologicky byly, kromě studovaných případů MASC, analyzovány také 3 případy sekrečního karcinomu prsu jako pozitivní kontroly, 14 případů nádorů slinných žlaz se sekreční morfologií a 10 případů normálních, nenádorových tkání slinných žlaz.

2.3.1. Histochemie a imunohistochemie

Tkáň byla fixována ve formalínu, rutinně zpracována, zalita do parafínu, nakrájena a obarvena hematoxylinem – eosínem. Ve většině případů byla provedena také další barvení, včetně PAS barvení s diastázou i bez, barvení mucikarmínem a *alcian blue* při pH 2,5.

U 15 případů MASC byly k dispozici parafínové bločky k imunohistochemickému vyšetření. 4 μ m silné řezy byly ukrojeny z každého parafínového bločku, byly přeneseny na sklíčka pokrytá 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma, St. Louis, USA), deparafinizovány v xylenu a rehydrovány v sestupné ethanolové řadě (100 až 70%). Řezy byly poté vystaveny teplem indukovanému zpřístupnění epitopů ponořením do 0,01 M citrátového pufru (pH 6,0) a zahřátím v mikrovlnné troubě Micromed TTmega po dobu 20 minut. Endogenní peroxidáza byla zablokována pětiminutovou inkubací s 3% peroxidem vodíku v absolutním metanolu. Sklíčka byla poté inkubována s primárními protilátkami (Tabulka 2.1) v barvicím automatu LabVision při pokojové teplotě po dobu 60 minut. Navázané protilátky byly vizualizovány použitím Histofine Simple Stain MAX PO (Multi) Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and Rabbit (Nichirei Biosciences inc., Tokyo, Japan) a 3-3'-diaminobenzidinu (Sigma) jako chromogenu. V každém barvení byly zahrnuty příslušné pozitivní a negativní kontroly. Sklíčka byla podbarvena Mayerovým hematoxylinem.

Tabulka 2.1. Protilátky použité v imunohistochemické studii

Protilátková specifita	Klon	Ředění	Výrobce
S-100 protein	S-100	1:2000	DakoCytomation
Vimentin	V9	1:200	DakoCytomation
CK7	OV-TL 12/30	1:100	DakoCytomation
CK8	35 beta H11	RTU	DakoCytomation
CK19	RCK 108	1:200	DakoCytomation
CK18	DC10	1:100	DakoCytomation
CK14	NCL-LL002	1:40	Novocastra
CK5/6	D5/16B4	1:100	DakoCytomation
BRST2	GCDF15	1:500	Signet
Mammaglobin	304-1A5	RTU	DakoCytomation
STAT 5a	Polyklonální	1:400	Assay Designs Inc.
MUC1	Ma695	1:200	Novocastra
MUC4	1G8	1:100	Santa Cruz
EMA	E29	1:200	DakoCytomation
Ki-67	MIB1	1:2000	DakoCytomation
P63	4A4	1:200	DakoCytomation
Calponin	CALP1	1:1000	DakoCytomation
EGFR	H11	1:400	DakoCytomation
c-erbB-2	HercepTest™	RTU	DakoCytomation
ER	1D5	1:100	DakoCytomation
PR	PgR 636 ¹	1:100	DakoCytomation
AR	AR441	1:50	DakoCytomation

Vysvětlivky: RTU (ready to use) – k přímému použití

2.3.2. Molekulární genetika

2.3.2.1. RT-PCR

RNA z formalínem fixovaných, v parafínu zalitých tkání byla izolována pomocí RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX, USA). cDNA byla syntetizována za použití First Strand cDNA Synthesis Kit (do každé reakce byl přidán 1 µg RNA) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Všechny kroky byly provedeny přesně podle protokolů výrobců. Ke kontrole kvality extrahované RNA byla použita PCR amplifikace 105 bp fragmentu transkriptu genu kódujícího β2-mikroglobulinu, 126 bp fragmentu transkriptu genu kódujícího PBGD a 247 bp fragmentu transkriptu genu kódujícího PGK (3, 14, 32).

Detekce 110 bp velkého fragmentu fúzního transkriptu ETV6-NTRK3 byla provedena podle metodiky popsané skupinou Burgeois a kol. (6). 2 µl cDNA bylo přidáno do reakční směsi obsahující 12.5 µl of HotStart Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Hilden, Germany), 10 pmol každého primeru (primer TRKC1059 komplementární k NTRK3:

5'-CAGTTCTCGCTTCAGCACGATG-3' a primer TEL971 komplementární k ETV6:

5'-ACCACATCATGGTCTCTGTCTCCC-3'). Reakční směs byla doplněna destilovanou vodou do objemu 25 µl. Amplifikační program se skládal z počáteční denaturace při 95°C po dobu 14 minut, následovalo 45 cyklů zahrnujících denaturaci při 95°C po dobu 1 minuty, annealing při 65°C po dobu 1 minuty a syntézu při 72°C po dobu 1 minuty. Program byl zakončen finální inkubací při 72°C po dobu 7 minut.

Úspěšně amplifikované PCR produkty byly purifikovány pomocí Montage PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore, Billerica, USA). Přečištěné PCR produkty byly poté z obou stran osekvenovány pomocí Big Dye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, USA) a analyzovány na automatickém genetickém analyzátoru ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) při konstantním napětí 13.2 kV po dobu 20 minut. Získané sekvence byly porovnány s databází GenBank.

2.3.2.2. FISH

Z každého studovaného případu byl ukrojen 4 µm silný řez, který byl přenesen na mikroskopické sklíčko. Tkáň byla odparafínována v xylenu 3x5 minut, opláchnuta 2x ve 100% etanolu, 1x v 95% etanolu a 1x v deionizované vodě, vždy po dobu 5 minut. Dále byla sklíčka zahřáta v 1x Target Retrieval Solution (pH 6) (DAKO, Glostrup, Denmark) při 95 °C po dobu 40 minut a následně ve stejném roztoku schlazena při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Sklíčka byla poté opláchnuta v deionizované vodě po dobu 5 minut a tkáně byly pokryty roztokem proteinázy K (20 mg/ml) (SERVA, Heidelberg, Germany) při pokojové teplotě po dobu 10 minut. Sklíčka byla následně opláchnuta v deionizované vodě po dobu 5 minut, dehydrována ve vzestupné etanolové řadě (70%, 85%, 96%,

každý 2 minuty) a osušena. Potřebné množství LSI ETV6 (TEL) (12p13) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (VYSIS/Abbott, Abbott Park, IL, USA) bylo nanášeno na každou tkáň, přikryto krycím sklem a zalepeno. Skla byla inkubována v přístroji ThermoBrite™ instrument (StatSpin/Iris Sample Processing, Westwood, MA, USA). Teplotní profil zahrnoval kodenaturaci při 85 °C po dobu 8 minut a hybridizaci při 37 °C po dobu 16 hodin. Poté byla odstraněna krycí skla a tkáně byly ponořeny na 2 minuty do posthybridizačního odmývacího roztoku (2xSSC/0.3% NP-40) zahřátého na 72 °C. Sklíčka byla osušena ve tmě, podbarvena DAPI II (VYSIS/Abbott), překryta krycím sklem a okamžitě vyhodnocena.

2.3.2.3. Interpretace FISH

Každý případ byl prohlédnut pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX51 za použití objektivu se zvětšením 100x a filtrů Triple Band Pass (DAPI/SpectrumGreen/SpectrumOrange), Dual Band Pass (FITC/Texas Red) a Single Band Pass (SpectrumGreen, nebo SpectrumOrange). Vyhodnocení bylo provedeno spočítáním fluorescenčních signálů ve 100 náhodně vybraných, nepřekrývajících se jader nádorových buněk. Skla byla nezávisle vyhodnocena dvěma pozorovateli (RNDr. Radek Šíma, RNDr. Tomáš Vaněček, PhD.). Hodnoty *cut-off* byly stanoveny spočtením 100 nepřekrývajících se jader u 10 případů normálních, nenádorových, kontrolních tkání slinných žláz. Průměrný počet rozdělených (translokovaných) signálů byl u normální, kontrolní tkáně 2,34% a standardní odchylka (SD) 1,83. Vzorky byly klasifikovány jako pozitivní, pokud více než 10% (průměr + 3 SD, zaokrouhлено nahoru) jader neslo rozdělený (translokovaný) signál.

2.4. Výsledky

2.4.1. Klinická data a *follow up*

Nejdůležitější klinická data a makroskopické vlastnosti všech 16 případů MASC jsou shrnuty v Tabulce 2.2. Průměrný věk pacientů byl 46 let (rozmezí od 21 do 75 let). Z 16 případů MASC se 9 vyskytlo u mužů a zbývajících 7 u žen. U jednoho pacienta byl tumor lokalizován v malých slinných žlázách bukální sliznice, jeden měl nádor patra, další měl nádor horního rtu, u ostatních 13 případů se nádor vyskytl v příušní žláze. Průměrná velikost nádorů byla 2,1 cm (rozmezí od 0,7 do 5,5 cm). Původní diagnózy zahrnovaly AcicCC, adenoidní cystický karcinom, cystadenokarcinom a nízcemaligní karcinom blíže nespecifikovaný. Trvání symptomů bylo zaznamenáváno u 14 případů a pohybovalo se v rozmezí od dvou měsíců do třiceti let. 7 pacientů popsalo svoje léze jako pomalu rostoucí noduly přítomné po mnoho let. U 3 pacientů byl zaznamenán rychlý růst nádorů. U 2 pacientů se vyskytl multinodulární tumor a mnohočetné recidivy izolovaných nádorových nodulů. U 1 případu byl nádor cystický a zvětšoval se pomalu (Tabulka 2.2).

V 10 případech byli pacienti léčeni nejprve neradikální chirurgickou excízi lézí, u 6 pacientů zahrnovala primární léčba radikální, nebo konzervativní chirurgické odstanění příušní žlázy. Dále je známo, že u 7 pacientů byla aplikována adjuvantní radioterapie. Klinický *follow up* byl k dispozici u 15 případů a jeho délka se pohybovala v rozmezí od 3 měsíců do 10 let. U 3 pacientů se vyskytly lokální recidivy. Jeden pacient (Případ 7) zemřel na následky mnohočetných lokálních recidiv s rozšířením nádoru do spánkové kosti. U dalšího pacienta (Případ 4) se vyvinul velký nádor příušní žlázy. Tento nádor metastazoval do tří krčních lymfatických uzlin. Pacient podstoupil radikální chirurgické odstranění příušní žlázy a odstranění krčních lymfatických uzlin, podpořené adjuvantní radioterapií. Navzdory agresivní terapii nádor u pacienta do dvou let metastazoval a infiltroval pleuru, perikard a vytvořil mnohočetné metastázy v plicích. Pacient zemřel z důvodu diseminace nádoru po 2 letech od zahájení léčby. U dalšího pacienta (Případ 16) se vyskytla 2,5 cm metastáza do krční lymfatické uzliny. Pacient podstoupil disekci cervikálních lymfatických uzlin a v 1 ze 37 vyoperovaných uzlin byl přítomen karcinom. Pacient je nyní v pořádku a bez známek onemocnění 27 měsíců po operaci.

Tabulka 2.2. Sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu (MASC): Důležitá klinická data

Případ	Věk/ Pohlaví	Lokalizace	Velikost (mm)	Trvání symptomů před operací	Klinický projev	Stage v čase diagnózy	Léčba	Follow up
1	51/Ž	Ústní sliznice	10	1 rok	Pomalou rostoucí, nebolestivý uzlík	T1N0M0	NRE	NED,4 roky
2	44/Ž	Příušnice	9x8x8	3 měsíce	Multinodulární nádor	T2N0M0	NRE	NED, 6 let
3	48/M	Měkké patro	10x15	NA	Pomalou rostoucí uzlík	T1N0M0	NRE	NED,9 let
4	55/M	Příušnice	55x45x30	2 měsíce	Rychlý růst	T4N2M0	RP/RT	ME 2 roky, DOD 2 roky
5	34/M	Příušnice	16	1 rok	Dobře ohraničený uzlík	T1N0M0	NRE	NED,7 let
6	53/M	Příušnice	15	NA	Recidivující nádor s extraglandulární extenzí	T3N0M0	CP	RE,6 let
7	53/M	Příušnice	35	1,5 roku	Nebolestivý uzlík tvrdé konzistence fixovaný k přilehlé tkáni, extraglandulární extenze, 60 × 40 mm	T3N0M0	CP/RT	RE, 2 roky,3 roky DOD,6 let
8	55/Ž	Příušnice	10	30 let	Mnohočetné recidivy izolovaných nádorových uzlíků	T1N0M0	NRE, RP/RT	Mnohočetná RE, NED,3 roky
9	26/M	Příušnice	15	14 let	Nádor levé příušnice rozšířený do pokožky obličeje	T3N0M0	RP/RT	RE 6 měsíců, NED 22 měsíců
10	35/Ž	Příušnice	30x25x20	NA	Cystický, nebolestivý, pomalu se zvětšující nádor	T1N0M0	NRE/RT	NED,9 let
11	46/M	Příušnice	14	26 let	Nebolestivý, neohraničený, bílý nádor, dlouhá přítomnost nebolestivého uzlíku	T1N0M0	CP/RT	NED,10 let
12	55/M	Příušnice	40	23 let	Nebolestivý, neohraničený, bílý nádor, rostoucí posledních 6 měsíců	T2N0M0	RP	NED,3 roky
13	59/Ž	Příušnice	NA	14 let	Tuhý, nebolestivý nádor	NA	NRE	Nebyl k dispozici
14	21/Ž	Příušnice	27	NA	Nebolestivý uzlík	T2N0M0	NRE	NED nový případ
15	75/Ž	Příušnice	7	NA	Nebolestivý uzlík	T1N0M0	NRE	NED nový případ
16	32/M	Horní ret	10	Několik měsíců	Nebolestivý, ale zvětšující se uzlík	T1N0M0	NRE, re- excize, RT/ND	LN ME 86 měsíců, NED 27 měsíců

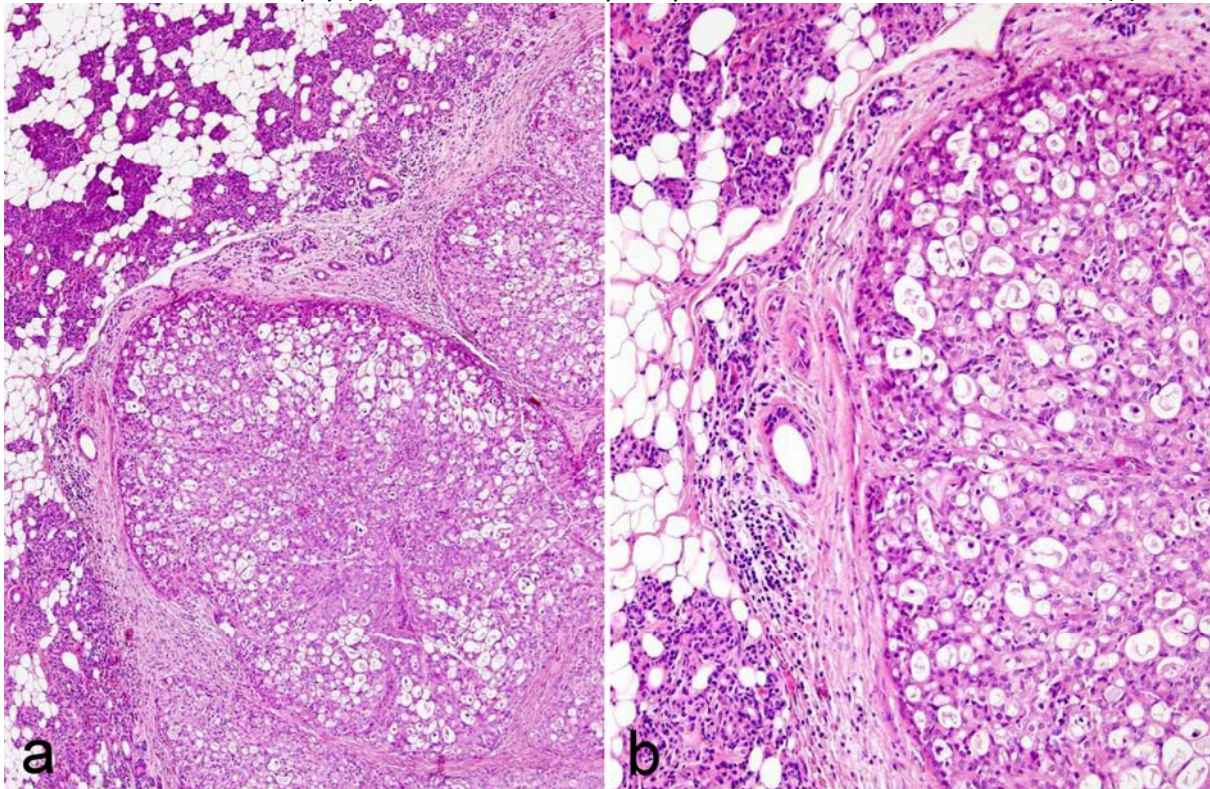
Vysvětlivky: Ž žena, M muž, NRE neradikální odstranění nádoru, RP radikální parotidektomie, CP konzervativní parotidektomie, RT radioterapie, ND – bloková krční disekce, NED bez známek onemocnění, DOD smrt následkem onemocnění, NA není k dispozici, ME metastáza, RE recidiva, LN lymfatická uzlina

