

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2014

SANDRA ŠILAROVÁ

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biologických a lékařských věd

**SLEDOVÁNÍ INCIDENCE NESTABILITY MIKROSATELITŮ
V NÁDOROVÝCH BUŇKÁCH KARCINOMU TLUSTÉHO
STŘEVA POMOCÍ IMUNOHISTOCHEMICKÉHO
VYŠETŘENÍ EXPRESE PROTEINŮ MLH1, MSH2 A MSH6**

Bakalářská práce

v oboru Zdravotní laborant

Vedoucí práce:

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Konzultant:

MUDr. Jan Nožička, PhD.

Hradec Králové 2014

Sandra Šilarová

Prohlášení:

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

V Hradci Králové.....

Poděkování:

Děkuji panu MUDr. Janu Nožičkovi, PhD. za výběr velmi zajímavého tématu bakalářské práce, za umožnění jeho praktického provedení, cenné rady a odbornou pomoc při vyhodnocování výsledků. Děkuji také paní Elišce Štaudové z Masarykova onkologického ústavu v Brně, za laskavé poskytnutí materiálů k sepsání této bakalářské práce.

Obsah.....	4
Zkratky.....	6
Abstrakt.....	8
ÚVOD.....	9
I. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
1. HISTORIE LYNCHOVA SYNDROMU.....	12
2. LYNCHŮV SYNDROM.....	12
2.1. Definice.....	12
2.2. Etiologie.....	13
2.2.1. Genetika.....	13
2.2.2. Patogeneze.....	15
2.3. Formy Lynchova syndromu.....	16
2.3.1. Kolorektální karcinom.....	17
2.3.2. Karcinom endometria.....	17
2.3.3. Muir-Torre syndrom.....	18
2.4. Rozdíly u pohlaví.....	19
2.5. Diagnostika Lynchova syndromu.....	21
2.5.1. Kritéria výběru pacientů pro testy při podezření na LS.....	21
2.5.2. Testování pacientů při podezření na LS.....	22
2.5.3. Kolonoskopie.....	26
2.5.4. Prenatální diagnostika.....	26
2.6. Prevence.....	27
2.7. Terapie.....	28
2.7.1. Chirurgická terapie.....	28
2.7.2. Chemoprevence.....	28
2.7.3. Chemická léčba kolorektálního karcinomu.....	29
II. PRAKTICKÁ ČÁST.....	30
3. ZHOTOVENÍ PREPARÁTU.....	32
3.1. Krájení parafinových bločků na mikrotomu.....	32
3.1.1. Přístroje a pomůcky.....	32
3.1.2. Postup.....	32

3.2. Imunohistochemické barvení preparátů.....	33
3.2.1. Metodika.....	33
3.2.2. Přístroje, měřicí prostředky, pomůcky a chemikálie.....	33
3.2.3. Příprava před barvením.....	35
3.2.4. Odparafinování a zavodnění řezů.....	36
3.2.5. Vlastní imunohistochemické barvení.....	36
3.2.6. Odvodnění a projasnění preparátů.....	37
3.2.7. Montování.....	38
3.2.8. Ukázka pozitivního a negativního preparátu nabarveného imunohistochemickým barvením.....	39
4. VÝSLEDKY.....	40
4.1. Vyhodnocení výsledků.....	42
5. DISKUZE.....	43
6. ZÁVĚR.....	45
III. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	46

Seznam použitých zkratek

LS	Lynchův syndrom
CRC	Kolorektální karcinom
HNPCC	Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
MLH1	MutL Protein Homolog 1
MSH2	MutS Protein Homolog 2
MSH6	MutS Protein Homolog 6
PMS2	Gen postmeiotické segregace 2
PMS1	Gen postmeiotické segregace 1
MLH3	MutL Protein Homolog 3
MSH3	MutS Protein Homolog 3
DNA	deoxyribonukleová kyselina
MMR	mismatch repair geny
MSI	nestabilita mikrosatelitů
EpCAM	gen pro epitelovou buňku adhezní molekuly
MSI-H	nestabilita mikrosatelitů s vysokou nestabilitou
MSI-L	nestabilita mikrosatelitů s nízkou nestabilitou
MSS	nestabilita mikrosatelitů neprokázána
TGF β R II	transformující růstový faktor β receptoru typu II
IGFR II	inzulínu podobný růstový faktor II
FAP	Familiární adenomatózní polypóza
MTS	Muir-Torre syndrom
CNS	centrální nervový systém
PCR	polymerázová řetězová reakce
NCI	National Cancer Institute
IHC	Imunohistochemické
PGD	preimplantační genetická diagnostika
TAC	úplná břišní kolektomie
NSAID	nesteroidní protizánětlivé léky
5FU	5-fluorouracil
VEGF	vaskulární endoteliální růstový faktor
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru

RTU	Ready to use
DAB	diaminoethylbenzidin
TMM	trometamolium
ZN	zhoubný novotvar

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá uvedením do praxe imunohistochemického průkazu proteinů jádra podílející se na opravách chyb vzniklých při transkripci genů (MLH1, MSH2 a MSH6). Klinicky se vrozené poruchy těchto genů projevují v rámci tzv. Lynchova syndromu a na molekulárně genetické úrovni se manifestují tzv. nestabilitou mikrosatelitů. V teoretické části se věnuji popisu onemocnění LS, etiologii, formám Lynchova syndromu, diagnostice i možnostem prevence a včasného záchytu kolorektálního karcinomu. V praktické části byla testována skupina 30 pacientů s pozitivním nálezem karcinomu tlustého střeva. Popisuji zde vlastní zhotovení imunohistochemického preparátu a výsledky studie.

Abstrakt

The main goal of this thesis is introducing of immunohistochemical staining MLH1, MSH2 and MSH6 nuclear proteins into practice. These proteins are involved in the repairs of errors that happen during the transcription of genes. Inherited mistake of any of these genes clinically displays usually in the form of so-called Lynch syndrome. The most typical presentation at the molecular-genetic level is microsatellite instability of tumor cells. In the theoretical part Lynch syndrome is described ,etiology , forms of Lynch syndrome, diagnosis and prevention possibilities. In the practical part a test of the group of 30 patients with positive colon cancer. I describe a preparation of immunohistochemical slides and study results.

ÚVOD

Incidence karcinomu tlustého střeva v České republice patří k nejvyšší na světě. Tato skutečnost se pravděpodobně nedá vysvětlit pouhými dietními či jinými zevními faktory a na této skutečnosti se bude s nejvyšší pravděpodobností podílet vliv genetické zátěže. Jednou z možností, která dosud nebyla v české populaci řádně prozkoumána je možnost zvýšeného výskytu tzv. HNPCC (Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom).

Cílem mé práce je uvedení do praxe imunohistochemického průkazu proteinů jádra podílející se na opravách chyb vzniklých při transkripci genů (MLH1, MSH2 a MSH6), které se nejčastěji vyskytují v rámci tzv. Lynchova syndromu.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. HISTORIE LYNCHOVA SYNDROMU

V roce 1895 začal Dr. Warthin, patolog na Univerzitě v Michiganu, studovat rodinu označenou jako „Family G“. Byla to rodina jeho švadleny, která před ním prohlásila, že zemře na rakovinu v mladém věku, jako celá její rodina. Podrobný popis této rodiny byl publikován v odborném článku roku 1913. (1)

Jako první popsal onemocnění americký profesor Henry T.Lynch v roce 1966 jako „rodinný rakovinný syndrom“. Až v roce 1984 byl jinými autory připojen termín Lynchův syndrom a v roce 1985 sám Henry T.Lynch přidal termín- dědičný nepolypózní kolorektální karcinom. Od rozpoznání molekulárně genetické podstaty této nemoci se používá termín Lynchův syndrom pro všechny nemoci, které vznikly na podkladě zárodečné mutace v jednom z DNA mismatch repair genů. (2)

2. LYNCHŮV SYNDROM

2.1. Definice

Lynchův syndrom nazývaný též hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC), je nejčastější vrozenou chorobou predisponující ke vzniku karcinomu tlustého střeva s vysokou penetrancí. Je dán autozomálně dominantním typem dědičnosti. Zaujímá asi 2 až 5 % všech případů nádorů tlustého střeva. Nejčastější příčinou onemocnění jsou zárodečné mutace genů MLH1 a MSH2. Menší podíl mají mutace genu MSH6. (3) Lynchův syndrom je charakteristický rozvojem nemoci v brzkém věku. (4) Průměrný věk diagnózy CRC u Lynchova syndromu je 44 let. U sporadického karcinomu je průměrný věk asi 64 let. (5)

Spolu s kolorektálním karcinomem jsou pro LS typické i karcinomy endometria, žaludku, vaječníků, močových cest, slinivky břišní a další. (4)

