

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

LÉKAŘSKÁ FAKULTA V PLZNI

ŠIKLŮV ÚSTAV PATOLOGIE



DOKTORSKÁ DIZERTAČNÍ PRÁCE

**NEOBVYKLÉ TUMORY KŮŽE A MĚKKÝCH TKÁNÍ**

MUDr. LADISLAV HADRAVSKÝ

PLZEŇ 2016

OBOR PATOLOGIE

ŠKOLITEL Doc. MUDr. DENISA KACEROVSKÁ Ph.D.

## PODĚKOVÁNÍ

*DOC. DENISE KACEROVSKÉ  
LÉKAŘSKÉ FAKULTĚ V PLZNI  
PROF. ALENĚ SKÁLOVÉ  
PROF. MICHALU MICHALOVI  
PROF. DMITRIMU KAZAKOVI  
DOC. ONDROVI DAUMOVI  
MGR. JANOVI STEHLÍKOVI  
MICHAELOVI A KVĚTĚ MICHALOVÝM  
BIOPTICKÉ LABORATOŘI A ŠIKLOVU ÚSTAVU PATOLOGIE FN PLZEŇ  
A JEJICH CELÉMU PRACOVNÍMU TÝMU  
SVÝM NYNĚJŠÍM SPOLUPRACOVNÍKŮM ÚSTAVU PATOLOGIE NA VINOHRADECH  
SVÉ RODINĚ A NEJBLIŽŠÍM.*



## PŘEDMLUVA

Doktorská dizertační práce je souhrnem komentovaných publikací, na kterých jsem se podílel jako hlavní autor nebo spoluautor v rámci doktorského studia. Tématem studia byly neobvyklé tumory kůže a měkkých tkání. Práce je rozdělena na dvě části určené pro kůži a měkké tkáně.

Cílem studia bylo identifikovat případy kožních a měkkotkáňových tumorů:

- v rámci dědičných syndromů
- s neobvyklou morfologií
- s vzácným biologickým chováním
- s minoritní kauzální spojitostí s příslušným onemocněním
- s rozdílnými fenotypy

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracoval samostatně a řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze své práce v databázi UK LF Plzeň.

V Plzni dne 12. 9. 2016

## ABSTRAKT

Doktorská dizertační práce popisuje neobvyklé tumory kůže a měkkých tkání, které byly podkladem postgraduálního studia MUDr. Ladislava Hadravského na Univerzitě Karlově v Praze, Lékařské fakultě v Plzni v období let 2013 – 2016.

Obsahuje zdokumentované kožní a měkkotkáňové tumory v rámci dědičných syndromů, s neobvyklou morfologií, vzácným biologickým chováním, minoritní kauzální spojitostí s příslušným onemocněním a rozdílnými fenotypy. Případy byly publikovány v časopisech s impakt faktorem a v recenzovaných časopisech.

## SUMMARY

This doctoral thesis describes unusual skin and soft-tissue tumors, which were the basis of the postgraduate study of Ladislav Hadravský, MD at Medical faculty in Pilsen of Charles University in Prague during 2013 – 2016.

It contains documented cases of skin and soft-tissue tumors related to hereditary syndromes, unusual morphology, rare biological behavior, minor causal association with the respective disease, or different phenotypes. These cases were published in journals with the impact factor and in peer-reviewed journals.

## OBSAH

ABSTRAKT .....	3
SUMMARY .....	3
KŮŽE .....	5
ÚVOD .....	6
KOŽNÍ TUMORY V RÁMCI DĚDIČNÝCH SYNDROMŮ.....	7
SEBACEÓZNÍ TUMORY KŮŽE.....	7
MUIRŮV-TORREŮV SYNDROM .....	7
PROJEVY - KOŽNÍ .....	7
MIKROSKOPICKY .....	7
MORFOLOGICKÉ ZMĚNY.....	8
PROJEVY - VISCERÁLNÍ.....	8
LYNCHŮV SYNDROM .....	9
SPECIFICKÉ VYSOKOŠKOLSKÉ VÝZKUMNÉ PROJEKTY (SVV) .....	9
IDENTIFIKACE PROBANDŮ .....	9
ZÁVĚRY SVV PROJEKTŮ.....	12
KOŽNÍ TUMOR SE VZÁCNÝM BIOLOGICKÝM CHOVÁNÍM .....	46
AGRESIVNÍ EXTRAOCULÁRNÍ SEBACEÓZNÍ KARCINOM KŠTICE S PROGRESÍ DO MOZKOVÉ TKÁŇĚ U PACIENTA S MUIROVÝM-TORREOVÝM SYNDROMEM.....	46
KOŽNÍ TUMORY S MINORITNÍ KAUZÁLNÍ SPOJITOSTÍ S PŘÍSLUŠNÝM ONEMOCNĚNÍM.....	53
KOŽNÍ SEBACEÓZNÍ LÉZE U PACIENTA S <i>MUTYH</i> -ASOCIOVANOU POLYPÓZOU S FENOTYPEM MUIROVA-TORREOVA SYNDROMU .....	53
KOŽNÍ TUMOR S NEOBVYKLOU MORFOLOGIÍ.....	64
LICHEN SCLEROSUS PENISU ASOCIOVANÝ S NÁPADNOU AKUMULACÍ ELASTICKÝCH VLÁKEN S DIFERENCIOVANOU PENILNÍ INTRAEPITELIÁLNÍ NEOPLÁZIÍ S PROGRESÍ DO INVAZIVNÍHO DLAŽDICOBUNĚČNÉHO KARCINOMU.....	64
MĚKKÉ TKÁŇĚ.....	68
ÚVOD .....	69
MĚKKOKTÁŇOVÉ TUMORY S ROZDÍLNÝMI FENOTYPY .....	70
PLEOMORNÍ HYALINIZUJÍCÍ ANGIKTATICKÉ TUMORY A MYXOINFLAMATORNÍ FIBROBLASTICKÉ SARKOMY.....	70
ZÁVĚR .....	84
BIBLIOGRAFIE .....	85
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	90

KŮŽE

## ÚVOD

Kůže vytváří vnější povrch našeho těla a slouží jako štít před fyzikálními, chemickými vlivy a infekčními organismy. Je jedním z největších orgánů lidského těla mající v průměru plochu 1,5 až 2 m<sup>2</sup> a váhu odpovídající kolem 10% tělesné hmotnosti. Kůže se skládá z 3 základních částí: epidermis (pokožka), dermis (korium, škára) a tela subcutanea (subcutis, podkoží či podkožní tuková tkáň).

Všechna kožní adnexa jsou deriváty epidermis, ačkoliv většina z nich je lokalizovaná v koriu. Kožní adnexa dělíme na dvě skupiny: keratinizovaná a žlázová. Mezi keratinizovaná patří nehty a vlasy, mezi žlázová mazové a potní žlázy, které se dále dělí na apokrinní (tzv. velké potní žlázy) a ekrinní (tzv. malé potní žlázy). (1)

Nádory podle Světové zdravotnické organizace (zkr. WHO z angl. World Health Organization) z roku 2006 dělíme na keratinocytární, melanocytární, hematolymfoidní, měkkotkáňové, nervové nádory a neoplázie kožních adnex.

## KOŽNÍ TUMORY V RÁMCI DĚDIČNÝCH SYNDROMŮ

### SEBACEÓZNÍ TUMORY KŮŽE

Během studia jsme se zaměřili především na sebaceózní tumory kůže. Kožní tumory se sebaceózní diferenciací dělíme: (2)

- *Sebaceózní adenomy*
- *Sebaceomy*
- *Sebaceózní karcinomy extraokulární*
- *Sebaceózní karcinomy periokulární*

Sebaceózní tumory kůže se mohou vyskytovat v rámci dědičného onemocnění, tzv. Muirova-Torreova syndromu (MTS).

### MUIRŮV-TORREŮV SYNDROM

Muirův-Torreův syndrom (MTS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění s incidencí kolem 1 : 10 000, které je definováno přítomností minimálně jednoho kožního tumoru se sebaceózní diferenciací a alespoň jednou viscerální malignitou. Poprvé byl popsán nezávisle dvěma autory Muirem a Torrem v roce 1967 a 1968. (3) V současnosti je považován za fenotypovou variantu mnohem častějšího Lynchova syndromu (LS; či tzv. syndromu hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu – HNPCC, zkratka z angl. hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma). (4)

### PROJEVY - KOŽNÍ

Kožní léze zahrnují sebaceózní adenom, sebaceom a extraokulární sebaceózní karcinom. Periokulární sebaceózní tumory jsou naopak u MTS vzácné s dosud popsanými cca 40 případy ve světové literatuře. (5) (6) Kožní tumory se vyskytují obvykle mnohočetně, ale byly popsány i případy solitárních lézí. (7) Klinický obraz je shodný jako u jejich sporadických protějšků projevující se jako papuly a noduly hladkého povrchu, nažloutlé či růžové barvy anebo zbarvení kůže velikosti od několika mm do 5 mm.

U sebaceózních karcinomů mohou léze dosahovat větších rozměrů a vyznačují se nepřesným ohraničením, rychlým růstem a možnou ulcerací na povrchu.

Obecně lze zhodnotit, že mnohočetné kožní nádory se sebaceózní diferenciací vyskytující se u jedinců před 50 rokem života nebo postihující tělní partie mimo obličej jsou indikátorem MTS. (8)

### MIKROSKOPICKY

#### SEBACEÓZNÍ ADENOM

Sebaceózní adenomy mají charakteristické lobulární uspořádání a jsou spojeny s přilehlou epidermis. Jednotlivé lobuly jsou složeny z periferní části tvořené několika řadami malých bazaloidních germinativních buněk a z centrální části prezentované zralými sebocyty s objemnou narůžovělou pěnitou až jemně vakuolizovanou cytoplazmou a jádrem hvězdicového tvaru.

## SEBACEOM

Sebaceom je tumor uložený v dermis, tvořený obvykle několika noduly s velmi vzácným epidermálním spojením. Noduly bývají kulaté, různých velikostí a složené převážně z malých monomorfních a bazaloidních buněk; zralé sebocyty tvoří méně než půlku samotného tumoru.

## SEBACEÓZNÍ KARCINOM

Sebaceózní karcinomy vykazují na rozdíl od výše zmíněných benigních tumorů maligní cytologické detaily, jako je buněčný a nukleární pleomorfismus a atypické mitózy. Dále může být přítomna i nekróza.

Histopatologicky jsou sebaceózní kožní nádory (sebaceózní adenom, sebaceom, sebaceózní karcinom) na podkladě MTS prakticky identické s jejich sporadickými protějšky. Existují ale některé morfologické změny, které mohou vzbudit podezření na MTS. (2) Jedná se o následující morfologické znaky: cystická přestavba, architektura napodobující keratoakantom, intra- a peritumorální infiltrace lymfocyty, mucinózní jezírka a inter- a intratumorální heterogenita.

## MORFOLOGICKÉ ZMĚNY

### CYSTICKÉ ZMĚNY

Cystická přestavba sebaceózního tumoru je považována za nejčastější indikátor MTS. (9) Obvykle se jedná o vystupňovanou holokrinní sekreci, fokální disintegrace buněk a sloučení mikrocyt. (10)

### ARCHITEKTURA NAPODOBUJÍCÍ KERATOAKANTOM

Tento morfologický rys je nejčastěji přítomen u sebaceózních adenomů. Jde o centrální, kráteru podobnou invaginaci, která může být přítomna solitárně nebo společně s periferním límcem a dlaždicobuněčnou diferenciací. V minulosti byly tyto léze nazývány seboakantomy. (11)

### INTRA- A PERITUMORÁLNÍ INFILTRACE LYMFOCYTY

Přítomnost intra- a peritumorálních lymfocytů u sebaceózních neoplazií je dalším vodítkem pro podezření na MTS.

### MUCINÓZA

Fokální mucinóza je vzácně zmiňována jako jeden z rysů MTS, a to zejména u sebaceózních adenomů a karcinomů. (10)

### INTRA- A INTERTUMORÁLNÍ HETEROGENITA

Biopsie z různě lokalizovaných lézí u jedince s MTS často vykazují rozdílnou morfologii. Různou morfologii můžeme pozorovat i u stejné histologické léze (např. adenomu, karcinomu), či dokonce i v rámci samotného nádoru mohou být detekovány morfologické rozdíly, např. ve stupni sebaceózní diferenciace a nukleárního pleomorfismu. (12)

## PROJEVY - VISCERÁLNÍ

Mezi viscerální maligní nádory ve spojitosti s MTS se nejčastěji řadí karcinomy kolorekta (66%), urogenitálního traktu (22%), prsu (6%), dále hematologické malignity (11%), nádory hlavy a krku (5%) a tenkého střeva (3%). (3)

## LYNCHŮV SYNDROM

Lynchův syndrom (LS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění projevující se vznikem kolorektálních karcinomů (CRC) u pacientů mladšího věku (kolem 40 – 45 let), s penetrancí u mužů 83% a u žen 48%, s incidencí 1 : 1050. Zastupuje cca 3-5% všech kolorektálních karcinomů. Oproti sporadickým kolorektálním karcinomům, které vznikají u pacientů obvykle až po 60 letech věku, se ve většině případů liší i prekurzorovými lézemi - plochými adenomy. Proto další používaný název Lynchova syndromu je syndrom hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (HNPCC, zkratka z anglického hereditary non-polyposis colorectal carcinoma). Tyto dědičné karcinomy poprvé popsal Henry T. Lynch v roce 1966 (13). Jedinci s LS jsou dále ve zvýšeném riziku vzniku endometriálních karcinomů (2% všech endometriálních karcinomů), tenkého střeva, žaludku a dalších orgánů. (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20)

## MORFOLOGICKÉ ZMĚNY

Stejně jako sebaceózní léze u MTS tak i kolorektální karcinomy u LS vykazují určité morfologické znaky oproti sporadickým analogům, které mohou vzbudit podezření na možnou asociaci se syndromem. Mezi tyto morfologické změny patří vystupňovaná hlenotvorba extracelulární v podobě hlenových jezírek, intracelulární v podobě prstenčitých buněk. Dále peri- a intratumorální infiltrace lymfocyty, mezibuněčná disociace, kdy buňky nedrží kohezivně a vytváří tzv. medulární vzhled. (21)

Dalším typickým mikroskopickým rysem u kolorektálních karcinomů vznikajících v rámci LS je intra- a peritumorální přítomnost lymfocytů a heterogenita tumoru definovaná přítomností dvou morfologicky odlišných nádorových populací tvořící minimálně 10% tumorózní tkáň. (21)

## SPECIFICKÉ VYSOKOŠKOLSKÉ VÝZKUMNÉ PROJEKTY (SVV)

V rámci SVV projektu: *Lynchův syndrom a jeho fenotypová varianta Muirův-Torreův syndrom: retrospektivní identifikace probandů a jejich pokrevních příbuzných (SVV 260809/2010)*, jsme provedli revizi 3 673 případů kolorektálních karcinomů od roku 1998-2009 z plzeňského registru.

Na tento projekt navazoval další SVV projekt: *Identifikace a vyšetření pacientů s Muirovým-Torreovým syndromem (SVV 262801/2011)*, při kterém jsme provedli revizi 450 případů kožních sebaceózních tumorů.

## IDENTIFIKACE PROBANDŮ

Příčinou MTS a LS je zárodečná mutace v jednom z MMR genů. Rozlišujeme sedm MMR genů: *MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PMS1, MSH3* a *MLH3*. (Tab. 1) Geny exprimují stejnojmenné jaderné MMR proteiny, které opravují nové vlákno DNA po replikaci. Pokud z důvodu mutace genu protein nefunguje správně, dochází ke kumulaci chyb na DNA. Časem takto poškozená DNA vede buňku k nekontrolované proliferaci a vzniku nádoru s charakteristickými morfologickými i diagnostickými rysy. (22)



<i>MMR GENY</i>	LOKALIZACE NA CHROMOZONU	DÉLKA cDNA (kB)	POČET EXONŮ
<i>MLH1</i>	3p23-21	2.3	19
<i>MSH2</i>	2p22-21	2.8	16
<i>MSH6</i>	2p16-15	4.2	10
<i>PMS2</i>	7p22	2.6	15
<i>PMS1</i>	2q31-33	2.8	13
<i>MSH3</i>	5q11-12	3.4	24
<i>MLH3</i>	14q24.3	4.4	12

Tab. 1 SEDM *MMR* GENŮ A JEJICH CHARAKTERISTIKA

Jelikož se jedná o tumor supresorové geny, k projevu onemocnění dochází až po tzv. druhém zásahu (second hit) druhé doposud funkční alely genu. To může být způsobeno somatickou mutací nebo ztrátou heterozygoty (LOH, z angl. loss of heterozygoty) funkční alely. (23)

#### ALGORTIMUS VYŠETŘENÍ IDENTIFIKACE PROBANDŮ

Kromě mikroskopického vyšetření mezi další laboratorní techniky pro identifikaci probandů s MTS a LS patří:

#### IMUNOHISTOCHEMIE

Přítomnost nebo absenci jaderných *MMR* proteinů můžeme detekovat pomocí imunohistochemického vyšetření. Standardně vyšetřujeme expresi proteinů *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*. (24) Proteiny pracují v páru *MLH1-PMS2* a *MSH2-MSH6*. V uvedených párech první *MMR* protein je hlavní, druhý vedlejší. Pokud nefunguje jeden z hlavních *MMR* proteinů, dochází ke ztrátě i vedlejšího proteinu, a to fyziologickou ubiquitinovou cestou. (25) Nepotřebný protein se rozloží na aminokyseliny. Při mnohočetných nádorech na podkladě MTS nebo LS se ve všech očekává výpadek stejných proteinů (26) (27) až na výjimečné případy. (28)

#### MIKROSATELITNÍ STABILITA

Na DNA rozlišujeme 5 úseků s krátkými sekvencemi nukleotidů, které nazýváme mikrosatelity. Na těchto místech DNA polymeráza při tvorbě nového vlákna DNA nejčastěji chybí. Funkční *MMR* proteiny tyto chyby posléze opraví. Avšak u nefunkčních proteinů chyby zůstávají. Proto se na tato místa diagnosticky zaměřujeme. Seznam doporučených mikrosatelitů k detekci. (Tab. 2)

MSI	MONO- NEBO DINUKLEOTIDY	UMÍSTĚNÍ NA DNA	LOKALIZACE NA CHORMOZONU
D2S123	DI	<i>MSH2</i> GEN	2p16
D5S346	DI	<i>APC</i> GEN	5q21-22
D17S250	DI	PŘÍLEHLÝ LOKUS K <i>TP53</i>	17q11.2-12
BAT25	MONO	INTRON <i>c-Kit</i> ONKOGENU	4q12
BAT26	MONO	INTRON <i>MSH2</i> GENU	2p22-21

Tab. 2 MIKROSATELITNÍ PANEL DOPORUČENÝ K DETEKCI MSI (NATIONAL CANCER INSTITUTE)

K vyšetření je zapotřebí tkáň tumoru a tkáň nenádorová, které se mezi sebou porovnají. (29) Možné jsou tři výsledky:

*MSS – mikrosatelitně stabilní*

*MSI LOW – mikrosatelitně instabilní – nízká nestabilita (liší se 30-70% mikrosatelitů)*

*MSI HIGH – mikrosatelitně instabilní – vysoká nestabilita (>70%)*

Vysokou mikrosatelitní nestabilitu vykazuje přibližně 70 % nádorů u pacientů s MTS. (22) (30)

#### MUTACE *BRAF*

Test mutace genu *BRAF* se provádí jako prospektivní screening u kolorektálních karcinomů s podezřením na LS. Jde o onkogenní hotspot mutace *V600E*, která se vyskytuje především u sporadických CRC s vysokou MSI vzniklé na podkladě hypermethylace promotoru genu *MLH1*. U LS se mutace *BRAF* nevyskytuje. Mutace *BRAF* tedy prakticky vylučuje LS. U kožních lézí při MTS se tento test neprovádí. (31)

#### HYPERMETHYLACE PROMOTORU GENU *MLH1*

Promotor je charakteristická sekvence DNA, na níž se váže prostřednictvím své  $\sigma$ -podjednotky RNA-polymeráza. V tomto místě se zahajuje transkripce daného genu. Pokud jsou obě alely promotoru hypermethylovány, promotor je uzamčen a gen není exprimován. Příčina je obvykle somatická, ale mohou nastat případy dědičné hypermethylace promotoru. (32) Při hypermethylaci promotoru genu *MLH1* nádor vykazuje zpravidla ztrátu exprese genů *MLH1* a *PMS2*, vysokou MSI a obvykle i pozitivní mutaci *BRAF* (31) a odhaduje se, že zahrnuje 15% mikrosatelitně nestabilních CRC. (33)

#### MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ VYŠETŘENÍ MUTACE Z PERIFERNÍ KRVE PACIENTA

Pro definitivní potvrzení MTS nebo LS se provádí molekulárně genetické vyšetření zárodečné mutace *MMR* genů z periferní krve probanda. Před odběrem krevního vzorku předchází genetická konzultace, která je prováděna lékařským genetikem. Lékařský genetik seznámí pacienta s onemocněním a jeho důsledky. Vytvoří s probandem rodokmen, podle něhož se provede screening následně zjištěné zárodečné mutace.

Obvykle je používána PCR metoda s následnou přímou sekvenací korespondujících PCR fragmentů sloužící k detekci malých mutací a MPLA (multiplex ligation-dependent probe amplification) umožňující detekci rozsáhlých delecí a duplikací.

Na vzniku MTS se podílí především zárodečné mutace v genu *MSH2* (cca 90 % případů). (22) (24) (30) Mutace v *MLH1* genu zahrnuje zhruba 10% případů a v poslední době byly detekovány také mutace v *MSH6* genu. (30) (34) (35) U pacientů s MTS byla zachycena celá škála mutací, a to krátké delece a inserce, bodové missense a nonsense mutace a rozsáhlé delece či duplikace celých exonů. (27)

U některých pacientů s LS byla nalezena i zárodečná delece genu *EPCAM* (také znám jako *TACSTD1*), která způsobuje metylaci genu *MSH2*. (36) Vyšetření tohoto genu je zahrnuto při molekulárně genetickém vyšetření genu *MSH2*.

#### LYNCH-LIKE A MUIR-TORRE-LIKE SYNDROMY

Poslední vědecké práce ukazují, že asi 70% takto vyšetřených pacientů připadá mezi tzv. Lynch-like syndrom. (33) Nádory u Lynch-like syndromu sice vykazují MSI, ale žádnou zárodečnou mutaci v *MMR* genech a ani hypermethylaci promotoru genu *MLH1*. (33) Existuje několik možných vysvětlení:

1. Mutace neznámých genů, které mohou způsobit MSI
2. Mutace *MMR* genů nebo jejich promotorů, které naše metody neumějí identifikovat
3. Jiné intratumorální genetické procesy spojené se „second-hit“ inaktivací genů nebo bialelickou hypermethylací promotoru genu *MLH1*

Podle práce Mesenkampa z roku 2014 je až polovina případů Lynch-like syndromu způsobena somatickou „two-hits“ kombinací nejčastěji z důvodu ztráty heterozygoty a somatickými bialelickými mutacemi. (37)

Soubor několika případů Muir-Torre-like syndromu se somatickými *MMR* mutacemi zdokumentoval Joly v roce 2015. (38)

#### ALGORITMUS

Ideální postup vyšetření znázorňuje schéma, které jsme publikovali v článku Diagnóza Lynchova syndromu od patologa v Klinické onkologii v roce 2016. (39)

#### ZÁVĚRY SVV PROJEKTŮ

Výstup SVV projektů vedl k vytvoření registru pacientů s MTS a LS. Z celkových 3 673 CRC a 450 sebaceózních tumorů kůže bylo imunohistochemicky a geneticky z bloku tkáně vyšetřeno přes 400 případů. Kolem 250 případů bylo selektováno pro molekulárně genetické vyšetření *MMR* genů z periferní krve pacienta. Ne u všech pacientů bylo možné provést vyšetření, a to z důvodu úmrtí pacienta, nemožností jej dohledat nebo jeho nesouhlasu s vyšetřením.

U LS bylo molekulárně geneticky testováno 79 jedinců. U 47 jsme neobjevili žádnou zárodečnou mutaci v *MMR* genech. Tyto případy jsou podkladem pro další vědecké bádání. U zbylých jsme našli 32 probandů, z nichž 12 se zárodečnou mutací v genu *MLH1*, 8 v genu *MSH2*, 7 v *MHS6*, 1 v *PMS2* a 2 v zárodečné hypermethylaci promotoru genu *MLH1*.

U MTS bylo provedeno molekulární vyšetření u 37 jedinců. U 30 nebyla nalezena zárodečná mutace v *MMR* genech. U 5 byly nalezeny zárodečné mutace po 2 v genech *MLH1* a *MSH2* a 1 v genu *MSH6*.

Dále výstup projektů vedl k zavedení imunohistochemického vyšetření MMR proteinů a mikrosatelitní stability do praxe, racionalizaci a vylepšení metodiky identifikace probandů pomocí nového algoritmu vyšetření. V rámci morfologické studie bylo objeveno několik neobvyklých tumorů v rámci MTS/LS, které byly následně podkladem publikací v mezinárodních časopisech s impakt faktorem. (viz dále)

Jedinci s diagnostikovaným MTS a LS vstupují do programu preventivní onkologické péče. Podstupují preventivní prohlídky k zastižení a odebrání včasné léze karcinomu. Díky tomuto postupu jedinci s MTS nebo LS se dožívají stejného věku jako běžná populace. (40)

Mladým párům, kde jeden z partnerů má MTS nebo LS, je nabízena možnost preimplantační genetické diagnostiky (PGD) pro početí potomka bez mutace. PGD je nástavba umělého oplodnění, při kterém se z buněk embrya provede molekulárně genetický test na přítomnost zárodečné mutace. Při autozomálně dominantní dědičnosti je poloviční riziko přenosu mutované alely genu. Po vyloučení mutace se embryo implantuje do dělohy. (41)

## MUIR-TORRE SYNDROM – FENOTYPICKÁ VARIANTA LYNCHOVA SYNDROMU

Kacerovská D.<sup>1,2</sup>, Kazakov D.V.<sup>1,2</sup>, Černá K.<sup>1,2</sup>, Hadravský L.<sup>1</sup>, Michal M. Jr.<sup>1</sup>, Dostál J.<sup>1</sup>, Skálová A. Jr.<sup>1</sup>, Michal M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Šiklův patologicko-anatomický ústav, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Plzeň

<sup>2</sup>Bioptická laboratoř s.r.o., Plzeň

### Souhrn

Muir-Torre syndrom (MTS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění, které je dnes považováno za fenotypickou variantu mnohem častějšího hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu neboli Lynchova syndromu. MTS zahrnuje kombinaci nejméně jednoho kožního nádoru se sebaceózní diferenciací (sebaceózní adenom, sebaceom, sebaceózní karcinom) a minimálně jednoho viscerálního tumoru. Příčinou vzniku je většinou autozomálně dominantně dědičná zárodečná mutace v některém z genů zodpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, tzv. mismatch repair (MMR) genů. Tumory vznikající u MTS se ve velké části případů vyznačují ztrátou exprese MMR proteinů a v cca 70 % vykazují vysokou mikrosatelitní nestabilitu.