2.4.2. Histopatologické a imunohistochemické nálezy

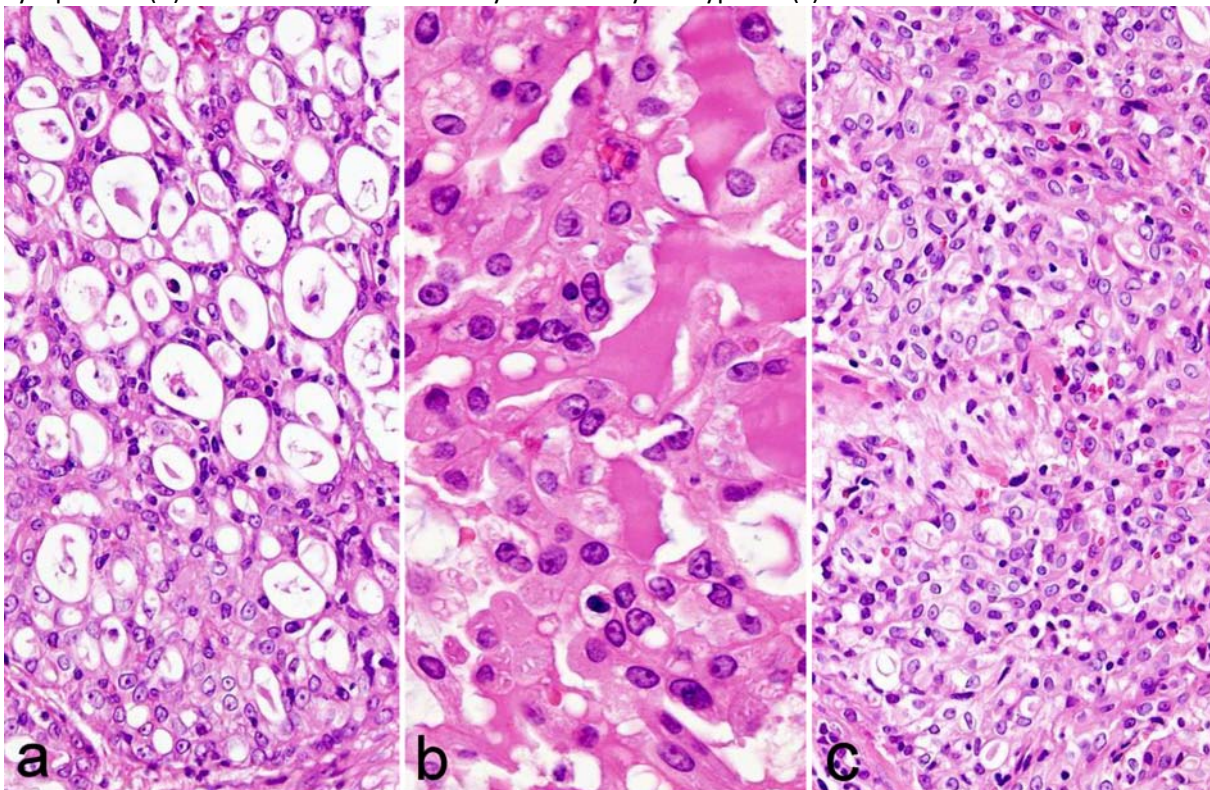
Nádory byly z makroskopického pohledu pružné konzistence, na řezu bělavé až šedé. Histologicky představovaly všechny případy ohraničenou, laločnatou masu rozdělenou fibrózními septy (Obrázek 2.1a) a složenou z mikrocystických, tubulárních a solidních struktur (Obrázek 2.1b). Okraje nádorů byly obvykle ohraničené, ale nezapouzdřené a často byl přítomen invazivní růst do slinné žlázy. U 4 případů se tumor šířil i do okolních tkání mimo slinnou žlázu. Nádorové buňky měly *low grade* vesikulární jádra s jemně zrnitým chromatinem, výrazná, centrálně lokalizovaná jadérka (Obrázek 2.2a) a světle růžovou, granulární, nebo vakuolizovanou cytoplasmu (Obrázek 2.2b). Buněčné atypie byly mírné a mitotické figury byly ve většině případů vzácné (Obrázek 2.2c). Nebyl nalezen žádný důkaz perineurální, nebo vaskulární invaze, nebyla přítomna ani nekróza. Oproti AcicC nebyla u žádného případu pozorována serózní acinární diferenciaci. V mikrocystických a tubulárních prostorách byla přítomna hojná bublinkovitá sekrece (Obrázek 2.3a). Sekreční materiál byl PAS pozitivní a to jak s natrávením diastázou, tak i bez (Obrázek 2.3b). Dále byl pozitivní v barvení mucikarminem, MUC1 (11 z 12 vyšetřených případů) a MUC4 (8 z 12 vyšetřených případů) (Obrázek 2.4a).

Histochemické a imunohistochemické profily všech 16 nádorů jsou shrnuty v Tabulce 2.3. Všechny případy MASC se barvily silně s protilátkami proti CK7, CK8, CK18, S-100 proteinu a vimentinu. Dále byla většina případů signifikantně pozitivních s protilátkami proti CK19 (11 z 12 vyšetřených případů), GCDFP-15 (8 z 11 vyšetřených případů) a EMA (9 z 11 vyšetřených případů) (Obrázek 2.4b). Nádorové buňky rovněž vykazovaly ve všech případech silnou expresi STAT5a a mammaglobinu (Obrázek 2.4c-d). Markery bazálních a myoepiteliálních buněk, jako např. p63, calponin, CK14, aktin hladké svaloviny a CK5/6 byly negativní. Proliferační aktivita byla variabilní s MIB1 indexy v rozmezí 5-28%.

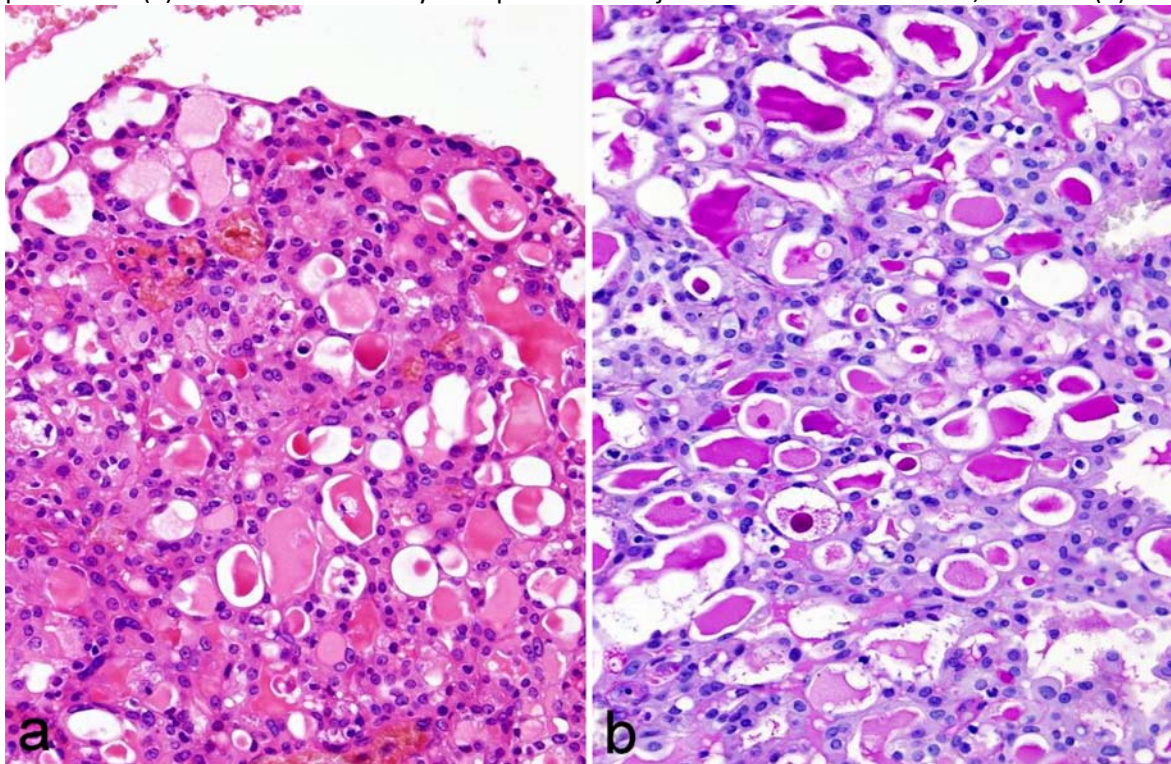
Obrázek 2.1. Histologicky představovaly všechny případy ohraničenou, laločnatou masu rozdělenou fibrózními septy (a), složenou z mikrocystických, tubulárních a solidních struktur (b).



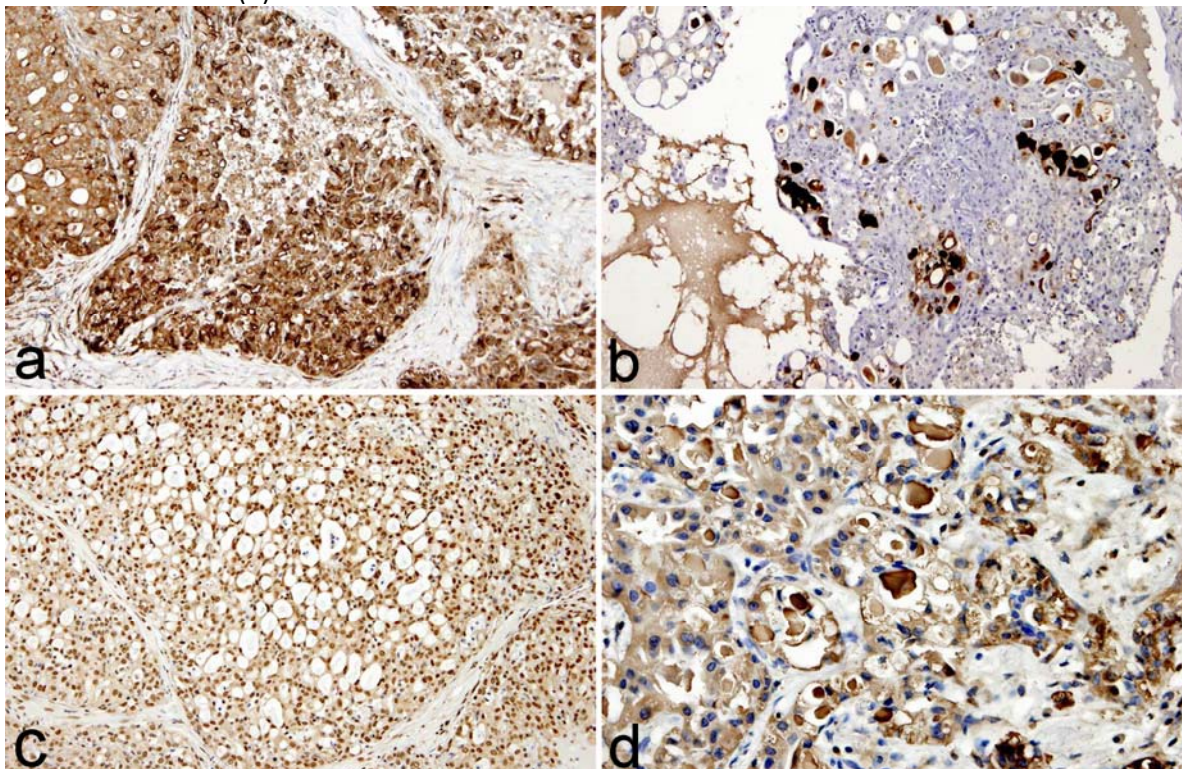
Obrázek 2.2. Nádorové buňky měly *low grade* vesikulární jádra s jemně zrnitým chromatinem, výrazná, centrálně lokalizovaná jádérka (a) a světle růžovou, granulární, nebo vakuolizovanou cytoplasmu (b). Více solidní oblast s mírnými buněčnými atypiami (c).



Obrázek 2.3. Hojná bublinkovitá, nebo homogenní sekrece přítomná v mikrocystických a tubulárních prostorách (a). Sekreční materiál byl PAS pozitivní a to jak s natrávením diastázou, tak i bez (b).



Obrázek 2.4. Imunohistochemický profil. Silná pozitivita s protilátkou proti MUC4 (a), většina případů byla signifikantně pozitivních s protilátkami proti GCDFP-15 (b), nádorové buňky vykazovaly silnou nukleární expresi STAT5a (c), protilátka proti mammaglobinu ve všech případech barvila cytoplazmu a sekreční materiál (d).



Tabulka 2.3. Výsledky imunohistochemických studií

IHC marker	MASC Počet případů: 15	SC prsu (Pozitivní kontroly) Počet případů: 4	Konvenční AciCC, (Negativní kontroly) Počet případů: 12
S-100 protein	15/15	4/4	4/12
Vimentin	15/15	4/4	3/12
CK7	15/15	4/4	8/9
CK8	15/15	4/4	2/10
CK19	15/15	2/4	2/10
CK18	15/15	4/4	9/10
GCDFP-15	8/11	3/4	4/10
Mammaglobin	15/15	4/4	1/11
STAT 5a	15/15	4/4	7/11
MUC1	11/12	4/4	6/8
MUC4	9/11	4/4	0/8
EMA	9/9	4/4	NT
Ki-67	5-28%	5-10%	5-50%
P63	0/9*	0/4*	0/6
Calponin	0/9	0/4	0/6
EGFR	0/9	0/4	0/6
c-erbB-2	0/9	0/4	0/6
ER	0/9	0/4	0/6
PR	0/9	0/4	0/6
AR	0/9	1/4	0/6

*buňky byly imunohistochemicky negativní, ale sekretorický materiál se barvil silně pozitivně

Vysvětlivky: NT nebylo testováno, **IHC** imunohistochemický, **SC** sekreční karcinom, **MASC** sekreční karcinom slinných žláz analogický karcinomu prsu, **AciCC** acinický karcinom

2.4.3. Molekulárně genetické nálezy

16 vzorků MASC od 15 pacientů bylo analyzováno pomocí RT-PCR. Ve 14 případech byla kvalita extrahované RNA dostatečná pro následné zjišťování přítomnosti fúzního genu ETV6-NTRK3 (tzn. amplifikovaly se alespoň dva kontrolní geny). Přítomnost fúzního transkriptu ETV6-NTRK3 byla potvrzena u 13 případů MASC (Tabulka 2.4, Obrázek 2.5) a u všech tří pozitivních kontrol (sekreční karcinom prsu). Příklad 8 byl negativní (Tabulka 2.4, Obrázek 2.5). U žádné z negativních kontrol (různé nádory slinných žlaz se sekreční morfologií a normální, nenádorové kontroly) nebyla prokázána přítomnost translokace genu ETV6.

Translokace zahrnující gen ETV6 byla potvrzena metodou FISH za použití sondy LSI ETV6 (TEL) (12p13) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (VYSIS/Abbott) u všech 11 analyzovatelných případů MASC (Obrázek 2.6) a u všech pozitivních kontrol. Zlom genu ETV6 nebyl detekován u žádného ze 14 případů nádorů slinných žlaz se sekreční morfologií, ani u 10 normálních, nenádorových kontrol.