2.2. Etiologie

Lynchův syndrom je onemocnění způsobené výpadkem účinnosti DNA mismatch repair genů (DNA MMR), důsledkem je ztráta nebo nefunkčnost DNA MMR proteinů. Mutace v MSH2, MLH1, MSH6 a PMS2 mohou snížit věrnost replikace DNA jako je schopnost rozpoznat a nahradit chyby vyplývající z nesprávného začlenění bází DNA polymerázy. (6) Pokud nedojde k opravě chyby, dochází dalšími replikacemi DNA ke kumulaci chyb, což vede ke zvrhnutí buňky v rakovinnou. (2)

2.2.1. Genetika

Lidský genom je dynamický. Odhaduje se, že každá buňka podstoupí více jak 20 000 DNA škodlivých událostí a více jak 10 000 chyb v replikaci na buňku za den. (7) K zachování integrity genetické informace používají buňky mnoho funkčních systémů. (8) Jedním z mechanismů, jak opravit chyby v replikaci, je MMR systém. (7) Nedokáže-li buňka chybu opravit, zahájí řízenou smrt – apoptózu. (8) Charakteristickým znakem nádorů v rámci LS je nestabilita mikrosatelitů (MSI). Mikrosatelity jsou krátké mono-, di-, trinukleotidové nekódující oblasti opakující se v celém lidském genomu. Existuje více než 200 mikrosatelitů. Páry bází mikrosatelitů ve vzorku pacienta jsou jedinečné jako otisk prstů. (9)

Dodnes je Lynchův syndrom spojen se sedmi DNA MMR proteiny: MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PMS1, MLH3 a MSH3. (10) Rozeznáváme 4 hlavní geny, jejichž zárodečné mutace jsou zodpovědné za LS. Jsou to geny ze skupiny takzvaných „DNA mismatch-repair genů“ (MMR genů), což jsou geny účastníci se rozpoznání a opravy chyb v DNA, vznikající při replikaci. (8) Neschopnost opravy chyb u eukaryot vyžaduje přítomnost dvou heterodimerních komplexů s názvem Mutl a Muts. (10)

Mezi nejčastější MMR geny způsobující vznik LS jsou MLH1 (Mult homolog 1) a MSH2 (Muts homolog 2) mající vysokou úroveň nestability mikrosatelitů. Mezi další MMR geny patří MSH6 (Muts homolog 6) a PMS2 (gen postmeotické segregace). Posledním genem způsobujícím LS je EpCAM (gen pro epitelovou buňku adhezní molekuly), která se při běžném vyšetřování MMR obvykle nedá rozlišit od MSH2. (11) DNA MMR proteiny pracují

ve dvojicích: MLH1/PMS2 a MSH2/MSH6 a rozlišujeme je jako protein hlavní/vedlejší. Pokud primárně chybí protein hlavní, chybí i protein vedlejší. Pokud chybí protein vedlejší, hlavní zůstává. Aby buňka šetřila aminokyselinami, všechny nepotřebné proteiny degraduje ubikvitinovou cestou. (2)

Gen MLH1 se nachází na krátkém raménku chromozomu 3 v oblasti 3p23-21 a u nemocných s HNPCC dochází k jeho mutaci. Bylo identifikováno více než 250 různých patogenních zárodečných mutací genu MLH1. Mutovaný gen MLH1 je nejčastější příčinou onemocnění HNPCC. (8) Komplex MLH1-PMS2 iniciuje opravné funkce postupující proti směru řetězce DNA (odstranění chybně spárované sekvence řetězce, opravy prostřednictvím navázání nukleáz, polymeráz a jiných proteinů). (25)

Gen MSH2 byl lokalizován na krátkém raménku chromozomu 2 oblast 2p21. Jeho mutace jsou druhou nejčastější příčinou HNPCC. Gen MSH2 má více než 200 různých patogenních zárodečných mutací. (8) MSH2 spolu s MSH6 nebo MSH3 se účastní přímého rozeznání chybně spárovaných jednotlivých nukleotidů a inzerčních-delečních smyček a zapojení MMR proteinů PMS2 a MLH1. (25)

Gen MSH6 byl objeven jako součást funkčního heterodimeru tvořeného společně s proteinem MSH2. MSH6 se též nachází v oblasti 2p21 vzdálen 1 Mb od genu MSH2.

Gen PMS2 způsobuje HNPCC jen vzácně. Navíc je jen výjimečně vyšetřován, jelikož jeho analýza je komplikovaná. Nachází se v oblasti dlouhého raménka chromozomu 7q11.23. (8)

EpCAM (dříve známý jako TACSTD1) je non-MMR gen, který kóduje epiteliální buněčné adhezni molekuly CD 326. Nachází se na všech normálních epiteliálních buňkách a na buňkách některých karcinomů. Germ-line delece zakončující 3' konec EpCAM v hypermethylaci promotoru způsobuje inaktivaci genu MSH2 a následný vývoj mnohočetných malignit v souladu s LS. (9)

2.2.2. Patogeneze

Vysoké riziko vzniku rakoviny u pacientů s HNPCC je způsobeno vadou opravy DNA v důsledku mutací v MMR genu. Mutace se obvykle dědí od jednoho rodiče, tudíž každá buňka v těle nese jak vadnou kopii, tak i plně funkční, kterou udržuje reparace DNA v buňkách. K chybné opravě DNA v buňkách dochází pouze tehdy, stane-li se i druhá kopie genu nefunkční v důsledku náhodné mutace. Chybná DNA způsobuje zvýšení frekvence somatických mutací v buněčné linii a tím zrychlení vzniku zhoubného onemocnění. (12)

Mutace v genech MLH1 a MSH2 mají větší význam v opravě DNA než mutace v dalších MMR genech. Pacienti s MLH1 nebo MSH2 mutací mají podstatně vyšší riziko vzniku nádoru než pacienti s MSH6 mutací. Mutace PMS2 jsou neobvyklé a riziko vzniku nádoru je u nich nejmenší. (12) MSH2 tvoří heterodimerické komplexy s MSH3 a MSH6 a je zodpovědný za mutaci vedoucí k vytvoření nefunkčního proteinu. Tato mutace se hromadí v oblasti mikrosatelitu, které lze snadno zjistit srovnáním s mikrosatelitní oblastí normální buňky. Tento genotypový výraz se nazývá vysoká mikrosatelitní nestabilita (MSI-H). Ztráta MSH6 nebo MSH3 sama o sobě nevede k tvorbě rakoviny. MLH1 tvoří heterodimer s PMS2 a pravděpodobně i s MLH3. MLH1 a MSH2 jsou dva nejčastější mutované geny u nádorů Lynchova syndromu. Při mutaci MMR genů je v kódující oblasti mikrosatelitů několik konkrétních genů citlivých na hromadění mutací. Mezi tři nejčastější patří Transformující růstový faktor β receptor typu II (TGF β R II), inzulínu podobný růstový faktor II (receptor IGFR II) a BAX. Devadesát procent nádorů s MSI mají buď mutaci TGF β R II nebo IGFR II. TGF β R II funguje jako nádorový supresor inhibující růst epitelových buněk. IGFR II aktivuje TGF β R II. Mutace obou těchto genů má za následek nekontrolovatelný růst epitelu a vznik rakoviny. (9)

2.3. Formy Lynchova syndromu

Pochopení Lynchova syndromu se v průběhu času měnilo a stále se vyvíjí. Spektrum malignit spojených s Lynchovým syndromem je mnohem rozmanitější než jsme si mysleli a velmi se liší od prvních popisů. Vedle dobře dokumentovaných malignit objevujeme další nádory, které přiřazujeme k Lynchově syndromu. Za tyto poznatky vděčíme hlavně vývoji diagnostických metod a medicínskému pokroku. (3)

Nejčastějším projevem Lynchova syndromu je kolorektální karcinom, celoživotní riziko propuknutí nemoci je u mužů 28 - 75 % a u žen 24 – 52 %. (3)

Nejčastějším extrakolonickým karcinomem u LS je karcinom endometria. Celoživotní riziko je 21 – 71 %. Riziko se liší podle mutace genu. Mutace genu MSH2 má vyšší riziko rakoviny endometria než mutace genu MLH1. (5)

Několik studií ukázalo, že sledování rodin s LS snižuje rozvoj CRC v 60% a také dochází k úbytku mortality. (5)

Zvýšené riziko malignit v extrakolonických lokalitách:

- endometrium (40 – 60 % riziko v průběhu života u žen nesoucích mutaci)
- vaječník (12 - 15 % riziko v průběhu života u žen nesoucích mutaci)
- žaludek (vyšší riziko v asijské populaci)
- tenké střevo
- hepatobiliární trakt (vzácné, bez screeningových doporučení)
- pankreas (vzácné, bez screeningových doporučení)
- horní uroteliální trakt (karcinom ureteru a ledvinové pánvičky z přechodných buněk)
- karcinom prostaty (zůstává kontroverzní)
- karcinom prsu
- karcinom kůry nadledvinek (vzácné, není jasné zda skutečně souvisí)
- hepatocelulární karcinom (vzácné, není jasné zda skutečně souvisí)
- mozek (glioblastom, u Lynchova syndromu označovaný jako Turcotův syndrom)
- sebaceózní adenomy nebo karcinomy a mnohočetné keratoakantomy u varianty Lynchova syndromu označovaného jako Muir-Torre syndrom (1)