Podezření na tento syndrom bývá nejčastěji vysloveno dermatology, dermatopatolog/patolog, event. gastroenterology a gynekology. K definitivnímu potvrzení diagnózy jsou však vyžadována další vyšetření, která lze provést jen na specializovaných patologických pracovištích disponujících imunohistochemickými a molekulárně biologickými metodami.

**Klíčová slova:** Muir-Torre syndrom – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – Lynchův syndrom – mismatch repair (MMR) geny – MMR deficiencie – MMR zárodečná mutace – mikrosatelitní nestabilita

### Summary

#### Muir-Torre Syndrome – a Phenotypic Variant of Lynch Syndrome

Muir-Torre syndrome (MTS) represents an autosomal dominantly inherited condition and is considered a phenotypic variant of the more common hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC), or Lynch syndrome. MTS combines at least one cutaneous neoplasm with sebaceous differentiation (e.g. sebaceoma, sebaceous adenoma, and sebaceous carcinoma), and at least one visceral malignancy. MTS is a genetic disorder caused by a germline mutation in one of the DNA mismatch repair (MMR) genes. Tumors in MTS patients are characteristically associated with the loss of MMR protein expression and/or microsatellite instability (70%).

Patients who are suspected to have MTS/Lynch syndrome are often identified by dermatologists, dermatopathologists/pathologists, gastroenterologists and gynecologists. If MTS is suspected on a clinicopathological ground, necessary additional laboratory investigations should be performed only in specialized pathological departments providing immunohistochemistry and molecular biologic analysis service.

**Key words:** Muir-Torre syndrome – hereditary nonpolyposis colorectal cancer – Lynch syndrome – mismatch repair (MMR) genes – MMR deficiency – MMR germline mutation – microsatellite instability

Čes.-slov. Patol., 46, 2010, No. 4, p. 86–94

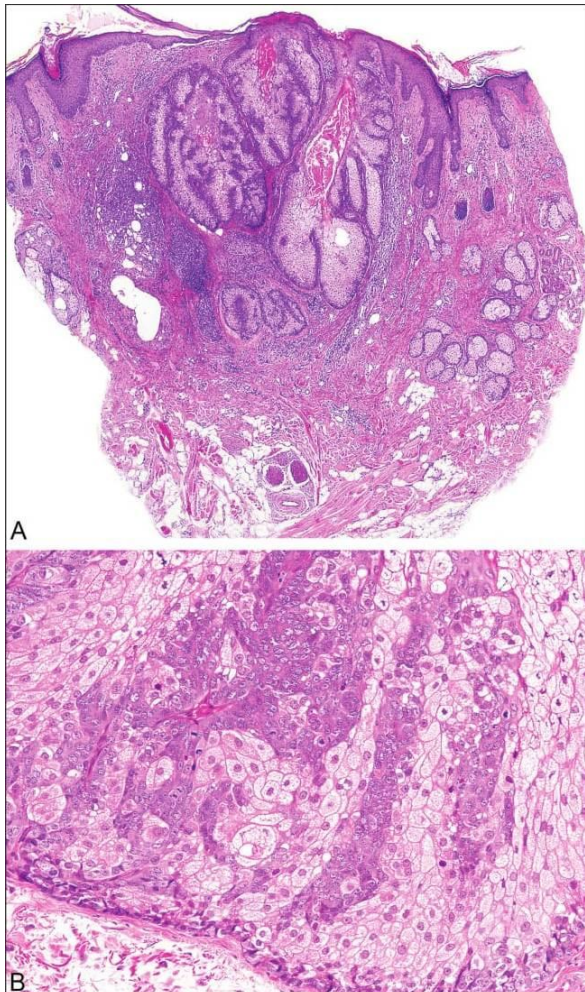
### ÚVOD

Muir-Torre syndrom (MTS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění, které bylo poprvé popsáno nezávisle dvěma autory, tj. Muirem a Torrem v roce 1967 a 1968. Tento syndrom zahrnuje kombinaci nejméně jednoho kožního nádoru se sebaceózní diferenciací a minimálně jednoho viscerálního tumoru. Stejně tak jsou kožním příznakem MTS mnohočetné keratoakantomy vyskytující se u mladých osob na místech chráněných před sluncem. Mezi nejčastější interní malignity asociované s tímto syndromem patří karcinomy gastrointestinálního (cca 50 %) a urogenitálního traktu (25 %). Kožní léze ve většině případů předcházejí anebo se vyskytují současně s nádory vnitřních orgánů (1).

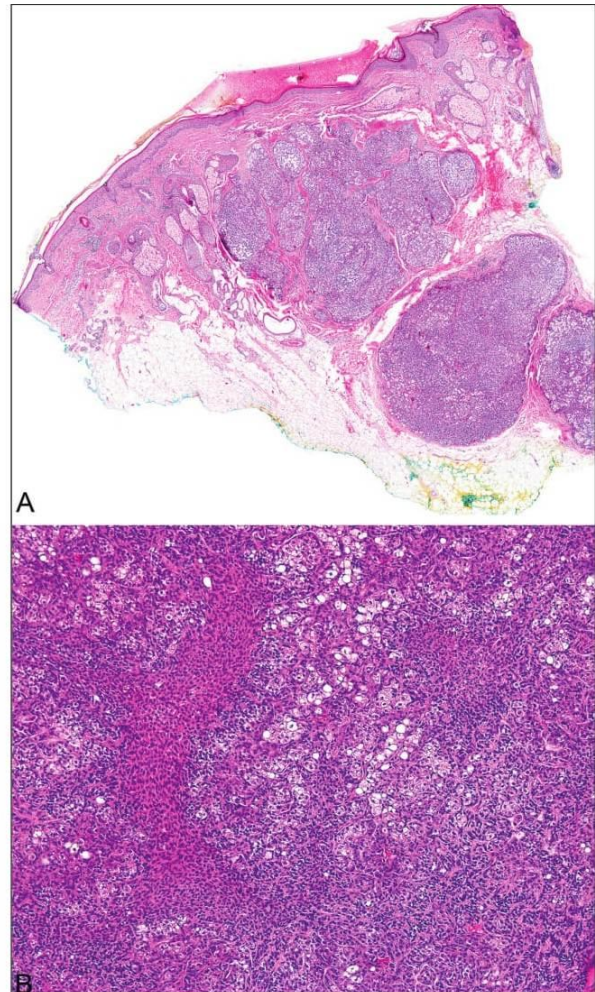
MTS je dnes považován za fenotypickou variantu mno-

hem častějšího hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu (hereditary nonpolyposis colorectal cancer; HNPCC) neboli Lynchova syndromu, pro který je typický časný výskyt kolorektálních karcinomů lokalizovaných převážně v proximálním úseku tlustého střeva a obvykle asociovaných s dalšími malignitami postihující jiné orgány. Právě „otec“ HNPCC Henry Lynch v roce 1981 poukázal na společnou možnou etiologii mezi MTS a HNPCC poté, co identifikoval pacienty s fenotypem MTS v rodině postižené HNPCC/Lynchovým syndromem (2). Následně bylo prokázáno, že oba syndromy jsou genetická onemocnění způsobená zárodečnou mutací v jedné alele některého z genů zodpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, tzv. mismatch repair (MMR) genů, která po inaktivaci druhé alely téhož genu vede ke ztrátě exprese příslušného proteinu, což má za následek mimo jiné tzv. mikrosatelitní nestabilitu (microsatellite instability; MSI).





Obr. 1. Sebaceózní adenom tvořený několika lobuly pyriformního tvaru spojené s epidermis (A); jednotlivé lobuly jsou složeny z periferní vrstvy tvořené několika řadami malých bazaloidních germinativních buněk a z centrálně uložených zralých sebocytů s objemnou, narůžovělou, pěnitou až jemně vakuolizovanou cytoplazmou (B)



Obr. 2. Sebaceom tvořený několika noduly v dermis (A), složenými převážně z malých, monomorfních, bazaloidních buněk; zralé sebocyty tvoří méně než 50 % samotného tumoru (B)

## KOŽNÍ NÁLEZY

Kožní léze u MTS zahrnují nádory se sebaceózní diferenciací, a to sebaceózní adenom, sebaceom a extraokulární sebaceózní karcinom. Hyperplazie mazových žlázek může být také přítomna (3). Výskyt periokulárních sebaceózních tumorů u MTS je vzácný. Kožní tumory jsou většinou mnohočetné, ale byly popsány i případy solitárních lézí (4). Klinický obraz se neliší od jejich sporadických protějšků, které jsou statisticky častější. Obecně lze shrnout, že mnohočetné kožní nádory se sebaceózní diferenciací vyskytující se u jedinců před 50. rokem života nebo postihující tělní partie mimo obličej jsou silným indikátorem MTS (5). Stejně tak mnohočetné keratoakantomy vznikající na místech chráněných před sluncem u mladých osob slouží jako vodítko pro správnou diagnózu.

Mikroskopicky jsou sebaceózní adenomy charakterizovány lobulárním uspořádáním a spojením s přilehlou epidermis (obr. 1A). Jednotlivé lobuly jsou složeny z periferní vrstvy tvořené několika řadami malých bazaloidních germinativních buněk a z centrálně uložených zralých sebo-

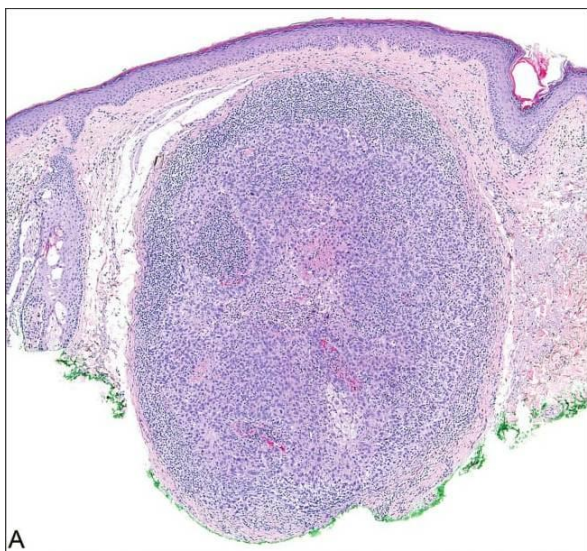
cytů s objemnou, narůžovělou, pěnitou až jemně vakuolizovanou cytoplazmou a s jádrem hvězdicového tvaru (obr. 1B). Naproti tomu sebaceom je uložen především v dermis, tvořen obvykle několika noduly s velmi vzácným epidermálním spojením (obr. 2A). Jednotlivé noduly bývají kulatého tvaru, avšak různé velikosti, složené z převážně malých, monomorfních, bazaloidních buněk. Zralé sebocyty tvoří méně než 50 % samotného tumoru (obr. 2B). U sebaceózních karcinomů jsou rozhodujícím nálezem cytologické detaily zahrnující buněčný a nukleární pleomorfismus a/nebo atypické mitózy (obr. 3). Může být přítomna i nekróza. Sebaceózní hyperplazie představuje zmožený počet a větší velikost jinak normálních mazových žlázek, často vázaných na vlasový folikl (obr. 4).

Histopatologicky jsou výše zmíněné sebaceózní kožní nádory prakticky identické s jejich sporadickými analogy, avšak existuje několik morfologických rysů, které mohou u patologa vzbudit podezření na možnou asociaci s MTS. Jedná se o:

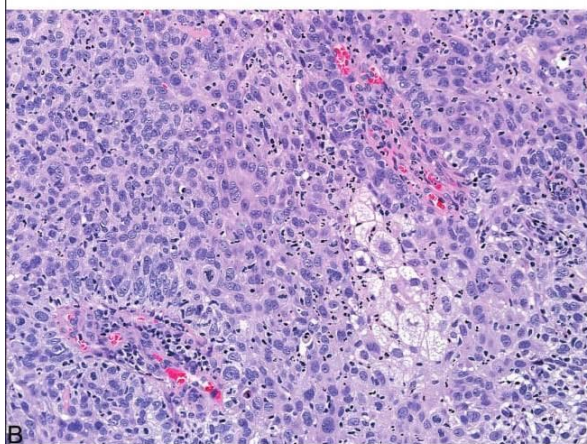
### 1. Cystické změny

Některé nádory u MTS vykazují nápadnou cystickou přeměnu. Tzv. cystický sebaceózní tumor (cystic sebaceous neo-





A

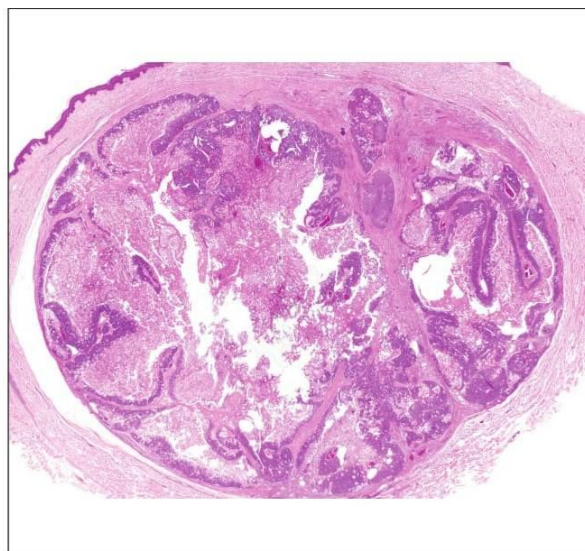


B

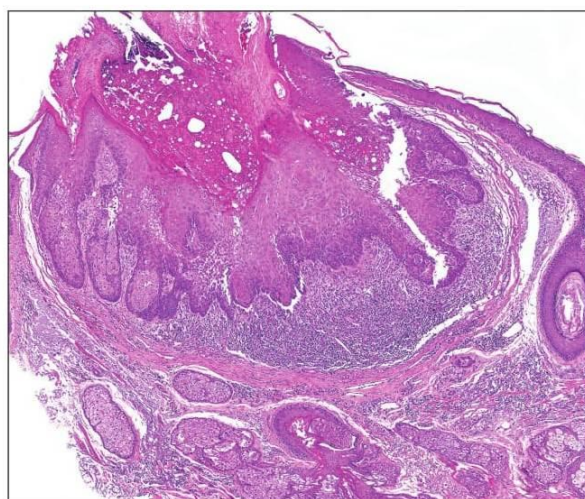
Obr. 3. Sebaseózní karcinom, který je z velké části nekroticky změněn (A); maligní cytologické detaily zahrnují nukleární pleomorfismus a četné atypické mitózy (B)



Obr. 4. Hyperplazie mazových žlázek



Obr. 5. Tzv. cystický sebaseózní tumor s výraznou cystickou přestavbou



Obr. 6. Sebaseózní adenom napodobující keratoakantom; podobné léze byly v minulosti nazývány jako seboakantomy

plasm) zahrnutý v posledním vydání WHO klasifikace je často citován jako nejčastější indikátor MTS (obr. 5) (6). Na druhé straně v některých lézích může být cystická přestavba výsledkem vystupňované holokrinní sekrece, fokální desintegrace buněk a sloučení mikrocyst (7).

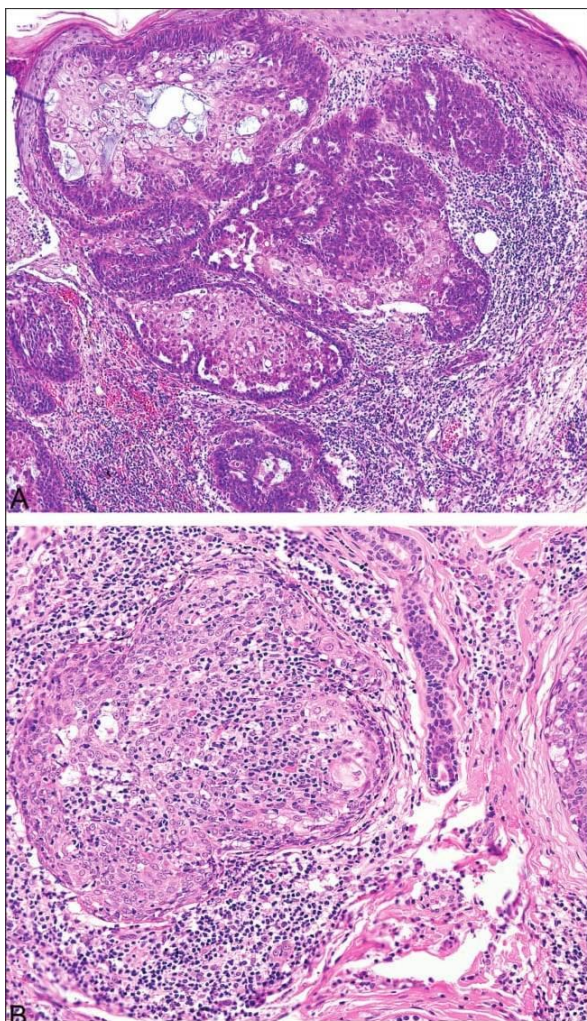
### 2. Architektura napodobující keratoakantom

Tento morfologický rys bývá často přítomen u sebaseózních adenomů. Projevuje se jako centrální, kráteru podobná invaginace (obvyčně mělká), která může být přítomna samostatně anebo v kombinaci s periferním koloretem a dlaždicobuněčnou diferenciací (obr. 6). Podobné léze byly v minulosti nazývány seboakantomy.

### 3. Intra- a peritumorální lymfocytární infiltrace

Podobně jako u kolorektálních a endometriálních karcinomů (8) v rámci HNPCC/Lynchova syndromu přítomnost intra- a peritumorálních lymfocytů u sebaseózních kožních neoplazií pravděpodobně koreluje s MMR deficiencí (obr. 7). Existuje však jen několik málo studií zabývajících se touto problematikou (9).





Obr. 7. Peritumorální lymfocytární infiltrace sebaceózního adenomu (A); intra- a peritumorální lymfocytární infiltrace sebaceomu (B)

#### 4. Mucinóza

Fokální mucinóza je vzácně zmiňována jako jeden z rysů MTS, zejména u sebaceózních adenomů a karcinomů (7).

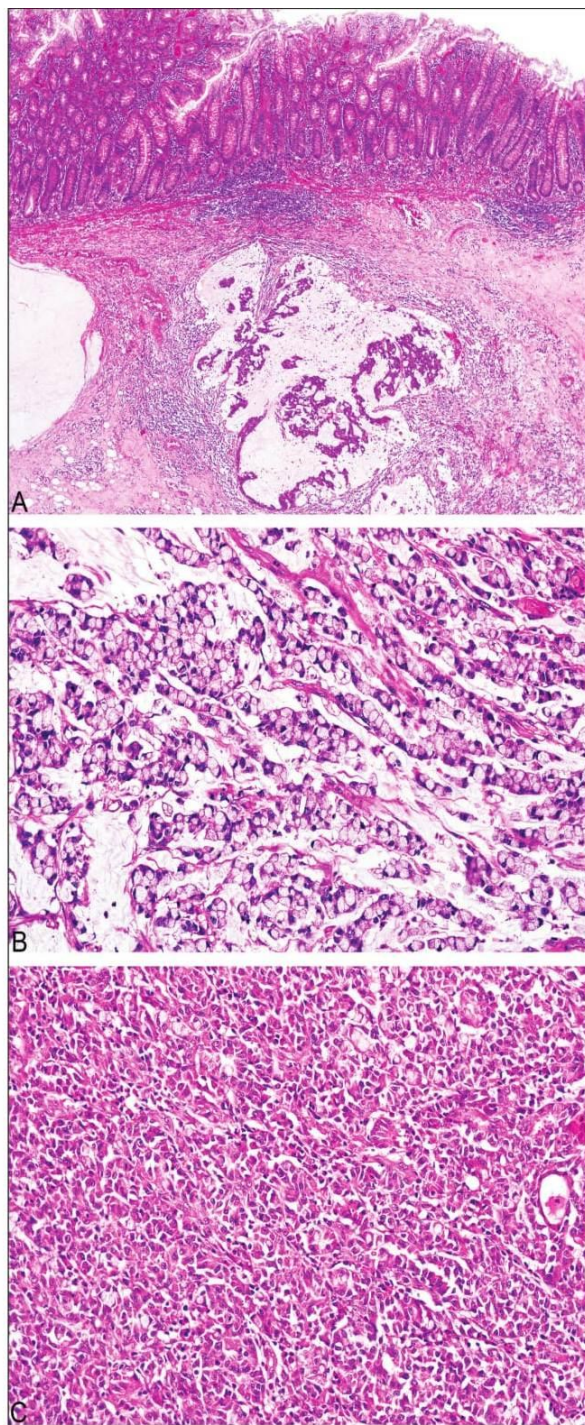
#### 5. Intra- a intertumorální heterogenita

Biopsie odebrané z různých lokalit od jedince s MTS mohou poměrně často vykazovat rozdílný vzhled, a to i tehdy, jednali se o stejné histologické léze (např. adenom, karcinom). Dokonce i v rámci samotného nádoru mohou být pozorovány rozdíly, např. ve stupni sebaceózní diferenciaci a nukleárního pleomorfismu (10).

Existují i další histopatologické rysy zmiňované u sebaceózních nádorů v kontextu s MTS. Burgdorf a kol. popsali přítomnost křibifonních žlázek v sebaceózní komponentě (7). Stejně tak byl u pacientů s MTS popsán mírný nukleární pleomorfismus u jinak běžných sebaceózních adenomů (11).

Zdá se, že sebaceomy s organoidním uspořádáním (karcinoid napodobující, labyrintní a sinusoidální růst) nejsou pravděpodobně předzvěstí MTS (12). Stejně tak retikulární akantom se sebaceózní diferenciací a nevus sebaceus Jadassohn nejsou spojeny s tímto syndromem (13, 14).

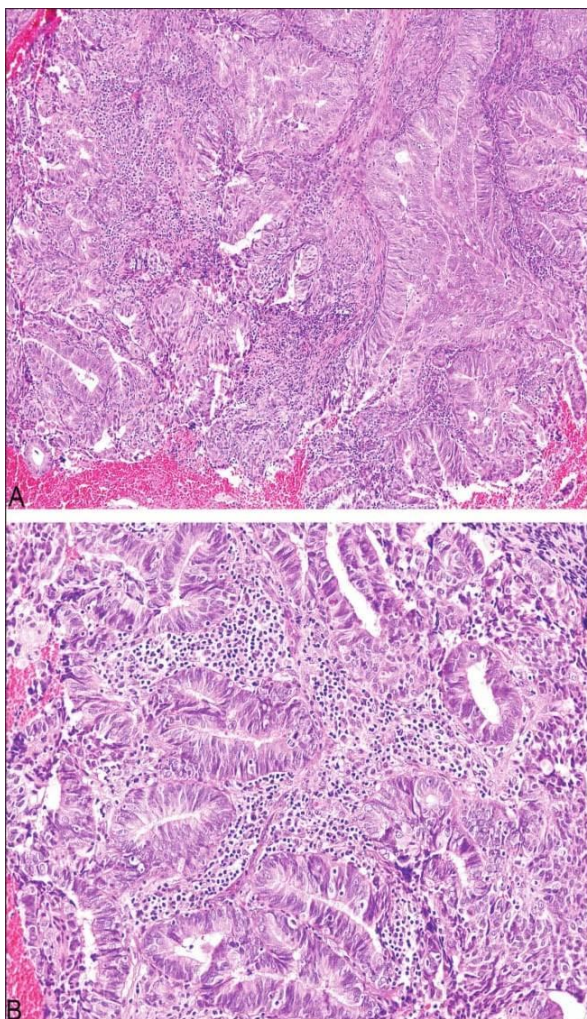
Periokulární sebaceózní léze se vyskytují jen ve vzácných případech. Dosud bylo popsáno cca 40 periokulárních sebaceózních nádorů u pacientů s MTS zahrnujících karci-



Obr. 8. Adenokarcinom tlustého střeva u pacienta s HNPCC/Lynchovým syndromem s typickými morfológickými nálezy, tj. mucinózní charakter, peri- a intratumorální infiltrace lymfocyty (A), přítomnost prstencitých buněk (B) a medulární růst (C)

nomy (nejčastější asociace), sebaceomy a sebaceózní adenomy (15, 16). Postižené osoby byly často mladšího věku ve srovnání se sporadickými případy, s průměrným věkem diagnózy 53 let. Horní a dolní víčko bylo postiženo se stejnou četností. Léze vznikající v oblasti mediálního kantu byly vzácné (15). Podobně jako u jejich extraokulárních analogů





Obr. 9. Endometriální endometroidní karcinom s peri- a intratumorální lymfocytární infiltrací (A, B)

byly u periokulárních lézí popsány neobvyklé morfologické rysy.

Je třeba zmínit i jeden z extrémních pohledů na kožní sebaceózní léze vznikající u pacientů s MTS vyslovený Ackermanem, který považoval všechny sebaceózní tumory kůže u těchto jedinců za karcinomy (17). Tento názor však nebyl obecně akceptován.

## MIMOKOŽNÍ NÁLEZY

### Gastrointestinální trakt

Cca v 50 % se u pacientů s MTS vyskytuje kolorektální karcinom, který většinou vzniká na rozdíl od normální populace v proximální části tlustého střeva. Vzácně se také mohou vyskytovat karcinomy rekta. V kontrastu se sporadickými případy, kde karcinom střeva vzniká často po 60. roce života, kolorektální karcinomy asociované s MTS či HNPCC/Lynchovým syndromem vznikají u pacientů mladšího věku (průměr 40–45 let). Ploché adenomy představují často prekurzorové léze, které bývají klinicky těžko detekovatelné a doba jejich maligní transformace bývá krátká. Většina pacientů však nemá zvýšený počet polypů, ačkoliv

Tab. 1. Mismatch repair (MMR) geny a jejich charakteristika

MMR geny	Lokalizace na chromozomu	Délka cDNA (kb)	Počet exonů
<i>MLH1</i>	3p23-21	2.3	19
<i>MSH2</i>	2p22-21	2.8	16
<i>MSH6</i>	2p16-15	4.2	10
<i>PMS2</i>	7p22	2.6	15
<i>PMS1</i>	2q31-33	2.8	13
<i>MSH3</i>	5q11-12	3.4	24
<i>MLH3</i>	14q24.3	4.4	13

přítomnost dvou i více kolorektálních karcinomů není výjimkou.

Histopatologicky vykazují nádory tlustého střeva spojené s MTS stejné morfologické rysy jako u HNPCC/Lynchova syndromu, a to mucinózní charakter, prstenčité buňky, peri- a intratumorální infiltraci lymfocyty a medulární růst (obr. 8) (18). Někteří autoři zahrnují mezi tyto znaky i nepřítomnost tzv. špinavé nekrózy v lumenech žlázek, která je naopak typickým nálezem u sporadických případů (19). Mucinózní karcinomy jsou obvykle dobře diferencované a epitel vykazuje podobnost s epitelem vilózních adenomů (19).