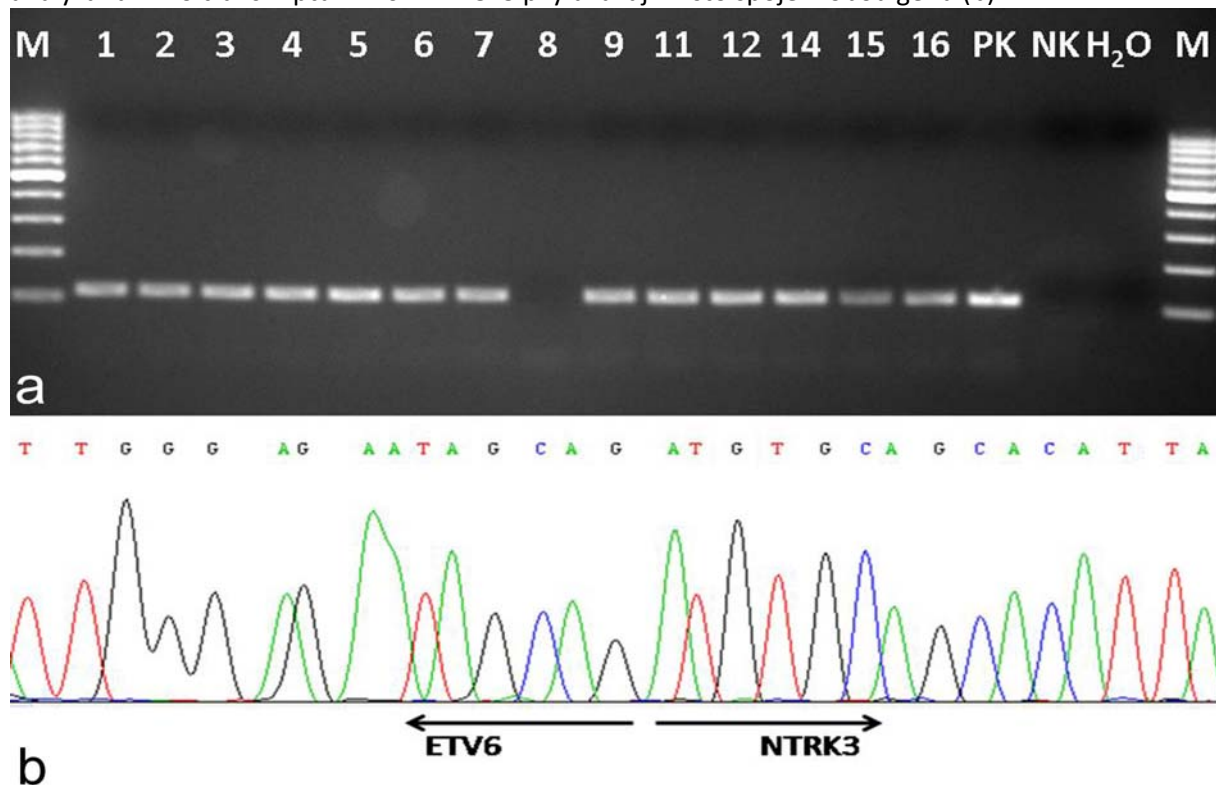
Tabulka 2.4. Výsledky molekulárně genetických studií MASC

		Kontrolní geny			fúzní gen	FISH	Souhrn
		β2M	PBGD	PGK	ETV6-NTRK3	zlom ETV6	
51/Ž	Případ 1	+	+	-	+	NA	+
44/Ž	Případ 2	+	+	-	+	NA	+
48/M	Případ 3	+f	-	-	NA	+	+
		+	+	-	+	+	+
55/M	Případ 4	+	+	+	+	+	+
34/M	Případ 5	+	+	-	+	NA	+
53/M	Případ 6	+	+	+	+	+	+
53/M	Případ 7	+	+	-	+	+	+
55/Ž	Případ 8	+	+	+	-	NA	-
26/M	Případ 9	+	+	+	+	+	+
35/Ž	Případ 10	+f	-	-	NA	NA	NA
46/M	Případ 11	+	+	+	+	+	+
55/M	Případ 12	+	+	+	+	+	+
59/Ž	Případ 13	NT	NT	NT	NT	NT	NT
21/Ž	Případ 14	+	+	+	+	+	+
75/Ž	Případ 15	+	+	+	+	+	+
32/M	Případ 16	+	+	+	+	+	+

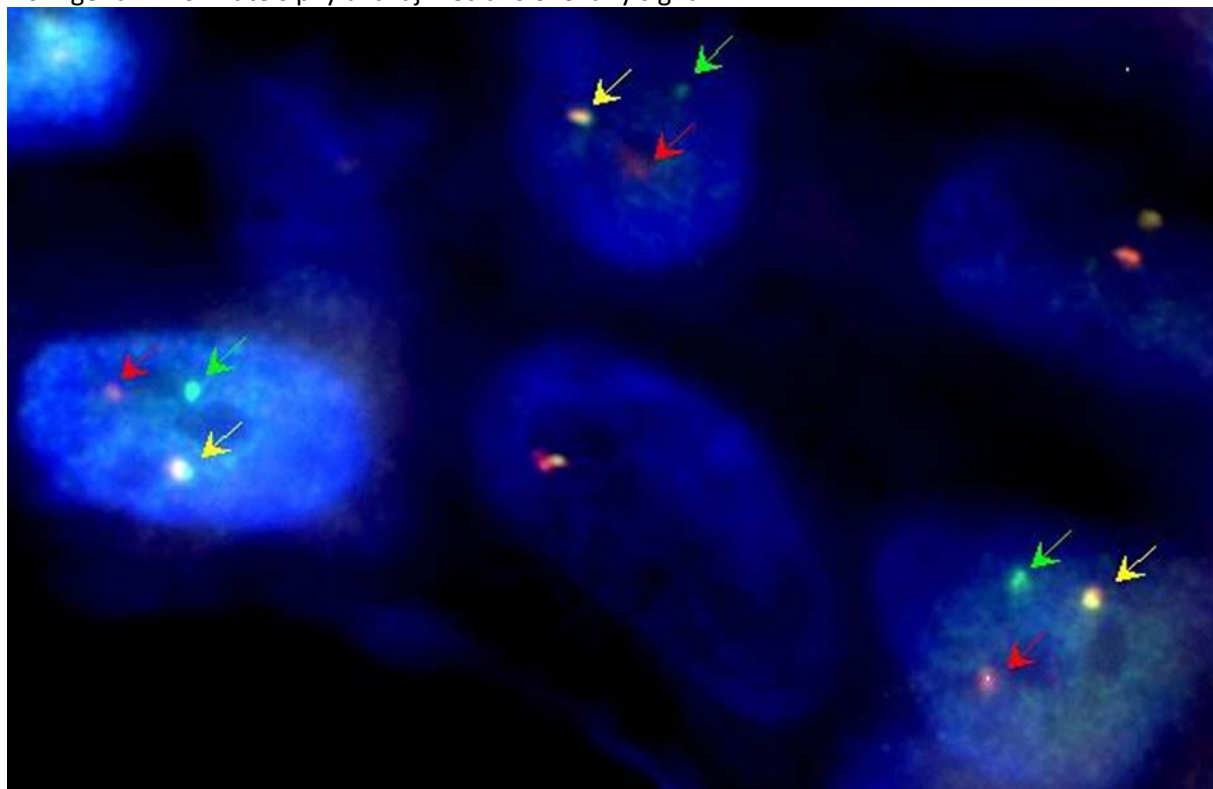
Vzorky byly uznány za translokované, pokud buď RT-PCR, nebo FISH vyšly pozitivní.

Vysvětlivky: Ž žena, M muž, **MASC** Sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu, **NA** nelze analyzovat, **NT** nebylo testováno, **f** slabý PCR produkt

Obrázek 2.5. Expresé fúzního transkriptu ETV6-NTRK3 u MASC a pozitivních kontrol (sekreční karcinom prsu). 1-16 Případy MASC, PK pozitivní kontrola, NK negativní kontrola (a), sekvenační analýza fúzního transkriptu ETV6-NTRK3. Šipky ukazují místo spojení obou genů (b).



Obrázek 2.6. FISH analýza Případu 12 za použití LSI ETV6 (TEL) (12p13) Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe (VYSIS/Abbott). Zelené a červené šipky ukazují rozdělené signály indikující zlom genu ETV6. Žluté šipky ukazují netranslokovaný signál.



2.5. Diskuze

Představujeme klinicko-patologickou studii 16 případů nádorů slinných žlaz s histomorfologickými a imunohistochemickými vlastnostmi připomínajícími sekreční karcinom prsu. Po dobu několika let jsme si uvědomovali existenci neobvyklé, doposud nepopsané, charakteristické skupiny nádorů slinných žlaz nesoucích některé morfologické znaky salivárního AcicC a sekrečního karcinomu prsu. Tato skupina nádorů je charakterizovaná silnou pozitivitou v reakci s protilátkami proti vimentinu a S-100 proteinu.

Mikroskopicky jsou nádory charakterizovány lobulárním růstem, přítomností mikrocystických a glandulárních prostor s hojným výskytem eosinofilního, homogenního, nebo pěníteho sekrečního materiálu, který je pozitivní v PAS reakci, v barvení mucicarminem, MUC1 a MUC4.

U všech analyzovatelných případů, kromě jednoho, zahrnutých v naší studii byla odhalena translokace t(12;15)(p13;q25)(ETV6/NTRK3). Tato translokace se běžně vyskytuje u sekrečního karcinomu prsu. Na základě těchto výsledků navrhuje pro tuto skupinu nádorů označení sekreční karcinom slinných žlaz analogický karcinomu prsu (Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands).

V diferenciální diagnostice připadá v úvahu jako první AcicC. Nádorové buňky MASC připomínají buňky vmezeřených vývodů, mají *low grade* jádra s výraznou jadernou membránou a centrálně lokalizovanými jádérky. Ale nejsou zde přítomny, pro AcicC typické, velké, serózní, acinární buňky, které mají v cytoplazmě PAS pozitivní granula připomínající zymogenní granula. Navíc, AcicC je charakterizován cytologickou a strukturní diverzitou. Nalézáme zde směs serózních, acinárních, vmezeřených, duktálních, vakuolizovaných, vodojasných a nespecifických glandulárních buněk uspořádaných do solidních/lobulárních, mikrocystických, papilárně – cystických a folikulárních struktur (12). Oproti tomu MASC je strukturně homogenní, celý tumor je prostoupen mikrocystickými a lehce dilatovanými glandulárními prostory s přítomností sekrečního materiálu v luminu.

Většina případů MASC byla v minulosti klasifikována jako *low grade* cystadenokarcinom blíže nespecifikovaný, nebo AcicC slinných žlaz. Podle našeho názoru může jednotka AcicC, tak jak je popsána v modré knize WHO (12) a svazku AFIP (11) zahrnovat heterogenní skupinu nádorů. MASC se zjevně liší morfologicky od jakýchkoliv doposud známých nádorů slinných žlaz, mají charakteristický imunohistochemický profil a nesou translokaci ETV6-NTRK3, která se nevyskytuje u konvenčního AcicC. Jsme proto přesvědčeni, že MASC reprezentují skutečně samostatnou skupinu a měly by být klasifikovány odděleně od konvenčního AcicC. Hlavním diferenciálně diagnostickým znakem MASC je absence acinárních buněk. Další diagnostická kritéria zahrnují mikrocystický, plástvovitý vzhled složený z malých cyst často splývajících do větších útvarů připomínajících thyroideální folikuly; tubulární

prostory obsahující sekreční materiál a uniformní neoplastické buňky s hojnou eozinofilní cytoplazmou, která může mít příležitostně pěnitý vzhled.

V nedávné době bylo prokázáno, že sekreční karcinom prsu nese balancovanou chromozomální translokaci t(12;15)(p13;q25), která vede ke vzniku fúzního produktu tvořeného genem ETV6 z chromozomu 12 a genem NTRK3 z chromozomu 15 (31). V této studii jsme jako první prokázali přítomnost translokace t(12;15)(p13;q25) u MASC. V našem souboru jsme tuto translokaci prokázali u všech případů MASC, kromě jednoho. Negativita u tohoto jednoho případu mohla být důsledkem nízké exprese fúzního produktu (6). Oproti tomu, u žádného ze studovaných konvenčních salivárních AciCC nebyla nalezena translokace zahrnující gen ETV6. Reis-Filho a kol. (23) ve své nedávné studii neprokázali pomocí FISH přítomnost translokace zahrnující gen ETV6 u AciCC prsu. Toto pozorování silně podporuje představu, že sekreční karcinom prsu a AciCC prsu jsou dvě různé nádorové jednotky. Podobně jsme také my přesvědčeni, že naše případy MASC slinných žlaz reprezentují jednotku, která je odlišná od konvenčního salivárního AciCC, resp. jakéhokoliv doposud známého karcinomu slinných žlaz.

Translokace ETV6-NTRK3 není zcela specifickým znakem sekrečního karcinomu (18). Tato translokace byla již dříve nalezena u kongenitálních fibrosarkomů, celulárních mesoblastických nefromů a akutní myeloidní leukemie (16), ale v souvislosti s malignitami prsu se přítomnost translokace ETV6-NTRK3 zdá být omezena pouze na sekreční karcinom (20). Biologickým důsledkem translokace je fúze transkripčního regulátoru (ETV6) s membránovou receptorovou kinázou (NTRK3). Tento fúzní produkt aktivuje buněčnou proliferaci a přežití buňky. Přítomnost fúzního produktu ETV6-NTRK3 nebyla doposud popsána u žádného z nádorů slinných žlaz.

Slinné a prsní žlázy jsou shodně tvořeny duktulo acinárními exokrinními žlázami. Proto není překvapující, že se ve slinných a prsních tkáních vyskytují histologicky podobné léze a nádory. Jako příklady nádorů, které mohou být nalezeny jak v prsních, tak ve slinných žlazách bychom mohli uvést adenoidní cystický karcinom, mukoepidermoidní karcinom a pleomorfní adenom (4, 13). Tyto neoplázie slinných žlaz vykazují silnou histopatologickou podobnost prsním nádorům, ale přestože jsou si hodně podobné, nejsou úplně identické a mohou vykazovat signifikantní odlišnosti v klinickém průběhu. Nejlépe je to vidět na příkladu salivárního epiteliálně myoepiteliálního karcinomu (26), který je morfologicky identický s adenomyoepiteliomem prsu (27), ale na rozdíl od tohoto nádoru se jedná o skutečnou malignitu, často invazivně rostoucí a mající nízký, ale nesporný potenciál k tvorbě metastáz. Oproti tomu adenomyoepiteliom prsu je benigní nádor. Podobně např. adenoidní cystický karcinom slinných žlaz je neúprosně rostoucí, letální nádor, kdežto jeho morfologicky identický mammární protějšek je obvykle zcela neškodný tumor.

Nejčastějším nálezem v patologii prsu je benigní fibrocystická mastopatie. Dlouhou dobu nebyl znám protějšek tohoto onemocnění ve slinných žlázách, ale nedávno byla popsána tzv. sklerozující polycystická adenóza (SPA), což je jednotka odpovídající nádorové lézi velkých slinných žlaz (29). Ačkoliv má SPA řadu histologických podobností se svým mammárním protějškem, ve skutečnosti reprezentuje opravdovou neoplázii charakterizovanou klonalitou, fokální dysplázií a tendencí k recidivám (28).

Doposud se soudilo, že se sekreční karcinom vyskytuje pouze v mléčné žláze, nicméně my věříme, že tato studie přináší průkaz dalších analogických nádorů vyskytujících se v obou orgánech, kde MASC je protějškem sekrečního karcinomu prsu vyskytujícím se ve slinné žláze.

Navzdory morfologickým a imunohistochemickým podobnostem se sekreční karcinom prsu a MASC slinných žlaz liší pokud jde o klinický průběh. Sekreční karcinomy prsu mají spíše mírný klinický průběh, mají sklon k lokálním recidivám a je pro ně charakteristické delší přežití (17). Oproti tomu salivární MASC reprezentují široké spektrum klinických manifestací zahrnujících případy s mírným průběhem, ale i případy s rychlým klinickým průběhem charakterizovaným maligní diseminací onemocnění a končící smrtí.

STAT (signal transducer and activator of transcription) molekuly jsou zodpovědné za transkripci řady diferenciačních a regulačních proteinů u nádorů prsu (8). Bylo prokázáno, že transkripční faktor STAT5a je důležitý pro diferenciaci a růst mléčné žlázy (22). Bylo demonstrováno, že imunohistochemicky lze protein STAT5a prokázat v cytoplasmě a jádře u řady buněčných typů zahrnujících prsní epitel, adipocyty, leukocyty a endoteliální buňky (7). Částečně zvýšená aktivita je přítomna u buněk se sekreční funkcí, včetně buněk sekrečního karcinomu prsu (30). Expresi STAT5a byla pozorována u buněk prsu podstupujících sekreční změny. V naší studii jsme imunohistochemicky zjišťovali expresi STAT5a u všech případů MASC. Oproti konvenčním AcicC, které postrádají expresi STAT5a, vykazovaly všechny případy MASC silnou jadernou expresi STAT5a. Tento nález může mít spojitost s chromozomální translokací t(12;15)(p13;q25), asociovanou jak se sekrečním karcinomem prsu, tak i slinných žlaz (30).

Mammaglobin je sekreční protein s molekulovou velikostí 10,5 kDa, který je overexprimován u karcinomů prsu (5). Pozitivní reakce s protilátkami proti mammaglobinu je pozorována také u endometriálních karcinomů a u podstatné části karcinomů potních žlaz, ale u jiných tkání je exprese mammaglobinu velice omezená (5). Pozitivní reakce proti mammaglobinu byla očekávaná také u nádorů slinných žlaz, ale žádné intenzivní barvení nebylo doposud u těchto nádorů pozorováno (5). Zdá se, že mammaglobin je zahrnut v mechanismu buněčné sekrece, není tedy překvapením, že jsme našli silnou overexpresi mammaglobinu u většiny případů MASC.

Epiteliální muciny MUC1 a MUC4 jsou transmembránové, nebo na membránu napojené glykoproteinové komponenty hlenu. V normálních slinných žlázách jsou MUC1 a MUC4 exprimovány v exkretčních žíhaných vývodech a někdy také v acinárních strukturách (2). MUC1 se barví převážně v apikálních částech buněčných membrán, kdežto MUC4 bývá cytoplazmaticky pozitivní převážně v apikální a supranukleární zóně (2). V našem souboru byla exprese MUC1 a MUC4 přítomna, kromě buněčných membrán, také v cytoplazmě neoplastických buněk a v sekrečním materiálu. V expresi obou mucinů nebyl signifikantní rozdíl. Oproti předchozím studiím korelujícím vysokou expresí MUC4 s nízkou agresivitou mukoepidermoidního karcinomu (2) jsme nebyli schopni demonstrovat žádný prognostický význam exprese MUC1 a MUC4 u MASC.

2.6. Závěr

Prostudovali jsme přítomnost translokace $t(12;15)(p13;q25)$ ETV-NTRK3 u souboru konvenčních salivárních AciCC (12 případů), prsních sekrečních karcinomů (3 případy) a u 16 případů MASC. Přítomnost translokace $t(12;15)(p13;q25)$ ETV-NTRK3 byla prokázána u všech analyzovatelných případů MASC, kromě jednoho a u žádného konvenčního salivárního AciCC. MASC se zjevně liší morfologicky od jakýchkoliv doposud známých nádorů slinných žláz, mají charakteristický imunohistochemický profil a nesou translokaci ETV6-NTRK3, která se nevyskytuje u konvenčního AciCC. Jsme proto přesvědčeni, že MASC reprezentují skutečně samostatnou skupinu a měly by být klasifikovány odděleně od konvenčního AciCC.

Výsledky této studie byly použity k přípravě publikace přijaté do tisku v American Journal of Surgical Pathology (Skalova A., Vanecek T., Sima R., Laco J., Weinreb I., Perez-Ordóñez B., Starek I., Geierova M., Simpson RHW., Passador-Santos F., Ryska A., Leivo I., Kinkor Z., Michal M. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the *ETV6-NTRK3* fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity.).