2.3.1. Kolorektální karcinom

Nejčastější rakovinou u HNPCC je kolorektální karcinom lokalizovaný zejména v proximální části tlustého střeva. (12) HNPCC odlišujeme od Familiární adenomatózní polypózy (FAP), u které jsou pacienti postiženi stovkami snadno se rozvíjejících adenomů. (19)

Prekurzorem léze CRC u Lynchova syndromu je adenom. Tento adenom je, na rozdíl od adenomů vyskytujících se u sporadického CRC, „agresivní“, to znamená, že progreduje do karcinomu rychleji. (20) Sporadické MSI-H karcinomy vznikají z tzv. „sesilných serrated adenomů“ (přisedlých pilovitých adenomů, kdežto pro Lynchův syndrom jsou typické „konvenční“ (tubulární, tubulovilózní nebo vilózní) adenomy. (26) Proto by pacienti s Lynchovým syndromem měli pravidelně podstupovat kolonoskopické vyšetření s pečlivým vyhledáváním a odstraňováním všech slizničních lézí. (20) Porucha opravy genů MMR DNA se vyskytuje u 95% dědičného kolorektálního karcinomu a u 10-15% sporadického CRC. (25)

2.3.2. Karcinom endometria

Předpokládá se, že na základě zděděné predispozice vzniká 5-10% všech karcinomů endometria. Naprostá většina vzniká na podkladě mutací genů MMR. Tyto ženy jsou nosičkami Lynchova syndromu. Riziko vzniku karcinomu endometria je u nich stejné jako riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Velmi častá je duplicita CRC a karcinomu endometria (až 61%), u poloviny žen prvně diagnostikována gynekologicky (endometriální histologií). Molekulárně jsou nacházeny mutace MMR genů odlišné od CRC a mutace supresorového genu PTEN. (13) Nejčastějším typem mutace je MSH6. (26) Prognóza karcinomu endometria u žen s Lynchovým syndromem se neliší od sporadického karcinomu. (13)

2.3.3. Muir-Torre syndrom

Muir-Torre syndrom je fenotypická varianta LS. Je kombinací minimálně jednoho kožního nádoru se sebaceózní diferenciací a nejméně jednoho viscerálního tumoru. (14) Poprvé byl popsán v roce 1967 a 1968 Muirem a Torrem. Kožním příznakem MTS jsou mnohočetné keratoakantomy lokalizované na místech chráněných před sluncem u osob před 50. rokem života. Kožní tumory jsou většinou mnohočetné a vyskytují se současně s nádory vnitřních orgánů nebo jim předcházejí.

Mezi mikroskopické změny u kožního typu Muir-Torre syndromu řadíme:

1. cystické změny (cystický sebaceózní tumor)
2. architektika napodobující keratoakantom (u sebaceózních adenomů, seboakantom)
3. intra- a peritumorální lymfocytární infiltrace
4. mucinóza
5. intra- a intertumorální heterogenita (rozdíly i v rámci samotného nádoru)

Nejčastějším mimo kožním nálezem u MTS je kolorektální karcinom vznikající v proximální části tlustého střeva, vzácně rekta. Prekurzorem bývají ploché adenomy s krátkou dobou maligní transformace. Nádory tlustého střeva spojené s MTS mají stejné morfologické rysy jako u HNPCC. Dále mohou u MTS vznikat nádory ženského pohlavního systému, ureteru a ledvinné pánvičky, močového měchýře a zřídka i jiných orgánů (prsa, plíce, CNS, varlata, prostata,...). (14)

2.4. Rozdíly u pohlaví

	Age (years)				
	30–39 n=25	40–49 n=30	50–59 n=21	60–69 n=10	70–79 n=5
Males	33%	64%	72%	80%	80%
Females	50%	59%	65%	68%	68%
Combined	43%	61%	67%	72%	72%

Tabulka 1 : Kumulativní riziko kolorektální neoplázie rozvoj podle věku a pohlaví

Age (years) = věk, Males = muži, Females = ženy, Combined = kombinace. (19)

Průměrný věk při prvním adenomu byl $46,5 \pm 9,7$ a pro první kolorektální karcinom $46,8 \pm 9,9$. Střední počet neoplastických lézí u dotčených osob bylo: $1,3 \pm 0,5$ ve věku 20-29, $1,8 \pm 1,4$ ve věku 30-39, $2,2 \pm 1,8$ ve věku 40-49, $3,5 \pm 2,9$ ve věku 50-59, $5,3 \pm 5,1$ pro věkové kategorie 60-69 let a $7,6 \pm 6,8$ ve věku 70-79 let. Kolorektální zátěž tří nebo více neoplastických lézí u pacientů do 30 let věku nebo šest nebo více u pacientů pod 50 let bylo více než dvě standardní odchylky od průměru. (19)

Tabulka 2:

Umístění kolorektální neoplázie bývá pravostranné u mladších i starších mužů, levostranné u mladších i starších žen. Rozdíly podle pohlaví jsou na hranici významnosti. (19)

Male		Age 20-49	R/L ratio	p-value ^a	Male		Age 50-79	R/L ratio	p-value ^b
	R	16	1.6	0.042		R		2.67	0.012
	L	10				L			
Female		Age 20-49	R/L ratio		Female		Age 50-79	R/L ratio	
	R	12	0.52			R		0.75	
	L	23				L			
Males and Females		Age 20-49	R/L ratio		Males and Females		Age 50-79	R/L ratio	
	R	28	0.85			R		1.16	
	L	33				L			

a) umístění kolorektální neoplázie mezi muži a ženami ve 20-49 letech

b) umístění kolorektální neoplázie mezi muži a ženami ve věku 50-79 lety

Pomocí statistické analýzy bylo zjištěno, že rozdíly podle pohlaví byly okrajově významné ($p = 0,09$) (19)

2.5. Diagnostika Lynchova syndromu

2.5.1. Kritéria výběru pacientů pro testy při podezření na LS

Jako diagnostická kritéria se používají kritéria Amsterdam I, II a revidovaná kritéria z Bethesdy.

Amsterdamská kritéria I

1. V rodině jsou alespoň tři pacienti s karcinomem tlustého střeva, jeden z nich je příbuzný prvního stupně ostatních dvou.
2. Jsou postiženy alespoň dvě generace.
3. Alespoň jeden nemocný byl mladší 50 let v době diagnózy.
4. Nádor byl ověřen patologem.
5. Je vyloučena familiární adenomatózní polypóza. (15)

Amsterdamská kritéria II

1. V rodině jsou alespoň tři příbuzní s karcinomem sdruženým s HNPCC (kolorektální karcinom, karcinom endometria, tenkého střeva, ureteru a ledvinové pánvičky), jeden z nich je příbuzný prvního stupně ostatních dvou.
2. Jsou postiženy alespoň dvě generace.
3. Alespoň jeden nemocný byl mladší 50 let v době diagnózy.
4. Nádor byl ověřen patologem.
5. Je vyloučena familiární adenomatózní polypóza. (16)

Revidovaná kritéria z Bethesdy:

1. Kolorektální karcinom diagnostikovaný u pacienta mladšího 50 let.
2. Přítomnost synchronních nebo metachronních karcinomů střeva nebo jiných nádorů sdružených s HNPCC (karcinom kolorekta, endometria, žaludku, tenkého střeva, ovaria, pankreatu, ureteru a pánvičky, biliárního traktu, mozku – glioblastom, kůže – adenomy sebaceózních žláz a keratoakanthomy), bez ohledu na věk.
3. Kolorektální karcinom s histologií odpovídající vysokému stupni MSI (MSI-H), diagnostikovaný u pacienta mladšího 60 let (přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů, lymfocytární reakce podobná Crohnově chorobě, acinózní charakter, medulární růst, prstencové buňky v nádoru).
4. Kolorektální karcinom diagnostikovaný u jednoho nebo více příbuzných prvního stupně s nádorem charakteristickým pro HNPCC, jeden z nádorů je diagnostikován před 50. rokem věku.
5. Kolorektální karcinom diagnostikovaný u dvou nebo více příbuzných prvního nebo druhého stupně s nádory sdruženými s HNPCC, bez ohledu na věk. (17)

Studie hodnotící provádění klinických kritérií u populací s vysokým rizikem vzniku syndromu Lynch ukázaly, že Bethesda pokyny mají vyšší citlivost než Amsterdamská I a II kritéria. (5)