### Ženský pohlavní systém

Zatímco HNPCC/Lynchův syndrom zahrnuje 2,3 % endometriálních karcinomů, u pacientů s MTS se zdají být gynekologické malignity vzácnější, což může být vysvětleno asociací endometriálních karcinomů s mutací v *MSH6* genu. Endometriální karcinomy se ve srovnání s běžnou populací vyskytují v mladším věku, avšak vzácně mohou vznikat i u starších žen nad 60 let (20). Nejčastějším histologickým typem je endometriální endometrioidní karcinom.

Mikroskopicky typickým rysem podobně jako u kolorektálních karcinomů je intra- a peritumorální přítomnost lymfocytů (obr. 9). Rovněž charakteristickým nálezem je heterogenita tumoru definovaná přítomností dvou morfologicky odlišných nádorových populací tvořící minimálně 10 % tumorózní tkáň (21). Ostatní morfologické nálezy u endometriálních karcinomů publikované v kontextu s MSI zahrnují kribriformní uspořádání, mucinózní oblasti a nekrózu (20).

### Urogenitální trakt

Nejčastějším typem nádoru vylučovacího traktu u pacientů s HNPCC/Lynchovým syndromem je uroteliální karcinom, jehož incidence je cca 14–22krát vyšší než u běžné populace. Typicky vzniká v horním močovém traktu (ureter a ledvinná pánvička). Močový měchýř bývá naopak postižen méně často (22). U pacientů s MTS vznikají tyto tumory jak v močovodech a v ledvinné pánvičce, tak i v močovém měchýři (23). Urologické malignity se v rámci obou syndromů objevují o 10–15 let dříve než jejich sporadické protějšky vznikající u běžné populace (22).

### Jiné orgány

U pacientů s MTS a HNPCC/Lynchovým syndromem mohou nádory zřídka postihovat i jiné orgány včetně prsu, plic, mediastina, CNS, slinivky břišní, hlavy a krku, biliárního traktu, varlat, ledvin a prostaty (23–25). Tumory ve výše zmíněných lokalizacích bývají vzácným nálezem stejně tak jako hematologické malignity a melanomy.



## MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE MTS SYNDROMU

Příčinou vzniku MTS je ve většině případů stejně jako u HNPCC/Lynchova syndromu autozomálně dominantně dědičná zárodečná mutace v některém z genů zodpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, tzv. mismatch repair (MMR) genů (viz tabulka 1) (26). Jelikož MMR geny jsou typické tumor supresorové geny, k nástupu onemocnění dochází až somatickou inaktivací druhé alely téhož genu (27).

Nejsou-li MMR geny poškozeny, exprimované MMR proteiny se spojují do funkčních komplexů, a to v heterodimery MSH2/MSH6 (příp. MSH2/MSH3) a MLH1/PMS2 (příp. MLH1/MLH3). První z těchto dimerů rozpoznává chyby v DNA (nespárované nebo špatně spárované nukleotidy) a signalizuje poškození, druhý chyby opravuje. Zároveň se podílí na zastavení buněčného cyklu a indukcii apoptózy v reakci na poškození DNA. Pokud některý z proteinů není funkční následkem inaktivace obou alel jeho genu, dochází ke vzniku nádorů charakteristických vysokým stupněm nestability v krátkých tandemových repetičích molekuly DNA (v tzv. mikrosatelitech) (28, 29). Tumory jeví mikrosatelitní nestabilitu (MSI) v 30 a více procentech sledovaných mikrosatelitních sekvencí jsou označovány jako léze s vysokým stupněm mikrosatelitní nestability (microsatellite instability-high; MSI-H) (30). Právě vysokou mikrosatelitní nestabilitu vykazuje přibližně 70 % nádorů u pacientů s MTS (31, 32).

Ačkoliv do skupiny MMR genů podílejících se na vzniku HNPCC/Lynchova syndromu řadíme v současné době 7 genů (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *PMS1*, *MSH3* a *MLH3*), na vzniku MTS se podílí především zárodečné mutace v genu *MSH2* (cca 90 % případů) (34). Mutace v *MLH1* genu zahrnují zhruba 10 % případů. V poslední době byly detekovány také mutace v *MSH6* genu (35, 36). U MTS byla zachycena celá škála mutací, a to krátké delece a inserce, bodové missense a nonsense mutace a rozsáhlé delece či duplikace celých exonů (37).

Fenotypové projevy MTS mohou být vyvolány i jinými mechanismy než přímým poškozením MMR genů. Příčinou může být i zárodečná delece několika posledních exonů genu *TACSTD1* kódujícího Ep-CAM. Tento gen se nachází na druhém chromozomu v těsné blízkosti před genem *MSH2*. Delece exonů tak dochází k zasažení jeho transkripce do oblasti *MSH2* genu. Promotor *MSH2* genu ležící na stejném chromozomu jako terminálně mutovaný *TACSTD1* je proto epigeneticky metylován a nedochází k transkripci této alely *MSH2* genu (38). Popsány byly také případy vzniku sebaceózních lézí u pacientů s bi-alelickými mutacemi v *MYH* (*MutYH*) genu, jehož proteinový produkt se podílí na excizní reparaci DNA v reakci na oxidativní poškození DNA (39). V takových případech léze mohou být stabilní v mikrosatelitních sekvencích (40).

## DIAGNOSTIKA MMR DEFICIENCE, MSI A MMR ZÁRODEČNÉ MUTACE

V případě klinicko-patologického podezření na MTS jsou nezbytná další laboratorní vyšetření k potvrzení nebo vyloučení MMR deficiencie a MSI. Senzitivita vyšetření nestability mikrosatelitů založená na PCR metodě versus imunohistochemické vyšetření je shodná. Prvním krokem skriningového testu je imunohistochemická studie exprese MMR proteinů, která představuje rychlou, efektivní a spolehlivou metodu s vysokou prediktivní hodnotou diagnózy MMR deficiencie (33). Charakter exprese MMR proteinů v kožních tumorech

Tab. 2. Mikrosatelitní panel doporučený k detekci mikrosatelitní nestability (MSI)

MSI	Mono- nebo dinukleotidy	Umístění na DNA	Lokalizace na chromozomu
D2S123	Di	<i>MSH6</i> gen	2p16
D5S346	Di	<i>APC</i> gen	5q21-22
D17S250	Di	Přílehlý lokus k <i>TP53</i>	17q11.2-12
BAT25	Mono	Intron c-Kit onkogenu	4q12
BAT26	Mono	Intron <i>MSH2</i> genu	2p22-21

koreluje s molekulárně-genetickými výsledky. Ztráta exprese těchto proteinů je indikátorem pravděpodobného zárodečného defektu MMR genů a s tím spojené MSI (**obr. 10**) (33). V naší rutinní praxi používáme standardně panel čtyř protilátek (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*), ačkoliv nedávné studie poukázaly na možnost použití pouze dvou-protilátkového panelu (*MSH6* a *PMS2*), jehož prediktivní hodnota je údajně shodná jako u vyšetření s použitím 4 protilátek (41).

*MLH1* a *MSH2* jsou tzv. základní proteiny, zatímco *PMS2* a *MSH6* představují tzv. sekundární proteiny. Abnormality v základních proteinech (*MLH1*, *MSH2*) vedou k proteolytické degradaci heterodimerů a následně ke ztrátě jak základních, tak sekundárních proteinů. Jestliže se mutace vyskytne v genech sekundárních proteinů (tj. geny *PMS2*, *MSH6*), heterodimery zůstávají stabilní a nedochází k současné ztrátě jejich partnerů, tj. základních proteinů. Proto v případě použití dvou-protilátkového panelu je třeba mít vždy na mysli, že většina případů se ztrátou *MSH6* proteinu může mít defekt v *MSH2* genu, zatímco u případů se ztrátou *PMS2* proteinu může být naopak genetický defekt v *MLH1* genu. Jestliže je využito čtyřprotilátkového panelu, často je ztráta *MLH1* nebo *MSH2* spojena ztrátou *PMS2* a *MSH6* proteinu.

Několik postřehů k imunohistochemickému vyšetření exprese MMR proteinů:

1. Sporadické sebaceózní léze mohou příležitostně vykazovat ztrátu MMR proteinů (42, 43).

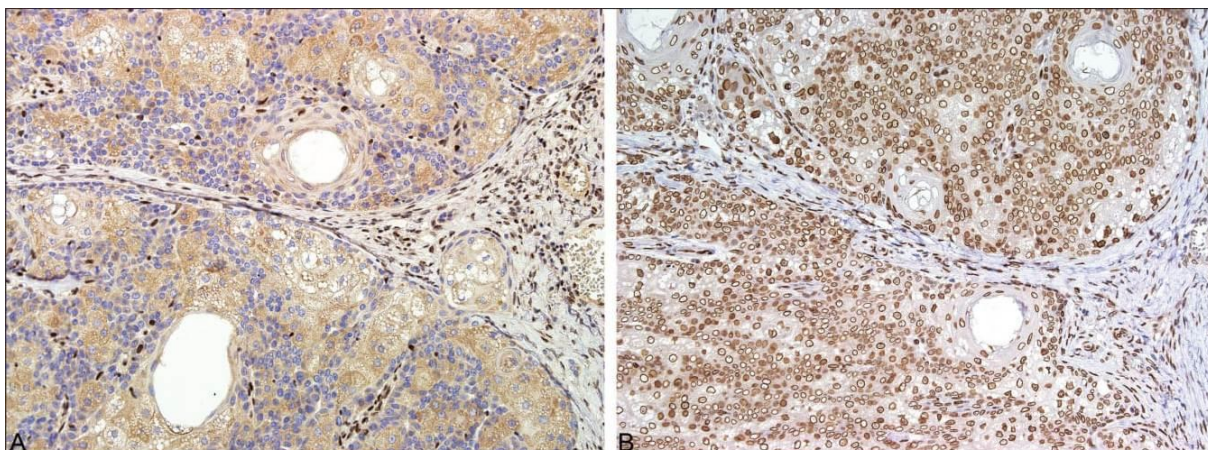
2. Někteří pacienti mohou mít zárodečnou mutaci, která se neprojevuje ztrátou MMR proteinů v tumoru. Taková situace může nastat u některých zárodečných missense mutací vedoucích k expresi nefunkčních, ale antigenně intaktních proteinů (33, 44).

3. U různých sebaceózních tumorů jednoho pacienta je očekáván identický barvicí obraz. Z tohoto důvodu postačí k testování osob s mnohočetnými projevy na kůži jen jedna léze (9, 32). Je však třeba zdůraznit, že sebaceózní hyperplazie obvykle nevykazuje ztrátu MMR proteinů, ačkoliv ostatní typy sebaceózních tumorů u téhož jedince (např. sebaceózní adenom, sebaceózní karcinom) simultánně vykazují MMR deficienci (9). Předpokládaným nálezem je taktéž imunohistochemická shoda mezi všemi tumory od jednoho pacienta včetně kožních a viscerálních tumorů, avšak vzácně může být u kožních a viscerálních tumorů detekován rozdílný charakter imunohistochemického vyšetření MMR proteinů (45).

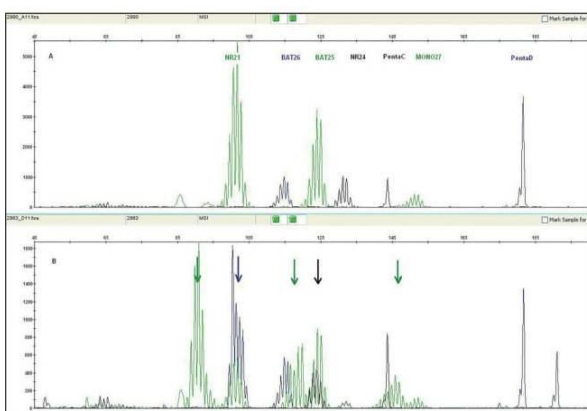
4. Pomocí imunohistochemického vyšetření nelze rozlišit mezi ztrátou *MLH1* exprese způsobené zárodečnou mutací versus somatickou hypermetylací promotoru (44).

5. Známým a často diskutovaným faktem je existence několika kvalit barvení včetně tzv. slabého barvení neoplastických elementů a nedostatku přesvědčivé pozitivní interní kontroly. Někteří autoři zastávají názor, že jenom kompletní ztráta exprese MMR proteinu v tumorózní tkáni s validní pozitivní kontrolou může být považována za interpretativní. Podle našich zkušeností je možné zaznamenat částečnou ztrátu exprese MMR proteinu, někdy s nápadným gradientním profilem (tj. ztráta





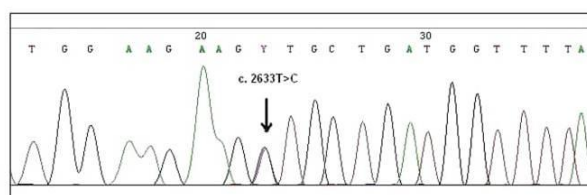
Obr. 10. Imunohistochemické vyšetření exprese MMR proteinů: ztráta exprese MSH2 v nádorových buňkách s pozitivní interní kontrolou, tj. lymfocyty (A); exprese MLH1 proteinu nádorovými buňkami (B)



Obr. 11. Mikrosatelitní nestabilita detekovaná pomocí PCR: pět mononukleotidových repetit (NR21, BAT26, BAT25, NR24, MONO27) v nenádorové tkáni a dvě kontrolní pentanukleotidové repetice (A); kolorektální nádorová tkáň téhož pacienta vykazující MSI-H všech 5 mononukleotidových repetit (B)

barvení v centru léze s naopak pozitivním, i když jen slabě, barvením na periférii tumoru) (33). V problematických případech je doporučováno vyhodnocení vzorku nejméně dvěma patology, kteří mají zkušenosti s interpretací imunohistochemických nálezů MMR proteinů. I přesto se vzácně vyskytnou případy s nevyhodnotitelným výsledkem imunohistochemického vyšetření (tzv. neinterpretovatelné barvení) (46).

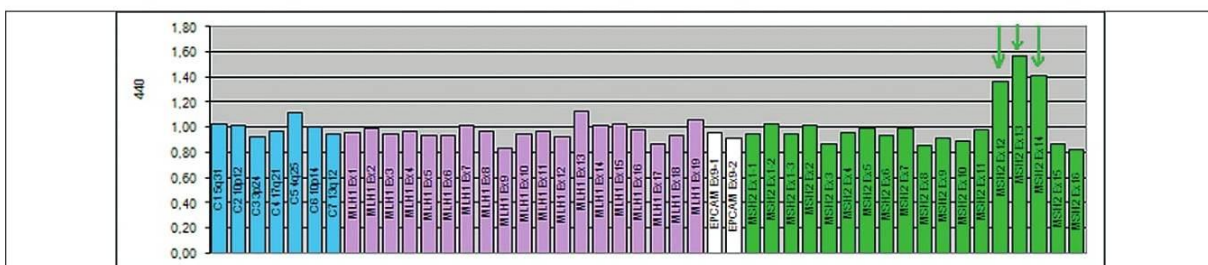
MSI může být detekována pomocí PCR technik a fragmentační analýzy zjišťující délku určitého segmentu DNA v lezi-



Obr. 12. Zárodečná bodová mutace c.2633T>C ve čtvrtém exonu MSH6 genu v periferních lymfocytech zjištěná metodou přímého sekvenování. Jde o tzv. missence mutace, kdy ve vznikajícím proteinu dochází k záměně aminokyseliny, a to valinu za alanin v kodonu 878.

onální tkáni a srovnávající ji se stejnými segmenty v normální tkáni přilehlé k tumoru. Pro tyto účely je nutná ve formulu fixovaná tkáň a dále pro dermatopatologickou praxi toto vyšetření předpokládá využití mikrodisektoru k obdržení optimálního výsledku. Snadnější a z praktického hlediska výhodnější alternativou získání kontrolního vzorku je odběr periferní krve pacienta, která může být také použita pro detekci zárodečné mutace. Současně nejvíce používaný panel mikrosatelitních markerů zahrnuje D2S123, D5S346, D17S250, BAT25, BAT26 (viz tabulka 2). V naší praxi navíc používáme i NR21, NR24 a MONO27. Výsledkem analýzy mohou být dva fenotypy MSI, a to mikrosatelitní nestabilita vysokého (high degree of MSI; MSI-H) (obr. 11) a nízkého stupně (low degree of MSI; MSI-L) (46). Zatímco MSI-H u sporadických sebaceózních kožních lézí a u sebaceózní hyperplazie je detekována pouze vzácně, u ostatních kožních lézí pacientů s MTS je častým nálezem (26, 31, 45, 47).

Zárodečná mutace v MMR genech může být detekována



Obr. 13. Zárodečná mutace velkého rozsahu v genu MSH2. Jedná se o duplikaci exonů 12, 13, 14, zachycenou metodou MLPA (SALSA MLPA KIT P003-B1, MRC-Holland). Výška hrotů >1,35 představuje duplikaci daného úseku



u pacienta a jeho pokrevních příbuzných mnoha metodami, např. testem na přítomnost zkrácených proteinů (protein truncation test), analýzou konformačního polymorfismu jednořetězcových segmentů (single strand conformation polymorphism analysis, SSCP), analýzou heteroduplexů. U pacientů s MTS je zárodečná mutace v MMR genech detekována v 60–70 % (26, 34). Na našem pracovišti je k detekci malých mutací používána PCR metoda amplifikující všechny exony a exon-intronové spoje daných genů s následnou přímou sekvenací korespondujících PCR fragmentů (obr. 12). K detekci rozsáhlých delecí a duplikací je využívána MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) (obr. 13). Součástí genetického vyšetření je i test na onkogenní V600E (dříve známý jako V599E) hotspot mutaci v genu *BRAF*. Tato metoda spolu s vyšetřením MSI byla nedávno přidána k prospektivnímu skríningu pacientů s kolorektálním karcinomem, u kterých bylo vysloveno podezření na HNPCC/Lynchův syndrom. *BRAF* mutace je identifikována ve významné části kolorektálních karcinomů s MSI-H vyvolaných hypermetylací *MLH1* promotoru (tzv. sporadické karcinomy), ale není přítomna u tumorů s MSI vznikajících v rámci HNPCC/Lynchova syndromu a MTS. Zjednodušeně lze shrnout, že identifikace V600E *BRAF* mutace prakticky vylučuje možnost HNPCC/Lynchova syndromu a MTS, a lze ji proto použít před samotným testováním zárodečné mutace v *MLH1* genu u kolorektálních karcinomů s MSI-H (48).

## GENOTYP – FENOTYP KORELACE U MTS

Mezi případy deficiencie MMR je naprosto unikátní významná korelace mezi genotypem a fenotypem, a to konkrétně mezi mutací *MSH2* genu a klinickým nálezem typickým pro MTS. Rodiny s HNPCC/Lynchovým syndromem, které jsou nositeli mutace c.942+3A>T v *MSH2* genu mají vyšší frekvenci vzniku MTS nežli rodiny, které jsou nositeli jiné mutace v téže genu (48).

MTS pacienti s postiženým *MSH2* genem mají ve srovnání s nosiči *MLH1* mutace signifikantně vyšší celoživotní riziko vzniku karcinomů na jiných místech než ve střevě. Jak již bylo zmíněno, jen menšina pacientů s MTS má mutován *MSH6* gen (35). Je třeba ale mít na paměti, že takovéto případy jsou obvykle velmi těžko identifikovatelné, neboť u HNPCC/Lynchova syndromu mutace v *MSH6* genu vykazují méně závažný klinický fenotyp, a to i s ohledem na kolorektální a endometriální karcinom (např. pozdní vznik nádoru, histologické rysy jsou více podobné tumorům u běžné populace) (50).

Nápadná je i korelace mezi anatomickou lokalizací tumoru, jeho typem, architekturou a deficiencí MMR. Bylo zjištěno, že deficiencie MMR je signifikantně spojena s anatomickou lokalizací nádoru (MMR deficientní tumory se převážně vyskytují na trupu a končetinách a jen velice vzácně na hlavě a krku), s typem tumoru (pokud léze vzniká na hlavě a krku, mnohem častěji se jedná o sebaceózní adenom než karcinom) a s architekturou (architektura sebaceózních lézí připomíná keratoakantom) (9, 51). Tato korelace vykazuje analogii s kolorektálními tumory, kde rovněž vpravo lokalizované karcinomy tlustého střeva jsou častěji spojeny s deficiencí MMR ve srovnání s levostrannými.

## ZÁVĚR

MTS, fenotypická varianta HNPCC/Lynchova syndromu, bývá nejčastěji diagnostikovaný dermatology, dermatopatolo-

gy/patology, gastroenterology a gynekology. Identifikace těchto pacientů a jejich pokrevních příbuzných vyžaduje další vyšetření, které lze provádět jen na specializovaných patologických pracovištích disponujících imunohistochemickými a molekulárně biologickými metodami. Tento přístup pak dovoluje včasné odhalení postižených a jejich pokrevních příbuzných, kteří jsou nositeli zárodečné mutace v MMR genech. V zemích, kde existuje registr těchto osob včetně striktního systému vyšetřování, je doba přežití pacientů srovnatelná s normální populací (52).

Práce byla zčásti podpořena Specifickým vysokoškolským výzkumným záměrem Univerzity Karlovy v Praze (č. projektu 260 809).

## LITERATURA

1. Cohen, P.R., Kohn, S.R., Kurzrock, R.: Association of sebaceous gland tumors and internal malignancy: the Muir-Torre syndrome. *Am J Med.*, 90, 1991, s. 606–613.
2. Lynch, H.T., Fusaro, R.M., Roberts, L., Voorhees, G.J., Lynch, J.F.: Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the Cancer Family Syndrome. *Br J Dermatol.*, 113, 1985, s. 295–301.
3. Esche, C., Kruse, R., Lamberti, C., et al.: Muir-Torre syndrome: clinical features and molecular genetic analysis. *Br J Dermatol.*, 136, 1997, s. 913–917.
4. Graham, R., McKee, P., McGibbon, D., Heyderman, E.: Torre-Muir syndrome. An association with isolated sebaceous carcinoma. *Cancer*, 55, 1985, s. 2868–2873.
5. Schwartz, R.A., Torre, D.P.: The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospective. *J Am Acad Dermatol.*, 33, 1995, s. 90–104.
6. Rutten, A., Burgdorf, W., Hugel, H., et al.: Cystic sebaceous tumors as marker lesions for the Muir-Torre syndrome: a histopathologic and molecular genetic study. *Am J Dermatopathol.*, 21, 1999, s. 405–413.
7. Burgdorf, W.H., Pitha, J., Fahmy, A.: Muir-Torre syndrome. Histologic spectrum of sebaceous proliferations. *Am J Dermatopathol.*, 8, 1986, s. 202–8.
8. Greenson, J.K., Bonner, J.D., Ben-Yzhak, O., et al.: Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol.*, 27, 2003, s. 563–570.
9. Orta, L., Klimstra, D.S., Qin, J., et al.: Towards identification of hereditary DNA mismatch repair deficiency: sebaceous neoplasm warrants routine immunohistochemical screening regardless of patient's age or other clinical characteristics. *Am J Surg Pathol.*, 33, 2009, s. 934–944.
10. Fahmy, A., Burgdorf, W.H., Schosser, R.H., Pitha, J.: Muir-Torre syndrome: report of a case and reevaluation of the dermatopathologic features. *Cancer* 1982;49:1898–903.
11. Misago N, Narisawa Y.: Sebaceous neoplasms in Muir-Torre syndrome. *Am J Dermatopathol.*, 22, 2000, s. 155–161.
12. Kazakov, D.V., Kutzner, H., Rutten, A., Mukensnabl, P., Michal, M.: Carcinoid-Like Pattern in Sebaceous Neoplasms: Another Distinctive, Previously Unrecognized Pattern in Extraocular Sebaceous Carcinoma and Sebaceoma. *Am J Dermatopathol.* 27, 2005, s.195–203.
13. Fukai, K., Sowa, J., Ishii, M.: Reticulated acanthoma with sebaceous differentiation. *Am J Dermatopathol.*, 28, 2006, s.158–161.
14. Haake, D.L., Minni, J.P., Nowak, M., Abenoza, P., Nousari, C.H.: Reticulated acanthoma with sebaceous differentiation. Lack of association with Muir-Torre syndrome. *Am J Dermatopathol.*, 31, 2009, s. 391–392.
15. Rishi, K., Font, R.L.: Sebaceous gland tumors of the eyelids and conjunctiva in the Muir-Torre syndrome: a clinicopathologic study of five cases and literature review. *Ophthal Plast Reconstr Surg.*, 20, 2004, s. 31–36.
16. Stockl, F.A., Dolmetsch, A.M., Codere, F., Burnier, M.N., Jr.: Sebaceous carcinoma of the eyelid in an immunocompromised patient with Muir-Torre syndrome. *Can J Ophthalmol.*, 30, 1995, s. 324–326.