2.7. Literatura

1. Akhtar M, Robinson C, Ashraf M, Godwin JT. Secretory carcinoma of the breast in adults: light and electron microscopic study of three cases with review of the literature. *Cancer* 1983;51:2245-2254.
2. Alos L, Lujan B, Castillo M, Nadal A, Carreiras M, Caballero M, de Bolos C, Cardesa A. Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands. *Am J Surg Pathol* 2005;29:806-813.
3. Antonescu CR, Kawai A, Leung DH, Lonardo F, Woodruff JM, Healey JH, Ladanyi M. Strong association of SYT-SSX fusion type and morphologic epithelial differentiation in synovial sarcoma. *Diagn Mol Pathol*. 2000;9(1):1-8.
4. Bennet AK, Mills SE, Wick MR. Salivary-type neoplasms of the breast and lung. *Semin Diagn Pathol* 2003;20:279-304.
5. Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFP-15. An immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol* 2007;127:103-113.
6. Bourgeois JM, Knezevich SR, Mathers JA, Sorensen PH. Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):937-46.
7. Bratthauer GL, Strauss BL, Tavassoli FA. STAT 5a expression in various lesions of the breast. *Virchows Archiv* 2006;448:165-71.
8. Clevenger CV. Roles and regulation of STAT family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol* 2004;165:1449-60.
9. Damiani S, Pasquinelli G, Lamovec J, Peterse JL, Eusebi V. Acinic cell carcinoma of the breast: an immunohistochemical and electron microscopic study. *Virchows Arch* 2000;437:74-81.
10. Diallo R, Schaeffer KL, Bankfalvi A, et al: Secretory carcinoma of the breast: a distinct variant of invasive ductal carcinoma assessed by comparative genomic hybridization and immunohistochemistry. *Hum Pathol* 2003;34:1299-305.
11. Ellis GL, Auclair PL. Acinic cell adenocarcinoma. In: *AFIP Atlas of Tumor Pathology, Fourth Series, Fascicle 9. Tumors of Salivary Glands*. ARP Press. Silver Spring, Maryland, 2008.
12. Ellis G, Simpson RHW. Acinic cell carcinoma. In: Barnes EL, Eveson JW, Reichart P, et al, eds. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon, IARC Press, 2005, pp. 216-218.
13. Foschini MP, Reis-Filho JS, Eusebi V, Lakhani SR. Salivary gland-like tumors of the breast: surgical and molecular pathology. *J Clin Pathol* 2003;56:497-506

14. Gaffney R, Chakerian A, O'Connell JX, Mathers J, Garner K, Joste N, Viswanatha DS. Novel fluorescent ligase detection reaction and flow cytometric analysis of SYT-SSX fusions in synovial sarcoma. *J Mol Diagn.* 2003;5:127–135.
15. Hirokawa M, Sugihara K, Sai T, et al. Secretory carcinoma of the breast: a tumour analogous to salivary gland acinic cell carcinoma. *Histopathology* 2002;40:223-229.
16. Knezevich SR, Garnett MJ, Pysher TJ, Beckwith JB, Grundy PE, Sorensen PH. ETV6-NTRK3 gene fusions and trisomy 11 establish a histogenetic link between mesoblastic nephroma and congenital fibrosarcoma. *Cancer Res* 1998;15:5046-8.
17. Krausz T, Jenkins D, Grontoft O, Pollock DJ, Azzopardi JG. Secretory carcinoma of the breast in adults: emphasis on the late recurrence and metastasis. *Histopathology* 1989;14: 25-36.
18. Lannon CL, Sorensen PH. ETV6-NTRK3: a chimeric protein tyrosine kinase with transformation activity in multiple cell lineages. *Semin Cancer Biol* 2005;15:215-223.
19. Li Z, Tognon CE, Godinho FJ, et al. ETV6-NTRK3 fusion oncogene initiates breast cancer from committed mammary progenitors via activation of AP1 complex. *Cancer Cell* 2007;12:542-558.
20. Makretsov N, He M, Hayes M et al: A fluorescence in situ hybridization study of ETV6-NTRK3 fusion gene in secretory breast carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2004;40:152-157.
21. McDivitt RW, Stewart FW: Breast carcinoma in children. *JAMA* 1966;195:144-146.
22. Miyoshi K, Shillingford JM, Smith GH, et al. Signal transducer and activator of transcription (STAT) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol* 2001;155:531-42.
23. Reis-Filho JS, Natrajan R, Vatcheva R, Lambors MBK, Marchio C, Mahler-Araujo B, Paish C, Hodi Z, Eusebi V, Ellis IO. Is acinic cell carcinoma a variant of secretory carcinoma? A FISH study using ETV6 split apart probes. *Histopathology* 2008;52:840-846.
24. Roncaroli F, Lamovec J, Zidar A, Eusebi V. Acinic cell-like carcinoma of the breast. *Virchows Arch* 1996;429:69-74.
25. Rosen PP, Cranor ML. Secretory carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:141-144.
26. Seethala RR, Barnes EL, Hunt JL. Epithelial-myoeepithelial carcinoma. A review of the clinicopathologic spectrum and immunophenotypic characteristics in 61 tumors of salivary glands and upper respiratory tract. *Am J Surg Pathol* 2007;31:44-57
27. Seifert G. Are adenomyoepithelioma of the breast and epithelial-myoeepithelial carcinomas of salivary glands identical tumors? *Virchows Arch* 1998; 433: 285-8.
28. Skálová A, Gnepp DR, Simpson RHW, Lewis JE, Janssen D, Sima R, Vanecek T, di Palma S, Michal M. Clonal nature of sclerosing polycystic adenosis of salivary glands demonstrated by using the

polymorphism of the human androgen receptor locus (HUMARA) as a marker. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:939-944.

29. Skálová A, Michal M, Simpson RHW, Stárek I, Příkladná J, Pfaltz M. Sclerosing polycystic adenosis of parotid gland with focal dysplasia and ductal carcinoma in situ. Report of three cases with immunohistochemical and ultrastructural examination. *Virchows Arch* 2002;440:29-35.
30. Strauss BL, Bratthauer GL, Tavassoli FA. STAT 5a expression in the breast is maintained in secretory carcinoma, in contrast to other histologic types. *Hum Pathol* 2006;37:586-592.
31. Tognon CE, Knezevich SR, Huntsman D, Roskelly CD, Meinyk N, Mathers JA, Becker L, Corneiro F, MacPherson N, Horsman D, Poremba C, Sorensen PH. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell* 2002;2:367-376.
32. Tsuji S, Hisaoka M, Morimitsu Y, Hashimoto H, Shimajiri S, Komiya S, Ushijima M, Nakamura T. Detection of SYT-SSX fusion transcripts in synovial sarcoma by reverse transcription-polymerase chain reaction using archival paraffin-embedded tissues. *Am J Pathol.* 1998;153: 1807–1812.

3. Příloha - Souhrn dalších publikací autora dizertační práce

3.1. Boudova L, Vanecek T, Sima R, Bouda J, Hes O, Fakan F. Role of p27Kip1 protein in the cell cycle and its appearance in lymphoid tissues, particularly non-Hodgkin's B-cell lymphomas. (Review). Cesk Patol. 2003 Jul;39(3):126-9.

Souhrn

Progrese buněčného cyklu z fáze G1 do fáze S je řízena cyklin-dependentními kinázami (CDK), na které působí aktivátory a inhibitory. Protein p27^{Kip1} je inhibítoem CDK, který ovládá přechod z fáze G1 do fáze S. Tento protein však zřejmě může mít také pozitivní regulační vliv. V nenádorových tkáních a ve většině zkoumaných tumorů je mezi imunohistochemickou pozitivitou p27^{Kip1} a proliferačním indexem nepřímý úměrný vztah. Výjimku z této závislosti mezi B-lymfomy představují například lymfom z plášťových buněk, leukémie z vlasatých buněk a imunoblastický typ difúzního velkobuněčného B-lymfomu s pozitivitou latentního membránového proteinu viru Epstein-Barré u pacientů s AIDS. Ztráta exprese p27^{Kip1} je negativním prognostickým faktorem u mnoha nádorů, včetně většiny B-lymfomů.

3.2. Daum O, Hes O, Vanecek T, Benes Z, Sima R, Zamecnik M, Mukensnabl P, Hadravská S, Curik R, Michal M. Vanek's tumor (inflammatory fibroid polyp). Report of 18 cases and comparison with three cases of original Vanek's series. Ann Diagn Pathol. 2003 Dec;7(6):337-47.

Souhrn

Soubor představuje osmnáct případů Vaňkova tumoru. Mezi pacienty bylo devět mužů a devět žen, jejichž věk se pohyboval v rozmezí 45 až 93 let (průměrný věk 66,2 let). Devět případů bylo klinicky diagnostikováno jako polyp žaludečního antra, pět jako polyp žaludku (blíže neurčeno), jeden polyp byl lokalizován v ileu a tři zbývající v tenkém střevě (blíže neurčeno). Velikost byla známa u třinácti polypů. U těchto se největší rozměr pohyboval od 0,4 do 5 cm (průměr 2,2 cm). Imunohistochemicky byly afekce pozitivní v průkazu vimentinu (18/18) a antigenu CD34 (15/18). Všechny případy negativní v průkazu CD34 také postrádaly koncentrické formace vřetenitých buněk okolo žlázek a cév. Rozdílný imunofenotyp a absence koncentrických formací může být vysvětlena existencí dvou různých lézí běžně společně označovaných jako Vaňkův tumor (inflatorní fibroidní polyp), nebo hypotézou o různých vývojových stádiích jedné entity. V diferenciací diagnóze je třeba odlišit zejména eosinofilní gastroenteritidu, gastrointestinální stromální tumor, inflamatorní pseudotumor, hemangioendoteliom a hemangiopericytom. Narozdíl od gastrointestinálního stromálního tumoru, molekulárně genetické vyšetření neprokázalo substituci, delecí ani inserci v exonech 11 a 9 genu c-kit v žádném z analyzovaných Vaňkových tumorů.

3.3. Michal M, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Boudova L, Brouckova M. Primary capillary hemangioblastoma of peripheral soft tissues. Am J Surg Pathol. 2004 Jul;28(7):962-6.

Souhrn

V této práci je prezentován případ kapilárního hemangioblastomu lokalizovaného v periferní měkké tkáni vnitřního kotníku u 74 leté ženy. Nádor byl neopouzdřený, ale ostře ohraničený, velikosti 2,5 cm, barvy žlutobílé, s výskytem červenohnědých skvrn a malých cyst (velikosti do 2 mm) vyplněných krví. Makroskopicky nebyl nádor napojen na žádný z periferních nervů. Znamky von Hippel-Lindauovy choroby byly vyloučeny důkladným klinickým vyšetřením. Žádný další tumor, ani erytrocytóza nebyly u pacientky nalezeny. Imunohistochemicky reagovaly stromální buňky nádoru silně s protilátkami proti proteinu S-100, NSE a calponinu a byly negativní s protilátkami proti GFAP, CD34, CD31, cytokeratinům, aktinu, desminu, EMA a HMB-45. Endotel kapilár reagoval pozitivně s protilátkami proti CD31, CD34 a Faktoru VIII. Kapilární pericyty byly aktin pozitivní. Všechny buňky nádoru se barvily pozitivně protilátkou proti vimentinu. Protilátka proti MIB1 reagovala pouze v malém počtu buněk (<1%). Ultrastrukturálně obsahovaly stromální buňky průhlednou cytoplazmu s lipidovými kapénkami, v malém množství drsné endoplazmatické retikulum a glykogenové partikule. Žádné elektron-denzní struktury charakteristické pro sekreční granula nebyly ve stromálních buňkách pozorovány. Nebyly nalezeny mutace kódujících oblastí genu VHL.

3.4. Daum O, Vanecek T, Sima R, Curik R, Zamecnik M, Yamanaka S, Mukensnabl P, Benes Z, Michal M. Reactive nodular fibrous pseudotumors of the gastrointestinal tract: report of 8 cases. Int J Surg Pathol. 2004 Oct;12(4):365-74.

Souhrn

Studie prezentuje osm případů reaktivního nodulárního fibrózního pseudotumoru gastrointestinálního traktu. Soubor pacientů byl tvořen šesti muži a dvěma ženami, věkové rozmezí bylo 1 - 68 let (průměrný věk 41,5 roku). Pět lézí bylo lokalizováno v tlustém střevě. Z těchto byly dvě v sigmatu, jedna v céku, jedna v appendixu a u jedné nebyla lokalizace v tlustém střevě blíže specifikována. Zbývající tři případy postihovaly tenké střevo. Největší rozměr těchto tumoriformních útvarů se pohyboval v rozmezí 3 až 10 cm (průměr 6,2 cm). Histologicky byly afekce tvořeny hvězdovitými nebo vřetenitými buňkami připomínajícími fibroblasty v nepravidelném uspořádání nebo tvořícími krátké svazky, uloženými ve stromatu bohatým na kolagen, s řídkými disperzními mononukleárními zánětlivými elementy často tvořícími lymfoidní folikly. Imunohistochemicky byly vřetenité a hvězdovité buňky pozitivní v průkazu vimentinu (7/7), hladkosvalového aktinu (8/8), aktinu specifického pro svalovinu (5/7), cytokeratinů protilátkou AE1/AE3 (6/7) a CAM 5.2 (1/7), a antigenu CD68 (1/7). Žádný případ (0/8) nereagoval s protilátkou proti antigenu CD117 (c-kit). Narozdíl od gastrointestinálního stromálního tumoru také molekulárně genetické vyšetření neprokázalo substituci, delecii ani inserci v exonech 11 a 9 genu c-kit v žádném z analyzovaných reaktivních nodulárních fibrózních pseudotumorů. Elektronmikroskopické vyšetření vřetenitých buněk prokázalo ultrastrukturální znaky myofibroblastů. Vzhledem k výše uvedeným výsledkům histologického, imunohistochemického a elektronmikroskopického vyšetření, zvláště vzhledem k imunoexpresi cytokeratinů o nízké molekulární hmotnosti, předpokládáme, že jde o proliferaci of multipotentních subserózních buněk spíše než běžných myofibroblastů či fibroblastů.

3.5. Kazakov DV, Pitha J, Sima R, Vanecek T, Shelekhova K, Mukensnabl P, Michal M. Hybrid peripheral nerve sheath tumors: Schwannoma-perineurioma and neurofibroma-perineurioma. A report of three cases in extradigital locations. Ann Diagn Pathol. 2005 Feb;9(1):16-23.

Souhrn

Publikace prezentuje tři případy podkožních nádorů s hybridními rysy schwannomu a perineuriomu (1 případ) a neurofibromu a perineuriomu (2 případy), které se vyskytly u dvou žen ve věku 50 a 52 let a jednoho muže ve věku 52 let. Nádory byly lokalizovány v oblasti lopatky, v kůži prsu a v oblasti kolena. Velikost nádorů byla 1,5, 4 a 5 cm. Žádný z pacientů nejevil známky neurofibromatózy. Všechny nádory byly operativně odstraněny a pacienti setrvali bez příznaků choroby po dobu 1-4 let. Klasifikace lézí do kategorií schwannom-perineuriom a neurofibrom-perineuriom spočívala na histopatologických a imunohistochemických nálezech. Ultrastrukturální studie byla provedena u jednoho případu neurofibromu-perineuriomu. Všechny případy byly testovány na přítomnost mutací genu NF-2. U jednoho případu (neurofibrom-perineuriom) byla nalezena bodová mutace v exonu 15 genu NF-2.

3.6. Kazakov DV, Hes O, Hora M, Sima R, Michal M. Primary intranodal cellular angiolipoma. Int J Surg Pathol. 2005 Jan;13(1):99-101.

Souhrn

Angiolipom je vzácný benigní nádor měkkých tkání, který se nejčastěji vyskytuje u mladých mužů ve formě mnohočetných, malých, podkožních citlivých až bolestivých nodulů, přednostně se vyskytujících na předloktí. Předkládáme případ angiolipomu, který byl nalezen u 67 letého muže s adenokarcinomem prostaty, který podstoupil radikální retropubickou prostatektomií s indikovanou pelvickou lymfadenektomií. Byla odstraněna prostata a 3 lymfatické uzliny lokalizované ve *fossa obturatoria*. Makroskopicky byla odhalena na řezu jedné z uzlin 8x5 mm velká, vejčitá, ostře ohraničená, nezapouzdřená, šedá léze podezřelá jako metastáza adenokarcinomu. Mikroskopicky byla majoritní část lymfatické uzliny nahrazena zralou metaplastickou tukovou tkání. Angiolipom byl dobře ohraničený, nezapouzdřený, skládal se z mnoha malých cév lemovaných monomorfními, plochými, nebo vřetenitými endoteliálními buňkami. Mnoho cév bylo vyplněno fibrinovými sraženinami. Vyskytovalo se zde malé množství zralých adipocytů. Místy byly pozorovány oblasti se zvýšeným počtem buněk a naznačeným solidním růstem endoteliálních buněk. Je známo, že lymfatické uzliny mohou být vzácně primárním místem vzniku řady nádorů, které se obvykle vyskytují v jiných orgánech. Znalost těchto nádorů je důležitá proto, aby nebyly mylně interpretovány jako metastatické léze. Mezi nejčastěji nalézané příklady patří pigmentované névy, palisádující myofibroblastom, různé benigní epiteliální inkluze, serózní cystické tumory s hraniční malignitou a hyperplastické mezotheliální inkluze. V tomto sdělení prezentujeme, že angiolipom je další neoplázií, jejíž primární výskyt v lymfatické uzlině by neměl být nesprávně interpretován jako metastatický tumor, nebo maligní vaskulární tumor.