2.5.2. Testování pacientů při podezření na LS

1. Mezi histologické znaky Lynchova syndromu řadíme:

- a) Lymfotropii – infiltrace nádoru lymfocyty
- b) Hlenová jezírka – nádorové buňky produkují hlen vytvářející hlenová jezírka (extra-celulární hlen). Nádorové buňky se nacházejí uvnitř jezírek v podobě ostrůvků buněk.
- c) Prstenčité buňky – buňky tvaru pečetního prstene. Uvnitř buněk se nachází sekreční váčky plné hlenem, které vytlačují jádro k plazmatické membráně.
- d) Medulární vzhled – architektura tkáně nádoru je rozpadnutá, protože buňky mezi sebou ztrácejí adhezi. (2)

2. Test mikrosatelitní nestability (MSI)

MSI testy jsou prováděny pomocí PCR. Principem je zjištění přítomnosti různých délek specifických mikrosatelitních repetitiv v nádorových buňkách v porovnání s normální tkání v důsledku nesouladu vzhledem k nepřítomnosti jednoho nebo více proteinů MMR. National Cancer Institute (NCI) stanovila v roce 1997 referenční panel mikrosatelitů pro klinické testování a výzkum a také definovala kritéria pro diagnostiku MSI. Panel se skládá ze dvou mononukleotidů (BAT25 a BAT26) a tří dinukleotidů (D5S346, D2S123, D17S250). Byly stanoveny tři kategorie: MSI-H = s vysokou nestabilitou, prokázána nestabilita na dvou nebo více lokusech (více jak 30% z lokusů ve větších panelech), MSI-L = nízká nestabilita, nestabilita v jednom lokusu (10 - 30% z lokusů ve větších panelech) a MSS = nebyla prokázána nestabilita (méně jak 10% ve větších panelech). (7)

3. Test vyloučení mutace BRAF

BRAF V600E mutace je přítomna přibližně u 10% nádorů CRC s vyšším podílem MSI. Tato mutace je spojena s inaktivací MLH1 a používá se k rozlišení LS od sporadického onemocnění. Nedostatek mutací BRAF identifikuje případy CRC spojené s LS s vysokou citlivostí (96 - 100%) a nižší specifitou (22 - 100%). Absence mutace BRAF znamená 96% jistotu, že jde o onemocnění LS. (18)

4. Test hypermetylace promotoru genu MLH1

Somatická hypermetylace promotoru MLH1 je přímá, přesná a nákladově efektivní pre-screeningová metoda sloužící k výběru pacientů při podezření na Lynchův syndrom. Metylace specifické MLPA(MS-MLPA) je založena na principu realtime PCR. Pomocí sond, které obsahují jedno nebo dvě trávící místa do kterých se navazuje enzym specifický pro metylaci.

Absence hypermetylace ukázala citlivost 96% a specifitu 66% pro identifikaci Lynchova syndromu. Některé studie dokonce dokazují, že analýza hypermetylace MLH1 z nádorových biopsií (jak jej hodnotí MS-MLPA) překonává BRAF mutace pro výběr pacientů s Lynchovým syndromem z hlediska citlivosti, specifčnosti a je i nákladově efektivní. (18)

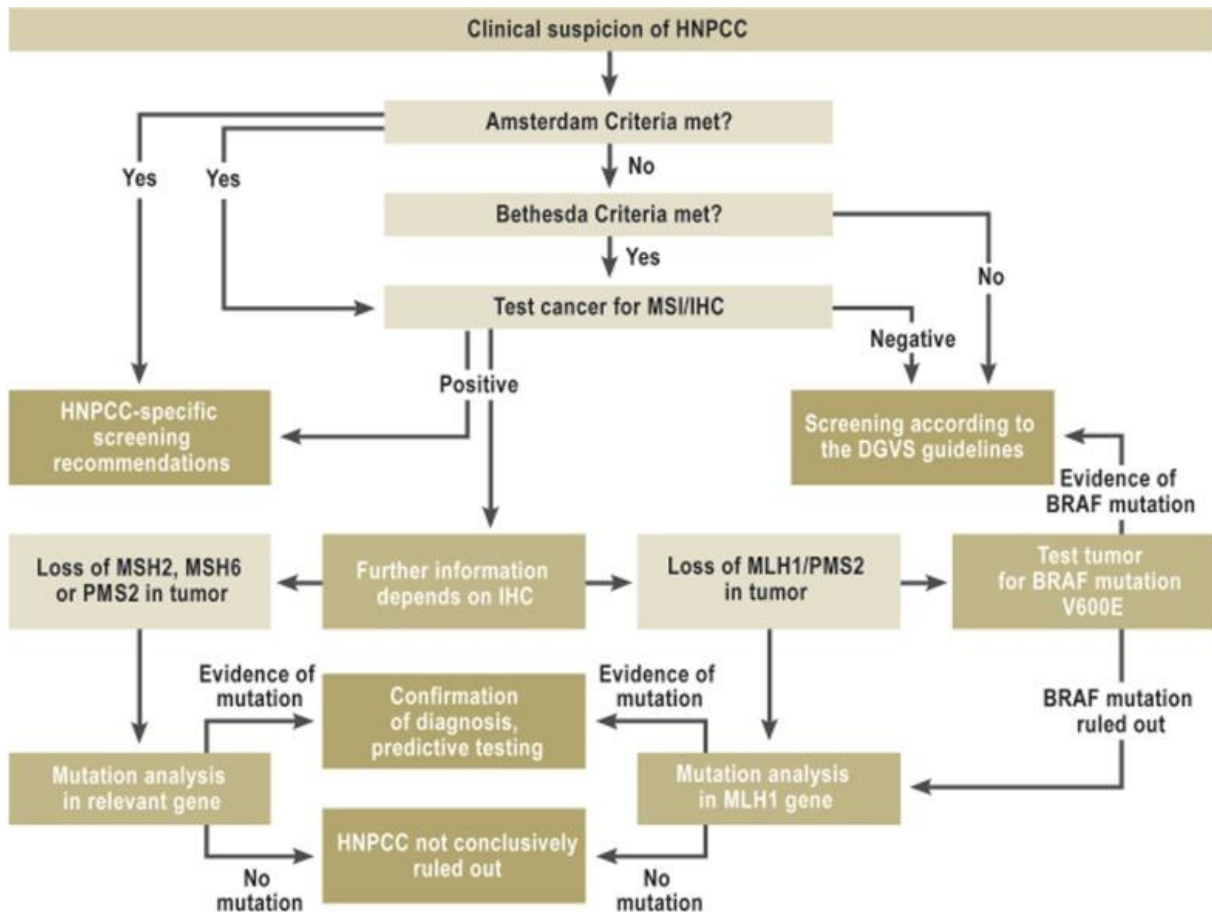
5. Imunohistochemické vyšetření MMR proteinů

IHC vyšetření slouží pro účely screeningu téměř stejně citlivě jako vyšetření MSI. Výhodou IHC je lepší dostupnost a možnost dalšího nasměrování genových testů. (3)

Princip použití IHC je postavený na nepřímém průkazu proteinů MMR pomocí jejich protilátek. Protilátky proti proteinům MMR jako je MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2 jsou komerčně dostupné a mohou být použity k poskytnutí informace o funkčnosti systému MMR. Ztráta exprese jednoho nebo více těchto proteinů naznačuje nedostatečnou funkčnost MMR systému a ukazuje, který gen byl inaktivován. Eukariotické MMR proteiny tvoří funkční heterodimery. MSH2 a MLH1 proteiny jsou společné podjednotky příslušných heterodimerních komplexů a při mutaci se ztráta obou společných podjednotek a jejich partnerských proteinů typicky projevuje při IHC.

Pochopení exprese MMR proteinů, genetický základ syndromu Lynch, sporadického CRC a MSI jsou důležité pro interpretaci výsledků IHC a pro vedení další molekulární analýzy.

Rigan et al. prokázali, že výhody IHC při posuzování MSI jsou: citlivost 92,4% a specifita 97,8% což je srovnatelné s PCR. (7)



Překlad k obrázku 1:

clinical suspicion of HNPCC = klinické podezření na HNPCC

Amsterdam criteria met = Splněna Amsterdamská kritéria

Bethesda criteria met = Splněna kritéria podle Bethesdy

Test cancer for ... = testování rakoviny pomocí

Yes = ano, No = ne, Positive = pozitivní, Negative = negativní

HNPCC-specific screening recommendation = HNPCC specifické screeningové doporučení

Screening according to the DGVS guidelines = screening podle pokynů DGVS

Evidence of mutation = evidence mutace

Loss of....in tumor = ztráta v nádoru

Further information depends on IHC = další informace je závislá na IHC

Mutation analysis in relevant gene = analýza mutací v příslušném genu

Confirmation of diagnosis predictive testing = potvrzení diagnózy prediktivní testování

HNPCC not conclusively ruled out = HNPCC nelze přesvědčivě vyloučit (12)

2.5.3. Kolonoskopie

K doporučenému screeningu rakoviny tlustého střeva patří zahájení kompletního kolonoskopického vyšetření tlustého střeva každé 1 až 2 roky začínající již ve 20 letech. Bylo prokázáno, že pravidelné kolonoskopie snižují mortalitu a morbiditu spojenou s CRC vyskytující se u Lynchova syndromu. (23)

2.5.4. Prenatální diagnostika

Preimplantační genetická diagnostika (PGD) obsahuje soubor molekulárně - biologických metod popisujících genetický stav embrya před implantací do dělohy. Do dělohy jsou pak zavedena pouze embrya, u kterých nebyla prokázána sledovaná abnormalita. Zabrání se tím přenosu zárodečného genetického onemocnění do další generace. PGD se týká pouze asistované reprodukce. Jako diagnostická metoda se používá PCR.