17. **Ackerman, A.B., Lee, S.N.:** Neoplasms in all organs of Muir-Torre syndrome are carcinomas: sebaceous carcinomas and squamous-cell carcinomas (keratoacanthomas) in skin and adenocarcinomas, squamous-cell carcinomas, and transitional-cell carcinomas in internal organs. *Dermatopathology: Practical & Conceptual*, 5, 1999, s. 312–318.
18. **Bellizzi, A.M., Frankel, W.L.:** Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol.*, 16, 2009, s. 405–417.
19. **Jass, J.R.:** Role of the pathologist in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Dis Markers*, 20, 2004, s. 215–224.
20. **Karamurzin, Y., Rutgers, J.K.:** DNA mismatch repair deficiency in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.*, 28, 2009, s. 239–255.
21. **Garg, K., Soslow, R.A.:** Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) and endometrial carcinoma. *J Clin Pathol.*, 62, 2009, s. 679–684.
22. **Roupret, M., Yates, D.R., Comperat, E., Cussenot, O.:** Upper urinary tract urothelial cell carcinomas and other urological malignancies involved in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer (lynch syndrome) tumor spectrum. *Eur Urol.*, 54, 2008, s. 1226–1236.
23. **Akhtar, S., Oza, K.K., Khan, S.A., Wright, J.:** Muir-Torre syndrome: case report of a patient with concurrent jejunal and ureteral cancer and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol.*, 41, 1999, s. 681–686.
24. **Sparr, J.A., Bandipalliam, P., Redston, M.S., Syngal, S.:** Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas with loss of mismatch repair in a patient with Lynch syndrome. *Am J Surg Pathol.*, 33, 2009, s. 309–312.
25. **Oman, S.A., Ballinger, L., Cerilli, L.A.:** Small cell carcinoma: arising in Lynch syndrome: a previously undocumented occurrence. *Int J Surg Pathol.*, 17, 2009, s. 46–50.
26. **Kruse, R., Rutten, A., Lamberti, C., et al.:** Muir-Torre phenotype has a frequency of DNA mismatch-repair-gene mutations similar to that in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families defined by the Amsterdam criteria. *Am J Hum Genet.*, 63, 1998, s. 63–70.
27. **Yuen, S.T., Chan, T.L., Ho, J.W., et al.:** Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene*, 21, 2002, s. 7585–7592.
28. **Peltomäki, P., Lothe, R.A., Aaltonen, L.A., et al.:** Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.*, 53, 1993, s. 5853–855.
29. **Thibodeau, S.N., Bren, G., Schaid, D.:** Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 260, 1993, s. 816–819.
30. **Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., et al.:** A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 58, 1998, s. 5248–5257.
31. **Entius, M.M., Keller, J.J., Drillenburger, P., Kuypers, K.C., Giardiello, F.M., Offerhaus, G.J.:** Microsatellite instability and expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sebaceous gland carcinomas as markers for Muir-Torre syndrome. *Clin Cancer Res.*, 6, 2000, s. 1784–9.
32. **Ponti, G., Losi, L., Di Gregorio, C., et al.:** Identification of Muir-Torre syndrome among patients with sebaceous tumors and keratoacanthomas: role of clinical features, microsatellite instability, and immunohistochemistry. *Cancer*, 103, 2005, s. 1018–1025.
33. **Mathiak, M., Rutten, A., Mangold, E., et al.:** Loss of DNA mismatch repair proteins in skin tumors from patients with Muir-Torre syndrome and MSH2 or MLH1 germline mutations: establishment of immunohistochemical analysis as a screening test. *Am J Surg Pathol.*, 26, 2002, s. 338–343.
34. **Mangold, E., Pagenstecher, C., Leister, M., et al.:** A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet.*, 41, 2004, s. 567–572.
35. **Mangold, E., Rahner, N., Friedrichs, N., et al.:** MSH6 mutation in Muir-Torre syndrome: could this be a rare finding? *Br J Dermatol.*, 156, 2007, s. 158–162.
36. **Arnold, A., Payne, S., Fisher, S., et al.:** An individual with Muir-Torre syndrome found to have a pathogenic MSH6 gene mutation. *Fam Cancer*, 6, 2007, s. 317–321.
37. **Ponti, G., Losi, L., Pedroni, M., et al.:** Value of MLH1 and MSH2 mutations in the appearance of Muir-Torre syndrome phenotype in HNPCC patients presenting sebaceous gland tumors or keratoacanthomas. *J Invest Dermatol.*, 126, 2006, s. 2302–2307.
38. **Ligtenberg, M.J., Kuiper, R.P., Chan, T.L., et al.:** Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet.*, 41, 2009, s. 112–117.
39. **Barnetson, R.A., Devlin, L., Miller, J., et al.:** Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer. *Clin Genet.*, 72, 2007, s. 551–555.
40. **Ponti, G., Ponz de Leon, M., Maffei, S., et al.:** Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations. *Clin Genet.*, 68, 2005, s. 442–447.
41. **Shia, J., Tang, L.H., Vakiani, E., et al.:** Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol.*, 33, 2009, s. 1639–1645.
42. **Cesinaro, A.M., Ubiali, A., Sighinolfi, P., Trentini, G.P., Gentili, F., Facchetti, F.:** Mismatch repair proteins expression and microsatellite instability in skin lesions with sebaceous differentiation: a study in different clinical subgroups with and without extracutaneous cancer. *Am J Dermatopathol.*, 29, 2007, s. 351–358.
43. **Morales-Burgos, A., Sanchez, J.L., Figueroa, L.D., et al.:** MSH-2 and MLH-1 protein expression in Muir-Torre syndrome-related and sporadic sebaceous neoplasms. *P R Health Sci J.*, 27, 2008, s. 322–327.
44. **Doxey, B.W., Kuwada, S.K., Burt, R.W.:** Inherited polyposis syndromes: molecular mechanisms, clinicopathology, and genetic testing. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 3, 2005, s. 633–641.
45. **Machin, P., Catusus, L., Pons, C., et al.:** Microsatellite instability and immunostaining for MSH-2 and MLH-1 in cutaneous and internal tumors from patients with the Muir-Torre syndrome. *J Cutan Pathol.*, 29, 2002, s. 415–420.
46. **Overbeek, L.I., Ligtenberg, M.J., Willems, R.W., et al.:** Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. *Am J Surg Pathol.*, 32, 2008, s. 1246–1251.
47. **Chung, D.C., Rustgi, A.K.:** The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.*, 138, 2003, s. 560–570.
48. **Domingo, E., Laiho, P., Ollikainen, M., et al.:** BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet.*, 41, 2004, s. 664–668.
49. **South, C.D., Hampel, H., Comeras, I., Westman, J.A., Frankel, W.L., de la Chapelle, A.:** The frequency of Muir-Torre syndrome among Lynch syndrome families. *J Natl Cancer Inst.*, 100, 2008, s. 277–281.
50. **Plaschke, J., Engel, C., Kruger, S., et al.:** Lower incidence of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic MSH6 germline mutations compared with families with MLH1 or MSH2 mutations: the German Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Consortium. *J Clin Oncol.*, 22, 2004, s. 4486–4494.
51. **Singh, R.S., Grayson, W., Redston, M., et al.:** Site and tumor type predicts DNA mismatch repair status in cutaneous sebaceous neoplasia. *Am J Surg Pathol.*, 32, 2008, s. 936–942.
52. **Järvinen, H.J., Renkonen-Sinisalo, L., Aktán-Collán, K., Peltomäki, P., Aaltonen, L.A., Mecklin, J.P.:** Ten years after mutation testing for Lynch syndrome: cancer incidence and outcomes in mutation-positive and mutation-negative family members. *J Clin Oncol.*, 27, 2009, s. 4793–4797.

*Korespondenční adresa:*  
 prof. MUDr. Michal Michal  
 Šiklův patologicko-anatomický ústav  
 Alej Svobody 80  
 304 60 Plzeň  
 tel.: +420-377104631  
 e-mail: michal@medima.cz

# Lynchův syndrom v rukách patologa

Ondřej Daum<sup>1</sup>, Zdeněk Beneš<sup>2</sup>, Ladislav Hadravský<sup>1</sup>, Jan Stehlík<sup>3</sup>,  
Kateřina Černá<sup>3</sup>, Martin Dušek<sup>1,3</sup>, Bohuslava Kokošková<sup>1</sup>, Michal Michal<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Šiklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup> Interní oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha

<sup>3</sup> Biopstická laboratoř, s.r.o., Plzeň

## SOUHRN

Lynchův syndrom (dříve hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) je nejčastější příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu se známým molekulárně genetickým podkladem. Příčinou je germinální mutace některého z genů kódujících takzvané MMR proteiny, které opravují chyby ve struktuře DNA vznikající při její replikaci. Tyto mutace způsobují dysfunkci opravného komplexu, která vede k rozvoji nestability mikrosatelitů (MSI) a ke vzniku a progresi nádorů, zejména kolorektálního karcinomu. Tradičně se jeho frekvence odhaduje na 2 % všech kolorektálních karcinomů, v současné době však odhady dosahují až 5 %. Vzhledem k této poměrně vysoké četnosti, absenci premorbidního fenotypu, familiárnímu výskytu a prezentaci maligních nádorů v produktivním věku se z jeho diagnostiky stává problém nejen medicínský, ale i socioekonomický. Bohužel, Bethesda guidelines, natož Amsterdamská kritéria, která byla sestavena především ke klinickému záchytu pacientů se suspekci na Lynchův syndrom, nejsou dostatečně senzitivní. Ukázalo se, že vyšší senzitivitu vykazuje histologická detekce karcinomů s morfologickými znaky asociovanými s MSI. Jedna pětina karcinomů s MSI by měla být podmíněna Lynchovým syndromem, zbytek tvoří sporadické MSI-H karcinomy způsobené epigenetickou inaktivací opravného proteinu. K vyloučení těchto sporadických případů z dalšího testování slouží vyšetření genu *BRAF* a analýza methylace promotoru genu *MLH1*. Podezření na Lynchův syndrom vyplývající z výsledků výše uvedeného komplexu vyšetření by mělo být nakonec potvrzeno detekcí germinální mutace některého z MMR genů v periferní krvi s následným vyšetřením rodinných příslušníků pro zajištění účinné prevence.

**Klíčová slova:** kolorektální karcinom – Lynchův syndrom – HNPCC – MSI – nestabilita mikrosatelitů

## Lynch syndrome in the hands of pathologists

### SUMMARY

Lynch syndrome (formerly hereditary non-polyposis colorectal cancer) is the most common familial colorectal cancer syndrome with a known molecular genetic background. The syndrome is caused by a germline mutation of one of the genes encoding mismatch repair (MMR) proteins that are responsible for DNA replication errors repair. Impaired function of these proteins leads to microsatellite instability (MSI) and forms a suitable background for the development and progression of tumors, mainly colorectal cancer. Traditionally, Lynch syndrome was regarded to be responsible for 2 % of all cases of colorectal cancer, however recent estimates reach even 5 %. Due to this relatively high frequency, familial occurrence, the absence of the premorbid phenotype and the development of malignant tumors during the productive years of life, the correct diagnosis becomes not only a medical, but also a socioeconomical problem. Unfortunately, clinical means of diagnostics of Lynch syndrome (like the Amsterdam criteria and Bethesda guidelines) lack sensitivity. It was shown that predictive models based on histological signs of MSI are more sensitive than the clinical criteria used to detect patients suspicious of Lynch syndrome. Of all MSI-H colorectal cancers, 1/5 is caused by Lynch syndrome, the rest being only sporadic cancers caused by epigenetic inactivation of a MMR protein. To rule out the sporadic cases, molecular genetic investigation of the *BRAF* gene and methylation analysis of *MLH1* is used in the diagnostic workup of Lynch syndrome. The suspicion of Lynch syndrome, based on the results of the assortment of diagnostic methods mentioned above, should be proven by detection of a germline mutation of an MMR gene in peripheral blood, and followed by screening of family members, which is a necessary condition for efficient prevention.

**Keywords:** colorectal cancer – Lynch syndrome – HNPCC – MSI – microsatellite instability

*Cesk Patol 2014; 50(1): 18-24*

## LYNCHŮV SYNDROM - SOUČASNÁ DEFINICE

Lynchův syndrom (LS) je autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku maligních ná-

dorů, jehož podkladem je (až na výjimky) germinální mutace některého z genů odpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, takzvaných mismatch repair (MMR) genů. Nejčastějším karcinomem vznikajícím při Lynchově syndromu je **kolorektální karcinom (CRC)**, je však zvýšené riziko vzniku i extrakolonických malignit, zejména **karcinomů endometria, žaludku, tenkého střeva, ovaria, ledvinné pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže**.

Na podkladě LS vzniká pravděpodobně až 5 % CRC. Na rozdíl od familiární adenomatózní polypózy (FAP) tyto nádory nevznikají v terénu polypózy (definované jako >100 polypů), což však neznamená, že nemohou být přítomny žádné polypy. Další

### ✉ Adresa pro korespondenci:

Doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.

Šiklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň

Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň

tel.: +420377402523

e-mail: DAUM@fnplzen.cz



důležitým znakem LS je absence „premorbidního fenotypu“, tedy přítomnosti benigních změn, které by umožňovaly diagnostikovat tento syndrom ještě před vznikem maligního tumoru (jako je tomu třeba v případě FAP, neurofibromatózy 1. typu a dalších familiárních karcinomových syndromů). Výjimkou z tohoto pravidla je fenotypická varianta LS projevující se vznikem kožních sebaceózních nádorů, označovaná jako Muir-Torrehova syndrom (MTS) (1). V ostatních případech může být LS diagnostikován prakticky až při nálezů maligního tumoru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného probanda.

## HISTORIE A VÝVOJ TERMINOLOGIE

První známou dokumentovanou rodinou s (tehdy samozřejmě ještě nepojmenovaným) LS je „karcinomová rodina G“, kterou v roce 1913 popsal prof. Warthin (2). Pozorování podobné významného rodinného výskytu kolorektálního karcinomu při absenci polypózy (3) přivedlo Lynche ke studiu a doplnění materiálů o „karcinomové rodině G“ a zaznamenání základních znaků tohoto syndromu:

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

Ve svých prvních publikacích Lynch používal k jeho označení termín „syndrom karcinomové rodiny“, v pozdějších „hereditární nepolypózní kolorektální karcinom“ (HNPPCC) (5). Zároveň se však začalo synonymicky používat označení „Lynchův syndrom“ (6). V současné době se upouští od termínu HNPPCC, přičemž označení „Lynchův syndrom“ se používá pro případy splňující Amsterdamská kritéria (viz níže) a zároveň nesoucí germinální mutaci některého z MMR genů, zatímco pro případy splňující Amsterdamská kritéria, ale bez prokazatelné germinální mutace některého z MMR genů, se doporučuje termín „familiární kolorektální karcinom typu X“ (7).

## MOLEKULÁRNĚ GENETICKÝ PODKLAD

Příčinou LS je ve většině případů germinální mutace v některém z genů zodpovědných za opravy replikačních chyb v DNA, takzvaných mismatch repair (MMR) genů (8,9). Fyziologicky se MMR proteiny kódované těmito geny spojují do funkčních komplexů, a to zejména v heterodimery MSH2-MSH6 (příp. MSH2-MSH3) a MLH1-PMS2. První z těchto dimerů rozpoznává chyby v DNA (nespárované nebo špatně spárované nukleotidy) a signalizuje poškození, druhý chyby opravuje. Zároveň se podílí na zastavení buněčného cyklu a indukci apoptózy v reakci na poškození DNA. Pokud některý z proteinů není funkční následkem inaktivace obou alel jeho genu, dochází ke vzniku nádorů charakteristických vysokým stupněm nestability v takzvaných mikrosatelitech, tedy krátkých tandemových repetičích (short tandem repeats, STR) (10,11).

**Mikrosatelity** jsou úseky DNA tvořené několikanásobným opakováním jednoho, dvou, tří, čtyř a vzácněji více nukleotidů, které se vyskytují v celém genomu poměrně hojně. Délky jednotlivých mikrosatelitů (tedy počty opakování těchto sekvencí) jsou v rámci jedince stejné, ale mohou se lišit mezi jednotlivci. Mikrosatelitní sekvence jsou velmi snadno zranitelné při replikaci DNA, protože DNA polymeráza na takovýchto místech snadněji sklouzává a dochází tak ke vzniku delších (inzerce sekvence) či kratších (delece sekvence) úseků. Kolísá-li délka mikrosatelitů v rámci jednoho jedince, hovoříme o nestabilitě mikrosatelitů (microsatellite insta-

**Tabulka 1.** Panel mikrosatelitních markerů a jeho použití

Bethesda panel mikrosatelitních markerů doporučený NCI	
a.	mononukleotidové: BAT25, BAT26
b.	dinukleotidové: D2S123, D5S346, D17S250
Rozdělení nádorů podle stability mikrosatelitů	
1.	MSS: 0 nestabilních markerů
2.	MSI-L: 1 nestabilní marker v Bethesda panelu (nebo frekvence nestabilních $\leq 30 - 40\%$ )
3.	MSI-H: > 1 nestabilní marker v Bethesda panelu (nebo frekvence nestabilních > 30 - 40%)

NCI: National Cancer Institute, MSS: microsatellite stable, nádor se stabilními mikrosatelity, MSI-L: microsatellite instability – low, nádor s nízkým stupněm nestability mikrosatelitů, MSI-H: microsatellite instability – high, nádor s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů

\*: možnost v závorce platí i při použití panelu složeného z většího počtu markerů

bility, MSI). Stanovení stupně MSI spočívá ve stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů, přičemž na základě počtů postižených markerů se rozlišují stavy (resp. nádory) se stabilními mikrosatelity (**microsatellite stable, MSS**), s nízkým stupněm nestability (**microsatellite instability – low, MSI-L**) a s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (**microsatellite instability – high, MSI-H**) (12). Přehled používaných markerů a algoritmus stanovení stupně MSI shrnuje tabulka 1.

MSI-H tumory mohou vznikat dvěma různými základními způsoby. Buď jde o sporadické nádory vyvolané genetickými a/ nebo epigenetickými změnami v somatické buňce, nebo o familiárně se vyskytující nádory v rámci LS způsobené nejčastěji germinální mutací některého z MMR genů. Mutovaná alela je děděna autozomálně dominantně. Jelikož ale MMR geny patří mezi typické tumor supresorové geny, k vlastnímu vzniku nádoru dochází až somatickou inaktivací druhé alely téhož genu (13). LS je z více než 80 % asociován se zárodečnými mutacemi genů *MLH1* a *MSH2* (14), přibližně 10 % objevených mutací je lokalizováno v genu *MSH6* a ostatní mutace připadají na další MMR geny (*PMS2*, *PMS1*, *MSH3*, *MLH3*). Většinou se jedná o mutace malého rozsahu jako jsou substituce, inzerce nebo delece, rozsáhlé delece a duplikace celých exonů bývají nacházeny hlavně v *MSH2* (až 1/3 mutací) a poměrně často také v *MLH1* (15). U posledně jmenovaného genu byly už popsány i germinální hypermetylace promotoru vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci (16,17). V nedávné době byly popsány i germinální delece 3' konce genu *EPCAM* (*TACSTD1*), které vedou k epigenetické inaktivaci *MSH2* (18,19). U některých mutací a polymorfizmů MMR genů zatím nebyl prokázán jejich klinický význam, nicméně poznatky o variantách genů jsou neustále aktualizovány na stránkách International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (<http://www.insight-group.org/>).

Je-li u osob nesoucích jednu germinálně mutovanou alelu MMR genu během jejich života inaktivována i alela druhá, dochází ke vzniku různých malignit, jako například CRC, karcinomů dalších částí GIT, urotelu a dalších. Důvodem může být somatická mutace v druhé alele genu, ztráta heterozygoty (LOH), nebo také metylace promotoru, jak tomu často bývá u genu *MLH1* (20). Velmi vzácně se vyskytuje germinální bialelická mutace genů MMR, a to zejména jako následek incestu. Tento stav je charakteristický vznikem CRC již v mladém věku, hematologickými malignitami a fenotypickým obrazem připomínajícím neurofibromatózu 1. typu (21,22).

Klinické projevy mohou být u mutací jednotlivých genů různé. Například nosiči germinální mutace *MLH1* mají riziko vzniku kolorektálního karcinomu v nízkém věku nižší, než je tomu u nosičů mutací v ostatních MMR genech, a také u nich často bývá kolorektální karcinom jedinou diagnostikovanou malignitou.



Ostatní nádorová onemocnění vyskytující se v souvislosti s Lynchovým syndromem jsou detekována častěji u pacientů s germinální mutací v *MSH2* (23). Mutace v *MSH6*, které mají poměrně nízkou penetranci, jsou 6x častěji asociovány s karcinomy endometria než s nádory kolorekta, navíc jsou u těchto pacientů kolorektální karcinomy (v porovnání s Lynchovými syndromy způsobenými mutacemi jiných MMR genů) častěji levostranné. Důležité také je, že mutace v *MSH6* nevedou vždy ke vzniku nestability mikrosatelitů, pravděpodobně díky tvorbě alternativního heterodimeru MSH2-MSH3 (24,25). Naopak mutace v *PMS2* vedou většinou ke vzniku MSI-H tumorů a jsou asociovány jak s časným kolorektálním, tak endometriálním karcinomem, avšak ani zde penetrance není příliš vysoká (26-28). Na vzniku MTS se podílí především germinální mutace v genech *MLH1* a *MSH2*, přičemž mutace v genu *MSH2* je převažující (29,30).

Turcotův syndrom, který je charakterizován společným výskytem nádorů mozku (většinou gliomů) a CRC, může být také způsoben zárodečnou mutací některého z MMR genů, mutace byly detekovány zejména v *MLH1* a *PMS2* (31).

Nádory pacientů s LS a MTS jsou v 89 %, resp. 70 % MSI-H, na rozdíl od sporadických kolorektálních karcinomů, kde se MSI-H status vyskytuje pouze u 15 % pacientů a v naprosté většině případů bývá asociován s hypermetylací promotoru genu *MLH1*, nikoli se somatickými mutacemi MMR genů (10,32,33).

Mutační analýza je prováděna v ideálním případě z periferní krve pacienta, lze k ní využít ale i nenádorovou tkáň pacienta. K detekci rozsáhlých delecí a duplikací, které zahrnují celé exony nebo několik exonů, je v poslední době stále častěji využívána metoda MLPA (multiple ligation probe amplification). Drobné mutace mohou být detekovány pomocí SSCP (single strand conformation polymorphism) nebo přímou sekvenací celých exonů a exon-intronových oblastí.

## ZÁKLADY KLINICKÉ DIAGNOSTIKY LYNCHOVA SYNDROMU

V roce 1990 byla formulována klinická kritéria k diagnostice HNPCC, která se označují jako Amsterdamská kritéria (34). Pro zvýšení senzitivity, zejména s přihlédnutím k možnosti prezentace syndromu extrakolonickou malignitou, byla tato kritéria v roce 1998 revidována na Amsterdamská kritéria II (Tabulka 2) (35).

### Bethesda guidelines

K identifikaci pacientů s CRC, u kterých by měla být vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (MSI), případně provedeno molekulárně genetické vyšetření, byla v roce 1996 vypracována a v roce 2002 revidována tzv. Bethesda guidelines (BG, resp. RBG), která berou v potaz nejen klinická kritéria, ale i morfologické znaky tumoru (Tabulka 3) (36). Bohužel ani tato širší kritéria nezachytí všechny případy LS (37), zejména v případě postižení *MSH6*

Tabulka 2. Amsterdamská kritéria II

Amsterdamská kritéria II
• Alespoň tři členové rodiny mají karcinom, který bývá součástí Lynchova syndromu (CRC, karcinom endometria, tenkého střeva, močových cest)
• Alespoň jeden pacient je přímý příbuzný dvou ostatních
• Postižení jedinců v rodině v nejméně dvou po sobě následujících generacích
• Nádorové onemocnění u alespoň jednoho z jedinců v rodině bylo diagnostikováno ve věku pod 50 let
• Byla vyloučena familiární adenomatózní poly póza (FAP)
• Diagnóza karcinomu byla potvrzena histopatologickým vyšetřením

Tabulka 3. Revidovaná Bethesda guidelines

Revidovaná Bethesda guidelines (RBG)
• CRC diagnostikovaný u pacienta mladšího než 50 let
• Přítomnost synchronního nebo metachronního CRC nebo jiného karcinomu, který bývá součástí Lynchova syndromu, bez ohledu na věk
• CRC s MSI-H histologií u pacienta mladšího 60 let
• Alespoň u jednoho příbuzného byl ve věku nižším než 50 let diagnostikován CRC nebo jiný karcinom, který bývá součástí Lynchova syndromu
• Alespoň u dvou příbuzných prvního nebo druhého stupně byl diagnostikován CRC nebo jiný karcinom, který bývá součástí Lynchova syndromu (bez ohledu na věk)

a *PMS2* (27, 38-41). Odhaduje se, že až čtvrtina pacientů s LS spadne sítím kritérií RBG. Vzhledem k tomu, že falešná negativita v případě LS nemá za následek nerozpoznání tohoto syndromu pouze u vyšetřovaného pacienta, ale i u jeho případných příbuzných, nelze tuto senzitivitu pokládat za dostatečnou.

## ROLE MORFOLOGA VE ZVÝŠENÍ ZÁCHYTU LYNCHOVA SYNDROMU

Současný nárůst role morfologických vyšetření v diagnostice Lynchova syndromu je způsoben potřebou zvýšení senzitivity, byť i za cenu snížení specifity, které je v tomto případě možné familiární tendence ke vzniku maligních nádorů ospravedlnitelné jak z hlediska etického, tak ekonomického.

Mezi hlavní argumenty pro zvýšení senzitivity systému depistáže patří fakt, že 1 ze 660 lidí je nositelem germinální mutace některého z MMR genů (42), riziko vzniku CRC u LS je 60 - 80 % (43,44), dále že k progresi z adenomu do karcinomu pravděpodobně dochází během 2-3 let, narodil od 8 - 10 let u sporadických případů (45,46), a zejména že průměrný věk v době diagnózy je 45 let, tedy asi o 20 let méně než u sporadického CRC, navíc se zvýšeným rizikem synchronního a metachronního CRC (45).

### 1. Konvenční histologie

Zapojení histopatologa do vyhledávání pacientů s LS je založeno na detekci histologických znaků charakteristických pro CRC s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů, tedy takzvané „*MSI-H histologii*“. Tyto morfologické rysy sice nejsou cha-

Tabulka 4. Model PREDICT

Znak	Skóre	Charakteristika
Pravostranná lokalizace	1,6	
Mucin	1,6	Disekující mucin i v minimální komponentě nádoru
Věk pod 50 let	1,3	
TIL	1,3	Třeba > 2/HPF, jinde zas > 10/100 epitelových jader
Peritumorální lymfoidní lem	0,7	Lichenoidní pruh při invazivním okraji nádoru
Stromální plasmocyty	0,7	> 25 % stromálních leukocytů

TIL: tumor-infiltrující lymfocyty

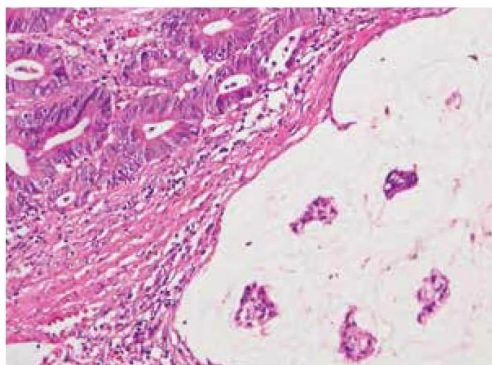
#### PREDICT skóre:

Maximální možné skóre: 7,8

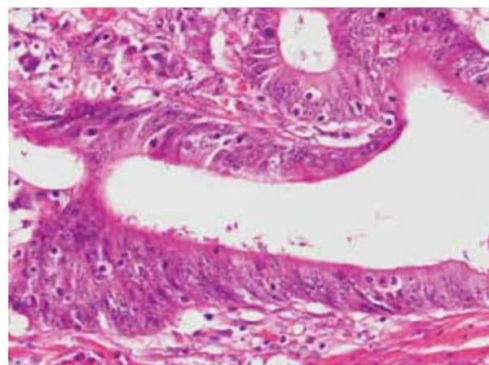
Suspekce na MSI-H: skóre  $\geq 2,5$

Semi PREDICT skóre: přítomny 2 a více znaků  $\rightarrow$  MSI-H susp.