3.7. Hes O, Benakova K, Vanecek T, Sima R, Michal M. Clear cell type of renal cell carcinoma with numerous hyaline globules: a diagnostic pitfall. Pathol Int. 2005 Mar;55(3):150-4.

Souhrn

Publikace představuje jedinečný a nikdy v minulosti publikovaný příklad světlobuněčného renálního karcinomu (CRCC) nalezeného mezi 9000 primárními nádory ledvin. Nádor obsahoval v cytoplazmě takovou hustotu hyalinních částic, že zcela zastínila morfologii neoplastických buněk. Výsledný zjev nádoru byl zcela zavádějící a odlišný od konvenčního RCC. Hyalinní částice byly v průměru velké 7-30 μm . Byly sklovité a v barvení hematoxylinem eosinem měly světlé, až lehce eosinofilní zbarvení. Hyalinní částice se pozitivně barvily v PAS reakci a negativně stříbrem a Haleho koloidním železem. Imunohistochemicky byly negativní s protilátkami proti antigenu *Mycobacterium bovis*. Ultrastrukturálně byly hyalinní částice tvořeny amorfní hmotou hvězdovitěho tvaru. Hyalinní částice byly lokalizovány v drsném endoplazmatickém retikulu. Molekulárně geneticky byla v nádoru nalezena posunová mutace v distální části exonu 3 genu VHL způsobující elongaci VHL proteinu. Tento nález podporuje diagnózu CRCC.

3.8. Daum O, Klecka J, Ferda J, Treska V, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M. Gastrointestinal stromal tumor of the pancreas: case report with documentation of KIT gene mutation. Virchows Arch. 2005 Apr;446(4):470-2.

Souhrn

Gastrointestinální stromální tumor (GIST) je nejčastější mesenchymální nádor trávicí trubice. Přestože bývá vzácněji popisován i v některých extragastrointestinálních lokalizacích, jako ve žlučníku, močovém měchýři, omentu a mesenteriu, až do konce roku 2003 nebyl popsán molekulárně geneticky prokázaný GIST pankreatu. Tato kazuistika popisuje případ (extra)gastrointestinálního stromálního tumoru, tedy (E)GISTu hlavy pankreatu u 70-leté ženy. Nádor byl dobře ohraničený, pružný, bílý, s centrální dutinou. Největší rozměr tumoru byl 5 cm. Histologicky byl tvořen především vřetenitými buňkami s relativně četnými perinukleárními vakuolami. Skeinoidní vlákna byla dobře patrná. V centrální části nádoru byla přítomna perivaskulární hyalinizace, myxoidní změny, ložiska nekrózy a cystické degenerace. Mitotický index byl 2 mitózy/50 zorných polí velkého zvětšení (HPF). Nádorové buňky vykazovaly imunoexpresi vimentinu, KIT proteinu a hladkosvalového aktinu. Molekulárně genetické vyšetření tumoru prokázalo delecí 6 bazí v exonu 11 genu c-kit. Podle našeho přesvědčení založeného na vyhledávání literatury v elektronických databázích je toto první případ adekvátně (imunohistochemicky a molekulárně geneticky) diagnostikovaného GISTu klinicky se prezentujícího jako tumor pankreatu.

3.9. Daum O., Sima R., Mukensnabl P., Vanecek T., Brouckova M., Michal M.: Pigmented Solid-Pseudopapillary Neoplasm of the Pancreas. Pathol Int. 2005 May;55(5):280-4.

Souhrn

Publikace představuje doposud neznámou variantu solidní pseudopapilární neoplázie pankreatu. Nádor se vyskytoval v hlavě pankreatu 57 leté ženy. Jednalo se o dobře ohraničený, zapouzdřený útvar měřící v průměru 27 mm. Barva byla různorodá, od žluté po hnědou, na řezu měl povrch šedou barvu. Histologicky byla neoplázie tvořena uniformními, mnohostěnnými buňkami uspořádanými okolo jemných fibrovaskulárních jader, které si uchovávaly svůj solidní charakter na periferii, kdežto centrální části nádoru byly charakterizovány výskytem papil a menších pseudocyst. Nebyla detekována ani mitotická aktivita, ani invazivní růst. Nádorové buňky byly imunohistochemicky pozitivní s protilátkami proti vimentinu, neuron-specifické endoláze a CD56 a negativní v reakci s protilátkami proti ostatním neuroendokrinním markerům, cytokeratinům, melanocytickým markerům a pankreatické amyláze. Kromě těchto typických nálezů byly nalezeny intracelulární pigmentové granule v tmavě hnědých částech nádoru. Tyto granule se pozitivně barvily v PAS reakci po natrávení diastázou, sudan black B a ve Schmorlově barvivu. Oproti tomu se nebarvily v reakcích dle Fontana-Masson, Ziehl-Neelsen a Perls. Pigment se ultrastrukturálně skládal z denzních granul s lipidovými kapénkami, připomínajících modifikované lysozomy. Tyto výsledky vylučují možnost melanogenního původu pigmentu, místo toho jej determinují jako lipofuchsin.

3.10. Hes O, Vanecek T, Sima R, Hora M, Velickinova H, Grossmann P, Kovar J, Michal M. Tumorous diseases in patients with the testicular feminization syndrome ("androgen insensitivity" syndrome) - description of two cases. Ceska Gynecol. 2005 Mar;70(2):113-7.

Souhrn

Cíl studie: Popis nádorů, které se vyskytly u dvou případů testikulární feminizace.

Typ studie: Kazuistika.

Název a sídlo pracoviště: Oddělení speciální diagnostiky ŠPAÚ, FN Plzeň.

Předmět a metoda studie: Ze čtyř případů syndromu testikulární feminizace v našem registru byly vybrány dva. „Pacientky“ byly staré 45, respektive 84 let. Resekovaný materiál byl rutinně zpracován, barven hematoxylinem a eosinem a dále inhibinem, cytokeratinem 20, placentární alkalickou fosfatázou, CD 99, Melanem A a hCG. U obou pacientů byly nalezeny adenomy ze Sertoliho buněk. Starší pacient měl navíc neklasifikovatelný *sex cord* tumor blízký nádoru z Leydigových buněk. Počet pohlavních chromozómů byl stanoven pomocí FISH.

Závěr: Pacienti se syndromem testikulární feminizace jsou často postiženi jak benigními tak maligními nádory v nesestouplých varlatech. Popisujeme dva benigní adenomy ze Sertoliho buněk a jeden *sex cord* tumor nejasného biologického chování. U pacientů s tímto syndromem by měla být odstraněna varlata po pubertě s následnou estrogenní terapií.

3.11. Kazakov DV, Sima R, Michal M. Hemosiderotic fibrohistiocytic lipomatous lesion: clinical correlation with venous stasis. Virchows Arch. 2005 Jul;447(1):103-6.

Souhrn

Hemosiderotická fibrohistiocytární lipomatózní léze (HFLL) je nedávno navržená lipomatózní jednotka. Původně se předpokládalo, že HFLL je benigní reaktivní léze vznikající jako následek dřívějšího traumatu. V tomto článku předkládáme dvě pacientky s HFLL, které také trpěly chronickou žilní nedostatečností způsobenou varikózou hlubokých žil dolních končetin. Obě pacientky byly ženy středního věku se solitárními, špatně ohraničenými podkožními lézemi na dolních končetinách. Histopatologické vyšetření odhalilo typické znaky HFLL. Myslíme si, že klinické znaky jako pokročilý věk, ženské pohlaví a specifická lokace lézí společně s charakteristickými histopatologickými znaky umožňují předpokládat, že narušená krevní cirkulace (tedy městnání krve) je zahrnuta v patogenezi HFLL. Předpokládáme, že proliferace vřetenitých fibroblastických a myofibroblastických buněk a kapilár, extravazace erytrocytů a ukládání hemosiderinu v lipomatózní tkáni HFLL může reprezentovat přehnanou odpověď tkáně na městnání krve, při kterém zvýšený žilní a kapilární tlak, snížená saturace kyslíkem a otok stimuluje proliferaci výše zmíněných elementů a vede k extravazaci erytrocytů. Podobný histopatologický nález je pozorován u akroangiodermatitidy Mali a u vaskulární transformace sinusů lymfatických uzlin. Tato onemocnění jsou také asociována s nedostatečnou cirkulací krve.

3.12. Kazakov DV., Vanecek T., Sima R., Kutzner H., Michal M. Dendritic cell neurofibroma with pseudorosettes lacks mutations in exons 1-15 of the neurofibromatosis type 2 gene. Am J Dermatopathol. 2005 Aug;27(4):286-9.

Souhrn

Neurofibrom z dendritických buněk s pseudorozetami (DCNWPR) je nedávno navržená varianta neurofibromu s charakteristickým mikroskopickým vzezřením pseudorozet, které jsou formovány z malých, tmavých, lymfocytům podobných buněk (Type I cells) uspořádaných soustředně kolem větších buněk se světle se barvícími vesikulárními jádry a objemnou, slabě eosinofilní cytoplasmou (Type II cells). Zdá se, že DCNWPR není asociován s neurofibromatózou, přesto byl popsán jeden pacient s DCNWPR u kterého se předpokládalo, že trpí formou neurofibromatózy, protože u něho byly nalezeny mnohočetné kožní léze, z nichž dvě byly DCNWPR (jak bylo potvrzeno histologicky). Cílem této studie bylo zjištění, zda je, či není u pacientů s DCNWPR mutován gen NF-2. Sedm histologicky potvrzených případů DCNWPR u kterých bylo dostupné dostatečné množství archivního, v parafínu zalitého materiálu, bylo vybráno do této studie. Tři případy (včetně intraneurální léze byly publikovány již dříve) a čtyři případy byly identifikovány nově. Soubor tvořili tři ženy a čtyři muži ve věku od 30 do 61 let (medián 48 let). U všech pacientů byla objevena malá solitární léze, která byla klinicky diagnostikovaná jako fibrom, nebo neurofibrom a žádný z pacientů nejevil známky neurofibromatózy. *Follow up* byl znám u šesti pacientů (v rozmezí 1-5 let, medián 2,5 roku) a byl ve všech případech bez komplikací. Všechny léze mikroskopicky naplňovaly kritéria DCNWPR. Exony 1-15 genu NF-2 byly amplifikovány pomocí PCR za použití dříve publikovaných primerů. Amplifikované fragmenty byly přečištěny a osekvenovány. Získané sekvence byly počítačově zpracovány a porovnány s daty v databázi GenBank. Nebyla nalezena žádná mutace ani u jednoho z pěti analyzovaných vzorků, ze kterých bylo možné získat použitelnou DNA. Zdá se, že DCNWPR nenese žádné mutace v exonech 1-15 genu NF-2. Z důvodu relativně malého počtu prostudovaných případů je předčasné vyvozovat závěr, že mutace genu NF-2 není zahrnuta v DCNWPR.

3.13. Boudova L., Kazakov DV., Sima R., Vanecek T., Torlakovic E., Lamovec J., Kutzner H., Szepe P., Plank L., Bouda J., Hes O., Mukensnabl P., Michal M. : Cutaneous lymphoid hyperplasia and other lymphoid infiltrates of the breast nipple: a retrospective clinicopathologic study of 56 patients. Am J Dermatopathol. 2005 Oct;27(5):375-86.

Souhrn

Tato studie charakterizuje klinickopatologické spektrum lymfoproliferací v oblasti prsní bradavky a/nebo areoly. Byly analyzovány morfologické, imunohistochemické, molekulárně genetické a klinické znaky 58 vzorků od 56 pacientů. Byly rediagnostikovány jako kožní lymfoidní hyperplázie (CLH, n=44), ostatní benigní lymfoidní infiltráty (OBLI, n=8), periferní T-lymfom, blíže nespecifikovaný (n=1), případy s překrývajícími se vlastnostmi CLH a B-lymfomu (n=3), jeden z nich se skládal z vřetenitých buněk. CLH infiltráty byly denzní, složené převážně z B-buněk formujících folikuly s germinálními centry. CLH nesly často znaky, které simulovaly malignitu, jako například splývání zárodečných center, ztráta polarizace germinálního centra, absence plášťových zón, „smazaný“ infiltrát, lymfoidní buňky šířící se do kolagenu (často jako *Indian files*), hladké svaloviny, cévních stěn a nervových pochev. Pouze dvě CLH recidivovaly, nicméně všichni pacienti jsou nyní bez příznaků nemoci (průměrný *follow up* je 62 měsíců). Za použití PCR reakce byla detekována monoklonální přestavba genu pro těžký řetězec imunoglobulinu u pěti a monoklonální přestavba genu pro TCR gamma receptor u dvou CLH, ale všichni tito pacienti jsou nyní rovněž v pořádku. Pomocí PCR a/nebo serologie byla detekována u 47% případů přítomnost *Borrelia burgdorferi*. Jeden z těchto případů byl monoklonální. Z našich výsledků vyvozujeme, že CLH je nejčastější lymfoproliferací prsní bradavky, vzácně rozpoznanou klinicky a často mylně histologicky diagnostikovanou jako lymfom.

3.14. Daum O., Vaněček T., Šíma R., Michal M. (2006): Gastrointestinální stromální tumor: současný pohled. Klinická onkologie 19, 203-11.

Souhrn

Gastrointestinální stromální tumor je nejčastější mesenchymální nádor trávicího traktu. V současné době je definovaný jako nádor tvořený vřetenitými a/nebo epiteloidními buňkami, jejichž fenotyp odpovídá diferenciaci v Cajalovy interstitiální buňky. Většinou jsou tyto nádorové buňky pozitivní v imunohistochemickém průkazu KIT proteinu a u téměř všech těchto tumorů lze prokázat mutaci genu c-kit nebo PDGFRA kódující transmembránové proteiny zařazené do III. třídy receptorových tyrosinkináz. Nejčastěji se gastrointestinální stromální tumor vyskytuje v žaludku, méně často v ostatních částech trávicí trubice, vzácně i v extragastrointestinální lokalizaci, a to v mesenteriu, omentu, retroperitoneu, žlučníku, močovém měchýři, pankreatu a ve vagině. Ve většině případů je možná poměrně spolehlivá diagnóza z konvenčního barvení hematoxylinem a eosinem ve světelné mikroskopii. Pomocnými diagnostickými metodami je imunohistochemický průkaz KIT proteinu (CD117) a průkaz mutace genu c-kit nebo PDGFRA. Negativita těchto vyšetření však diagnózu nevylučuje. Každý gastrointestinální stromální tumor je třeba považovat za potenciálně maligní. Riziko agresivního chování se v současné době stanovuje na základě mitotického indexu a maximálního rozměru nádoru. Mutační analýza umožňuje predikovat odpověď tumoru na terapii imatinib mesylátem.

3.15. Kazakov DV, Bisceglia M, Sima R, Michal M. Adenosis tumor of anogenital mammary-like glands: a case report and demonstration of clonality by HUMARA assay. J Cutan Pathol. 2006 Jan;33(1):43-6.

Souhrn

V patologii prsu je nodulární adenóza (adenosis tumor) definována jako klinicky rozpoznatelná léze, která histologicky představuje převážně adenózu, ale rovněž může vykazovat různé kombinace rozličných epiteliálních změn pozorovaných u ostatních benigních onemocnění prsu. Popisujeme lézi, která se vyskytla v anogenitální oblasti 46 leté ženy a zřejmě vznikla v anogenitální žláze a podle našeho názoru je nejlépe klasifikovatelná jako nodulární adenóza. Biopsie odhalila dobře ohraničenou, nezapouzdřenou lézi obklopenou zhuštěnou fibrózní tkání, která tvořila pseudokapsulu. V tumoru bylo možné rozpoznat několik různých histologických změn: změny připomínající sklerozující adenózu; různě velké mikrocysty, některé měly ojedinělé, krátké, papilární struktury s epiteliálními rysy připomínajícími duktální hyperplázií; oblasti s apokrinní metaplázií a světlobuněčné epiteliální změny připomínající mucinózní metaplázií. V mnoha lumen byla pozorována sekrece. Některá lumen byla vyplněna pěníými makrofágy. Byly zde také fokální světlobuněčné změny myoepiteliálních buněk. Ve stromatu byla malá hustota buněk, stroma bylo v některých místech sklerózní a složené z myofibroblastů, v jiných místech bylo myxoidní. Myoepiteliální buňky se barvily v reakci s protilátkami proti calponinu, aktinům a p53. Buňky v oblastech s oxyfilní (apokrinní) metaplázií se barvily s protilátkami proti mitochondriálnímu antigenu a Bcl-2. Protilátky proti progesteronovému a estrogenovému receptoru barvily přibližně 50 a 20% epiteliálních buněk. Analýza lokusu HUMARA odhalila monoklonální původ léze. Zdá se, že označení naší léze jako nodulární adenóza je oprávněné, protože náš případ nese řadu znaků identických těm, které jsou pozorovány u různých benigních onemocnění prsu. Tato kožní perianální léze je mikroskopicky nerozlišitelná od svého prsního analogu.

3.16. Kinkor Z, Sima R, Skalova A, Boudova L, Pekova S, Dvorakova D, Dedic K, Kracik M, Janousek M, Michal M. Isolated lymphadenopathy as the first presentation of systemic mastocytosis--description of two cases Cesk Patol. 2006 Jan;42(1):34-8.