V Sanatoriu Helios v Brně se PGD PCR provádí na embryích ve stádiu blastocysty. Hlavní výhodou zkoumání u tohoto stádia je, že na rozdíl od biopsie třídenních embryí se bioptují a vyšetřují pouze embrya nejvyšší kvality s největší pravděpodobností implantace. Dochází tím k získání většího počtu buněk a tím i vyšetřovaného materiálu, což vede k větší přesnosti výsledku genotypizace.

PGD je pro páry s výskytem genetického onemocnění v rodině možností mít dítě, které neponese patologickou vlohu do další generace. Přes mnohá úskalí a etnická dilemata pak PGD představuje unikátní alternativu prenatální diagnostiky. (21)

2.6. Prevence

Tabulka 3: Péče o nosiče mismatch-repair genů (podle národního doporučení : Plevová, P. et al. Klin Onkol, 2009, 22, p. 12 – 15).

Vyšetření	Od věku	Frekvence
klinické vyšetření onkologem	18	1 x ročně
kolonoskopie	20 – 25	1 x za 2 roky
test okultního krvácení do stolice	20 – 25 (nebo o 10 – 15 let dříve než byl věk v době vzniku nejčasnějšího nádoru v rodině)	1 x za 2 roky (střídavě s kolonoskopií)
gynekologické vyšetření a TVUZ*	18	1 x ročně
Nádorový marker CA1 125	20 - 25	1 x za 6 měsíců (do 30 let 1 x ročně)
aspirační biopsie endometria*	30 – 35 (nebo o 10 – 15 let dříve než byl věk v době vzniku nejčasnějšího nádoru v rodině)	1 x ročně
UZ břicha	30	1 x ročně
nádorové markery CEA , CA 19 – 9	18	1 x ročně
moč chemicky + sediment	30	1 x ročně
Gastroskopie (u rodin s výskytem rakoviny žaludku)	35 (nebo o 10 – 15 let dříve než byl věk v době vzniku nejčasnějšího nádoru v rodině)	1 x za 3 – 4 roky
samovyšetření prsů	18	1 x měsíčně
ultrazvuk prsů	35	1 x ročně
mamografie	45	1 x ročně

* nejsou důkazy o efektivitě tohoto vyšetření (13)

2.7. Terapie

2.7.1. Chirurgická terapie

Jakmile je rakovina tlustého střeva diagnostikována, mezi chirurgické možnosti patří segmentální resekce nebo úplná břišní kolektomie s ileorektální anastomózou. Segmentální resekce je odstranění pouze postižené části tlustého střeva jako je pravostranná nebo levostranná hemikolektomie. Úplná břišní kolektomie s ileorektální anastomózou (TAC) je odstranění celého tlustého střeva a anastomóza ilea, konečníku nebo rektosigmoidea. Většina autorů se shoduje, že TAC je možností jak u pacientů s Lynchovým syndromem předejít vysokému riziku nádorového onemocnění zbytku střeva.

Dále se někteří autoři domnívají, že preventivní kolektomie by mohly být nabízeny pacientům s Lynchovým syndromem za určitých okolností. Například u těch pacientů, kteří mají tlusté střevo, které je technicky obtížné hodnotit z kolonoskopie. Pacientům, kteří nemohou nebo nejsou v souladu se screeningovým doporučením, pacientům, kteří trpí těžkou psychickou úzkostí kvůli strachu z rozvoje CRC, rodinám s časným nástupem nebo závažnou penetrací na fenotypu CRC a ženám, které už podstoupily hysterektomii pro rakovinu dělohy.

Zatím žádné studie neprokázaly statisticky významný rozdíl v přežití u pacientů se segmentovanou kolektomií nebo TAC. Nicméně jsou potřebné další studie pro posouzení rozdílů kvality života pacientů po zákroku. (22)

2.7.2. Chemoprevence

Preklinické studie na buněčných liniích a myších byly užitečné pro lidské chemopreventivní pokusy. Byly prováděny i observační studie rizika CRC v normálních populacích. Mezi ně patří kyselina acetylsalicylová a nesteroidní protizánětlivé léky (NSAID).

Nejlepší lék ve studiích HNPCC je aspirin. Aspirin zvyšuje produkci MMR proteinů u MMR deficitních buněk. Studie aspirinu u Lynchova syndromu je první a největší chemopreventivní studie zaměřená na genetické onemocnění. Autoři studie dospěli k názoru, že nejméně dvouleté každodenní užívání aspirinu, u pacientů s Lynchovým syndromem, vede k významnému poklesu incidence CRC a polypů (ale ne dalších rakovin souvisejících s LS). (22)

2.7.3 Chemická léčba kolorektálního karcinomu

Zpočátku adjuvantní chemoterapie se skládala z 5-fluorouracilu (5FU), 5FU a levamisolu nebo 5FU s leukovorinem. Těchto hladin mohlo být dosaženo i v monoterapii kaperitabinem. Kombinací 5FU a oxaliplatin vzrostlo tříleté přežití bez známk onemocnění přibližně u 6% pacientů.

Mezi nová léčiva patří protilátky proti vaskulárnímu endoteliálnímu růstovému faktoru (VEGF) a receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR). Tyto látky mají přínos hlavně pro pacienty s metastatickým CRC.

V klinických studiích je zařazeno několik inhibitorů checkpoint kinázy.

Dalšími léky jsou : fluoropyrimidiny, sloučeniny platiny, irinorektan, kurkumin, statiny a flavonoidy. (24)

II. PRAKTICKÁ ČÁST

Praktická část byla prováděna v Histologické a cytologické laboratoři,
MUDr. Jan Nožička, PhD. v Ústí nad Orlicí.

Cílem bylo prověřit kohortu 30 pacientů s pozitivním nálezem karcinomu tlustého střeva pomocí imunohistochemického vyšetření MMR proteinů (MLH1, MSH2 a MSH6).

Zaměřila jsem se nejprve na výběr pacientů s pozitivním nálezem karcinomu tlustého střeva před padesátým rokem věku (za rok 2013 a uplynulou část roku 2014) a doplnila staršími pacienty s pozitivním nálezem karcinomu tlustého střeva do poměru 1:1.

3. ZHOTOVENÍ PREPARÁTU

3.1. Krájení parafinových bločků na mikrotomu

3.1.1. Přístroje a pomůcky

Mikrotom

Destilovaná voda

Podložní skla (Superfrost Plus)

Elektrická plotýnka

Chladicí deska

Preparační jehly

Buničitá vata

Kovový stojan na preparáty

Termostat

3.1.2. Postup

Chlazený parafinový bloček umístíme do Neapolské svorky mikrotomu. Pomocí nastavovacích šroubů bloček podle potřeby orientujeme. Mikrometrickým šroubem si nastavíme tloušťku řezu na 0,5 – 1 um. Na imunohistochemická vyšetření používáme speciální elektrostaticky upravené podložní skla (Superfrost Plus). Na tyto skla kápneme kapku destilované vody.

Ukrojené řezy pomocí preparační jehly natáhneme na podložní sklo, které má stejné číslo, jako ukrojený bloček. Podložní sklo máme rovněž označeno zkratkou požadovaného vyšetření.

Řezy se napínají na elektrické plotýnce při teplotě cca 60°C. Přebytek destilované vody slijeme do buničité vaty.

Zhotovené preparáty vkládáme do kovového stojanu a sušíme v termostatu vyhřívaném na 60°C minimálně jednu hodinu.

3.2. Imunohistochemické barvení breparátů

3.2.1. Metodika

Používáme koncentrované i předředěné protilátky Ready to use (RTU) od firmy DAKO. Jako detekční systém používáme EnVision + Dual Link a DAB též od firmy DAKO. Jedná se o detekční systém ve dvou krocích, který je založen na polymeru značeném pomocí HRP a konjugovaném se sekundárními protilátkami. Průkazem přítomnosti antigenu je barevná reakce DAB (diaminoethylbenzidinu). Výsledný efekt, hnědé zbarvení vazby protilátky na antigen ve tkáni, pozorujeme ve světelném mikroskopu.