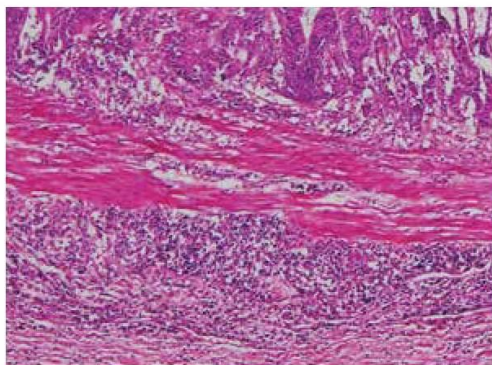




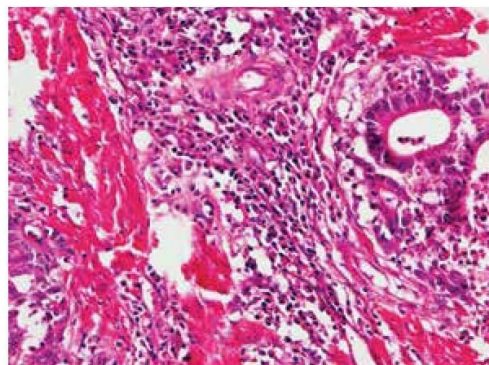
**Obr. 1.** V dolní části obrázku je patrný hlen disekující stroma a vytvářející hlenové jezírko. V hlenu plavou ostrůvky nádorových buněk. V horní části obrázku je zřetelně vidět „posypání“ nádorových žlázek lymfocytů obklopenými světlými halo (HE, původní objektiv 10x).



**Obr. 2.** Tumor-infiltrující lymfocyty ve větším detailu (HE, původní objektiv 20x).



**Obr. 3.** Vpravo od nádoru je souvislý lem lymfocytů, který částečně proniká i do přilehlé hladké svaloviny (HE, původní objektiv 10x).



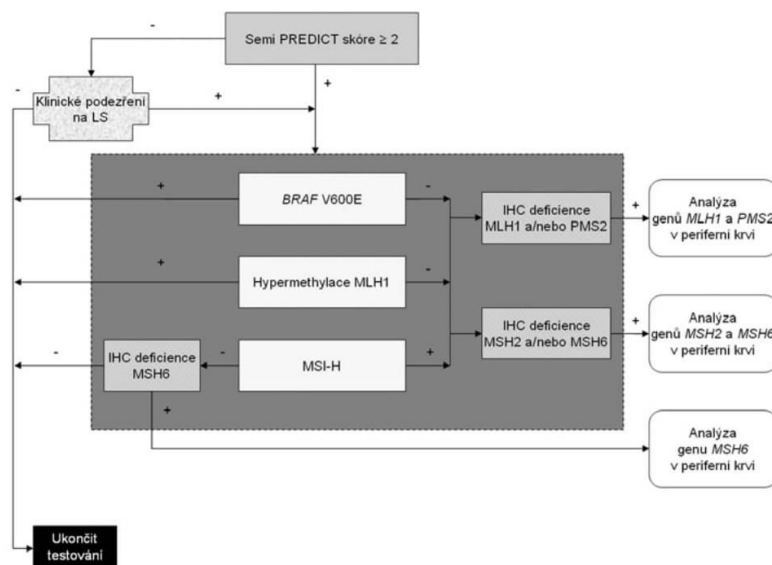
**Obr. 4.** Zánětlivá infiltrace v nádorovém stromatu v tomto zorném poli je ve výrazné většině tvořena plazmatickými buňkami (HE, původní objektiv 20x).

rakteristické pouze pro LS, protože se vyskytují i u sporadických MSI-H karcinomů způsobených epigenetickou inaktivací *MLH1*, ale odhaduje se, že 1 z 5 MSI-H CRC je CRC v rámci LS. Tento jistě ospravedlnitelný pokles specifity je daní za fakt, že samotná MSI-H morfologie má vyšší senzitivitu než souhrn zbývajících 4 kritérií RBG (47). Ačkoli byly morfologické znaky vídané v MSI-H CRC popsány již v RBG (konkrétně byly uváděny karcinomy se špatnou diferenciací, karcinomy mucinózní, medulární nebo „z buněk pečetního prstenu“, přítomnost Crohn-like lymfoidních nodulů a tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL)), nebyla dostatečně známa ani prediktivní hodnota jednotlivých znaků, ani jejich reprodukovatelná kvantitativní definice, která by byla použitelná v rutinní praxi (36,48). Proto v posledních letech proběhlo několik studií (49), jejichž cílem bylo nalézt racionální algoritmus detekce MSI-H karcinomů, z nichž se v současné době jako nejužitečnější jeví model Model PREDICT (Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors) (47), zejména ve své zjednodušené formě jako Semi PREDICT skóre (Tabulka 4). Histologickými znaky, na nichž je tento model založen jsou: přítomnost mucinu disekujícího stroma v jakémkoli množství (obr. 1), přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL) (obr. 1, 2), peritumorální lymfoidní lem (obr. 3) a zastoupení plazmatických buněk mezi buňkami zánětlivého infiltrátu ve stromatu převyšující 25 % (obr. 4).

## 2. Imunohistochemie a stanovení MSI

Méně zprostředkovanou informací o funkci MMR komplexu lze získat pomocí imunohistochemického vyšetření exprese hlavních MMR proteinů (tedy *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* a *MSH6*) nebo prostřednictvím vyšetření MSI Bethesda panelem mikrosatelitních markerů (viz výše a Tabulka 1). Zpočátku, když byla imunohistochemicky stanovována pouze exprese *MLH1* a *MSH2*, zdála se senzitivita imunohistochemického vyšetření ve srovnání s MSI nedostatečná. Avšak po zavedení dalších dvou protilátek, které detekují partnery *MLH1* a *MSH2* pro tvorbu heterodimerů (tedy proteiny *PMS2* a *MSH6*), je senzitivita imunohistochemického vyšetření a stanovení MSI srovnatelná (50). Význam detekce těchto funkčně minoritních partnerů pro tvorbu heterodimerů spočívá nejen v průkazu jejich vlastních strukturálních abnormalit, ale i v nepřímém průkazu ztráty aktivity jejich dominantních partnerů. Některé mutace totiž vedou ke ztrátě funkce při zachování antigenicity, zejména v případě *MLH1*, což se ale projeví ztrátou exprese *PMS2* (50). Tento efekt závislosti exprese funkčně minoritních proteinů (*PMS2* a *MSH6*) na intaktní funkci jejich dominantních partnerů (*MLH1* a *MSH2*) vedl i k vytvoření imunohistochemického detekčního modelu založeného pouze na dvou protilátkách detekujících *PMS2* a *MSH6*. Podle něj by ztráta exprese *PMS2* měla detekovat mutace *MLH1* i *PMS2*, ztráta exprese *MSH6* detekuje i poškození *MSH2* (51). Další studie však





**Obr. 5. Algoritmus diagnostiky Lynchova syndromu.** Na základě mikroskopického nálezu MSI-H histologie (nebo klinické žádosti) je proveden komplex vyšetření situovaný do tmavě šedého obdélníku, který sestává z imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů, analýzy MSI, methylace promotoru *MLH1* a stavu genu *BRAF*. Tyto metody jsou v současné době na našem pracovišti z časových důvodů prováděny simultánně. K dalšímu genetickému vyšetření germinálních mutací MMR genů jsou primárně vybráni pacienti s MSI-H tumory bez mutace *BRAF* a bez hypermethylace promotoru genu *MLH1*. Za zvláštních okolností (zejména při ztrátě imunoexpresy *MSH6*) je však vhodné testovat i MSS karcinomy (bližší viz text).

tento model zpochybnila, navíc dokonce navrhla semikvantitativní model místo dosavadního binárního (pozitivní/negativní) (52).

V současné době jsou obě metody (stanovení MSI a imunohistochemické vyšetření) vnímány jako komplementární, protože v kombinaci mají vyšší senzitivitu než při samostatném použití (53,54). Typickým příkladem přínosu imunohistochemie jsou případy s mutací *MSH6*, které mohou uniknout při detekci MSI pomocí PCR, protože *MSH2* může také tvořit komplex s *MSH3* (50,55). Imunohistochemická detekce MMR proteinů navíc (narozdíl od stanovení MSI) umožňuje predikovat postižený gen pro molekulární genetické vyšetření.

### 3. Rozlišení mezi karcinomem při Lynchově syndromu a sporadickým MSI-H karcinomem

Běžná světelná mikroskopie může být nápomocna i v diferenciální diagnostice mezi sporadickým MSI-H karcinomem a MSI-H karcinomem při LS. Zatímco sporadické MSI-H karcinomy s methylní promotoru *MLH1* vznikají z tzv. „sesilných serrated adenomů“ (do češtiny někdy nešťastně překládaných jako „přisedlé pilovité adenomy“), prekursorovou lézí karcinomů v terénu LS je „konvenční“ (tubulární, tubulovilózní nebo vilózní) adenom. Z toho lze odvodit, že najdeme-li v periférii tumoru zbytky prekursorového sesilného serrated adenomu, jde s největší pravděpodobností o sporadický MSI-H karcinom (56). Nicméně tento jednoduchý diagnostický znak vylučující LS nemusí být vždy dostupný, ať již z důvodu nedostatečného samplingu nebo destrukce adenomu pokročilým adenokarcinomem, což vyžaduje použití dalších metod k diferenciální diagnostice.

V současné době umožňuje rozlišení sporadických a LS-asociovaných MSI-H karcinomů zapojení dvou metod molekulární patologie do managementu CRC. První z nich je analýza genu *BRAF*, konkrétně průkaz mutace V600E, která je přítomna až u poloviny sporadických MSI-H CRC, ale (téměř) nikdy u LS. Druhou metodu představuje průkaz hypermethylace promotoru *MLH1*, která je markerem sporadických MSI-H CRC a naopak až na výjimky nebývá přítomna u LS (57). S vědomím určitého statistického zjednodušení lze tedy tyto dvě metody využít k vyřazení pacientů z dalšího (nákladného) diagnostického managementu, pokud tomu nebrání jiné okolnosti (např. nízký věk, výrazné familiární postižení, multiplicita nádorů).

Spíše teoretickou hodnotu má fakt, že MSI je přítomna již asi v polovině případů adenomů u LS, zatímco ve sporadických adenomech není prakticky nikdy, takže průkaz MSI v adenomu je celkem specifický pro LS.

### 4. Komplexní diagnostický management CRC

Ke zvýšení záchytu LS využíváme v současné době diagnostický algoritmus, na jehož počátku stojí mikroskopické vyšetření histologických řezů obarvených hematoxylinem a eozinem, na něž v případě přítomnosti znaků „MSI-H histologie“ navazuje sada metod imunohistochemických a molekulárně patologických, jejichž cílem je potvrdit přítomnost MSI-H, vyloučit možnost sporadického MSI-H karcinomu a určit pravděpodobně postižený gen k detekci germinální mutace.

Nádory, jejichž Semi PREDICT skóre vzbuzuje podezření na MSI-H, vykazují ztrátu exprese některého (nebo některých) z MMR proteinů, nemají hypermethylovaný promotor genu *MLH1* a nebyla u nich prokázána substituce V600E genu *BRAF*, jsou určeny k detekci germinální mutace MMR genu určeného na základě imunohistochemického vyšetření. Celý algoritmus je znázorněn na obr. 5. Zatímco imunohistochemické vyšetření a analýza genu *BRAF* se běžně provádí v materiálu z parafinových bločků tumoru (ačkoli pro molekulární genetickou analýzu by byla vhodnějším materiálem čerstvá nádorová tkáň, jejíž získání je však z logistických důvodů kromě specifických situací poměrně obtížné), analýza hypermethylace promotoru *MLH1* a stanovení MSI vyžaduje srovnání s nenádorovou tkání. Tato sice bývá běžně dostupná v případě chirurgických resekátů (většinou jsou k tomuto účelu používány vzorky z chirurgických okrajů resekátů), většinou však není k dispozici při vyšetřování endoskopických biopsií. V těchto případech je nutná domluva se zainteresovaným gastroenterologem, aby zajistil kontrolní tkáň, ať už v podobě endoskopického vzorku z nenádorové sliznice nebo nesrážlivé periferní krve. Pokud jde o finální analýzu MMR genů, zde je optimálním materiálem nesrážlivá periferní krev, protože průkaz mutace mimo nádorovou tkáň potvrzuje její germinální povahu, přičemž z důvodu technické náročnosti analýzy těchto genů je výtěžnost z krve výrazně vyšší než z nenádorové tkáně fixované ve formolu.

Ačkoli jsou možné i odlišné přístupy (např. primární plošné vyšetřování MSI u všech CRC), plnohodnotný postup by

měl zahrnovat všechny uvedené diagnostické modalit. Důvodem je jejich vzájemná komplementárnost. Kupříkladu samotné vyšetření MSI bez analýzy genu *BRAF* a stavu methylace promotoru *MLH1* nedokáže odlišit sporadické CRC od syndromových, dále značná část karcinomů s mutací *MSH6* nemusí vykazovat MSI-H, a konečně bez imunohistochemického vyšetření nelze zúžit spektrum MMR genů, jejichž stav má být analyzován.

## PREZENTACE LYNCHOVA SYNDROMU MIMO KOLOREKTÁLNÍ KARCINOM

Ačkoli germinální mutace způsobující LS může být teoreticky zodpovědná za vznik maligního tumoru ve kterékoli lokalizaci (viz výše), zvláštní zřetel zasluhuje endometriální karcinom a syndromologické varianty LS.

Endometriální karcinom je totiž u žen druhou nejčastější malignitou asociovanou s LS, přičemž riziko vzniku je podle literárních údajů 40 - 60 % (44,58,59). Odhaduje se, že 1,8% všech nově zjištěných karcinomů endometria je součástí LS, přičemž častěji než u typických případů LS je u nich zastoupena mutace *MSH6* (24). S tím jde ruku v ruce nižší penetrance LS, která může zakrýt familiární vazbu endometriálního karcinomu, prezentace ve vyšším věku než je pro LS typické, absence MSI-H a morfologických znaků svědčících pro LS. Z toho důvodu se jeví jako nutnost provádění imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů u všech diagnostikovaných endometriálních karcinomů (60).

Ze syndromologických variant byl samostatně popsán Turcotův syndrom 1. typu, který (ačkoli použití internetového vyhledávače odhaluje v této oblasti značný terminologický chaos) je v našich podmínkách definován jako asociace CRC a nádoru mozku, zejména astrocytárního. Ačkoli je tento syndrom závažný z hlediska prognózy pacienta a může hrát i určitou diagnostickou roli, nelze jej významem srovnávat s MTS, který se vyznačuje přítomností sebaceózních kožních nádorů, které jsou snadno přístupné vyšetření, a představuje jedinou variantu LS s premorbidním fenotypem (1).

## ZÁVĚR

Lynchův syndrom (LS) je familiární karcinomový syndrom způsobený germinální mutací některého z genů, jehož proteinový produkt se účastní opravy chyb v DNA vzniklých při replikaci. Vzhledem k tomu, že výskyt LS v populaci se nyní odhaduje až na 5% a vede ke vzniku maligních nádorů již v produktivním věku, sílí v současné době tlak na zvýšení senzitivity jeho detekce. Protože klinický přístup k jeho záchytu se ukázal jako nedostatečně efektivní, klade se dnes stále větší důraz na morfologickou a molekulárně patologickou diagnostiku. Ta by měla představovat komplex vyšetření histologického, imunohistochemického a molekulárně biologického, byť vzájemně uspořádaní jednotlivých komponent tohoto komplexu může být různé v závislosti na lokálních podmínkách. Podle našich zkušeností je nezbytné zavést jasný algoritmus, aby se diagnostika LS stala rutinní záležitostí a její management se co nejvíce zautomatizoval. Bohužel se dosud nepodařilo v našich podmínkách vytvořit spolehlivě fungující systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli organizovat další průběh vyšetření rodiny nemocného s LS. V nejbližších letech je tedy nezbytné zainteresovat do diagnostiky LS i klinické lékaře, bez jejichž aktivní účasti není možná ani kompletní diagnostika pacienta ani další vyšetření jeho rodinných příslušníků.

## SEZNAM ZKRATEK

**BG** - Bethesda guidelines  
**CRC** - colorectal carcinoma, kolorektální karcinom  
**EPCAM** - epithelial cell adhesion molecule  
**FAP** - familiární adenomatózní polypóza  
**HNPCC** - hereditary non-polyposis colorectal cancer, hereditární nepolypózní kolorektální karcinom  
**LS** - Lynchův syndrom  
**MLH1** - mut L homolog 1  
**MMR** - mismatch repair  
**MSH2** - mut S homolog 2  
**MSH6** - mut S homolog 6  
**MSI** - microsatellite instability, nestabilita mikrosatelitů  
**MSI-H** - microsatellite instability - high, vysoký stupeň nestability mikrosatelitů  
**MSS** - microsatellite stable, stabilní mikrosatelity  
**MTS** - Muir - Torreho syndrom  
**PMS2** - postmeiotic segregation increased 2  
**RBG** - revidovaná Bethesda guidelines

## LITERATURA

1. Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K, et al. Muir-Torre syndrom - fenotypická varianta Lynchova syndromu. *Cesk Patol* 2010; 46(4): 86-94.
2. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med* 1913; 12(5): 546-555.
3. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966; 117(2): 206-212.
4. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer* 1971; 27(6): 1505-1511.
5. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15(3-4): 209-213.
6. Boland CR, Troncale FJ. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann Intern Med* 1984; 100(5): 700-701.
7. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293(16): 1979-1985.
8. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75(5): 1027-1038.
9. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75(6): 1215-1225.
10. Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53(24): 5853-5855.
11. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109): 816-819.
12. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(22): 5248-5257.
13. Yuen ST, Chan TL, Ho JW, et al. Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002; 21(49): 7585-7592.
14. Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL, et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6): 763-769.
15. Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, et al. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet* 1998; 20(4): 326-328.
16. Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925-3928.
17. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697-705.



18. **Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, et al.** Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112-117.
19. **Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E.** Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197-203.
20. **Kruse R, Rutten A, Hosseiny-Malayeri HR, et al.** "Second hit" in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463-465.
21. **Gallinger S, Aronson M, Shayan K, et al.** Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 576-585.
22. **Bandipalliam P.** Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 323-333.
23. **Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J, et al.** Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044-2051.
24. **Hampel H, Frankel W, Panescu J, et al.** Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810-7817.
25. **Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, et al.** Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 26-37.
26. **Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL, et al.** Mismatch repair gene PMS2: disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer Res* 2004; 64(14): 4721-4727.
27. **Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, et al.** Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312-322.
28. **Truninger K, Menigatti M, Luz J, et al.** Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 128(5): 1160-1171.
29. **Mathiak M, Rutten A, Mangold E, et al.** Loss of DNA mismatch repair proteins in skin tumors from patients with Muir-Torre syndrome and MSH2 or MLH1 germline mutations: establishment of immunohistochemical analysis as a screening test. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(3): 338-343.
30. **Mangold E, Pagenstecher C, Leister M, et al.** A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet* 2004; 41(7): 567-572.
31. **De Rosa M, Fasano C, Panariello L, et al.** Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* 2000; 19(13): 1719-1723.
32. **Kamory E, Kolacsek O, Otto S, Csuka O.** hMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2003; 9(4): 236-241.
33. **Entius MM, Keller JJ, Drillenburger P, et al.** Microsatellite instability and expression of hMLH1 and hMSH2 in sebaceous gland carcinomas as markers for Muir-Torre syndrome. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1784-1789.
34. **Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT.** The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424-425.
35. **Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT.** New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453-1456.
36. **Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al.** Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261-268.
37. **Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al.** Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851-1860.
38. **Liu T, Yan H, Kuismanen S, et al.** The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798-7802.
39. **van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, et al.** Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123-138.
40. **Dovrat S, Figer A, Fidder HH, et al.** Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291-294.
41. **Hegde MR, Chong B, Blazo ME, et al.** A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689-4693.
42. **de la Chapelle A.** The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005; 4(3): 233-237.
43. **Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG, et al.** Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489-498.
44. **Quehenberger F, Vasen HF, van Houtwelingen HC.** Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; 42(6): 491-496.
45. **Lynch HT, de la Chapelle A.** Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801-818.
46. **Jass JR, Stewart SM.** Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783-786.
47. **Hyde A, Fontaine D, Stuckless S, et al.** A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(12): 1820-1829.
48. **Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, et al.** Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007; 133(1): 48-56.
49. **Roman R, Verdu M, Calvo M, et al.** Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathology examination. A prospective multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* 2010; 456(5): 533-541.
50. **Shia J.** Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293-300.
51. **Shia J, Tang LH, Vakiani E, et al.** Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg Pathol* 2009; 33(11): 1639-1645.
52. **Barrow E, Jagger E, Brierley J, et al.** Semi-quantitative assessment of immunohistochemistry for mismatch repair proteins in Lynch syndrome. *Histopathology* 2010; 56(3): 331-344.
53. **Funkhouser WK, Jr., Lubin IM, Monzon FA, et al.** Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14(2): 91-103.
54. **Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M.** Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444(2): 135-141.
55. **Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM.** The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7(1): 41-52.
56. **Jass JR.** Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113-130.
57. **Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, et al.** BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41(9): 664-668.
58. **Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al.** Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997; 6(1): 105-110.
59. **Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al.** Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999; 81(2): 214-218.
60. **Clarke BA, Cooper K.** Identifying Lynch syndrome in patients with endometrial carcinoma: shortcomings of morphologic and clinical schemas. *Adv Anat Pathol* 2012; 19(4): 231-238.

# Moderní diagnostika Lynchova syndromu

## Modern diagnostics of Lynch syndrome

B. Kokošková<sup>1,2</sup>, O. Daum<sup>1</sup>, Z. Beneš<sup>3</sup>, M. Dušek<sup>1,2</sup>, J. Stehlík<sup>2</sup>, K. Černá<sup>2</sup>, L. Hadravský<sup>1</sup>, M. Michal<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Šiklův ústav patologie, LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup>Bioptická laboratoř, s. r. o., Plzeň

<sup>3</sup>Interní oddělení Fakultní Thomayerovy nemocnice, Praha

**Souhrn:** Lynchův syndrom (dříve zvaný hereditární nepolypózní kolorektální karcinom – HNPCC) je nejčastější genetickou příčinou familiárního výskytu kolorektálního karcinomu. Příčinou je zárodečná mutace některého z MMR genů, které jsou zodpovědné za opravy chyb ve struktuře DNA vznikající při její replikaci. Tyto mutace způsobují dysfunkci opravného komplexu, která vede k rozvoji nestability mikrosatelitů (MSI) a ke vzniku a progresi nádorů, zejména kolorektálního karcinomu. V současné době se odhaduje, že až 5 % kolorektálních karcinomů vzniká v asociaci s Lynchovým syndromem. Vzhledem k této poměrně vysoké četnosti, absenci premorbidního fenotypu, familiárnímu výskytu a prezentaci maligních nádorů v produktivním věku je včasná diagnostika Lynchova syndromu důležitá nejen z etického, ale i ekonomického hlediska. Bohužel, Bethesda guidelines, natož Amsterdamská kritéria, nejsou dostatečně senzitivní. Vyšší senzitivitu vykazuje detekce morfoloogických znaků asociovaných s MSI při histologickém vyšetření vzorků kolorektálních karcinomů. Přibližně jedna pětina karcinomů s MSI je geneticky podmíněna Lynchovým syndromem, zbytek tvoří sporadické MSI-H karcinomy způsobené epigenetickou inaktivací MMR genu. K vyloučení těchto sporadických případů z dalšího testování slouží vyšetření genu *BRAF* a analýza metylace promotoru genu *MLH1*. Podezření na Lynchův syndrom vyplývající z výsledků výše uvedeného komplexu vyšetření by mělo být nakonec potvrzeno detekcí zárodečné mutace některého z MMR genů v periferní krvi pacienta s následným vyšetřením rodinných příslušníků pro zajištění účinné prevence.

**Klíčová slova:** kolorektální karcinom – Lynchův syndrom – HNPCC – nestabilita mikrosatelitů

**Summary:** Lynch syndrome (formerly known as hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC) is the most common hereditary colorectal cancer syndrome. The syndrome is caused by a germline mutation of one of the mismatch repair (MMR) genes which are responsible for DNA replication error repair. Impaired function of the proteins encoded by these genes leads to microsatellite instability (MSI) and forms a suitable background for development and progression of tumours, mainly colorectal cancer. According to recent estimates up to 5% of all cases of colorectal cancer are associated with Lynch syndrome. Due to this relatively high frequency, familial occurrence, absence of premorbid phenotype and development of malignant tumors in productive age, correct diagnosis is important not only from the ethical but also the economical point of view. Unfortunately, clinical means of diagnostics of Lynch syndrome (like the Amsterdam criteria and Bethesda guidelines) lacks sensitivity. It was shown that predictive models based on histological signs of MSI are more sensitive than the clinical criteria used to detect patients with suspected Lynch syndrome. Of all MSI-H colorectal cancers, 1/5 is caused by Lynch syndrome, while the rest are sporadic cancers caused by epigenetic inactivation of an MMR gene. To rule out the sporadic cases, molecular genetic investigation of the *BRAF* gene and methylation analysis of the *MLH1* promoter is used in the diagnostic workup of Lynch syndrome. The suspicion of Lynch syndrome, based on the results of the complex of diagnostic methods mentioned above, should be proved by detection of a germline mutation of an MMR gene in peripheral blood, and followed by screening of family members, which is a necessary condition for efficient prevention.

**Key words:** colorectal cancer – Lynch syndrome – HNPCC – microsatellite instability

### Lynchův syndrom – historie a současnost

V současné době je Lynchův syndrom (LS) definován jako autozomálně dominantně dědičné onemocnění vytvářející predispozici ke vzniku maligních nádorů, jehož podkladem je zárodečná mutace některého z genů odpovědných za

opravy replikačních chyb v DNA, tzv. mismatch repair (MMR) genů. Nejčastějším karcinomem vznikajícím při LS je kolorektální karcinom (CRC), je však zvýšené riziko vzniku i dalších malignit, zejména karcinomů endometria, žaludku, tenkého střeva, ovaria, ledvinné pánvičky a močovodu, nádorů mozku a kůže.

Navzdory svému názvu je první literární zpráva o LS obsažena v publikaci Prof. Warthina z roku 1913, v níž je popsána „karcinomová rodina G“ [1]. Obdobné pozorování rodinného výskytu kolorektálního karcinomu při absenci polypózy [2] přivedlo dr. Lynche k návratu ke „karcinomové rodině G“,



aktualizaci informací a rozpoznání základních znaků tohoto syndromu, kterými jsou [3]:

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

Onemocnění bylo zpočátku označováno jako „syndrom karcinomové rodiny“, později „hereditární nepolypózní kolorektální karcinom“ (HNPCC) [4]. Zároveň se však začalo synonymně používat označení „Lynchův syndrom“ [5]. Z důvodu možnosti výskytu extrakolonických malignit se v současné době upouští od zavádějícího termínu HNPCC, přičemž označení „Lynchův syndrom“ se používá pro případy způsobené germinální mutací některého z MMR genů, zatímco pro případy splňující Amsterdamská kritéria, ale bez prokazatelné zárodečné mutace některého z MMR genů, se doporučuje termín „familiární kolorektální karcinom typu X“ [6].