Souhrn

Popisovány jsou dva případy systémové mastocytózy u 46 leté a 63 leté ženy, kdy byla prvně stanovena správná diagnóza na základě morfologie v náhodně zjištěné izolované krční, resp. nitrobřišní lymfadenopatii. U obou nemocných chyběly v okamžiku histologické diagnózy charakteristické kožní projevy i typické „mediátorové“ symptomy. V jednom případě šlo o indolentní typ systémové mastocytózy bez prokázané genetické alterace, druhý případ byl uzavírán jako agresivní systémová mastocytóza s eozinofílií se zjištěnou bodovou mutací Asp816Val c-kit genu a překvapivě dobrou odpovědí na terapii Gleevecem. Rozebírána je jak morfologická diferenciální diagnóza mastocytózy v lymfatické uzlině, tak nové poznatky v molekulární biologii těchto proliferací, které mají vedle osvětlení rozdílné geneze systémových mastocytóz především zásadní prognostické a terapeutické implikace.

3.17. Michal M, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Hes O, Kazakov DV, Matoska J, Zuntova A, Dvorak V, Talerman A. Mixed germ cell sex cord-stromal tumors of the testis and ovary. Morphological, immunohistochemical, and molecular genetic study of seven cases. Virchows Arch. 2006 May;448(5):612-22.

Souhrn

Prezentujeme morfologické, imunohistochemické a molekulárně genetické vlastnosti tří případů testikulárních a tří případů ovariálních MGST (mixed germ cell sex cord–stromal tumors). Záradečné buňky testikulárních MGST se morfologicky odlišovaly od buněk u klasických seminomů absencí typických kulovitých jader. Oproti jádrům u klasických seminomů byla jejich velikost u testikulárních MGST menší a jádérka byla nepatrná, cytoplazma byla PAS negativní. Velikostní variabilita jader zárodečných buněk u testikulárního MGST byla naopak více podobná těm, které lze pozorovat u zárodečných buněk spermatocytických seminomů. Záradečné buňky MGST u jednoho případu vykazovaly imunohistochemickou paranukleární pozitivitu s protilátkami proti AE1-AE3 připomínající tečky, nebo čárky. Všechny tři testikulární MGST reagovaly negativně se zbývajícími protilátkami, včetně placentální alkalické fosfatázy (PLAP), OCT4 a C-KIT proteinu. Ovariální MGST se v našem souboru odlišovaly od testikulárních lézí jak v komponentě zárodečných buněk, tak v *sex-cord* komponentě. Záradečné buňky měly u všech čtyř ovariálních případů cytomorfolické a imunohistochemické znaky identické s klasickými seminomy/dysgerminomy. Vyznačovaly se typickými kulovitými jádry, která byla mnohem více blastická, s větším počtem mitóz v porovnání s testikulárními nádory v naší sérii. Imunohistochemicky byly buňky PLAP (4/4), OCT (4/4) a C-KIT protein (3/4) pozitivní. Cytoplazma zárodečných buněk u ovariálních neoplázií obsahovala PAS pozitivní glykogen. U zárodečných buněk jednoho ovariálního MGST byla prokázána amplifikace 12p. U všech ostatních zárodečných buněk tato amplifikace nebyla prokázána. U žádného z pěti úspěšně analyzovaných případů nebyla prokázána mutace v žádném z vyšetřovaných exonů (včetně exon-intronových spojů) genů c-kit a PDGFRa.

3.18. Kralickova M, Sima R, Vanecek T, Sima P, Rokyta Z, Ulcova-Gallova Z, Sucha R, Uher P, Hes O. Leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women are not restricted to nulligravid patients. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006 2006 Aug;127(2):231-5

Souhrn

LIF (leukemia inhibitory factor) je jedním z klíčových cytokinů zahrnutých v regulaci implantace embrya. Zkoumali jsme prevalenci mutací genu LIF v populaci neplodných žen, která se skládala z nuligravidních a sekundárně neplodných pacientek. Ke screeningu mutací genu LIF jsme vyvinuli testovací metodu založenou na teplotní gradientové gelové elektroforéze (TGGE). Soubor testovaných pacientek tvořilo 176 neplodných žen rozdělených do skupiny A reprezentující 147 nuligravidních žen a skupiny B představující 29 žen se sekundární neplodností u kterých byl v minulosti zaznamenán potrat, nebo ektopické těhotenství, ale ne úspěšný porod. Kontrolní populace byla tvořena skupinou 75 zdravých, plodných žen. Skupiny plodných kontrol a neplodných pacientek byly porovnány pomocí t-testu za účelem zjištění statisticky signifikantních rozdílů. Bylo nalezeno šest pacientek s potenciálně funkčních mutací genu LIF. Jednalo se o transici G3400A, která vedla k záměně valinu za methionin v pozici 64 (V64M), tj. v oblasti tzv. AB smyčky. Všechny ze šesti mutovaných žen byly neplodné. Čtyři z nich byly nuligravidní a dvě v minulosti spontánně otěhotněly a následně předčasně potratily. Žádné mutace nebyly odhaleny v kontrolní skupině, což znamená, že frekvence funkčně relevantních mutací genu LIF je signifikantně vyšší u neplodných žen v porovnání s kontrolní skupinou ($P < 0,05$, t-test). Naše výsledky podporují myšlenku, že mutace genu LIF ovlivňují fertilitu. Přestože se nevyskytují příliš často, jejich vliv na molekulární děje v průběhu časných fází těhotenství by měl být dále objasněn.

3.19. Skalova A, Gnepp DR, Simpson RH, Lewis JE, Janssen D, Sima R, Vanecek T, Di Palma S, Michal M. Clonal nature of sclerosing polycystic adenosis of salivary glands demonstrated by using the polymorphism of the human androgen receptor (HUMARA) locus as a marker. Am J Surg Pathol. 2006 Aug;30(8):939-44.

Souhrn

Sklerozující polycystická adenóza (SPA) je nedávno popsaná vzácná léze slinných žlaz, která připomíná epiteliální proliferativní léze prsu. Skutečná povaha lézí je neznámá, ale doposud se obecně předpokládalo, že reprezentuje pseudoneoplastický, sklerozující a zánětlivý proces, přestože se asi u třetiny případů objevily lokální recidivy. U SPA byly popsány různé displastické změny v rozsahu od nízké maligní dysplázie po in-situ karcinom. Ačkoliv nebyla dokumentována smrt pacientů v souvislosti s tímto onemocněním, nebo jeho metastázami, klinické a histopatologické vlastnosti lézí napovídají, že SPA může reprezentovat neoplastickou lézi. Polymorfismus lokusu HUMARA je nejčastěji používán ke zjišťování, zda je výsledek inaktivace chromozómu X náhodný nebo ne, čehož lze využít k indikaci klonality. V této studii byla analýza lokusu HUMARA použita k vyšetření 12 případů SPA. Tři případy (muži) byly neinformativní a tři případy (ženy) nebylo možné vyšetřit z důvodu nízké kvality DNA. Zbývajících šest případů bylo monoklonálních. Tyto výsledky podporují skutečnost, že SPA je skutečnou neoplázií a nejen reaktivním procesem.

3.20. Boudova L, Kazakov DV, Jindra P, Sima R, Vanecek T, Kuntscher V, Vera V, Bouda J, Michal M. Primary cutaneous histiocyte and neutrophil-rich CD30+ and CD56+ anaplastic large-cell lymphoma with prominent angioinvasion and nerve involvement in the forehead and scalp of an immunocompetent woman. J Cutan Pathol. 2006 Aug;33(8):584-9.

Souhrn

Kožní lymfomy koexprimující CD56 a CD30 jsou velice vzácné. Nesou překrývající se klinickopatologické znaky natural killer – (NK)/T buněčných lymfomů a anaplastických velkobuněčných lymfomů (ALCL), dvou jednotek s velice rozdílným klinickým chováním. Prezentujeme případ imunokompetentní, 57 leté bělošské ženy s rapidně rostoucím, angiodestruktivním a neuroinvasivním primárním kožním ALCL (PCALCL). Neoplastická populace velkých, anaplastických CD30+ a CD56+ T buněk byla překryta masivní příměsí histiocyťů a neutrofilů. Částečně ulcerovaný a hnisající tumor zasahoval čelo a kštici a byl posouzen jako klinické stádium IAE. Po chemoterapii (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine a prednisone) pacientka dosáhla kompletní remise. Dále byla pacientce podána vysoce dávková chemoterapie a byla provedena autologní transplantace periferních krevních kmenových buněk ke konsolidaci kompletní remise, ve které pacientka setrvala po dobu 6 let. Toto je první popis CD30+ a CD56+ primárního kožního lymfomu s lokalizací na hlavě. Prezentovaný případ nese nevšední kombinaci klinickopatologických znaků PCALCL a NK-/T buněčného lymfomu.

3.21. Kazakov DV, Belousova IE, Sima R, Michal M. Mammary type tubulolobular carcinoma of the anogenital area: report of a case of a unique tumor presumably originating in anogenital mammarylike glands. Am J Surg Pathol. 2006 Sep;30(9):1193-6.

Souhrn

V této studii prezentujeme případ neobvyklého nádoru, který se vyskytl v perianální oblasti 64 leté ženy. Klinické vyšetření neodhalilo žádný další nádor. Léze byla odstraněna a pacientka je naživu bez známek metastáz, nebo recidivy po dobu 5,5 roku po operaci. Neoplázie se histopatologicky skládala z jednořadých pruhů uniformních, kulatých až vejčitých buněk promíchaných s kulatými až protáhlými tubuly jevícími známky sekrece na luminálním okraji. Tubuly byly tvořeny převážně jednou vrstvou buněk, ale místy se vyskytoval mnohvrstevný epitel (bez známek diferenciacie myoepiteliálních buněk), stejně tak jako jednotlivé kribriformní struktury a intraluminální můstky. Trabekulární komponenta celkově lehce dominovala nad tubulární komponentou a obě byly promíchané. Místy bylo pozorováno vágní terčovitě uspořádání *sex cords*. Nádorové buňky v obou komponentách reagovaly imunohistochemicky pozitivně s protilátkami proti E-catherinu, 34βE12, estrogenovým receptorům, progesteronovému receptoru a byly negativní s protilátkami proti HER2/neu (c-erbB-2). Reakce s protilátkami proti calponinu neodhalila žádné známky myoepiteliální buněčné diferenciacie. Věříme, že prezentovaný případ lze nejlépe klasifikovat jako tubulolobulární karcinom mammárního typu a díky lokalizaci původem z anogenitálních žláz.

3.22. Daum O, Grossmann P, Vanecek T, Sima R, Mukensnabl P, Michal M. Diagnostic morphological features of PDGFRA-mutated gastrointestinal stromal tumors: molecular genetic and histologic analysis of 60 cases of gastric gastrointestinal stromal tumors. Ann Diagn Pathol. 2007 Feb;11(1):27-33.

Souhrn

Byla provedena analýza vztahu morfologických znaků a přítomnosti mutací genů KIT a PDGFRA u 60 gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST) žaludku. Soubor zahrnoval nádory pocházející od 27 mužů a 33 žen, průměrný věk byl 63,8 let (rozmezí 12 až 92 let). Pouze jeden z tumorů pocházel od dívky mladší 21 let. Mutace KIT genu byly detekovány v 31 případech (51,7%), mutace PDGFRA genu v 22 případech (36,7%), zatímco 7 tumorů (11,7%) mělo divoké alely KIT a PDGFRA genů. Korelace výsledků mutační analýzy s histologickými znaky tumorů prokázala, že přítomnost epiteloidních nádorových buněk a infiltrace nádoru žírnými buňkami jsou nejvýznamější znaky mutace PDGFRA genu. Nádorové rhabdoidní buňky a nádorové vícejaderné buňky, které také někteří autoři uvádějí jako typické pro GIST s mutací PDGFRA genu, se v našem souboru jevily jako méně specifické markery, a tumor infiltrující lymfocyty a myxoidní stroma jako atributy zcela beze vztahu k mutačnímu profilu GISTu. Zhodnocení histomorfologie GISTu tak umožňuje volbu cílenějšího molekulárně genetického vyšetření a tedy i časnější diagnózu a účelnější využití finančních prostředků.

3.23. Kazakov DV, Bisceglia M, Spagnolo DV, Kutzner H, Belousova IE, Hes O, Sima R, Vanecek T, Yang Y, Michal M. Apocrine Mixed Tumors of the Skin With Architectural and/or Cytologic Atypia: A Retrospective Clinicopathologic Study of 18 Cases. Am J Surg Pathol. 2007 Jul;31(7):1094-1102.

Souhrn

Prezentujeme soubor 18 atypických, apokrinních, smíšených nádorů kůže charakterizovaných strukturálními a/nebo cytologickými atypiami, které ale přesto neklasifikují tyto léze jako karcinomy. Soubor tvořilo 15 mužů a 3 ženy, u všech kromě jednoho se vyskytly solitární noduly, jejichž velikost se pohybovala od 4 do 20 mm, jedna žena měla velký nádor o velikosti 12 cm. Nádory byly lokalizovány převážně na hlavě, zvláště na obličeji (13 případů). Dále se vyskytly na dolních končetinách (3 případy) a v oblasti třísel (2 případy). Ve všech případech byly nádory chirurgicky odstraněny. Klinický *follow up* byl k dispozici u 11 případů a jeho délka se pohybovala v rozmezí od 1 do 24 let (průměr 9,6 let, medián 5 let). Nebyly zaznamenány žádné recidivy, ani metastázy. Celkově měly léze spíše benigní stavbu, obvykle s dobrým ohraničením, nebyly zde známky porušení pouzdra, ani hypercelularity. Přesto zde byla pozorována určitá asymetrie, okraje nádoru byly charakterizovány nepravidelným, expandujícím a infiltrujícím růstem. 17 případů mikroskopicky odpovídalo tzv. variantě bohaté na hyalinní buňky. V oblastech hyalinních buněk se nacházely mnohojaderné, atypické, hyperchromatické buňky, které vykazovaly myoepiteliální imunofenotyp. U jednoho případu byly nalezeny atypické mitotické figury. U jednoho případu se v duktální komponentě vyskytl mírný jaderný pleomorfismus. Nádory byly negativní v reakci s protilátkami proti p53, včetně bizarních obřích buněk, které se nebarvily Ki-67. Hyalinní buňky ultrastrukturálně vykazovaly znaky odpovídající myoepiteliální diferenciaci. U 7 případů, které byly vyšetřeny imunohistochemicky nebyla prokázána exprese proteinu HER2/neu (c-erbB-2), stejně tak nebyla u 5 testovaných případů prokázána amplifikace genu HER2/neu pomocí FISH. Jako kontroly byly použity 4 skutečně maligní smíšené tumory, ale ani u nich nebyla prokázána exprese proteinu HER2/neu, ani amplifikace genu. U jednoho maligního smíšeného tumoru byla prokázána polysomie chromozómu 17. Závěrem této studie je, že některé atypické cytoarchitektonické rysy apokrinních smíšených tumorů, i když je to znepokojující, neindikují maligní změnu.

3.24. Michal M, Kazakov DV, Síma R, Vanecek T. Primitive small cell tumor with epithelial, gangliocytic, neuroendocrine, and mesenchymal differentiation: report of 2 cases. Int J Surg Pathol. 2007 Oct;15(4):429-36.

Souhrn

Publikace popisuje dva nádory, které, podle našeho nejlepšího vědomí, nebyly doposud popsány. Převažujícím buněčným typem byly malé, kulaté až vřetenité, tmavě modré buňky. Tmavě modré buňky tvořily zřetelné epiteliální pruhy se žlazovým uspořádáním a s hlenem pozitivním na mucikarmin. Dále byla v nádorech přítomna zřetelná mezenchymální komponenta. Mezenchymální oblasti měly benigní vzhled a mohly by být přirovnány k fibromu. Měly denzní kolagenové stroma, nebo vřetenité buňky zasazené v myxoidním pozadí navozují podobnost myxomu. Dalším výrazným znakem byla diference gangliových buněk. Mitotické figury, včetně atypických forem, byly nalezeny pouze v malobuněčné komponentě. Všechny buňky byly imunohistochemicky negativní v reakci s protilátkami proti aktinu, calponinu, desminu, HMB45, neurofilamentovému proteinu, CD99/MIC2, MelanA, tyrozináze, serotoninu, CD56, GFAP a S-100 proteinu. Protilátky proti cytokeratinu, synaptophysinu, FLI1 proteinu a chromograninu reagovaly pouze v primitivních, malých, kulatých buňkách, všechny ostatní komponenty byly cytokeratin negativní. Pomocí FISH nebyla prokázána translokace zahrnující gen EWSR1, ani zisk (gain) chromozomálního regionu 12p. Ultrastrukturálně byly mezi buňkami patrné dobře zformované desmozomy. V cytoplasmě se nacházela granula. Pro tuto neoplázii navrhuje název primitivní malobuněčný tumor s epiteliální, gangliocytickou, neuroendokrinní a mezenchymální diferenciací.

3.25. Králíčková M, Síma R, Martínek P, Vanecek T, Ulcová-Gallová Z, Síma P, Krizan J, Kalis V, Stepán Jr, Stepán J, Rokyta Z, Uher P, Hes O. The leukemia inhibitory factor gene mutations in the population of infertile women: the heterozygote transition G to A on the position 3400 does not affect the outcome of the infertility treatment. Ceska Gynekol. 2007 Aug;72(4):293-8.

Souhrn

Cíl studie: Leukemický inhibiční faktor (LIF) je jedním z klíčových cytokinů embryo-maternálního molekulárního dialogu, který probíhá během implantace embrya. Naším cílem bylo zjistit prevalenci mutací v genu pro LIF v populaci neplodných žen a sledovat jejich vliv na úspěšnost léčby.