3.2.2. Přístroje, měřící prostředky, pomůcky a chemikálie

Přístroje:

Termostat

Lednice

Destilační přístroj

váhy Denver

Tlakové zařízení Pascal

Mikroskop

Digitální fotoaparát

Měřící prostředky:

pH metr GRS 3100

Teploměr monitorovací maximo-minimální

Minutky Techno line a JVD

Finnpipety

Pomůcky:

Dako Pen for imunochemistry

Laboratorní sklo

Buničitá vata

Kapátka na pertex

Vlhké MIST komůrky

Jednorázové plastové pipety

Žluté plastové špičky

Plastové kyvety a stojánky na pufry

Plastové stříčky

Stojánek se zkumavkami

Krycí skla

Chemikálie a barviva:

Aceton

Alkohol 96% a 70%

Antibody Diluent

DAB + Chromogen

DAB + Substrate Buffer

Destilovaná voda

En Vision – HRP Rabbit and Mouse

HCl

Hematoxin Gill

MLH1 (MutL Protein Homolog 1) - koncentrovaný

MSH2 (MutS Protein Homolog 2) - koncentrovaný

MSH6 (MutS Protein Homolog 6) – ředíme s diluentem 2:1

NaCl

NaOH

Peroxid vodíku 30%

Pertex

TMM (trometamolium)

Xylen

3.2.3. Příprava před barvením

Nakrájené preparáty umístíme do termostatu předehřátého na 60°C na dobu minimálně 60 minut. Připravíme si dostatečné množství TRIS pufru, destilované vody a odmaskovací pufrů o pH9 do kyvet. Z lednice vyndáme Diluent, potřebné protilátky a detekční systém En Vision, DAB a provedeme naředění protilátek.

Příprava 3% peroxidu vodíku: 10 ml koncentrovaného (33%) peroxidu vodíku + 90 ml destilované vody.

Příprava 1000 ml roztoku TRIS pufru o pH 7,2 – 7,6 :

Do 1000 ml Erlenmeyerovy baňky odlijeme cca 700 ml destilované vody. Na předvážkách odvážíme 8 g NaCl a krouživým pohybem rozpustíme. Dále odvážíme 6,05 g TMM a opět důkladně rozpustíme. Nakonec nalijeme 14 ml ředěné HCl (150 ml destilované vody + 50 ml koncentrované HCl) a destilovanou vodou doplníme roztok do objemu 1000 ml. Důkladně promícháme.

Pomocí pH metru a kyselého roztoku 0,1 M HCl nebo zásaditého roztoku 0,1 M NaOH provádíme úpravu pH TRIS pufru.

Příprava odmaskovacího pufru:

Příslušný Target retrieval solution naředíme destilovanou vodou v poměru 1:9. Pro jeden běh procesu odmaskování (maximálně 24 podložních skel):

20 ml pufru (Target retrieval solution + 180 ml destilované vody)

Příprava Hematoxylinu Gill:

Chemikálie	Na 1000 ml
Jodičnan sodný	0,4 g
Síran hlinitý	35,2 g
Destilovaná voda	710 ml
Ethylenglykol	250 ml
Kyselina octová koncentrovaná	40 ml
Hematoxylin	4 g

hematoxylin rozpustíme spolu s jodičnanem sodným a síranem hlinitým v destilované vodě a mícháme, dokud se vše nerozpustí. Poté přidáme etylenglykol a znovu mícháme. Nakonec přidáme koncentrovanou kyselinu octovou.

3.2.4. Odparafínování a zavodnění řezů

K odparafínování a zavodnění použijeme čtyři lázně xylynu po pěti minutách, dvě lázně 96% alkoholu a jednu lázeň 70% alkoholu rovněž po pěti minutách. Nakonec opláchneme třikrát destilovanou vodou a vizuálně zkontrolujeme.

3.2.5. Vlastní imunohistochemické barvení

1. Odmaskování antigenu:

Skla vložíme do odmaskovacího pufru pH 9 a s kyvetou vložíme do vodní lázně tlakového zařízení Pascal. Teplota a doba odmaskování (cca 35 minut) je dána programem tlakového zařízení Pascal. Po vyndání necháme volně chladnout 15 minut.

Opláchneme destilovanou vodou.

2. Blokování peroxidázy:

Na preparáty nakapeme 3% Peroxid vodíku a necháme 15 minut působit.

Opět opláchneme destilovanou vodou.

Dále provedeme oplach preparátů TRIS pufrům pH = 7,2 – 7,6, ve kterém se uchovávají až do aplikace protilátek (cca 5 – 15 minut).

3. Aplikace protilátky:

Skla položíme na nerezovou podložku, řezy zakroužkujeme mastnou tužkou PEN, pečlivě oťřeme a kapeme protilátky, tak jak je uvedeno na sklech včetně kontrol. Skla pak vložíme do vlhké MIST komůrky. Doba inkubace ve vlhké MIST komůrce je dle použité protilátky 45 – 60 minut. Následuje dvojitý oplach TRIS pufrům.

4. Aplikace detekčního systému:

Skla proplachu TRIS pufrům zakapeme En Vision a ponecháme ve vlhké komůrce ještě 30 minut. Poté opláchneme TRIS pufrům dvakrát. Podle celkového počtu barvených skel a spotřebě En Vision připravíme detekční systém DAB (ředění : na každý 1 ml Substrate Buffer 1 kapka DAB + chromogen).

Skla po oplachu TRIS pufrům zakapeme DAF ve vlhké MIST komůrce a ponecháme 3 – 5 minut reagovat.

Opláchneme třikrát destilovanou vodou.

5. Dobarvení jader:

Na preparáty nakapeme Hematoxylin Gill na 15 sekund.

Opláchneme pramenitou vodou a necháme v ní modrat po dobu 5 – 10 minut.

Po ukončení barvení uklidíme do lednice všechny reagenty (protilátky, pufrů, DAB, Diluent, En Vision).

3.2.6. Odvodnění a projasnění preparátů

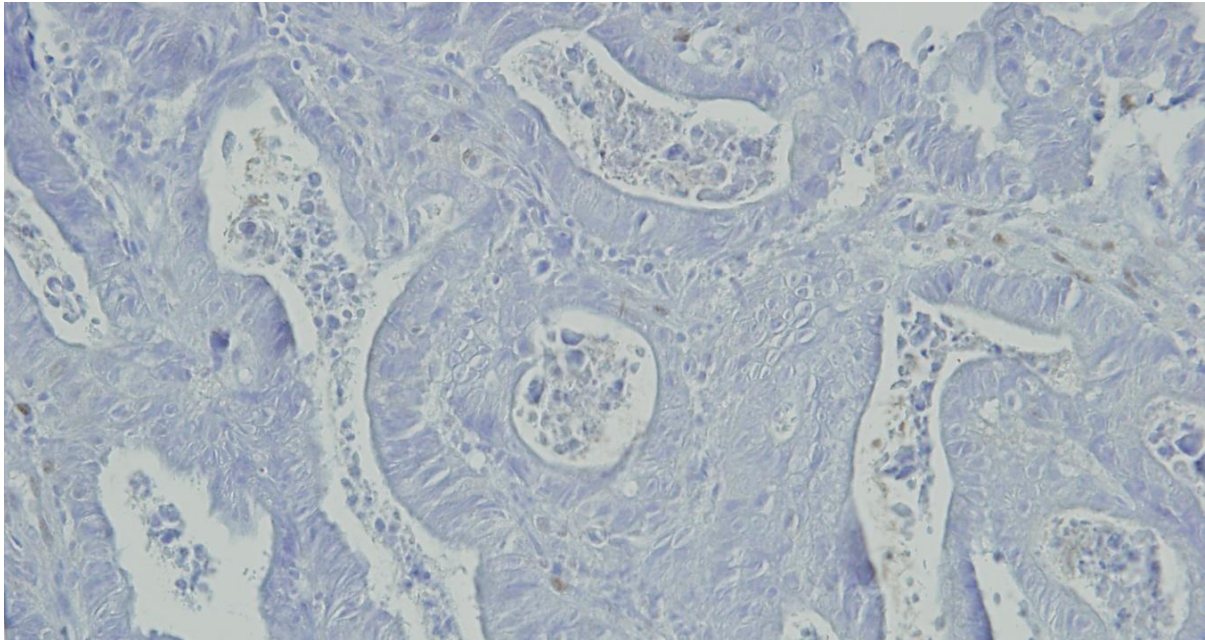
Preparáty zbavíme vody ve třech lázních alkoholu. Nejprve necháme preparáty pět minut v 70% alkoholu a poté dvakrát po pěti minutách v 96% alkoholu. Následuje jedna lázeň acetonu na pět minut a projasňujeme třemi lázněmi xylenu opět po pěti minutách.