Na podkladě LS vzniká podle současných odhadů až 5 % CRC. Důvodem, proč přesto stále zůstává ve stínu méně časté familiární adenomatózní polypózy (FAP, cca 1 %) je, že tyto nádory nevznikají v terénu polypózy (definované jako > 100 polypů), což však neznamená, že nemohou být přítomny žádné polypy. Absence „premorbidního fenotypu“, tedy přítomnosti benigních změn, které by umožňovaly diagnostikovat tento syndrom ještě před vznikem maligního tumoru (jako je tomu třeba v případě FAP, neurofibromatózy 1. typu a dalších familiárních karcinomových syndromů) výrazně ztěžuje jeho včasnou klinickou diagnostiku. Výjimkou z tohoto pravidla je fenotypická varianta LS projevující se vznikem kožních sebaceózních nádorů, označovaná jako Muir-Torrehova syndrom (MTS) [7]. V ostatních případech může být LS diagnostikován prakticky až při nálezů maligního tu-

moru, případně při genetickém vyšetření rodinných příslušníků již diagnostikovaného probanda.

### Lynchův syndrom z pohledu molekulární genetiky

#### MMR geny a MMR proteiny

Naprostá většina případů LS je způsobena zárodečnou mutací některého z genů odpovědných za opravy replikačních chyb v DNA (replication error repair, RER), které jsou označovány jako mismatch repair (MMR) geny [8,9]. Fyziologicky se MMR proteiny kódované těmito geny spojují do funkčních komplexů, především v heterodimery MLH1-PMS2 a MSH2-MSH6 (příp. MSH2-MSH3). Zatímco druhý jmenovaný dimer se uplatňuje v rozpoznávání chyb (především nespárovaných nebo špatně spárovaných nukleotidů) v DNA, první heterodimer slouží k opravě těchto nalezených chyb. Inaktivace obou alel některého ze jmenovaných genů vede k dysfunkci celého komplexu a ke vzniku nádorů charakteristických vysokým stupněm tzv. nestability mikrosatelitů [10,11].

#### Mikrosatelity a MSI

Mikrosatelity jsou úseky DNA tvořené několikanásobným opakováním jednoho až čtyř, vzácněji i více nukleotidů. Tyto krátké repetitivní sekvence se vyskytují v genomu poměrně hojně, přičemž délky jednotlivých mikrosatelitů (tedy počty opakování těchto sekvencí) jsou za normálních okolností v rámci jedince stejné, ale mohou se lišit mezi jednotlivci. Sekvence mikrosatelitů jsou snadno zranitelné při replikaci DNA, protože DNA polymeráza v oblasti repetice „sklouzává“ a v důsledku toho dochází ke vzniku delších či kratších úseků. Jestliže nedochází ke korekci těchto chyb, potom může délka mikrosatelitů v rámci jednoho jedince kolísat, což je stav označovaný jako nestabilita mikrosatelitů (microsatellite instability, MSI). MSI však není jednoznačně daným stavem, který by přímo způsoboval vznik nádorů. Jde

spíše o semikvantitativní vyjádření genetického poškození DNA uvedeným mechanismem. Stanovení stupně MSI je tedy arbitrární a spočívá ve stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů, přičemž na základě počtu postižených markerů se rozlišují stavy (hlavně nádory) se stabilními mikrosatelity (microsatellite stable, MSS), s nízkým stupněm nestability (microsatellite instability – low, MSI-L) a s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (microsatellite instability – high, MSI-H) [12].

#### MMR geny a MSI-H tumory

Tumory s MSI-H vznikají dvěma různými mechanismy, a to buď jako sporadické nádory vyvolané genetickými a/nebo epigenetickými změnami v somatické buňce, nebo jako familiárně se vyskytující nádory v rámci LS způsobené zárodečnou mutací některého z MMR genů. Ačkoli je mutovaná alela děděna autozomálně dominantně, k vlastnímu vzniku nádoru dochází až somatickou inaktivací druhé alely téhož genu, což je dáno tím, že MMR geny patří mezi typické tumor supresorové geny s recesivním charakterem účinku [13]. Teprve tehdy, je-li u osob nesoucích jednu zárodečně mutovanou alelu MMR genu během jejich života inaktivována i alela druhá, dochází ke vzniku maligních tumorů. Příčinou této inaktivace může být somatická mutace v druhé alele genu, ztráta heterozygosity (LOH) nebo metylace promotoru, jak tomu bývá u genu *MLH1* [14].

Nejčastěji postiženými geny při LS jsou *MLH1* a *MSH2* (dohromady více než 80 %) [15], dále následuje *MSH6* (10 %) a zbylé případy představují vzácná zárodečná postižení dalších MMR genů (*PMS2*, *PMS1*, *MSH3*, *MLH3*).

#### Vzácné příčiny Lynchova syndromu

Ačkoli je LS obecně vnímán jako důsledek zárodečné mutace MMR genů, vzácně může vést ke stejné dysfunkci MMR proteinů, a tím i ke stejnému klinickému postižení, odlišný mechaniz-

mus, jehož neznalost může mít za následek diagnostické rozpaky. V případě genu *MLH1* byly například popsány zárodečné hypermetylace promotoru vedoucí k jeho epigenetické inaktivaci [16,17]. V nedávné době byly popsány i zárodečné delece 3' konce genu *EPCAM (TACSTD1)*, které zase vedou k epigenetické inaktivaci *MSH2* [18,19]. Navíc dosud u řady mutací a polymorfizmů MMR genů nebyl objasněn jejich klinický význam.

### Klinické a genetické varianty Lynchova syndromu

Klinické projevy LS se mohou lišit podle postiženého genu, případně i podle konkrétního typu mutace. Například u nosičů zárodečné mutace *MLH1* často bývá kolorektální karcinom jedinou diagnostikovanou malignitou na rozdíl od pacientů se zárodečnou mutací v *MSH2*, u nichž se častěji vyskytují i extrakolonické nádory [20]. Mutace v *MSH6* mají jednak nízkou penetranci, dále jsou šestkrát častěji asociovány s karcinomy endometria než s nádory kolorekta, a navíc jsou u těchto pacientů kolorektální karcinomy (v porovnání s LS způsobeným mutacemi jiných MMR genů) častěji levostranné. Důležité také je, že mutace v *MSH6* nevedou tvrdě k MSI-H, pravděpodobně díky tvorbě alternativního heterodimeru MSH2-MSH3, což může ovlivnit jejich diagnostiku [21,22]. Naopak mutace v *PMS2* vedou většinou ke vzniku MSI-H tumorů a jsou asociovány jak s časným kolorektálním, tak endometriálním karcinomem, avšak ani zde penetrance není příliš vysoká [23–25]. Nádory pacientů s LS a MTS jsou v 89 %, resp. 70 % MSI-H, na rozdíl od sporadických kolorektálních karcinomů, kde se MSI-H status vyskytuje pouze u 15 % pacientů a v naprosté většině případů bývá asociován s hypermetylací promotoru genu *MLH1*, nikoli se somatickými mutacemi MMR genů [10,26,27]. V některých případech je kombinace klinických znaků natolik výrazná, že dala vznik novým klinickým syndro-

mům, které ve skutečnosti představují pouze varianty LS.

### Muir-Torreho syndrom

MTS zahrnuje kombinaci nejméně jednoho kožního nádoru se sebaceózní diferenciací a minimálně jednoho viscerálního tumoru. Byl to právě „otec“ LS Henry Lynch, kdo v roce 1981 poukázal na společnou možnou etiologii MTS a LS, poté co identifikoval pacienty s fenotypem MTS v rodině postižené LS [28]. MTS jako varianta LS je unikátní v tom, že jako jediná představuje premorbidní fenotyp, tedy vykazuje znaky umožňující diagnózu LS ještě před rozvojem CRC.

Mezi kožní léze asociované s MTS patří sebaceózní adenom, sebaceom a extraokulární sebaceózní karcinom (naopak výskyt periokulárních sebaceózních tumorů je u MTS vzácný). Kožní tumory jsou většinou mnohčetné, ale byly popsány i případy solitárních lézí [29]. Klinický obraz se neliší od jejich sporadických protějšků, které jsou statisticky častější. Ve většině případů se jedná o nenápadné papuly a noduly hladkého povrchu, nažloutlé či růžové barvy anebo zbarvení kůže, velikosti od několika mm do 5 cm. U sebaceózních karcinomů mohou léze dosahovat větších rozměrů, vyznačují se nepřesným ohraničením, rychlým růstem a možnou ulcerací jejich povrchu. Přítomna může být také hyperplazie mazových žlázek [30]. Ta se jeví jako žlutobělavé papulky velikosti několika milimetrů, s typickou centrální vkleslinou. Obecně lze shrnout, že mnohčetné kožní nádory se sebaceózní diferenciací vyskytující se u jedinců před 50. rokem života nebo postihující tělní partie mimo obličej jsou silným indikátorem MTS [31]. Podobně i mnohčetné keratoakantomy vznikající na místech chráněných před sluncem u mladých osob slouží jako vodítko pro správnou diagnózu. Tyto se nejprve manifestují jako narůžovělé noduly s rychlým růstem, později na vrcholu s rohovatěním, případně i ulcerací.

Na vzniku MTS se podílí především zárodečné mutace v genech *MLH1* a *MSH2*, přičemž mutace v genu *MSH2* je převažující [32,33].

### Turcotův syndrom 1. typu

Turcotův syndrom (TS) je klasicky charakterizován společným výskytem nádorů mozku a CRC. Podtyp označovaný jako TS 1. typu je blíže specifikován vazbou mozkového nádoru (hlavně gliomu) s CRC bez polypózy, přičemž může být také způsoben zárodečnou mutací některého z MMR genů; mutace byly detekovány zejména v *MLH1* a *PMS2* [34]. Za těchto podmínek se TS 1. typu jeví ve většině případů jako fenotypická varianta LS.

### Syndrom konstitučního mismatch repair deficitu

Syndrom konstitučního mismatch repair deficitu (constitutional mismatch repair deficiency, CMMRD) je velmi vzácně se vyskytující zárodečná bi-alelická mutace genů MMR. Vzhledem k tomu, že jde o onemocnění dědičné autozomálně recesivně, vyskytuje se zejména jako následek incestu. Tento stav je charakteristický vznikem CRC již v mladém věku, hematologickými malignitami a fenotypickým obrazem připomínajícím neurofibromatózu 1. typu, zejména skvrnami café-au-lait [35,36]. Z diagnostického hlediska je také důležité, že imunohistochemicky stanovený deficit MMR proteinu má vyšší senzitivitu než vyšetření MSI [37]. V některých pramenech se tento syndrom označuje jako Turcotův syndrom. Přestože je i v tomto případě přítomna koincidence mozkového nádoru s CRC, celková odlišnost fenotypového obrazu i genetického podkladu je jasným argumentem proti zaměňování těchto dvou syndromů.

### Tradiční diagnostika Lynchova syndromu

Ke klinické diagnostice HNPCC sloužila Amsterdamská kritéria [38], která byla pro zvýšení senzitivity, zejména



s přihlédnutím k možnosti prezentace syndromu extrakolonickou malignitou (tzv. LS 2. typu), v roce 1998 revidována na Amsterdamská kritéria II [39]. Nicméně protože se postupně zlatým standardem diagnózy LS stávalo molekulárně genetické vyšetření, prioritou se stal záchyt co největšího množství pacientů pro toto vyšetření, nikoli samotná klinická diagnóza LS.

#### Bethesda guidelines

K identifikaci pacientů s CRC, u kterých by měla být vyšetřena nestabilita mikrosatelitů (MSI), případně provedeno molekulárně genetické vyšetření, byla v roce 1996 vypracována a v roce 2002 revidována tzv. Bethesda guidelines (BG, resp. RBG), která berou v potaz nejen klinická kritéria, ale i morfologické znaky tumoru [40]. Bohužel ani tato širší kritéria nezachytí všechny případy LS [41], zejména v případě postižení *MSH6* a *PMS2* [24,42–45]. Podle současných odhadů není až 25 % pacientů s LS zachyceno systémem kritérií RBG. Vzhledem k tomu, že falešná negativita v případě LS nemá za následek nerozpoznání tohoto syndromu pouze u vyšetřovaného pacienta, ale i u jeho případných příbuzných, nelze senzitivitu RBG pokládat za dostatečnou.

#### Moderní diagnostika Lynchova syndromu

Výše uvedená nedostatečná senzitivita RBG, případně další klinická kritéria sloužící k záchytu pacientů s LS, je příčinou současné snahy o zavedení senzitivnějšího systému depistáže, byť i za cenu snížení specifity. V tomto případě je možné familiární tendence ke vzniku maligních nádorů ospravedlnit jak z hlediska etického, tak ekonomického.

Mezi hlavní argumenty pro zvýšení senzitivity systému depistáže patří fakt, že 1 ze 660 lidí je nositelem germinální mutace některého z MMR genů [46], riziko vzniku CRC u LS je 60–80 % [47,48], dále že k progresi

z adenomu do karcinomu pravděpodobně dochází během 2–3 let na rozdíl od 8–10 let u sporadických případů [49,50], a zejména že průměrný věk v době diagnózy je 45 let, tedy asi o 20 let méně než u sporadického CRC, navíc se zvýšeným rizikem synchronního a metachronního CRC [49].

V současné době jsou k dispozici tři základní senzitivní modely vyhledávání pacientů s podezřením na LS, přičemž každý z nich má své výhody a své nevýhody. Všechny tři mají společné, že detekují tumory s MSI-H, a to buď přímo (tedy molekulárně genetickým stanovením MSI), nebo zprostředkovaně. Do druhé skupiny patří jednak imunohistochemická detekce exprese MMR proteinů, jednak histologický průkaz morfologických znaků asociovaných s MSI.

Nicméně čtyři z pěti MSI-H CRC jsou sporadické tumory způsobené somatickou epigenetickou inaktivací MMR genu (zdaleka nejčastěji metylací promotoru *MLH1*). Tyto sporadické nádory je třeba odlišit před nákladnou analýzou jednotlivých MMR genů. V současné době umožňuje rozlišení sporadických a LS-asociovaných MSI-H karcinomů zapojení dvou metod molekulární patologie do managementu CRC. První z nich je analýza genu *BRAF*, konkrétně průkaz mutace V600E, která je přítomna až u poloviny sporadických MSI-H CRC, ale (téměř) nikdy u LS. Druhou metodu představuje průkaz hypermetylace promotoru *MLH1*, která je markerem sporadických MSI-H CRC a naopak až na výjimky nebývá přítomna u LS [51]. S vědomím určitého statistického zjednodušení lze tedy tyto dvě metody využít k vyřazení pacientů z dalšího (nákladného) diagnostického managementu, pokud tomu nebrání jiné okolnosti (např. nízký věk, výrazné familiární postižení, multiplicita nádorů).

#### Stanovení MSI

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

lity mezinárodně kodifikovaných markerů se samozřejmě v diagnostice Lynchova syndromu využívalo již dříve, ale cíleně, nikoli plošně. Plošné využití stanovení MSI k depistáži Lynchova syndromu je založeno na vyšetření všech CRC touto metodou. Mezi nevýhody systému patří výrazný nárůst zátěže laboratoří molekulární genetiky, absence informace o postiženém genu a konečně i fakt, že (navzdory obecnému přesvědčení) ne všechny LS-asociované nádory musí vykazovat MSI-H. Praktické využití plošného vyšetřování MSI naráží též na nezbytnost porovnání stavu markerů ve tkáni nádoru s tkání nenádorovou. To vyžaduje buď přítomnost nenádorové tkáně v materiálu (např. chirurgický okraj střevního resektátu), nebo odběr periferní krve pacienta (zejména v případě endoskopicky získaných vzorků).

#### Imunohistochemická detekce MMR proteinů

Zprostředkovanou informaci o funkci MMR komplexu lze získat pomocí imunohistochemického vyšetření exprese hlavních MMR proteinů (tedy *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* a *MSH6*). Ačkoli zpočátku, kdy byla imunohistochemicky stanovována pouze exprese *MLH1* a *MSH2*, bylo preferováno stanovení MSI, po zavedení protilátek proti jejich dvěma partnerům pro tvorbu heterodimerů (*PMS2* a *MSH6*) je senzitivita imunohistochemického vyšetření a stanovení MSI srovnatelná [52]. V současné době jsou obě metody (stanovení MSI a imunohistochemické vyšetření) vnímány jako komplementární, protože v kombinaci mají vyšší senzitivitu než při samostatném použití [53,54]. Typickým příkladem přínosu imunohistochemie jsou případy s mutací *MSH6*, které mohou uniknout při detekci MSI pomocí PCR, protože *MSH2* může také tvořit komplex s *MSH3*, a tím nemusí nutně vést ke stavu MSI-H [52,55]. Imunohistochemická detekce MMR proteinů navíc (na rozdíl od stanovení MSI) umožňuje



predikovat postižený gen pro molekulárně genetické vyšetření, což výrazně sníží náklady při následné detekci případné zárodečné mutace. Nicméně, názory na prioritu stanovení MSI nebo imunohistochemického vyšetření nejsou jednotné a různí autoři prosazují plošný screening pomocí MSI nebo pomocí imunohistochemie.

#### Detekce morfologických znaků MSI konvenční histologií

Histologické vyšetření představuje finančně nejméně náročnou metodu plošné depistáže. Je založeno na detekci histologických znaků charakteristických pro CRC s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů, tedy tzv. MSI-H histologii, která samotná má vyšší senzitivitu než souhrn zbývajících čtyř kritérií RBG [56]. Ačkoli byly morfologické znaky pozorovatelné v MSI-H CRC popsány již v RBG (konkrétně byly uváděny karcinomy se špatnou diferenciací, karcinomy mucinózní, medulární nebo „z buněk pečetiho prstenu“, přítomnost Crohn-like lymfoidních nodulů a tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL)), nebyla dostatečně známa ani prediktivní hodnota jednotlivých znaků ani jejich reprodukovatelná kvantitativní definice, která by byla použitelná v rutinní praxi [40,57]. Z různých studií, jejichž cílem bylo nalézt racionální algoritmus detekce MSI-H karcinomů [58], se v současné době jako nejužitečnější jeví model Model PREDICT (Pathological Role in the Determination of Instability in Colorectal Tumors) [56], zejména ve své zjednodušené formě jako Semi PREDICT skóre (tab. 1). Histologickými znaky, na nichž je tento model založen, jsou: přítomnost mucinu disekujícího stroma v jakémkoli množství, přítomnost tumor-infiltrujících lymfocytů (TIL), peritumorální lymfoidní lem a zastoupení plazmatických buněk mezi leukocyty ve stromatu převyšující 25 % (obr. 1).

Mezi výhody histologického vyšetření patří i možnost levného, rychlého

**Tab. 1. Model PREDICT.**

Tab. 1. Model PREDICT.

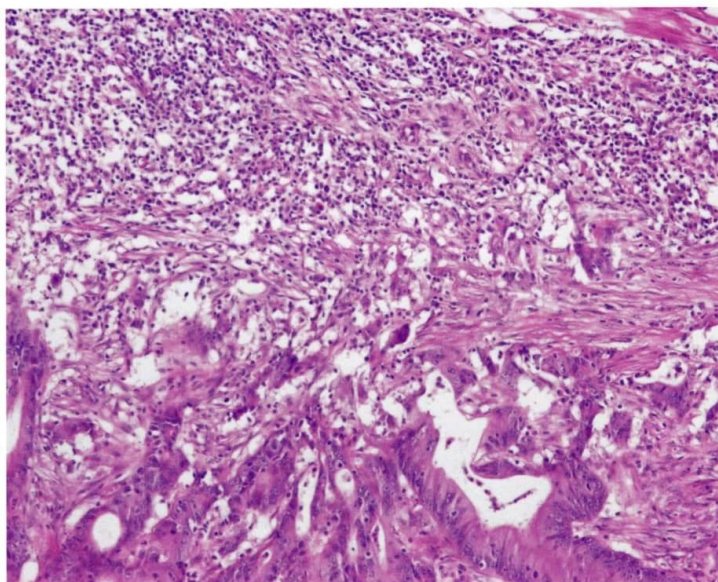
Znak	Skóre
pravostranná lokalizace	1,6
jakékoli množství disekujícího mucinu	1,6
věk pod 50 let	1,3
tumor infiltrující lymfocyty	1,3
peritumorální lymfoidní lem	0,7
plazmocyty tvoří > 25 % stromálních leukocytů	0,7

#### PREDICT skóre:

Maximální možné skóre: 7,8

Suspekce na MSI-H: skóre  $\geq$  2,5

Semi PREDICT skóre: přítomny dva a více znaků  $\rightarrow$  MSI-H susp.



**Obr. 1. Příklad „MSI-H histologie“.** Jeden z typických obrazů MSI-H CRC, zde představovaný zejména intraepiteliální lymfocytózou vytvářející v dolní části obrázku „posypání“ nádorových žlázek lymfocyty obklopenými světlými halo a souvislým lymfoidním lem v horní části snímku (HE, původní objektiv 10 $\times$ ).

Fig. 1. Example of "MSI-H histology". One of the typical images of MSI-H CRC is represented in particular by intraepithelial lymphocytosis forming the "sprinkling" of cancer glandular cells with lymphocytes surrounded by bright halos at the bottom of the picture and continuous lymphoid band in the upper part of the image (HE, original lens 10 $\times$ ).

a jednoduchého vyloučení sporadických MSI-H karcinomů podmíněných většinou somatickou metylací promotoru genu *MLH1*. Zatímco tyto vznikají z tzv. „sesilných serrated adenomů“ (do češtiny někdy nešťastně

překládaných jako „přisedlé pilovité adenomy“), prekurzorovou lézí karcinomů v terénu LS je „konvenční“ (tubulární, tubulovilózní nebo vilózní) adenom. Jsou-li tedy v periferii tumoru zbytky prekurzorového

sesilního serrated adenomu, jde s největší pravděpodobností o sporadický MSI-H karcinom [59]. Nicméně tento jednoduchý diagnostický znak vylučující LS nemusí být vždy dostupný, ať již z důvodu nedostatečného samplingu nebo destrukce adenomu pokročilým adenokarcinomem.

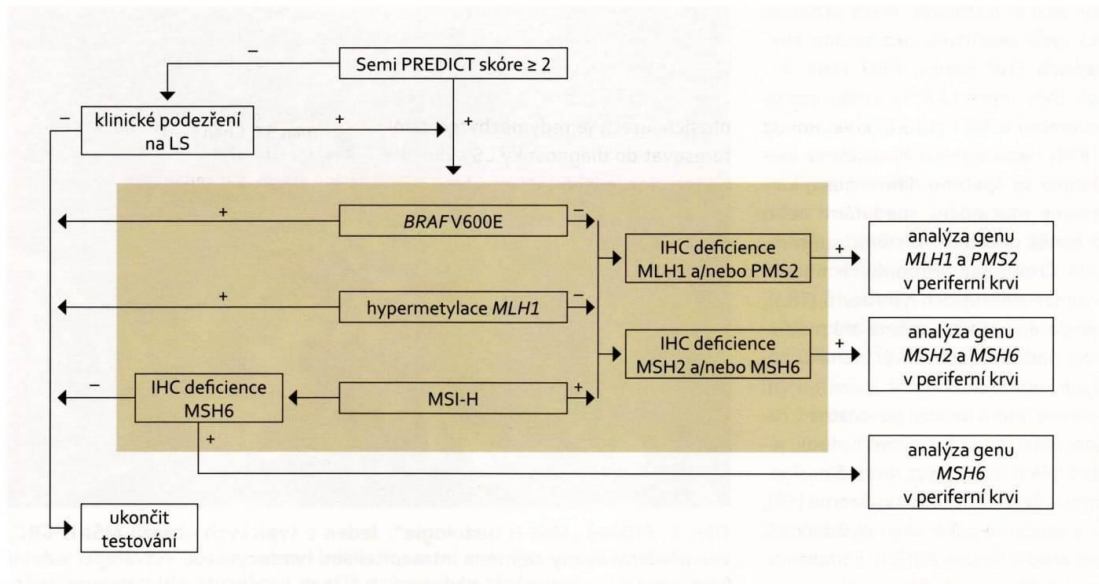
Protože informace, kterou poskytuje histologické vyšetření o MSI, je značně zprostředkovaná, nemůže samozřejmě plnit roli samostatné metody depistáže. Pro svou finanční nenáročnost je však velmi vhodná jako první linie plošného vyšetřování CRC v rámci komplexního diagnostického managementu.

### Komplexní diagnostický management CRC

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

Vzhledem k současným možnostem systému zdravotnictví a zvážení

poměru ceny a užítku jsme na našem pracovišti místo plošného vyšetřování MSI či exprese MMR proteinů k vyhledávání pacientů s LS zavedli „komplexní diagnostický management“, na jehož počátku stojí mikroskopické vyšetření histologických řezů obarvených hematoxylinem a eozinem, na něž v případě přítomnosti znaků „MSI-H histologie“ navazuje sada metod imunohistochemických a molekulárně patologických, jejichž cílem je potvrdit přítomnost MSI-H, vyloučit možnost sporadického MSI-H karcinomu a určit pravděpodobně postižený gen k detekci zárodečné mutace.



Obr. 2. Komplexní management diagnostiky Lynchova syndromu. Na základě mikroskopického nálezu MSI-H histologie (nebo klinické žádosti) je proveden komplex vyšetření situovaný do hnědého obdélníku, který sestává z imunohistochemického vyšetření exprese MMR proteinů, analýzy MSI, metylace promotoru *MLH1* a stavu genu *BRAF*. Tyto metody jsou v současné době na našem pracovišti z časových důvodů prováděny simultánně. K dalšímu genetickému vyšetření zárodečných mutací MMR genů jsou primárně vybráni pacienti s MSI-H tumory bez mutace *BRAF* a bez hypermetylace promotoru genu *MLH1*. Za zvláštních okolností (zejména při ztrátě imunoexpresí *MSH6*) je však vhodné testovat i MSS karcinomy (převzato z webu <http://www.lynch.cz>).

Fig. 2. Comprehensive management of Lynch syndrome diagnosis. Based on the microscopic finding of MSI-H histology (or clinical request), a complex of examinations is made (situated in the brown rectangle), which consist of immunohistochemical examination of the expression of MMR proteins, MSI analysis, methylation of the *MLH1* promoter, and *BRAF* gene status. These methods are currently performed simultaneously in our department because of the time conditions. Further genetic testing of germ-line mutations of MMR genes is primarily made in patients with MSI-H tumors without *BRAF* mutations and without *MLH1* gene promoter hypermethylation. Under special circumstances (especially the loss of *MSH6* immunoexpression) it is appropriate to test also MSS carcinoma (taken from website <http://www.lynch.cz>).