Typ studie: Kohortová studie.

Název a sídlo pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN v Plzni.

Metodika a soubor: Vyšetřili jsme 399 infertilních a 202 kontrolních zdravých plodných žen. K analýze jsme použili elektroforézu probíhající v teplotním gradientu (TGGE) s následnou sekvenací všech TGGE pozitivních vzorků. Statistické zhodnocení rozdílů mezi skupinou neplodných pacientek a skupinou fertálních kontrol bylo provedeno pomocí Fisherova exaktního testu pro čtyřpolní tabulky.

Výsledky: Ve skupině neplodných žen byla u 12 z nich detekována potencionálně funkční mutace v genu pro LIF, bodová záměna G za A na pozici 3400. Tato mutace vede k výměně valinu za methionin v 64. kodónu (V64M). V kontrolní skupině zdravých plodných žen nebyla žádná mutace nalezena, což znamená, že výskyt mutací v genu pro LIF je signifikantně zvýšen v populaci neplodných v porovnání s kontrolní skupinou ($P = 0.01$, Fisherův exaktní test pro čtyřpolní tabulky). Sedm z těchto žen po léčbě otěhotnělo.

Závěr: Výsledky prokazují, že mutace v genu pro LIF na pozici 3400 snižuje plodnost, ale její výskyt neznámá, že žena nebude moci být úspěšně léčena pomocí běžných metod léčby neplodnosti. Ačkoliv se mutace v genu pro LIF vyskytují vzácně, jejich vliv na molekulární pochody během implantace a časně embryogeneze by měl být objasněn.

3.26. Hes O, Michal M, Síma R, Vaněček T, Brunelli M, Martignoni G, Kuroda N, Alvarado Cabrero I, Perez-Montiel D, Hora M, Urge T, Dvořák M, Jarošová M, Yang X. Renal oncocytoma with and without intravascular extension into the branches of renal vein have the same morphological, immunohistochemical, and genetic features. Virchows Arch. 2008 Feb;452(2):193-200.

Souhrn

V této publikaci jsme se pokusili prozkoumat klinickopatologické vztahy renálního onkocytomu (RO) s rozšířením do renální žíly. Identifikovali jsme 7 RO s rozšířením do renální žíly. Věk těchto sedmi pacientů se pohyboval od 61 do 82 let. Pět případů bylo odhaleno náhodně, dva pacienti měli silnou hematurii. Po operaci byli všichni pacienti živí a bez známek dalšího nádorového onemocnění po dobu od 1 do 5 let (průměr = 3,6 let). Onkocytomy měřily od 2,2 do 7,5 cm. Rozšíření do renální žíly bylo makroskopicky očekáváno u 5 ze 7 případů a histologicky potvrzeno u všech sedmi případů. Nádorové buňky byly pozitivní s protilátkami proti cytokeratinům, mitochondriálnímu antigenu (MIA), epiteliálnímu membránovému antigenu (EMA) a parvalbuminu. 5 ze 7 nádorů bylo fokálně pozitivních s protilátkami proti CD117. Ultrastrukturálně byla cytoplazma přeplněna mitochondriemi. Molekulárně genetická analýza neodhalila abnormální počty chromozomů 1, 2, 6, 7, 10, 17, X a Y, ztrátu heterozygotnosti chromozomálního regionu 3p, ani mutaci genu VHL v žádném ze studovaných případů. Array CGH u dvou případů neodhalila žádné významné genetické změny. Naše závěry jsou: 1) renální onkocytomy mohou mít rozšíření do renálních žil, 2) renální onkocytomy s intravaskulární extenzí do renálních žil mají stejné morfologické, imunohistochemické a cytogenetické charakteristiky jako jejich analogy bez intravaskulární invaze, 3) absence metastáz naznačuje celkově benigní chování tohoto nádoru, ale toto musí být podloženo dalšími studii s dlouhodobým sledováním, 4) u renálních nádorů s granulózní cytoplazmou a s extenzí do renální žíly je potřeba pečlivě vyloučit renální karcinomy jako např. chromofobní renální karcinom, onkocytická varianta papilárního renálního karcinomu a granulózní varianta světlobuněčného renálního karcinomu.

3.27. Králícková M, Ulcová-Gallová Z, Síma R, Vanecek T, Síma P, Krizan J, Suchá R, Uher P, Hes O, Novotný Z, Rokyta Z, Vetvicka V. Association of the leukemia inhibitory factor gene mutation and the antiphospholipid antibodies in the peripheral blood of infertile women. Folia Microbiol (Praha). 2007;52(5):543-8.

Souhrn

Cílem této práce bylo charakterizovat vliv potenciálně funkční mutace – tranzice G>A v pozici 3400 genu kódujícího leukemický inhibiční faktor (LIF, pluripotentní cytokin, který hraje klíčovou úlohu v řízení implantace embrya). Tato mutace vede k aminokyselinové záměně valinu za metionin v kodonu 64. Zhodnotili jsme vztah mutací genu LIF a hladiny antifosfolipidových protilátek (aPLs) v periferní krvi neplodných žen (vyšetření aPLs bylo součástí našeho rutinního imunologického testování v průběhu lékařského vyšetření neplodnosti). 8 neplodných, mutovaných žen bylo diagnostikováno s idiopatickou neplodností (n=5) a endometriózou (n=3) a jejich hodnoty aPLs v séru byly porovnány se 115 neplodnými ženami bez mutace genu LIF. K detekci sedmi antifosfolipidových protilátek byla použita metoda ELISA. Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí Fisherova 2x2 exaktního testu s cílem zhodnotit vztah mutací genu LIF a hladiny aPLs v séru neplodných pacientek. Hladina aPLs byla signifikantně vyšší v naší studované skupině (100%) v porovnání s 30% aPLs pozitivních pacientek u kontrolní skupiny ($p=0,0035$), což naznačuje, že aPLs jsou zvýšeny u žen s mutací genu LIF.

3.28. Vazmitel M, Michal M, Shelekhova KV, Sima R, Mukensnabl P, Kazakov DV. Vascular changes in merkel cell carcinoma based on a histopathological study of 92 cases. Am J Dermatopathol. 2008 Apr;30(2):106-11.

Souhrn

Ačkoliv je prominentní vaskulární proliferace známým rysem nejrůznějších neuroendokrinních nádorů, nebyl tento znak doposud studován u karcinomu z Merkelových buněk (MCC). Záměrem této studie bylo plně charakterizovat mikroskopické, imunohistochemické a ultrastrukturální rysy vaskulárních změn asociovaných s MCC a determinovat jejich frekvenci a význam v diferenciální diagnostice. Dále byla v těchto lézích zjišťována přítomnost DNA lidského herpes viru 8 (HHV-8). Z 92 prostudovaných případů MCC byly u 18 případů (20%) nalezeny oblasti s výraznými vaskulárními změnami, které byly rozděleny do následujících šesti typů: pericytární hyperplázie, změny podobné pyogennímu granulomu, hemangioendotheliomu, epithelioidnímu hemangiomu, pelióze a folikulárnímu dendritickému tumoru. Dále byl pozorován Azzopardiho fenomén. Tyto změny byly pozorovány samostatně, nebo v kombinaci. V žádném z 18 analyzovaných případů nebyla pomocí PCR detekována přítomnost HHV-8. Závěrem naší studie je, že prominentní vaskulární proliferace může být pozorována u 20% MCC a tím připomíná neuroendokrinní nádory v jiných orgánech. Když je vaskulární proliferace nadměrná a setkáme se s ní v malé biopsii, může reprezentovat potenciální diagnostické úskalí, ale na druhou stranu může sama o sobě sloužit jako vodítko ke správné diagnóze. HHV-8 nehraje roli v angiogenezi u MCC.

3.29. Skalova A, Síma R, Bohuš P, Cuřík R, Lukáš J, Michal M. Endolymphatic sac tumor (aggressive papillary tumor of middle ear and temporal bone) Report of two cases with analysis of the VHL gene. Pathol Res Pract. 2008;204(8):599-606.

Souhrn

Nádor endolymfatického váčku (Heffnerův tumor) (ELST) je velice vzácný, nemetastázující, místy agresivní, *low grade* adenokarcinom pocházející z endolymfatického váčku, který je spojen s vonHippel-Lindauovou chorobou (VHLD). VHLD je autozomálně dominantní onemocnění charakterizované vrozenou genetickou abnormalitou genu VHL lokalizovaného na krátkém raménku chromozomu 3 (3p26-p25). Mutace genu VHL byly nalezeny jak u ELST asociovaných s VHLD, tak u sporadických případů. Díky tomu, že je ELST velice vzácný, byl pomocí molekulárně genetických metod vyšetřen pouze malý počet případů. Setkali jsme se se dvěma pacienty s ELST, jeden z nich měl prokázanou dědičnou VHLD. Druhý byl sporadický případ, pacient neměl příznaky VHLD. Tkáně získané z Heffnerova tumoru a hemangiomu mozečku pacienta s vrozenou VHLD nesly bodovou mutaci v exonu 1 genu VHL. Touto mutací byla záměna C194T vedoucí k aminokyselinové záměně S65L. U sporadického případu nebyla nalezena mutace v žádném ze tří analyzovaných exonů genu VHL, včetně exon-intronových spojů.

3.30. Kazakov DV, Belousova IE, Kacerovska D, Sima R, Vanecek T, Vazmitel M, Pizinger K, Michal M. Hyperplasia of hair follicles and other adnexal structures in cutaneous lymphoproliferative disorders: a study of 53 cases, including so-called pseudolymphomatous folliculitis and overt lymphomas. Am J Surg Pathol. 2008 Oct;32(10):1468-78.

Souhrn

V této práci jsme prostudovali 53 kožních lymphoproliferativních onemocnění s hyperplázií vlasových folikulů. Soubor tvořilo 42 případů spadajících do kategorie pseudolymphomatózní folikulitidy (PLF) a 11 případů skutečných lymfomů (mycosis fungoides, CD30+ anaplastický velkobuněčný lymfom, difuzní velkobuněčný B-lymfom, malobuněčný B-lymfom/leukemie a periferní T-lymfom blíže nespecifikovaný). U všech pacientů s PLF byl přítomen solitární uzlík, přednostně se objevující na tváři. Kromě hyperplázie vlasových folikulů byly dalšími typickými znaky těchto lézí např. denzní infiltrát malých, dobře diferencovaných lymfocytů, lymfoplazmacytoidní buňky, plazmatické buňky a epiteloidní histiocyty formující drobné granulomy. Byly rovněž odhaleny některé neobvyklé, nebo znepokojující znaky jako např. hyperplázie ekrinních/apokrinních ductů, infiltrace podkoží/svaloviny, smazaný lymfoidní infiltrát, jednořadá infiltrace a velké atypické buňky. V souboru imunohistochemicky dominovaly T-buněčné případy. U všech 34 testovaných případů byl odhalen polyklonální pattern exprese κ a λ lehkých řetězců imunoglobulinů. U 4 případů byly nalezeny rozptýlené CD30+ buňky. Monoklonální přestavba T-buněčného receptoru gamma (TCR) a genu kódujícího těžký řetězec imunoglobulinu (IgH) byla detekována u 19, respektive 3 případů. Jeden případ nesl jak přestavbu TCR, tak i IgH. U 3 ze 30 testovaných případů byl prokázán Herpes simplex virus (HSV) 1. HSV-2 nebyl prokázán u žádného z testovaných vzorků. 30 z 31 testovaných vzorků bylo negativních na přítomnost *Borrelia burgdorferi*. U 9 případů byla provedena FISH na průkaz t(11,18) a t(14,18). U žádného z těchto případů nebyla prokázána žádná z testovaných translokací. Nejčastějším způsobem ošetření bylo chirurgické odstranění lézí. U 40 případů byl znám *follow up* (průměrná délka 3,7 roku), u 39 pacientů nebyla žádná známka pokračování onemocnění, u 1 pacienta se objevila lokální recidiva. Porovnání klonálních případů PLF s případy polyklonálními, nebo těmi, u kterých nebylo možné klonalitu zjistit, neodhalilo žádné rozdíly v klinické prezentaci a co se týče patologických a imunohistochemických znaků. Závěrem této publikace je, že hyperplázie vlasových folikulů a dalších adnex nemusí být přítomna pouze u PLF, ale také u skutečných kožních lymfomů a může být pouhou náhodnou událostí doprovázející základní patologický proces.

3.31. Hes O, Síma R, Nemcová J, Hora M, Bulimbasic S, Kazakov DV, Urge T, Reischig T, Dvorák M, Michal M. End-stage kidney disease: gains of chromosomes 7 and 17 and loss of Y chromosome in non-neoplastic tissue. Virchows Arch. 2008 Oct;453(4):313-9.

Souhrn

Cílem této studie bylo determinovat změny počtu kopií chromozómů 7, 17, Y a chromozomálního regionu 3p v nenádorovém tubulárním epitelu u ledvin ve stádiu tzv. *end stage* (end stage kidney disease = ESKD). Z našeho archivu bylo získáno 17 ledvin od 11 pacientů s ESKD. Nenádorová tkáň ledvin byla u těchto případů vyšetřena odděleně. Tkáň obsahující papilární adenomy (PA), světlobuněčné (CRCC), papilární renální karcinomy (PRCC) a myxoidní liposarkom (LPS) byly vyšetřeny za použití stejných sond a výsledky byly porovnány s údaji získanými vyšetřením nenádorové tkáně. Tubulární změny ledvinného parenchymu byly klasifikovány do tří typů. 1) Naprostá většina tubulů byla zcela atrofovaná, 2) některé tubuly byly hyperplastické, t.j. tubuly s nediferencovanými, velkými epiteliálními buňkami, u kterých nebylo možné určit specifický typ renálního tubulu, 3) dysplastické tubuly, které byly dilatované, někdy svrstělé. Bazální membrány byly lemovány velkými, eosinofilními, epiteliálními buňkami s polymorfními jádry a pseudostratifikací. Jadérka byla jasně zřetelná. Tyto tubulární změny byly multifokální s náhodnou distribucí v atrofovaném parenchymu. PA byly detekovány u 9 pacientů, u 8 z nich byly nalezeny ještě další nádory (4x CRCC, 3x PRCC, 1x PRCC+CRCC). Jeden pacient měl pouze CRCC, další měl kombinaci PRCC a myxoidního LPS. Chromozomální abnormality byly nalezeny u druhé a třetí skupiny tubulárních změn, t.j. u hyperplastických a dysplastických tubulů. Trizomie chromozómu 7 byla detekována u šesti případů, trizomie chromozómu 17 u 8 případů. Kombinace obou trizomií byla nalezena u 5 případů. Ztráta chromozómu Y byla detekována u 2 případů. FISH u tkání obsahujících PA, RCC a myxoidní LPS odhalila očekávané výsledky, t.j. trizomie chromozómů 7 a 17 u všech PA a PRCC. Žádné zisky chromozómů nebyly zjištěny u CRCC a myxoidního LPS. Ztráta chromozómu Y byla nalezena u 6 PA, 5 PRCC a 1 myxoidního LPS, ztráta chromozómu X byla nalezena u 2 CRCC. Závěrem této studie je, že chromozomální změny typické pro papilární renální neoplázie, t.j. trizomie chromozómů 7 a 17 jsou velice frekventované v nenádorovém parenchymu ledvin ve stádiu tzv. *end stage* a zpravidla se vyskytují multifokálně.

3.32. Michal M, Hes O, Nemcova J, Sima R, Kuroda N, Bulimbasic S, Franco M, Sakaida N, Danis D, Kazakov DV, Ohe C, Hora M. Renal angiomyoadenomatous tumor: morphologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of a distinct entity. Virchows Arch. 2009 Jan;454(1):89-99.

Souhrn

V této publikaci prezentujeme vzácnou nádorovou jednotku nazvanou renální angiomyomatózní tumor (RAT). Z konzultačních archivů autorů bylo vybráno 5 případů tohoto nádoru. Byla provedena histologická a imunohistochemická vyšetření těchto nádorů. U všech případů byla provedena sekvenční analýza kódujících oblastí genu VHL. Nádory byly tvořeny epiteliální světlobuněčnou komponentou a prominentním leiomyomatózním stromatem. Epiteliální buňky byly formovány do adenomatózních, tubulárních struktur, jejichž vnitřní povrch byl kryt puchýřnatými výrůstky. Všechny tubulární a glandulární struktury byly lemovány jemnou kapilární sítí. Epiteliální komponenta byla u všech případů pozitivní v reakci s protilátkami proti epiteliálnímu membránovému antigenu, CK7, CK20, AE1-AE3, CAM5.2 a vimentinu. U žádného z analyzovaných vzorků nebyla nalezena mutace genu VHL. RAT je vzácná morfologická jednotka, která se liší morfologicky, imunohistochemicky a geneticky od všech renálních tumorů, včetně konvenčního světlobuněčného karcinomu a smíšeného epiteliálního a stromálního tumoru ledviny.

3.33. Kazakov DV, Zelger B, Rütten A, Vazmitel M, Spagnolo DV, Kacerovska D, Vanecek T, Grossmann P, Sima R, Grayson W, Calonje E, Koren J, Mukensnabl P, Danis D, Michal M. Morphologic Diversity of Malignant Neoplasms Arising in Preexisting Spiradenoma, Cylindroma, and Spiradenocylindroma Based on the Study of 24 Cases, Sporadic or Occurring in the Setting of Brooke-Spiegler Syndrome. Am J Surg Pathol. 2009 May;33(5):705-19.