3.2.7. Montování

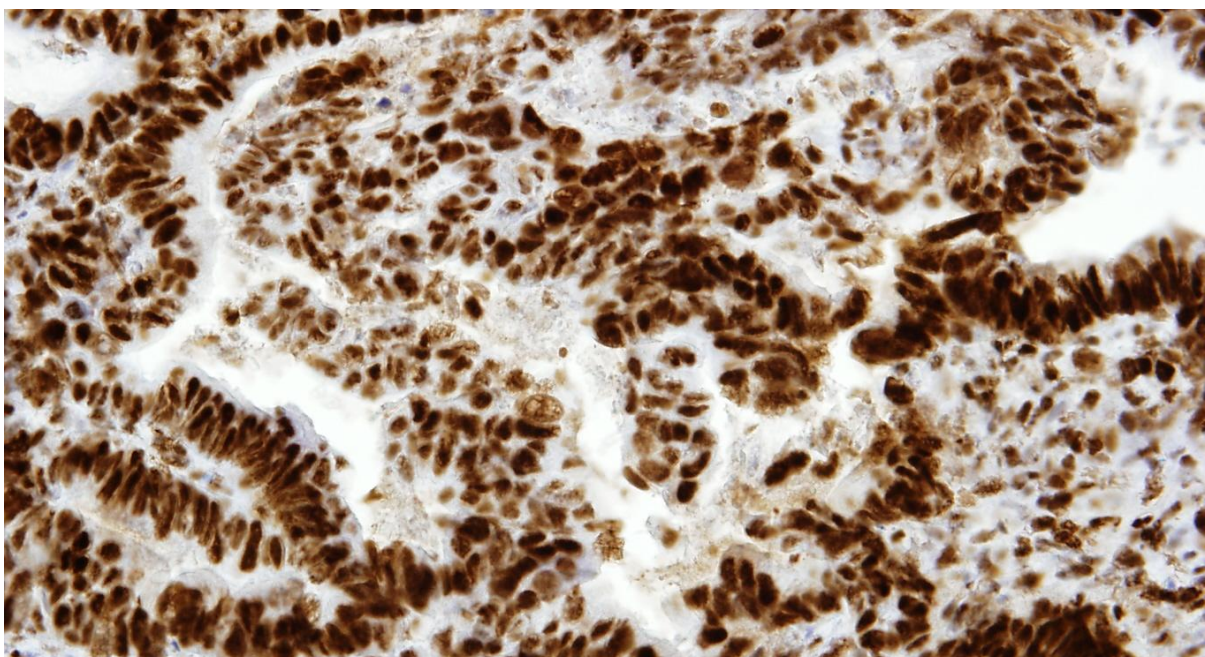
Nabarvené preparáty zamontujeme ručně. Na krycí sklo nakápneme kapku pertexu a opatrně přiklopíme na řez. Necháme dostatečně zaschnout.

3.2.8. Ukázka pozitivního a negativního preparátu nabarveného imunohistochemickým barvením

Obrázek č.1 - Negativní imunohistochemická reakce



Obrázek č.2 - Pozitivní imunohistochemická reakce



4. VÝSLEDKY

Pacient	MLH1	MSH2	MSH6	Pohlaví	Věk	Závěrečná diagnóza
1	+	+	+	Žena	1955	Málo diferencovaný adenokarcinom tlustého střeva
2	-	+	-	Žena	1967	Málo diferencovaný dlaždicobuněčný karcinom tlustého střeva
3	+	+	+	Muž	1923	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
4	-	-	+	Muž	1945	Dobře diferencovaný invazivně rostoucí adenokarcinom tlustého střeva
5	-	+	+	Žena	1938	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
6	+	+	+	Muž	1965	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
7	+	+	+	Muž	1938	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
8	-	+	+	Muž	1937	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
	-	+	+			
9	-	+	+	Žena	1947	Málo diferencovaný adenokarcinom tlustého střeva
	-	-	+			
10	+	+	+	Žena	1923	Málo diferencovaný adenokarcinom tlustého střeva
	+	+	+			
11	-	+	+	Žena	1963	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
	-	+	+			
12	+	+	+	Žena	1947	Málo diferencovaný adenokarcinom tlustého střeva
13	+	+	+	Muž	1947	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
14	+	+	+	Muž	1947	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
	+	+	+			
15	-	-	-	Žena	1967	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
16	-	+	-	Muž	1962	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
17	+	+	-	Muž	1965	Málo diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
18	+	+	-	Žena	1968	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
19	+	+	+	Žena	1977	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
20	-	+	-	Žena	1963	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
21	+	+	-	Muž	1966	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
22	+	+	+	Žena	1966	Středně diferencovaný invazivní

	+	+	+			adenokarcinom tlustého střeva
23	-	+	-	Žena	1967	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
	+	+	-			
24	+	+	+	Muž	1967	Málo diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
	+	+	+			
25	+	+	+	Muž	1967	Středně diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
26	-	-	-	Muž	1983	Málo diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
27	+	-	-	Muž	1947	Málo diferencovaný adenokarcinom tlustého střeva
	+	-	-			
28	+	+	+	Žena	1954	Dobře diferencovaný invazivně rostoucí adenokarcinom tlustého střeva
29	+	+	+	Žena	1947	Středně diferencovaný invazivně rostoucí adenokarcinom tlustého střeva
	+	+	+			
30	+	+	-	Muž	1967	Málo diferencovaný invazivní adenokarcinom tlustého střeva
	-	+	-			

Vysvětlení k tabulce:

Znaménko mínus znamená, že se v buňce neexprimuje příslušný protein s vysokou pravděpodobností následkem mutace příslušného genu.

Pokud jsou negativní jak protein MLH1 tak MSH2 – může se jednat o poruchu ve dvou genech, nelze ale vyloučit hypermethylaci promotoru MLH1. Pokud jsou negativní jak MSH2 a MSH6 znamená to, že se neexprimuje ani jeden protein. Pokud jsou negativní všechny tři geny, jedná se o pacienta s poruchou v obou genech, nelze však vyloučit hypermethylaci promotoru MLH1 nebo možnost falešné negativy. K bezpečnému rozlišení těchto eventualit by bylo vhodné doplnit vyšetření vzorku nádoru z chirurgického resektátu tlustého střeva.

Vzhledem k tomu, že Průvodní listy k zásilce histologického materiálu neobsahují potřebné množství informací k podrobné analýze jednotlivých pacientů, omezila jsem informace v tabulce na pohlaví, věk a závěrečnou diagnózu pacienta stanovenou v biotické laboratoři.

4.1. Vyhodnocení výsledků

Ze třiceti zkoumaných případů se v šestnácti objevila suspektní mutace některého z genů, tudíž by se mohlo jednat o projev Lynchova syndromu. Z těchto šestnácti pozitivních pacientů se jedná v osmi případech o pacienty mladší padesáti let a ve zbývajících osmi případech o pacienty starší padesáti let. Z toho vyplývá, že výskyt možnosti Lynchova syndromu v tomto testu dosáhl více než padesáti procentní pravděpodobnosti.

Věk pacienta	+	-	Věk pacienta	+	-
≥50 let	8	8	≥50 let	26.7 %	26.7 %
≤ 50 let	8	6	≤ 50 let	26.7 %	20 %

Je zajímavé, že z těchto šestnácti pozitivních pacientů se jednalo v osmi případech o ženy a v osmi o muže. Lze tedy říci, že v soulase s literárními údaji nebyl neprokázán vliv pohlaví na výskyt Lynchova syndromu.

Nejčastějším typem mutace byla mutace genu MLH1 a to celkem ve dvanácti případech, poté následovala mutace MSH6, která se vyskytla v jedenácti případech. Nejméně zastoupenou mutací byla MSH2.

5. DISKUSE

Lynchův syndrom je nejčastější známou vrozenou chorobou predisponující ke vzniku karcinomu tlustého střeva s vysokou penetrancí. Je dán autozomálně dominantním typem dědičnosti. Dle literárních údajů se podílí na vzniku nejméně 2 až 5 % všech případů karcinomů tlustého střeva. Nejčastější příčinou onemocnění jsou zárodečné mutace genů MLH1 a MSH2. Menší podíl mají mutace genu MSH6. (3) Lynchův syndrom je charakteristický rozvojem nemoci v brzkém věku. (4) Průměrný věk diagnózy CRC u Lynchova syndromu je 44 let. U sporadického karcinomu je průměrný věk asi 64 let. (5)

Tato bakalářská práce s názvem „sledování incidence nestability mikrosatelitů v nádorových buňkách karcinomu tlustého střeva pomocí imunohistochemického vyšetření exprese proteinů MLH1, MSH2 a MSH6“, měla za cíl uvedení do praxe imunohistochemického průkazu proteinů jádra podílející se na opravách chyb vzniklých při transkripci genů (MLH1, MSH2 a MSH6), jejichž poruchy se nejčastěji vyskytují v rámci tzv. Lynchova syndromu.