Nádory, jejichž Semi PREDICT skóre vzbuzuje podezření na MSI-H, vykazují ztrátu exprese některého (nebo některých) z MMR proteinů, nemají hypermetylovaný promotor genu *MLH1* a nebyla u nich prokázána substituce V600E genu *BRAF*, jsou určeny k detekci germinální mutace MMR genu určeného na základě imunohistochemického vyšetření (obr. 2). Podobně jako již bylo uvedeno u vyšetřování MSI, istanovení hypermetylace promotoru *MLH1* vyžaduje srovnání s nenádorovou tkání. Tato sice bývá běžně dostupná v případech chirurgických resekátů, většinou však není k dispozici při vyšetřování endoskopických biopsií. V těchto případech je nutná domluva se zainteresovaným gastroenterologem, aby zajistil kontrolní tkáň, ať už v podobě endoskopického vzorku z nenádorové sliznice nebo nesrážlivé periferní krve. Pokud jde o finální analýzu MMR genů, zde je optimálním materiálem nesrážlivá periferní krev, protože průkaz mutace mimo nádorovou tkáň potvrzuje její zárodečnou povahu, přičemž z důvodu technické náročnosti analýzy těchto genů je výtěžnost z krve výrazně vyšší než z nenádorové tkáně fixované ve formolu.

Ať už je konkrétní uspořádání tohoto algoritmu jakékoli, plnohodnotný postup by každopádně měl zahrnovat všechny uvedené diagnostické modalit. Důvodem je jejich vzájemná komplementárnost. Kupříkladu samotné vyšetření MSI bez analýzy genu *BRAF* a stavu metylace promotoru *MLH1* nedokáže odlišit sporadické CRC od syndromových, dále značná část karcinomů s mutací *MSH6* nemusí vykazovat MSI-H a konečně bez imunohistochemického vyšetření nelze zúžit spektrum MMR genů, jejichž stav má být analyzován.

### Závěr

Lynchův syndrom (LS) je familiární karcinomový syndrom způsobený zárodečnou mutací některého z genů,

jehož proteinový produkt se účastní opravy chyb v DNA vzniklých při replikaci. Vzhledem k tomu, že se nyní vyskyt LS v populaci odhaduje až na 5 % a vede ke vzniku maligních nádorů již v produktivním věku, sílí v současné době tlak na zvýšení senzitivity jeho detekce. Protože klinická kritéria jeho diagnostiky nedosahují dostatečné senzitivity, klade se dnes stále větší důraz na morfologickou a molekulárně patologickou diagnostiku. Podle našich zkušeností je nezbytné zavést jasný algoritmus, aby se diagnostika LS stala rutinní záležitostí a její management se co nejvíce automatizoval. Bohužel se dosud nepodařilo v našich podmínkách vytvořit spolehlivě fungující systém zpětné vazby s klinickými lékaři, kteří by měli organizovat další průběh vyšetření rodiny nemocného s LS. V nejbližších letech je tedy nezbytné zainteresovat do diagnostiky LS i klinické lékaře, bez jejichž aktivní účasti není možná ani kompletní diagnostika pacienta ani další vyšetření jeho rodinných příslušníků.

### Literatura

1. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895–1913. *Arch Intern Med* 1913; 12(5): 546–555.
2. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW et al. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 1966; 117(2): 206–212.
3. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895–1970. *Cancer* 1971; 27(6): 1505–1511.
4. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15(3–4): 209–213.
5. Boland CR, Troncale FJ. Familial colonic cancer without antecedent polyposis. *Ann Intern Med* 1984; 100(5): 700–701.
6. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293(16): 1979–1985.
7. Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K et al. Muir-Torre syndrom – a phenotypic va-

- riant of Lynch syndrome. *Cesk Patol* 2010; 46(4): 86–94.
8. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75(5): 1027–1038.
9. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75(6): 1215–1225.
10. Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53(24): 5853–5855.
11. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109): 816–819.
12. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(22): 5248–5257.
13. Yuen ST, Chan TL, Ho JW et al. Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene* 2002; 21(49): 7585–7592.
14. Kruse R, Rütten A, Hosseiny-Malayeri HR et al. "Second hit" in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463–465.
15. Nyström-Lahti M, Wu Y, Moisio AL et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6): 763–769.
16. Gazzoli I, Loda M, Garber J et al. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the *MLH1* gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925–3928.
17. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G et al. Inheritance of a cancer-associated *MLH1* germ-line epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697–705.
18. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112–117. doi: 10.1038/ng.283.
19. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al. Deletions removing the last exon of TA-



- CSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197–203. doi: 10.1002/humu.20942.
20. Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J et al. Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044–2051. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0301.
21. Hampel H, Frankel W, Panescu J et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810–7817.
22. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 26–37.
23. Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL et al. Mismatch repair gene PMS2: disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer Res* 2004; 64(14): 4721–4727.
24. Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology* 2006; 130(2): 312–322.
25. Truninger K, Menigatti M, Luz J et al. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005; 128(5): 1160–1171.
26. Kámory E, Kolacsek O, Ottó S et al. HMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res* 2003; 9(4): 236–241.
27. Entius MM, Keller JJ, Drillenburg P et al. Microsatellite instability and expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sebaceous gland carcinomas as markers for Muir-Torre syndrome. *Clin Cancer Res* 2000; 6(5): 1784–1789.
28. Lynch HT, Fusaro RM, Roberts L et al. Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the Cancer Family Syndrome. *Br J Dermatol* 1985; 113(3): 295–301.
29. Graham R, McKee P, McGibbon D et al. Torre-Muir syndrome. An association with isolated sebaceous carcinoma. *Cancer* 1985; 55(12): 2868–2873.
30. Esche C, Kruse R, Lamberti C et al. Muir-Torre syndrome: clinical features and molecular genetic analysis. *Br J Dermatol* 1997; 136(6): 913–917.
31. Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(1): 90–104.
32. Mathiak M, Rütten A, Mangold E et al. Loss of DNA mismatch repair proteins in skin tumors from patients with Muir-Torre syndrome and MSH2 or MLH1 germline mutations: establishment of immunohistochemical analysis as a screening test. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(3): 338–343.
33. Mangold E, Pagenstecher C, Leister M et al. A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet* 2004; 41(7): 567–572.
34. De Rosa M, Fasano C, Panariello L et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* 2000; 19(13): 1719–1723.
35. Gallinger S, Aronson M, Shayan K et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 576–585.
36. Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 323–333.
37. Bakry D, Aronson M, Durno C et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014; 50(5): 987–996. doi:10.1016/j.ejca.2013.12.005.
38. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424–425.
39. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453–1456.
40. Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261–268.
41. Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851–1860.
42. Liu T, Yan H, Kuismanen S et al. The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798–7802.
43. Van der Klift H, Wijnen J, Wagner A et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123–138.
44. Dovrat S, Figer A, Fidder HH et al. Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291–294.
45. Hegde MR, Chong B, Blazo ME et al. A homozygous mutation in MSH6 causes Turcot syndrome. *Clin Cancer Res* 2005; 11(13): 4689–4693.
46. De la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005; 4(3): 233–237.
47. Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4(4): 489–498.
48. Quehenberger F, Vasen HF, van Houtwelingen HC. Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; 42(6): 491–496.
49. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999; 36(11): 801–818.
50. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33(6): 783–786.
51. Domingo E, Laiho P, Ollikainen M et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41(9): 664–668.
52. Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn* 2008; 10(4): 293–300. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031.
53. Funkhouser WK Jr, Lubin IM, Monzon FA et al. Relevance, pathogenesis, and testing algorithm for mismatch repair-defective colorectal carcinomas: a report of the association for molecular pathology. *J Mol Diagn* 2012; 14(2): 91–103. doi: 10.1016/j.jmoldx.2011.11.001.
54. Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E et al. Microsatellite instability analysis and/or immunostaining for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? *Virchows Arch* 2004; 444(2): 135–141.
55. Boland CR, Koi M, Chang DK et al. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome:

from bench to bedside. *Fam Cancer* 2008; 7(1): 41–52.

56. Hyde A, Fontaine D, Stuckless S et al. A histology-based model for predicting microsatellite instability in colorectal cancers. *Am J Surg Pathol* 2010; 34(12): 1820–1829. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181f6a912.

57. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM et al. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology* 2007; 133(1): 48–56.

58. Román R, Verdú M, Calvo M et al. Microsatellite instability of the colorectal carcinoma can be predicted in the conventional pathologic examination. A prospective

multicentric study and the statistical analysis of 615 cases consolidate our previously proposed logistic regression model. *Virchows Arch* 2010; 456(5): 533–541. doi: 10.1007/s00428-010-0896-6.

59. Jass JR. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007; 50(1): 113–130.

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

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

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

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE „uniform requirements“ for biomedical papers.

*Doručeno/Submitted: 9. 2. 2014*

*Přijato/Accepted: 31. 3. 2014*

*doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.*

*Šiklův ústav patologie LF UK a FN Plzeň*

*Edvarda Beneše 13, 305 99 Plzeň*

*DAUM@fnplzen.cz*



# Diagnóza Lynchova syndromu od patologa

## Lynch Syndrome – the Pathologist's Diagnosis

Dušek M.<sup>1,2</sup>, Hadravský L.<sup>1</sup>, Černá K.<sup>2</sup>, Stehlík J.<sup>2</sup>, Švajdler M.<sup>1,2</sup>, Kokošková B.<sup>1,2</sup>, Dubová M.<sup>1</sup>, Michal M.<sup>1</sup>, Daum O.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Šiklův ústav patologie, LF UK a FN Plzeň

<sup>2</sup>Bioptická laboratoř, s. r. o., Plzeň

### Souhrn

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

### Klíčová slova

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

### Summary

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

### Key words

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

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

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

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

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

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

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



doc. MUDr. Ondřej Daum, Ph.D.  
Šiklův ústav patologie  
LF UK a FN Plzeň  
Dr. E. Beneše 13  
305 99 Plzeň  
e-mail: daum@fnplzen.cz

Obdrženo/Submitted: 9. 6. 2015

Přijato/Accepted: 20. 3. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko20161>

### Lynchův syndrom – definice

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

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

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

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

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

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

### Molekulární biologie LS

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

#### MMR (mismatch repair)

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

#### Mikrosatelity

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

#### MSI

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

#### MSI-H tumory

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

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

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



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

### Variabilita klinických projevů LS

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

### Muir-Torrehova syndrom

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

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

### Turcotův syndrom 1. typu

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

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

### Syndrom bialelického mismatch repair deficitu

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

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

### Možnosti diagnostiky LS

#### Tradiční klinická diagnostika LS

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

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

#### Moderní patologická diagnostika LS

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

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

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



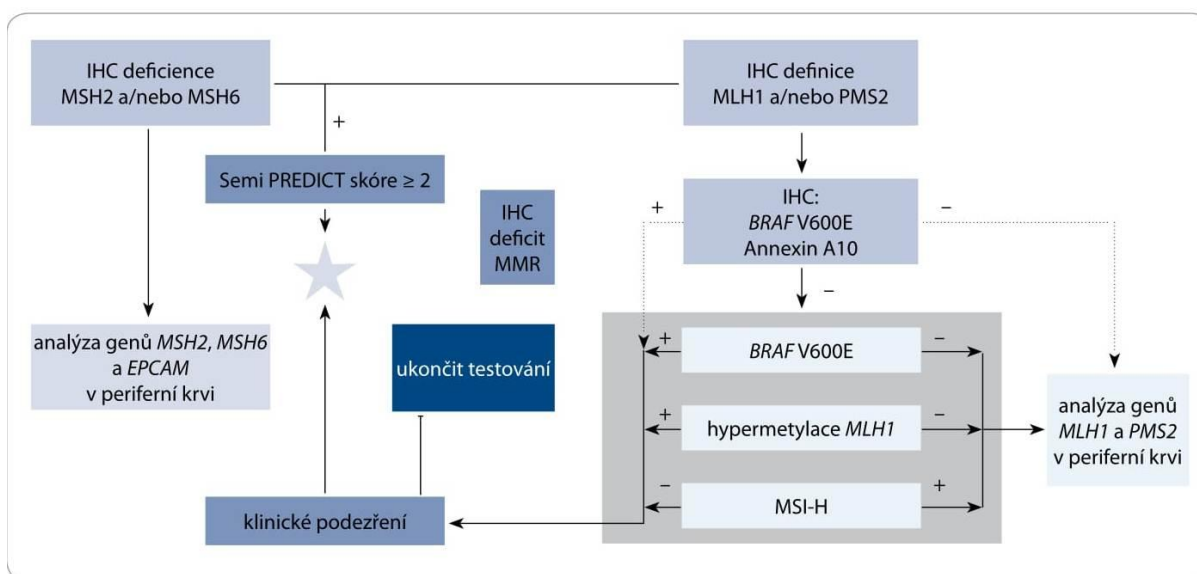


Schéma 1. Management diagnostiky LS.

Na pracovištích vyššího typu zapojených do depistáže LS diagnostika začíná vyšetřením všech CRC monoklonálními protilátkami proti jednotlivým MMR proteinům (hvězda). V případě průkazu deficiencie MSH2 a/nebo MSH6 je kontaktován klinik s požadavkem na zaslání nesrážlivé periferní krve spolu s Informovaným souhlasem pacienta k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů. Je-li prokázána deficiencie proteinů MLH1 a/nebo PMS2, následuje komplex vyšetření obsažený v šedém obdélníku, jehož cílem je vyloučit z dalšího vyšetřování případy sporadických MSI-H karcinomů, případně MSS karcinomy s falešnou negativitou IHC průkazu MMR proteinů. Volitelně lze místo těchto molekulárně genetických metod (nebo spolu s nimi) k vyloučení sporadického MSI-H karcinomu využít IHC vyšetření exprese annexinu A10 a/nebo mutované formy proteinu BRAF (bílý obdélník a přerušované šipky). Pouze MSI-H tumory bez mutace genu *BRAF*, hypermetylace promotoru *MLH1* a případně bez exprese annexinu A10 jsou indikovány k molekulárně genetickému vyšetření zárodečných mutací příslušných genů (opět je nutné získat vzorek periferní krve a Informovaný souhlas). Není-li místní pracoviště patologie vybaveno laboratorii disponující možností imunohistochemických a molekulárně genetických vyšetření uvedených výše, měl by patolog provést histologické vyšetření znaků „MSI-H histologie“ podle modelu PREDICT. V případě suspektního Semipredict skóre pak odeslat vzorek karcinomu (a optimálně i nenádorové tkáně pro možnost komparace) na specializované pracoviště provádějící výše uvedená imunohistochemická a molekulárně genetická vyšetření. Alternativně může být indikací k tomuto odeslání na specializované pracoviště žádost gastroenterologa či onkologa v případě klinické suspekce na LS (např. na podkladě RBG). Klinické podezření na hereditární podklad onemocnění může být stimulem i pro další pokračování vyšetřování pacientů, u nichž byl LS běžným algoritmem vyloučen (např. může být dále vyšetřována možnost MAP).

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

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

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

#### 1. Stanovení MSI

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

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

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

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

## 2. Imunohistochemická detekce MMR proteinů

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

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

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

Další kroky diagnostického managementu založeného na iniciační imunohistochemické detekci MMR proteinů demonstruje schéma 1.

## 3. Histologická detekce morfologických znaků asociovaných s MSI-H

Pro většinu pracovišť patologie, která vyšetřují bioptické vzorky karcinomů

**Tab. 1. Model PREDICT.**

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

PREDICT skóre: maximální možné skóre: 7,8; suspekce na MSI-H: skóre ≥ 2,5  
Semi PREDICT skóre: přítomny 2 a více znaků → MSI-H suspektní

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

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

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

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

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

## Problémy s algoritmy – suspektní LS a Lynch-like syndrom

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

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



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

### Závěr

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

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

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

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

### Literatura

1. Kacerovská D, Kazakov DV, Černá K et al. Muir-Torre syndrom – fenotypická varianta Lynchova syndromu. *Cesk Patol* 2010; 46(4): 86–94.
2. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family „G“ revisited: 1895–1970. *Cancer* 1971; 27(6): 1505–1511.
3. Lynch HT, Drouhard TJ, Schuelke GS et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Navajo Indian family. *Cancer Genet Cytogenet* 1985; 15(3–4): 209–213.
4. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005; 293(16): 1979–1985.
5. Daum O, Beneš Z, Hadravský L et al. Lynchův syndrom v rukách patologa. *Cesk Patol* 2014; 50(1): 18–24.
6. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75(5): 1027–1038.
7. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75(6): 1215–1225.
8. Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53(24): 5853–5855.
9. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109): 816–819.
10. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(22): 5248–5257.
11. Kruse R, Rutten A, Hosseiny-Malayeri HR et al. „Second hit“ in sebaceous tumors from Muir-Torre patients with germline mutations in MSH2: allele loss is not the preferred mode of inactivation. *J Invest Dermatol* 2001; 116(3): 463–465.
12. Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996; 5(6): 763–769.
13. Gazzoli I, Loda M, Garber J et al. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002; 62(14): 3925–3928.
14. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* 2007; 356(7): 697–705.
15. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009; 41(1): 112–117. doi: 10.1038/ng.283.
16. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z et al. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct

- class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30(2): 197–203. doi: 10.1002/humu.20942.
17. Kastrinos F, Stoffel EM, Balmana J et al. Phenotype comparison of MLH1 and MSH2 mutation carriers in a cohort of 1,914 individuals undergoing clinical genetic testing in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(8): 2044–2051. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0301.
  18. Hampel H, Frankel W, Panescu J et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res* 2006; 66(15): 7810–7817.
  19. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002; 70(1): 26–37.
  20. Lynch HT, Fusaro RM, Roberts L et al. Muir-Torre syndrome in several members of a family with a variant of the Cancer Family Syndrome. *Br J Dermatol* 1985; 113(3): 295–301.
  21. Kokošková B, Daum O, Beneš Z et al. Moderní diagnostika Lynchova syndromu. *Gastroent Hepatol* 2014; 68(2): 157–165.
  22. Schwartz RA, Torre DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33(1): 90–104.
  23. De Rosa M, Fasano C, Panariello L et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene* 2000; 19(13): 1719–1723.
  24. Gallinger S, Aronson M, Shayan K et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology* 2004; 126(2): 576–585.
  25. Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 323–333.
  26. Bakry D, Aronson M, Durno C et al. Genetic and clinical determinants of constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Report from the constitutional mismatch repair deficiency consortium. *Eur J Cancer* 2014; 50(5): 987–996. doi: 10.1016/j.ejca.2013.12.005.
  27. Durno CA, Sherman PM, Aronson M et al. Phenotypic and genotypic characterisation of biallelic mismatch repair deficiency (BMMR-D) syndrome. *Eur J Cancer* 2015; 51(8): 977–983. doi: 10.1016/j.ejca.2015.02.008.
  28. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34(5): 424–425.
  29. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6): 1453–1456.
  30. Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96(4): 261–268.
  31. Hampel H, Frankel WL, Martin E et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005; 352(18): 1851–1860.
  32. Liu T, Yan H, Kuismann S et al. The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 2001; 61(21): 7798–7802.
  33. van der Klift H, Wijnen J, Wagner A et al. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 44(2): 123–138.
  34. Dovrat S, Figer A, Fidder HH et al. Mutational analysis of hMSH6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005; 4(4): 291–294.

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



# KOŽNÍ TUMOR SE VZÁCNÝM BIOLOGICKÝM CHOVÁNÍM

## AGRESIVNÍ EXTRAOCULÁRNÍ SEBACEÓZNÍ KARCINOM KŠTICE S PROGRESÍ DO MOZKOVÉ TKÁŇE U PACIENTA S MUIROVÝM-TORREOVÝM SYNDROMEM

### ÚVOD

Extraokulární sebaceózní karcinomy kůže mají obvykle indolentní průběh. (2) Během revize případů sebaceózních tumorů v SVV projektu jsme ale objevili agresivně se chovající extraokulární sebaceózní karcinom kštice s propagací do mozkové tkáně u pacienta s MTS.

### KLINICKY

Jednalo se o muže ve věku 56 let s kožním tumorem kštice parieto-okcipitálně na ploše velikosti 4 x 4,5 cm a anamnézou adenokarcinomu rekta ve věku 39 let. Na CT snímcích byl tumor dobře ohraničený s usurací kosti a infiltrací horního sagitálního sinu mezi falx cerebri bez invaze do mozkové tkáně.

Tumor byl kompletně odstraněn. Po jednom roce se objevila recidiva. Magnetická rezonance ukázala částečně nekrotický a cystický tumor zasahující oboustranně do parietookcipitálních laloků mozkových hemisfér. Následovaly 4 resekce tumoru. Pacient umřel ve věku 60 let na invazi tumoru do mozkového kmene. Pitva nebyla provedena.

### HISTOLOGICKY

Histologicky se jednalo o extraokulární sebaceózní karcinom uložený v dermis bez spojení s epidermis, s multinodulární růstem, cystickou přestavbou a tzv. komedo-nekrózami. Noduly byly tvořeny různě diferencovanými sebaceózními buňkami a basaloidními buňkami s vysokým stupněm atypie včetně vysokého nukleocytoplasmatického poměru, jaderným pleomorfismem, promínajícími jádérky, atypickými mitózami a nekrózou.

### IMUNOHISTOCHEMICKY

Imunohistochemický průkaz MMR proteinů odhalil v nádorových buňkách sníženou expresi MSH2 a MSH6 s pozitivní vnitřní kontrolou a plnou jadernou expresí MLH1 a PMS2.

### GENEALOGICKY

Pacient měl 39letého syna a 35letou dceru bez klinických známek MTS v době vyšetření a dva bratry. Staršího s anamnézou adenokarcinomu sigmoidea ve věku 34 let, který zemřel ve 49 letech. A mladšího s anamnézou adenokarcinomu céka v 32 letech a sigmoidea v 54 letech s recidivou po dvou letech. Mladší bratr měl tři zdravé děti.

### GENETICKY

Diagnóza MTS byla molekulárně geneticky potvrzena se stejnou mutací u syna pacienta, jeho bratra a syna jeho bratra. Molekulárně genetické vyšetření odhalilo rozsáhlou delecí exonů 9 – 16 genu *MSH2*.

### ZÁVĚR

Jednalo se o neobvyklý případ extraokulárního sebaceózního karcinomu kštice u pacienta postiženého MTS s agresivní propagací nádoru do mozkové tkáně vedoucí ke smrti. Doposud bylo publikováno pouze 37 případů agresivních extraokulárních sebaceózních karcinomů (tj. způsobující

vzdálené metastázy či lokální nádorovou propagací do okolních tkání), z nichž 7 bylo lokalizováno ve kštici. U žádného z těchto 7 případů nebylo provedeno molekulárně-genetické vyšetření potvrzující souvislost s MTS.



# Aggressive Extraocular Sebaceous Carcinoma of the Scalp Involving the Brain in a Patient With Muir–Torre Syndrome

Ladislav Hadravsky, MD,\* Dmitry V. Kazakov, MD, PhD,\*† Jan Stehlik, PhD,† Michal Michal, MD,\*†  
Romuald Curik, MD,† Petr Krupa, MD, PhD,‡ Alena Skalova Jr, MD,§  
and Denisa Kacerovska, MD, PhD\*†

**Abstract:** This article reports an unusual case of aggressive extraocular sebaceous carcinoma located on the scalp with subsequent usurpation of the bone and penetrating through the bone and meninges to the brain in a 56-year-old man affected by Muir–Torre syndrome. Microscopically, the sebaceous neoplasm was located in the middle to deep dermis without any connection to the epidermis and showed a multinodular growth with neoplastic nodules with a central comedo-type necrosis separated from each other by fibrovascular stroma. The nodules were composed of varying proportions of mature sebaceous cells and atypical basaloid cells with high degree of atypia, including high nuclear/cytoplasmic ratio, nuclear pleomorphism, macronucleoli, atypical mitoses, and necrosis. The neoplasm was totally removed. Histopathological examinations of the recurrent lesion showed identical morphological features and, in addition, signs of the tumors growing through the periosteum were noted. In the final excision specimen, both the dura mater and the brain tissue were infiltrated by the sebaceous carcinoma. The diagnosis of Muir–Torre syndrome was confirmed by molecular genetic investigation that revealed an identical germline mutation in *MSH2* gene in several family members, some of whom had colorectal tumors.

**Key Words:** extraocular sebaceous carcinoma, aggressive, metastasizing, Muir–Torre syndrome, brain

(*Am J Dermatopathol* 2016;38:618–622)

Muir–Torre syndrome (MTS) represents an autosomal dominantly inherited condition that combines at least one cutaneous neoplasm with sebaceous differentiation and at least one visceral malignancy.<sup>1–3</sup> Cutaneous sebaceous lesions in MTS often present in a multiple fashion, occur before the age of 50 years, and include mostly sebaceous adenoma and extraocular sebaceous carcinoma. Sebaceoma and sebaceous hyperplasia are less common.

Extraocular sebaceous carcinomas occurring both sporadically and in the setting of MTS are mostly indolent tumors

From the \*Sikl's Department of Pathology, Charles University in Prague, Medical Faculty in Pilsen, Pilsen, Czech Republic; †Bioptical Laboratory, Pilsen, Czech Republic; ‡Department of Radiology, University of Ostrava, Medical Faculty Hospital, Ostrava, Czech Republic; and §Department of Oncology and Radiotherapy, Charles University in Prague, Medical Faculty in Pilsen, Pilsen, Czech Republic.

The authors declare no conflicts of interest.

Supported in part by the Charles University Research Fund (project number SVV 260171/2015).

Reprints: Denisa Kacerovska, MD, PhD, Sikl's Department of Pathology, Charles University Medical Faculty Hospital, Alej Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic (e-mail: kacerovska@medima.cz).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

that rarely can metastasize and cause the death of a patient. To date, 30 articles reporting a total of 37 patients<sup>4–33</sup> with metastatic extraocular sebaceous carcinoma (metastases to the regional lymph nodes, viscera, bones) or sebaceous neoplasms with other aggressive behavior (local invasion of the neoplasms into deeper tissues, including soft tissue, bone, meninges, brain, etc.) have been published. Only 3 reported cases have been shown to exhibit brain metastasis, and only 1 patient had MTS.<sup>11,23,27,31</sup> We report another case of aggressive extraocular sebaceous carcinoma that has involved the brain during the disease progression in a patient with MTS.

## CASE REPORT

A 56-year-old white man with a history of adenocarcinoma of the rectum removed 17 years ago and a colon polyp resected 4 years ago presented with a cutaneous tumor that measured 4.0 × 4.5 cm and which was located on the right parieto-occipital area of the scalp. The computed tomography showed a sharply demarcated neoplasm in the middle line, originating in the skin and affecting the bone structure of the cranium in a dorsal parietal region penetrating around the superior sagittal sinus between the falx cerebri. No penetration into the brain was detected (Fig. 1A). The lesion was surgically removed but recurred 1 year later. Magnetic resonance imaging revealed a partly necrotic and cystic tumor extending into both parieto-occipital regions of the brain hemispheres (with a right side prevalence) and a right lateral ventricle occipital horn's deformation (Fig. 1B). Four surgeries were performed to remove the recurrent intracranial neoplasm followed by radiation therapy but the patient died of the invasion of the tumor into the brainstem at the age of 60 years. No autopsy was performed.