Souhrn

V této publikaci prezentujeme soubor 24 maligních neoplázií vznikajících z preexistujících benigních spiradenomů (20), cylindromů (2) a spiradenocylindromů (2). 19 pacientů (12 žen, 7 mužů ve věku od 41 do 92 let) mělo solitární neoplázií (velikostní rozpětí 2,2 až 17,5 cm, medián 4 cm). Zbývajících 5 pacientů (4 ženy, 1 muž ve věku od 66 do 72 let) mělo klinické znaky Brooke-Spieglerova syndromu (BSS), autozomálně dominantního, dědičného onemocnění charakterizovaného tvorbou velkého množství malých, benigních neoplázií, na jejichž pozadí se objevily větší maligní léze. U všech případů byly mikroskopicky nalezeny pozůstatky preexistujících benigních neoplázií. Maligní komponenty lézí byly variabilní a byly klasifikovány do 4 různých typů vyskytujících se samostatně, nebo v kombinaci: 1) struktury podobné *low grade* bazocelulárnímu salivárnímu adenokarcinomu (BCAC-LG), 2) struktury podobné *high grade* bazocelulárnímu salivárnímu adenokarcinomu (BCAC-HG), 3) invazivní karcinom, blíže nespecifikovaný (IAC-NOS), 4) sarkomatoidní (metaplastický) karcinom. U jednoho případu IAC-NOS byl nalezen také in-situ adenokarcinom. Lze se domnívat, že se mohl vyvinout z přilehlé adenomatózní a atypické adenomatózní komponenty. Případy se sarkomatoidním karcinomem měly maligní epiteliální komponentu tvořenou různými kombinacemi BCAC-HG, BCAC-LG, IAC-NOS, nebo squamózního karcinomu, kdežto sarkomatoidní komponenta vypadala jako pleomorfní, nebo vřetenobuněčný sarkom. U dvou případů byla navíc nalezena ložiska s heterologní chondrosarkomatózní diferenciací, u jednoho případu byla nalezena rhabdomyosarkomatózní diferenciace. U 21 pacientů byl k dispozici klinický *follow up* (rozmezí 3 měsíce až 15 let, průměr 4,8 roku, medián 3,5 roku). 10 pacientů bylo bez známek nemoci, 1 byl naživu s metastatickým onemocněním, 1 byl naživu s BSS, u 3 pacientů se rozvinula lokální recidiva, 4 zemřeli následkem nemoci a 2 zemřeli z jiných příčin. Histologický nález maligních neoplázií koreloval v určitém rozsahu s klinickým průběhem. BCAC-LG neoplázie vykazovaly méně agresivní průběh s lokálními recidivami, ale bez metastáz, kdežto BCAC-HG neoplázie typicky vykazovaly vysoce agresivní průběh, jehož důsledkem byla smrt 3 ze 6 pacientů s BCAC-HG. Pacienti se sarkomatoidním karcinomem měli relativně dobré přežití. Molekulárně genetické vyšetření neodhalilo žádné mutace genu *CYLD* u 4

sporadických případů. Jeden pacient s BSS nesl novou zárodečnou missense mutaci v exonu 14 (c.1961T>A, p.V654E). Živý potomek jiného zesnulého pacienta nesl zárodečnou nonsense mutaci v exonu 20 (c.2806C>T, p.R936X). Vzhledem k morfologické diverzitě a komplexitě neoplázií navrhuje používání více specifické terminologie s přesným popisem jednotlivých komponent, místo všeobecných a méně informativních termínů jako „spiradenokarcinom“, nebo „karcinom ex cylindrom“.

3.34. Kazakov DV, Ivan D, Kutzner H, Spagnolo DV, Grossmann P, Vanecek T, Sima R, Kacerovska D, Shelekhova KV, Denisjuk N, Hillen U, Kuroda N, Mukensnabl P, Danis D, Michal M. Cutaneous hidradenocarcinoma: a clinicopathological, immunohistochemical, and molecular biologic study of 14 cases, including Her2/neu gene expression/amplification, TP53 gene mutation analysis, and t(11;19) translocation. Am J Dermatopathol. 2009 May;31(3):236-47.

Souhrn

Prezentujeme soubor 14 případů kožních hidradenokarcinomů. Soubor byl tvořen 6 ženami a 8 muži, jejich věk se v době diagnózy pohyboval v rozmezí 34-93 let. Kromě jednoho se u všech pacientů vyskytoval solitární uzlík, který neměl žádné predilekční místo. U jednoho pacienta byly nalezeny mnohočetné léze reprezentující metastatické noduly. Z 12 pacientů u kterých byl k dispozici *follow up*, 2 zemřeli následkem nemoci, zbývajících 10 pacientů bylo naživu, ale u 3 z nich se vyvinula lokální recidiva. Velikost nádoru se pohybovala od 1,2 do 6 cm. Ze 14 primárních nádorů jich 9 mikroskopicky vykazovalo *low grade* cytomorfolonii, kdežto 5 zbývajících neoplázií byly *high grade* léze. Pozůstatky hidradenomů byly přítomny u 5 ze 14 primárních nádorů. Mitotická aktivita byla vysoce variabilní, v rozmezí od 2 do 64 mitóz na 10 HPF. Buněčné složení nádorů bylo mírně variabilní, se světlými buňkami, epidermoidními buňkami a přechodnými formami přítomnými u každého případu. U jednoho případu byla pozorována metaplastická transformace směrem k sarkomatoidnímu karcinomu. Glandulární diferenciaci se lišila u každého případu a nejčastěji měla vzhled jednoduchých kulatých žlázek, nebo buněk s intracytoplazmatickou hlenovou vakuolou. Nekróza „en masse“ byla detekována u 8 případů. Jeden případ prezentoval reexcizi a byl neobvyklý, protože vykazoval dobře ohraničenou intradermální proliferaci poměrně benigních světlých buněk v kombinaci s intraepidermálně rostoucími světlými buňkami podobnými hidradenoacanthoma simplex. Navzdory benignímu vzhledu nádor metastazoval do lymfatické uzliny. Imunohistochemicky bylo 5 z 8 studovaných případů negativní na expresi HER2/neu proteinu, kdežto 3 vzorky od 2 pacientů vykazovaly skóre 2+, ale všechny 3 vzorky se skóre 2+ byly následně negativní při průkazu amplifikace genu HER2/neu pomocí FISH. Z 10 studovaných primárních nádorů byly 4 imunohistochemicky pozitivní v reakci s protilátkami proti p53 u více než 25% buněk tvořících maligní složku lézí, u 2 případů vykazovalo malé množství buněk (10-20%) jaderné barvení, 4 zbývajících případy byly negativní. U 9 případů hidradenokarcinomů byla provedena analýza mutací genu TP53. U 2 z nich byla prokázána mutace, 7 zbývajících případů bylo negativních. U 11 případů byla zjišťována translokace t(11,19), u 2 případů byla tato translokace prokázána. Závěrem lze říci, že kožní

hidradenokarcinomy vykazují určitou mikroskopickou heterogenitu a jsou tvořeny jak *low*, tak i *high grade* lézemi, které jsou cytologicky podobné jejich benigním protějškům – hidradenomům. Zdá se, že ve spektru *low grade* lézí existují nádory téměř nerozlišitelné od hidradenomů, ale schopné tvořit regionální, nebo vzdálené metastázy. Podobně jako hidradenomy, také hidradenokarcinomy nesou translokaci t(11,19), ale výrazně méně často. Ještě vzácnější je amplifikace genu HER2/neu. Pozornost si zaslouží relativně nízká frekvence mutaci genu TP53, navzdory vysokému poměru exprese proteinu p53 na imunohistochemické úrovni.

3.35. Kazakov DV, Sima R, Vanecek T, Kutzner H, Palmedo G, Kacerovska D, Grossmann P, Michal M. Mutations in exon 3 of the CTNNB1 gene (beta-catenin gene) in cutaneous adnexal tumors. Am J Dermatopathol. 2009 May;31(3):248-55.

Souhrn

Předchozí studie naznačovaly, že mutace genu kódujícího β -catenin u kožních adnexálních nádorů s matrikální diferenciací přispívají k jejich tumorigenezi. S výjimkou pilomatrixomů a pilomatrikálních karcinomů byla dosud prostudována pouze hrstka dalších typů kožních adnexálních nádorů. DNA byla extrahována z 86 lézí zahrnujících 17 proliferujících tricholemmálních a trichilemmálních tumorů, 15 trichoblastomů, 7 trichoadenomů, 4 pilomatrixomy, 1 pilomatrikální karcinom, 4 karcinomy z bazálních buněk (BCC) s duchovitými buňkami, 2 trichofolikulomy, 3 BCC se sebaceózní diferenciací, 9 sebaceózních adenomů, 6 sebaceomů, 14 sebaceózních karcinomů (jak okulární, tak extraokulární formy), 2 gigantické rohy a 2 apokrinní smíšené tumory s duchovitými buňkami. Dále byly studovány 3 kraniopharyngiomy. Všechny léze byly analyzovány pomocí PCR s nově navrženými primery ohraničujícími *glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation site* genu CTNNB1. Sekvenační analýza odhalila 8 pravděpodobných mutací genu CTNNB1. Tyto zahrnovaly 5 různých bodových mutací, 3 z nich byly nalezeny u 2 různých nádorů: S23N (kribriformní trichoblastom), D32Y (pilomatrixom a kraniopharyngiom), G34R (pilomatrikální karcinom a kraniopharyngiom), S37F (2 BCC s diferenciací do duchovitých buněk) a G34V (kraniopharyngiom). Tato studie rozšiřuje seznam kožních adnexálních tumorů nesoucích mutaci genu CTNNB1 a rovněž doplňuje přehled mutací vyskytujících se u těchto neoplázií.

3.36. Skálová A, Sima R, Vanecek T, Muller S, Korabecna M, Nemcova J, Elmberger G, Leivo I, Passador-Santos F, Walter J, Rousarova M, Jedlickova K, Curik R, Geierova M, Michal M. Acinic Cell Carcinoma With High-grade Transformation: A Report of 9 Cases With Immunohistochemical Study and Analysis of TP53 and HER-2/neu Genes. Am J Surg Pathol. 2009 May 20.

Souhrn

High grade transformace acinického karcinomu (AciCC) (dříve popisovaná jako dediferenciace) je vzácný fenomén charakterizovaný histologickou progresí *low grade* AciCC směrem k *high grade* adenokarcinomu, nebo nediferencovanému karcinomu. Předkládáme 9 nových případů charakterizovaných imunohistochemicky a vyšetřených molekulárně biologicky (detekce amplifikace genu HER2/neu, analýza mutací genu p53) k bližšímu definování profilu tohoto nádoru. *High grade* komponenta byla histologicky složena z polymorfních buněk s vysokým mitotickým poměrem, uskupených do glandulárních a solidně rostoucích struktur s komedonekrózou. MIB1 indexy byly zvýšeny v *high grade* komponentě v porovnání s *low grade* konvenčním AciCC. *High grade* komponenta AciCC byla charakterizována silnou membránovou pozitivitou s protilátkami proti CK18 a β -catenin a nukleární pozitivitou proti cyklinu-D1. HER2/neu, androgen receptor, c-kit a EGFR se nebarvily ani v *low grade*, ani v *high grade* komponentě. Oproti tomu S-100 protein, α -1-antitrypsin a lysozym se neexprimoval pouze v *high grade* komponentě transformovaného AciCC. Medián věku pacientů byl 61 let (rozmezí 43-76 let). Metastázy do lymfatických uzlin byly nalezeny u 5 z 9 případů (56%). Dále byly pozorovány vzdálené metastázy do plic (4), pleury (2), mozku(3), peritonea (1) a paraaortálních, paratracheálních a mediastinálních lymfatických uzlin (2). 6 z 9 pacientů (66%) zemřelo z důvodu diseminace nádoru, s mediánem přežití 4,3 let (rozmezí 1-9 let). Vysoká tendence k metastázám do lymfatických uzlin naznačuje potřebu disekce cervikálních lymfatických uzlin v době diagnózy.

3.37. Kacerovska D, Sima R, Michal M, Hes O, Roucka P, Zarybnicka M, Hora M, Chudacek Z, Kazakov DV. Carney complex: a clinicopathologic and molecular biological study of a sporadic case, including extracutaneous and cutaneous lesions and a novel mutation of the PRKAR1A gene. J Am Acad Dermatol. 2009 Jul;61(1):80-7.

Souhrn

Carneyho komplex (CNC) je autozomálně dominantní onemocnění asociované s mnohočetnými neopláziemi. Předkládáme případ 40 letého muže se sporadickou formou CNC. Jedná se o klinicko patologický popis a molekulárně biologickou studii s důrazem na histopatologické poznatky. Pacient měl mnohočetné kožní myxomy, srdeční myxomy a flekatou pigmentaci na typických místech. Dále byly nalezeny: modrý névus, lipom, mnohočetné kalcifikace v obou testes a hypoechogenní oblasti ve štítné žláze, suspektní jako adenomy. 2 prostudované srdeční a 6 kožních myxomů mělo typický vzhled. Byly tvořeny roztroušenými, polygonálními, hvězdicovými, kulatými a/nebo vřetenitými buňkami v mucinózní matrix obsahující malé, někdy dilatované cévy. Ze 6 kožních myxomů byla pouze u jedné léze nalezena abnormální epiteliální komponenta (drobné bazaloidní papuly a rohovitá cysta). Molekulárně biologické vyšetření odhalilo heterozygotní posunovou mutaci c.796dupA v exonu 10 genu PRKAR1a. Zdravotní prohlídka i genetické vyšetření genu PRKAR1a u ostatních členů rodiny (oba rodiče a dva bratři) byly negativní, stejně jako vyšetření DNA z periferní krve od 110 náhodně vybraných, nepříbuzných, zdravých osob. Tyto nálezy naznačují, že se jedná o sporadické onemocnění a novou mutaci.

3.38. Novotný Z, Krízan J, Síma R, Síma P, Uher P, Zech N, Hütelová R, Baborová P, Ulcová-Gallová Z, Subrt I, Ulmanová E, Houdek Z, Rokyta Z, Babuska V, Králícková M. Leukaemia inhibitory factor (LIF) gene mutations in women diagnosed with unexplained infertility and endometriosis have a negative impact on the IVF outcome. A pilot study. Folia Biol (Praha). 2009;55(3):92-7.

Souhrn

Frekvence funkčně relevantních mutací genu LIF je u neplodných žen signifikantně vyšší v porovnání s plodnými kontrolami. Cílem této retrospektivní studie bylo zjištění vlivu mutací genu LIF na výsledek léčby žen s různými příčinami neplodnosti. Bylo analyzováno 15 neplodných žen nesoucích transici G>A v pozici 3400 genu LIF vedoucí k aminokyselinové záměně V64M. Skupina A byla tvořena ženami s diagnózami, které jsou často spojeny se změnami v humorální i buněčné imunitě – idiopatická infertilita a endometrióza (n=7). Skupina B se skládala z pacientek se syndromem polycystických ovárií (PCOS), pacientek, u nichž byl příčinou infertility andrologický faktor, tubální faktor a hyperprolaktinémie (n=8). Kontrolní skupinu tvořilo 136 neplodných žen bez mutace genu LIF diagnostikovaných s idiopatickou infertilitou a endometriózou (n=37) (skupina C) a pacientky s PCOS, tubální a andrologickou příčinou infertility (n=99) (skupina D). 7 z mutovaných pacientek bylo úspěšně vyléčeno in vitro fertilizací (IVF), ale žádná z těchto pacientek nebyla diagnostikována s idiopatickou infertilitou a pouze jedna s endometriózou, což znamená, že existuje statisticky signifikantní rozdíl poměru těhotných mezi skupinami A a B (P=0,01, Fisherův exaktní test), ale nebyl nalezen statisticky signifikantní rozdíl, pokud byly porovnávány pacientky s mutacemi genu LIF (skupiny A+B) s pacientkami bez LIF mutací (skupiny C+D). Výsledky naznačují, že u žen s mutací mají idiopatická infertilita a endometrióza negativní vliv na výsledek IVF léčby.

3.39. Daum O, Šíma R, Michal M. Patologická diagnostika gastrointestinálního stromálního tumoru. Onkologie 2010; 4(1).

Souhrn

Gastrointestinální stromální tumor je nejčastější mezenchymální nádor trávicího traktu. V současné době je definovaný jako nádor tvořený vřetenitými a/nebo epiteloidními buňkami, jejichž fenotyp odpovídá diferenciaci v Cajalovy interstitiální buňky. Nejčastěji se gastrointestinální stromální tumor vyskytuje v žaludku, méně často v ostatních částech trávicí trubice, vzácně i mimo trávicí trakt, a to v mezenteriu, omentu, retroperitoneu, žlučníku, močovém měchýři, pankreatu a ve vagině. Ve většině případů je možná poměrně spolehlivá diagnóza z rutinního barvení hematoxylinem a eosinem ve světelné mikroskopii. Imunohistochemická vyšetření zahrnují pozitivní průkaz KIT proteinu (CD117), PDGFRA a/nebo DOG-1, stejně jako negativní průkaz markerů jiných diferenciačních linií. Molekulárně genetické vyšetření genů KIT a PDGFRA má význam nejen diferenciačně diagnostický, ale i prediktivní. Negativita těchto vyšetření však diagnózu nevylučuje. Každý gastrointestinální stromální tumor je třeba považovat za potenciálně maligní. Riziko agresivního chování se v současné době stanovuje na základě lokalizace, mitotického indexu a maximálního rozměru nádoru.