Výsledky této práce ukazují nápadně vysokou incidenci výskytu poruchy tvorby proteinů podílejících se na opravách replikující se DNA, což lze považovat za nepřímý průkaz tzv. nestability mikrosatelitů v nádorových buňkách tlustého střeva. Z více než padesáti procent se potvrzuje výskyt poruchy tvorby proteinů MMR genů. Jedná se tedy o relativně vysokou pravděpodobnost výskytu Lynchova syndromu v populaci pacientů jak mladších padesáti let, tak i těch starších.

Lehce vyšší procento výskytu u pacientů mladších 50 let je při malém souboru pacientů z hlediska statistického zcela zanedbatelné.

Vliv pohlaví nebyl prokázán.

Nejčastějším typem poruchy byla absence tvorby MLH1, na které se však bude jistě v určitém procentu podílet tzv. hypermethylace promotoru MLH1. Tuto možnost by však bylo možné došetřit relativně nákladnou molekulárně genetickou analýzou. Patrně nejzajímavějším nálezem v této studii byl nález, že druhou nejčastější mutací u zkoumaných pacientů byla mutace MSH6, která bývá v literatuře uváděna jako méně častá mutace. Mimo jiné na tento fakt by bylo vhodné dalšími vyšetřeními verifikovat a sledovat zda se nejedná o příčinu zvýšeného výskytu CRC v Čechách. V naší studii byla nejméně zastoupenou mutací MSH2.

Aby bylo možné vyloučit falešně negativní výsledky imunohistochemického průkazu zkoumaných proteinů bylo by vhodné doplnit vyšetření o imunohistochemické zpracování následných resekátů tlustého střeva u všech případů s nálezem absence tvorby kteréhokoliv sledovaného proteinu MMR genů. Pro vlastní potvrzení, či vyvrácení možného Lynchova syndromu je navíc nutné doplnit anamnestické (rodinnou anamnézu) údaje a případné molekulárně genetické vyšetření.

6. ZÁVĚR

Jednalo se o relativně malý soubor pacientů, proto budeme nadále pokračovat v testování dalších pacientů s CRC.

V dnešní době hraje genetická informace stále důležitější úlohu v řešení běžných zdravotních problémů. Obzvláště důležité je sledovat dědičnost u CRC, kde má vliv na diagnózu, léčbu a hlavně prevenci rakoviny tlustého střeva u pacientů trpících Lynchovým syndromem.

Bohužel se u nás stále nedaří vytvořit spolehlivě fungující systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli rodiny informovat o dědičnosti Lynchova syndromu o možnostech genetického testování a především o zahájení prevence, jakou jsou například pravidelné kolonoskopické kontroly. Je tudíž nezbytné zasvětit do problematiky Lynchova syndromu i klinické lékaře, bez nichž není možná kompletní diagnostika ani další vyšetřování rodiných příslušníků.

III. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1) DNA Alterations in Lynch Syndrome. Advances in molecular diagnosis and genetic counselling, Majtaž Vogelsang

2) <http://www.lynch.cz/> - ke dni 22.4.2014

3) Molecular Genetics and Hereditary Colorectal Cancer: Resolution of the Diagnosis Dilemma of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, Lynch Syndrome, Familial Colorectal Cancer Type X, and Multiple Polyposis Syndromes, By Henry T. Lynch, MD, Zoran Gatalica, MD, DSc, and Joseph Knezetic, PhD

4) Molekulárně genetická diagnostika Lynchova syndromu, Házová Jana, Křepelová Anna, Macháčková Eva, Míková Miroslava, Navrátilová Marie, Foretová Lenka

5) Identification of patients at risk for hereditary colorectal cancer.

Mishra N, Hall J.

Clin Colon Rectal Surg. 2012 Jun;25(2):67-82. doi: 10.1055/s-0032-1313777.

PMID: 23730221 [PubMed]

6) Genetic modifiers of cancer risk in Lynch syndrome: a review.

Talseth-Palmer BA, Wijnen JT, Grice DM, Scott RJ.

Fam Cancer. 2013 Jun;12(2):207-16. doi: 10.1007/s10689-013-9614-2.

PMID: 23471748 [PubMed – in process]

7) Era of universal testing of microsatellite instability in colorectal cancer.

Zhang X, Li J.

World J Gastrointest Oncol. 2013 Feb 15;5(2):12-9. Doi: 10.4251/wjgo.v5.i2.12.

PMID: 23556052 [PubMed]

8) Diagnostika Lynchova syndromu-nové geny a metody.

Křepelová A., Pavlíková K., Plevová P.

9) History and pathogenesis of lynch syndrome.

Bansidhar BJ, Silinsky J.

Clin Colon Rectal Surg. 2012 Jun;25(2):63-6. doi: 10.1055/s-0032-1313776.

PMID: 23730220 [PubMed]

10) Anticipation in lynch syndrome: where we are where we go.

Bozzao C, Lastella P, Stella A.

Curr Genomics. 2011 Nov;12(7):451-65. doi: 10.2174/138920211797904070.

PMID: 22547953 [PubMed]

11) Lynch Syndrome Associated With PMS2 Mutation: Understanding Current Concepts.

Gulati S, Gustafson S, Daw HA.

Gastrointest Cancer Res. 2011 Sep;4(5-6):188-90. No abstract available.

PMDI: 23413378 [PubMed – in process]

12) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)/Lynch syndrome.
Steinke V, Engel C, Buttner R, Schackert HK, Schmiegel WH, Propping P.
Dtsch Arztebl Int. 2013 Jan;110(3):32-8. doi: 10.3238/arztebl.2013.0032. Epub 2013 Jan 18.
PMDI: 23413378 [PubMed in process]

13) Dědičná dispozice ke vziku karcinomu endometria.
Zikán M., Sláma J., Pinkavová I., Fischerová D., Frietag P., Cibula D.
Čes. Gynek. 2011, 76, č.3, s 176-179

14) Muir-Torre syndrom-fenotypická varianta Lynchova syndromu.
Kacerovská D., Kazakov D.V., Černá K., Hadravský L., Michal M. Jr., Dostál J.,
Skálová A. Jr., Michal M.
Čes.-slov.Patol., 46, 2010, No. 4, p. 86-94

15) The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC).
Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al.
Dis Colon Rectum 1991, 34: 424-425

16) New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC
Gastroenterology 1990; 116; 1453-1456

17) Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability.
Umar A, Boland CR, Tediman JP et al.
J Natl Cancer Inst 2004;96; 261- 268

18) MLH1 promoter hypermethylation in the analytical algorithm of Lynch syndrome: a cost-effectiveness study.
Gausachs M, Mur P, Corral J, Pineda M, González S, Benito L, Menéndez M, Espinas JA, Brunet J, Iniesta MD, Gruber SB, Lazaro C, Blanco I, Capella G.
Eur J Hum Genet. 2012 Jul;20(7):762-8. doi: 10.1038/ejhg.2011.277. Epub 2012 Jan 25.
PMDI: 22274583 [PubMed – indexed for MEDLINE]

19) Rapid development of colorectal neoplasia in with Lynch syndrome.
Edelstein DL, Axilbund J, Baxter M, Hyland LM, Romans K, Griffin CA, Cruz-Correa M, Giardiello FM.
Clin Gastroenterol Hepatol. 2011 Apr;9(4):340-3. doi: 10.1016/j.cgh.2010.10.033. Epub 2010 Nov 9.
PMDI: 21070872 [PubMed – indexed for MEDLINE]

20) Interval colon cancer in a Lynch syndrome patient under Antal colonoscopic surveillance: a case for advanced paging techniques?

Oxentenko AS, Smyrk TC.

BMC Gastroenterol. 2013 May 24;50. doi: 10.1186/1471-230X-12-50.

PMDI: 22624972 [PubMed – indexed for MEDLINE]

21) Preimplantační genetická diagnostika (PGD) hereditárních nádorových syndromů.

Raszyková L., Hořínová V., Texl P.

Laboratoř lékařské genetiky, Sanatorium Helios, Brno

22) Endoscopic and surgical management of hereditary nonpolyposis colorectal cancer.

Baucom RB, Wise PE.

Clin Colon Rectal Surg. 2012 Jun;25(2):90-6. doi: 10.1055/s-0032-1313779.

PMDI: 23730223 [PubMed]

23) Colonoscopy use following mutation detection in Lynch syndrome: exploring a role for cancer screening adaptation.

Hadley DW, Ashida S, Jenkins JF, Calzone KA, Kirsch IR, Koehly LM.

Clin Genet. 2011 Apr;79(4):321-8. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01622.x. Epub 2011 Jan 19.

PMDI: [PubMed – indexed for MEDLINE]

24) General aspects of colorectal cancer.

Centelles JJ.

ISRN Oncol. 2012;2012:139268. doi: 10.5402/2012139268. Epub 2012 Nov 14.

PMDI: 23209942 [PubMed]

25) Příbalové informace k protilátkám MLH1, MSH2 a MSH6 od firmy DAKO