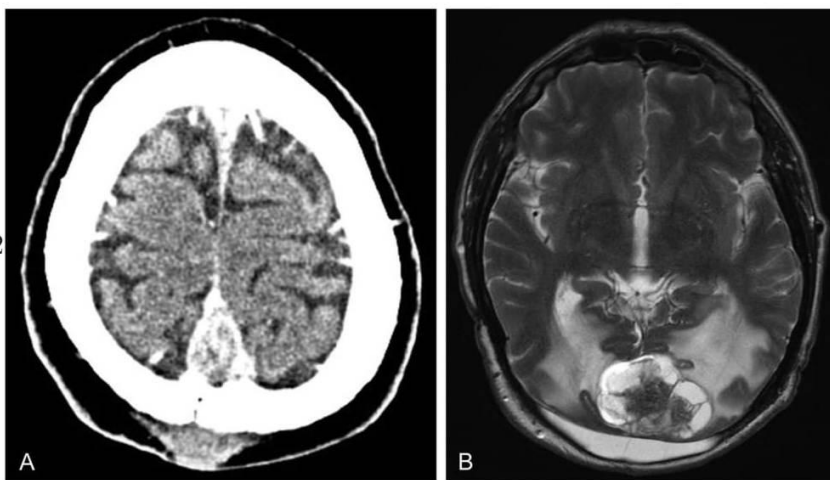
## Family History

The patient had a 39-year-old son and a 35-year-old daughter with no clinical manifestation of MTS at the time of investigation and had 2 brothers with a history of colorectal adenocarcinoma. The elder brother had a history of adenocarcinoma of the sigmoid at his 34 years and died at the age of 49 years. The patient's younger brother had a history of adenocarcinoma of the cecum at the age of 32 years, and of the sigmoid in his 54 years, with the recurrence in 56 years, and is still alive. He had 3 children who were apparently healthy. The diagnosis of MTS was confirmed by molecular genetic investigation revealing an identical germline mutation in *MSH2* gene in several family members (vide infra). There was no available information on the family of the patient's elder brother (Fig. 2).

## MATERIALS AND METHODS

The removed tissue was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. The paraffin blocks were cut into

**FIGURE 1.** A, Computed tomography of the original tumor showing a sharply demarcated neoplasm in the middle line, extending from the skin into the bone structure of the cranium in a dorsal parietal region and penetrating around the superior sagittal sinus between the falx cerebri. No penetration into the brain was detected. B, Magnetic resonance imaging of the recurrent lesion revealing neoplasm extending into both parieto-occipital regions of the brain hemispheres with a right side prevalence.



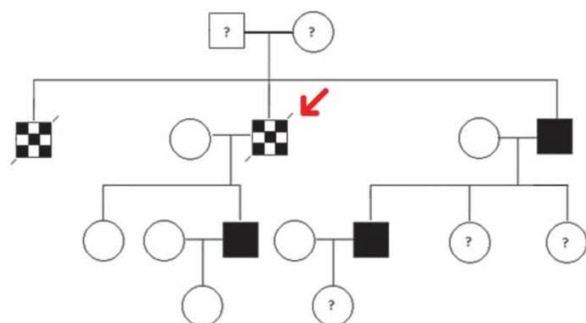
5- $\mu$ m-thick sections and stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemical staining for MLH1 (clone G168-728; CELL MARQUE, Rocklin, CA), PMS2 (clone EPR 3947; CELL MARQUE), MSH2 (clone G219-1129; CELL MARQUE), and MSH6 (clone 44; Ventana, Tucson, AZ) was performed according to standard protocol. Appropriate positive and negative control was used.

**DNA Extraction**

After obtaining written consent of the patient’s younger brother, DNA from peripheral blood was extracted using DNA NucleoSpin Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer’s instructions. Quality and amplifiability of isolated DNA was examined by amplification of control genes in a multiplex polymerase chain reaction (PCR).

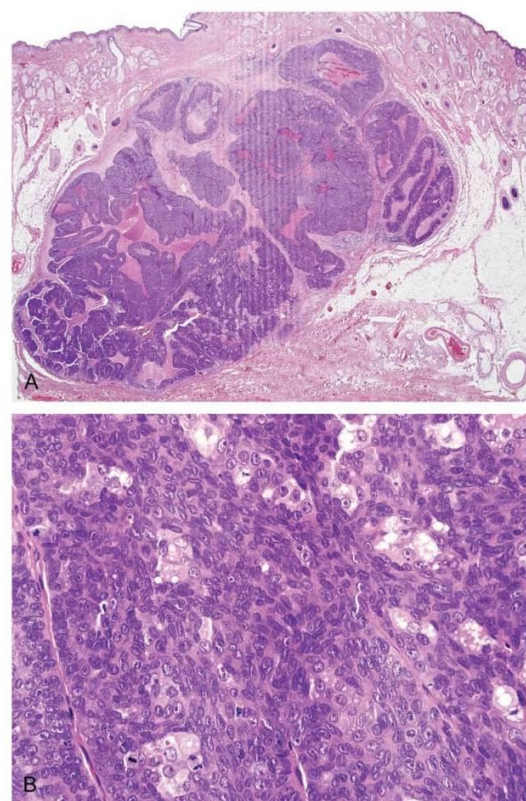
**MMR Genes Mutation Analysis**

For the analyses of mutations of the *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* genes, coding sequence and exon–intron junctions were amplified by PCR. All primers were designed to NCBI reference sequences of actual genes (*MLH1*: NG\_007109.1, *MSH2*: NG\_007110.1, and *MSH6*: NG\_007111.1) using the



**FIGURE 2.** Pedigree of the family affected by Muir–Torre syndrome.

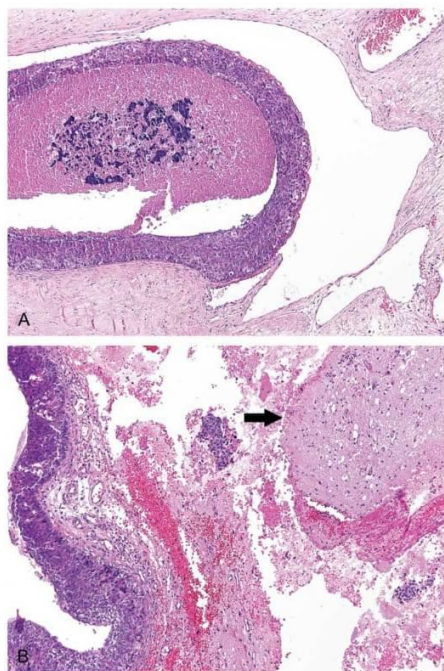
Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.



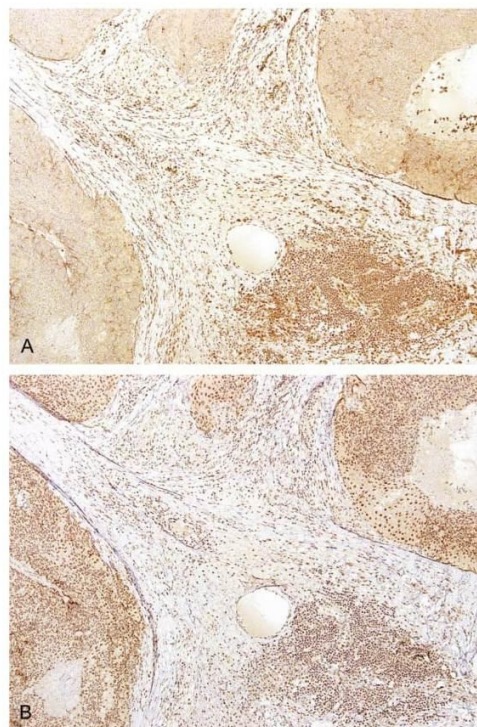
**FIGURE 3.** A, Neoplasm located in the middle to deep dermis without a connection to the epidermis showing a multinodular growth with individual nodules separated by fibrovascular stroma. Note cystic changes. B, Neoplastic nodules are composed of varying proportions of mature sebaceous cells and atypical basaloid cells with high degree of atypia, including high nuclear/cytoplasmic ratio, nuclear pleomorphism, macronucleoli, atypical mitoses, and necrosis.

www.amjdermatopathology.com | 619





**FIGURE 4.** A, Tumor lobule with a central comedo-type necrosis surrounded by fibrotic hyalinized dura. B, Brain tissue (arrow) infiltrated by sebaceous carcinoma can be recognized.



**FIGURE 5.** Staining for MMR proteins. Tumor cells show reduced nuclear expression of MSH2 protein (with positive internal control) (A), whereas there is no loss of PMS2 (B).

Primer 3 software, which allows avoiding known single-nucleotide polymorphisms ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)).<sup>7</sup> Annealing temperature of all primers was 60°C.

Each 22  $\mu$ L of PCR mixture consisted of 11  $\mu$ L of Fast Start PCR Master Mix (QIAGEN), 1.8  $\mu$ L of 5  $\mu$ M forward and reverse primer mix, 8  $\mu$ L of PCR grade water, and 1.3  $\mu$ L of template DNA (50–100 ng/ $\mu$ L). Following amplification program was used: initial denaturation at 95°C for 10 minutes, then 40 amplification cycles (95°C for 60 seconds, 60°C for 60 seconds, 72°C for 60 seconds), and final extension at 72°C for 7 minutes. Successfully amplified PCR products were purified using an Agencourt AMPure kit (Agencourt, Beverly, MA). Then, sequencing reactions were prepared using a Big Dye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) and purified using Agencourt CleanSEQ kit (Agencourt) according to the manufacturer's instructions. Electrophoretograms were obtained on an automated genetic analyzer ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) at a constant voltage of 13.2 kV for 20 minutes. Analyzed sequences were compared with the appropriate reference sequences.

For detection of large gene rearrangements, we used the multiple ligation probe amplification (MLPA) technique. Namely, kits SALSA MLPA P003 MLH1/MSH2 and SALSA MLPA P072 MSH6 were used according to the manufacturer's protocols (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands). Coafalyser.Net software was used for data analysis (MRC-Holland).

## RESULTS

### Histopathological Findings

In total, 3 excisions of the sebaceous neoplasm were available for histopathological examination. In the first specimen, the lesion was located in the middle to deep dermis without any connection to the epidermis, showing a multinodular growth of individual nodules separated by fibrovascular stroma. Cystic changes resulting from a central comedo-type necrosis were noted (Fig. 3A). The neoplastic nodules were composed of varying proportions of mature sebaceous cells and atypical basaloid cells with high degree of atypia, including high nuclear/cytoplasmic ratio, nuclear pleomorphism, macronucleoli, atypical mitoses, and necrosis (Fig. 3B). The neoplasm was totally removed.

The second excision of the recurrent lesion showed identical morphological features and, additionally, at the base of the biopsy, there were signs of the tumors growing through the periosteum with the bone usurpation.

The specimen of the third wide surgical extirpation contained several tumor's fragments. Focally fibrotic and hyalinized dura mater and brain tissue were infiltrated by widely necrotic, lobular growing sebaceous carcinoma (Figs. 4A, B).



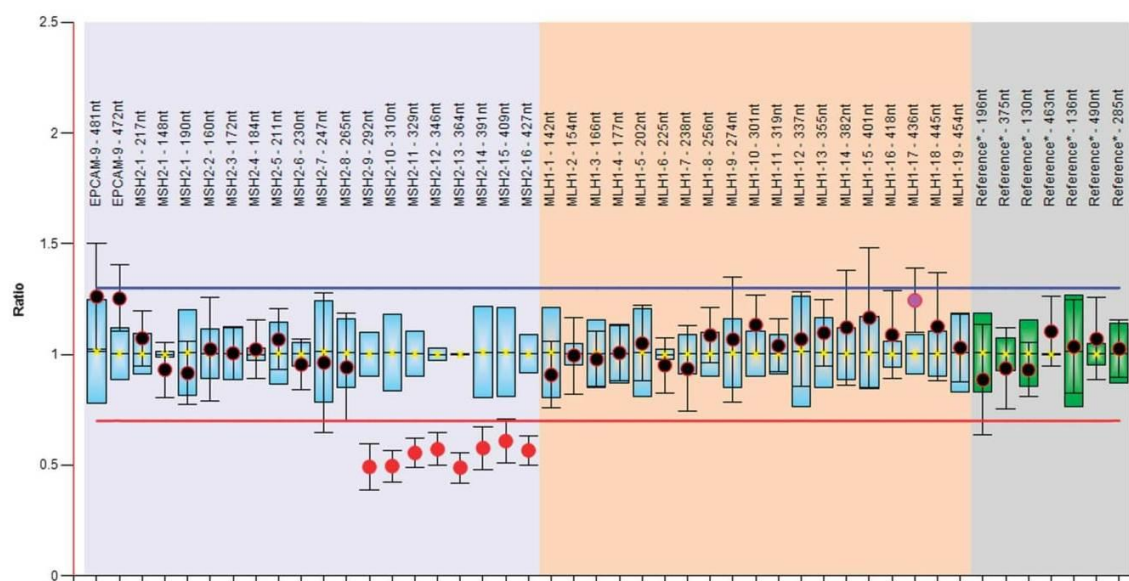


FIGURE 6. Large deletions in *MLH1* and *MSH2* genes were examined by MLPA test (P003). Red dots under the cutoff (red, ratio value 1.3) indicate large deletion of exon 9 to exon 16 in *MSH2* gene. Blue rectangles represent negative control samples.

### Immunohistochemical Findings

Immunohistochemically, the tumor cells showed reduced expression of MSH2 and MSH6 protein (with positive internal control), whereas there was no loss of MLH1 and PMS2 (Fig. 5).

### Molecular Biologic Findings

Deletion including exon 9–16 of *MSH2* gene was identified in the blood specimens from the patient's son, patient's younger brother, and one of the younger brother's children (a 26-year-old son) (Fig. 6).

### DISCUSSION

In contrast to sebaceous carcinomas of the periocular area, extraocular sebaceous carcinomas usually have an indolent course after complete excision in the majority of cases.<sup>34</sup> A total of 37 cases of extraocular sebaceous carcinoma with an aggressive biological behavior were found in the literature, of which 29 manifested a spread to the regional lymph nodes, 14 tumors have metastasized to the viscera, 4 to the bones, and 3 to the brain. The neoplasms involving the brain were located on the scalp (2 cases) and on the cheek (1 case).<sup>11,23,27</sup> No association with MTS was mentioned in 2 of these cases,<sup>11,27</sup> whereas in the remaining 1 patient there was no family history of hereditary colon cancer, so a diagnosis of MTS was ruled out. Neither immunohistochemical examination of MMR protein expression nor molecular genetic testing was performed in those 3 cases with brain involvement.

From the above-mentioned 30 articles reporting on aggressive extraocular sebaceous carcinoma, only in 1 case was an association with MTS described, confirmed by molecular genetic testing.<sup>31</sup> Other works did not

mention a possible association with this hereditary syndrome or just ruled the latter out by negative colonoscopy (2 cases) or immunohistochemistry using MMR proteins (1 case).

In conclusion, we have documented an unusual case of aggressive extraocular sebaceous carcinoma on the scalp penetrating through the periosteum and meninges into the brain in an MTS patient, causing his death. Despite general statement that extraocular sebaceous carcinomas pursue an indolent clinical course after complete excision in the majority of cases, it is necessary to be aware of rare examples of these neoplasms, which might show an unexpectedly aggressive clinical behavior. Factors that might be useful in a prediction of aggressive behavior have not been studied, but it seems that lesions in unusual locations (penis, toe, axilla, vulva, and external auditory meatus) are overrepresented in this cohort of metastatic tumors compared with the usual anatomic sites.

### REFERENCES

1. Torre D. Multiple sebaceous tumors. *Arch Dermatol*. 1968;98:549–551.
2. Muir EG, Bell AJY, Barlow KA. Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with trichoacanthomata of the face. *Br J Surg*. 1967;54:191–195.
3. Torres JS, Amorim AC, Hercules FM, et al. Giant extraocular sebaceous carcinoma: case report and a brief review of a literature. *Dermatol Online J*. 2012;18:7.
4. Beach A, Severance AO. Sebaceous gland carcinoma. *Ann Surg*. 1942;115:258–266.
5. Warren S, Warvi WN. Tumors of sebaceous glands. *Am J Pathol*. 1943;19:441–459.
6. Constant E, Leahy MS. Sebaceous cell carcinoma. *Plast Reconstr Surg*. 1968;41:433–437.



7. Ikuse S, Jinbou A, Matsushima I. A case sebaceous carcinoma [abstract]. *Jpn J Dermatol*. 1976;86:783.
8. Hernández-Pérez E, Baños E. Sebaceous carcinoma. Report of two cases with metastasis. *Dermatologica*. 1978;156:184–188.
9. King DT, Hirose FM, Gurevitch AW. Sebaceous carcinoma of the skin with visceral metastases. *Arch Dermatol*. 1979;115:862–863.
10. Mellette JR, Amonette RA, Gardner JH, et al. Carcinoma of sebaceous glands on the head and neck. A report of four cases. *J Dermatol Surg Oncol*. 1981;7:404–407.
11. Wick MR, Goellner JR, Wolfe JT III, et al. Adnexal carcinomas of the skin. II. Extraocular sebaceous carcinomas. *Cancer*. 1985;56:1163–1172.
12. Hood IC, Qizilbash AH, Salama SS, et al. Sebaceous carcinoma of the face following irradiation. *Am J Dermatopathol*. 1986;8:505–508.
13. Audisio RA, Lodeville D, Quagliuolo V, et al. Sebaceous carcinoma arising from the eyelid and from extra-ocular sites. *Tumori*. 1987;73:531–535.
14. Jensen ML. Extraocular sebaceous carcinoma of the skin with visceral metastases: case report. *J Cutan Pathol*. 1990;17:117–121.
15. Dangou JM, Delplace J, Dargent JL, et al. Sebaceous cutaneous carcinoma. Value of early cytological test [in French]. *Ann Dermatol Venereol*. 1994;121:117–119.
16. Kawamoto M, Fukuda Y, Kamoi S, et al. Sebaceous carcinoma of the vulva. *Pathol Int*. 1995;45:767–773.
17. Magremanne M, Philippart P, Dourov N, et al. Sebaceous carcinoma. Apropos of an extra-ocular location [in French]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 1995;96:21–26.
18. Antuña SA, Méndez JG, Cincunegui JA, et al. Metastatic lesion of the cervical spine secondary to an extraocular sebaceous carcinoma. *Acta Orthop Belg*. 1996;62:229–232.
19. Moreno C, Jacyk WK, Judd MJ, et al. Highly aggressive extraocular sebaceous carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2001;23:450–455.
20. Duman DG, Ceyhan BB, Celikel T, et al. Extraorbital sebaceous carcinoma with rapidly developing visceral metastases. *Dermatol Surg*. 2003;29:987–989.
21. Bhavarajua VM, Shamim SE, Naik VR, et al. Sebaceous cell carcinoma of scalp—a rare presentation. *Malays J Med Sci*. 2007;14:67–70.
22. Malhotra P, Arora VK, Singh N, et al. Metastatic extraocular sebaceous carcinoma with an occult primary. *Diagn Cytopathol*. 2004;31:326–329.
23. De Leo A, Innocenzi D, Onesti MG, et al. Extraocular sebaceous carcinoma in Muir Torre syndrome with unfavorable prognosis. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2006;58:842–844.
24. Reina RS, Parry E. Aggressive extraocular sebaceous carcinoma in a 52-year-old man. *Dermatol Surg*. 2006;32:1283–1286.
25. Swick JM, Lang PG Jr. Sebaceous gland carcinoma of the right flank. *South Med J*. 2009;102:312–314.
26. Ornellas AA, Frota R, Lopes da Silva LF, et al. Sebaceous carcinoma of the penis. *Urol Int*. 2009;82:477–480.
27. Scuderi S, Giaccone M, D'Errico E, et al. Aggressive sebaceous carcinoma of the head. *Chir Ital*. 2009;61:401–404.
28. Osada S, Ueno T, Inai S, et al. Sebaceous carcinoma of the nose with a regional metastasis following false-negative sentinel lymph node biopsy. *Acta Derm Venereol*. 2011;91:367–368.
29. Oshiro H, Iwai T, Hirota M, et al. Primary sebaceous carcinoma of the tongue. *Med Mol Morphol*. 2010;43:246–252.
30. Samarasinghe V, Marsden J, Roberts C. Sebaceous carcinoma of the scalp presenting with nodal metastasis. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63:2193–2194.
31. Bongu A, Lee ES, Peters SR, et al. Locally aggressive and multicentric recurrent extraocular sebaceous carcinoma: case report and literature review. *Eplasty*. 2013;13:e44; eCollection 2013.
32. Lucares DO, Bernardes Filho F, Vega H, et al. Inguinal ulcerated sebaceous carcinoma: an unusual presentation. *An Bras Dermatol*. 2013;88-(6 suppl 1):48–51.
33. Orcurto A, Gay BE, Sozzi WJ, et al. Long-term remission of an aggressive sebaceous carcinoma following chemotherapy. *Case Rep Dermatol*. 2014;6:80–84; eCollection 2014.
34. Kazakov DV, Michal M, Kacerovska D, et al. *Cutaneous Adnexal Tumors*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.

# KOŽNÍ TUMORY S MINORITNÍ KAUZÁLNÍ SPOJITOSTÍ S PŘÍSLUŠNÝM ONEMOCNĚNÍM

## KOŽNÍ SEBACEÓZNÍ LÉZE U PACIENTA S *MUTYH*-ASOCIOVANOU POLYPÓZOU S FENOTYPEM MUIROVA-TORREOVA SYNDROMU

### ÚVOD

Dalším zajímavým případem, který jsme našli během studie, byl případ kožních sebaceózních lézí u pacienta s *MUTYH* asociovanou polypózou s fenotypem MTS.

### KLINICKY

Jednalo se o 79letého muže s anamnézou adenokarcinomu rektosigmatu a mnohočetných střevních polypů odstraněných ve 38 a 39 letech abdominoperitoneální amputací a totální kolektomií, nyní s mnohočetnými bělavými a žlutavými papulami na obličeji, které se začaly objevovat ve věku 69 let. Během 3 let bylo odstraněno celkem 13 lézí, které byly histologicky vyšetřeny.

Dle sdělení pacienta v jeho rodině se neobjevily případy malignity nebo polypózy střev. Pacient měl 2 zdravé syny a jednu zdravou dceru ve věku 50, 44 a 47 let.

### HISTOLOGICKY

Histologicky se jednalo o 11 sebaceózních adenomů, 1 low-grade sebaceózní karcinom a 1 dlaždicobuněčný karcinom. Některé sebaceózní léze vykazovaly známky dlaždicobuněčné metaplazie, intratumorální heterogenity, mucinózních změn a přítomnost peritumorálních lymfocytů. Tyto změny jsou často pozorovány u lézí s MTS. Společně s anamnézou adenokarcinomu rektosigmatu pacient splňoval definici MTS.

### IMUNOHISTOCHEMICKY

Všechny sebaceózní léze byly imunohistochemicky vyšetřeny pro expresi MMR proteinů. Všechny exprimovaly MSH2, MLH1 a PMS2. Vyšetření proteinu MSH6 odhalilo zvláštní expresi, kdy v centru lézí docházelo k částečné až úplné ztrátě, na periferii byla plná exprese proteinu.

### GENETICKY

Molekulárně genetické vyšetření z periferní krve pacienta neodhalilo zárodečnou mutaci nebo velkou delecii či duplikaci ani v jednom z *MMR* genů. Zároveň se nepotvrdila žádná aberantní metylace promotoru genu *MLH1* nebo somatická mutace genu *MSH2* nebo *MSH6*, kterou jsme vyšetřovali z tkáně jednoho ze sebaceózních adenomů na tváři.

Následně provedené molekulárně genetické vyšetření genu *MUTYH* odhalilo bialeickou heterozygotní mutaci v exonu 9 a exonu 13. Shodná mutace byla potvrzena i u dcery pacienta.

### *MUTYH* – ASOCIOVANÁ POLYPÓZA

*MUTYH*-asociovaná polypóza (MAP) je autozomálně recesivně dědičné onemocnění charakterizované mnohočetnými střevními polypy se zvýšeným rizikem kolorektálních karcinomů s incidencí 1:40000-20000 a penetrancí 43-100% u pacientů ve věku 50 let. Jedinci s bialeickou zárodečnou mutací MAP mají zvýšené riziko vzniku polypů a karcinomů duodena a žaludku. Do extragastrointestinálních projevů jsou řazeny nádory ovária, prsu, endometria, kůže a štítné žlázy. U heterozygotů se



zárodečnou *MUTYH* mutací je jen marginálně zvýšené riziko vzniku karcinomů oproti běžné populaci.  
(42)

## Cutaneous Sebaceous Lesions in a Patient With *MUTYH*-Associated Polyposis Mimicking Muir-Torre Syndrome

Denisa Kacerovska, MD, PhD,\*† Lubomir Drlik, MD,‡ Lenka Slezakova, MD,‡ Michal Michal, MD,\*† Jan Stehlik,† Monika Sedivcova,† Ladislav Hadravsky, MD,\* and Dmitry V. Kazakov, MD, PhD\*†

**Abstract:** A 76-year-old white male with a history of adenocarcinoma of the rectosigmoidum and multiple colonic polyps removed at the age of 38 and 39 years by an abdominoperitoneal amputation and total colectomy, respectively, presented with multiple whitish and yellowish papules on the face and a verrucous lesion on the trunk. The lesions were surgically removed during the next 3 years and a total of 13 lesions were investigated histologically. The diagnoses included 11 sebaceous adenomas, 1 low-grade sebaceous carcinoma, and 1 squamous cell carcinoma. In some sebaceous lesions, squamous metaplasia, intratumoral heterogeneity, mucinous changes, and peritumoral lymphocytes as sometimes seen in sebaceous lesions in Muir-Torre syndrome were noted. Mutation analysis of the peripheral blood revealed a germline mutation c.692G>A, p.(Arg231His) in exon 9 and c.1145G>A, p.(Gly382Asp) in exon 13 of the *MUTYH* gene. A *KRAS* mutation G12C (c.34G>T, p.Gly12Cys) was detected in 1 sebaceous adenoma and a *NRAS* mutation Q61K (c.181C>A, p.Gln61Lys) was found in 2 other sebaceous adenomas. No germline mutations in *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2* genes, no microsatellite instability, no aberrant methylation of *MLH1* promoter, and no somatic mutations in *MSH2* and *MSH6* were found. An identical *MUTYH* germline mutation was found in the patient's daughter. Despite striking clinicopathological similarities with Muir-Torre syndrome, the molecular biologic testing confirmed the final diagnosis of *MUTYH*-associated polyposis.

**Key Words:** *MUTYH*-associated polyposis, Muir-Torre syndrome-like, Lynch syndrome-like, cutaneous sebaceous neoplasms

(*Am J Dermatopathol* 2016;00:1-9)

**M***MUTYH*-associated polyposis (MAP) is an autosomal recessive disorder associated with colorectal polyps (adenomas) and adenocarcinomas, which was first described in 2002.<sup>1</sup> MAP is believed to be responsible for 0.3%–1% of all colorectal cancers.<sup>2,3</sup> Although alterations in the gastrointestinal tract (GIT) in the condition have been

extensively studied, there is relatively little information on the spectrum of extracolonic manifestations in MAP. We report an unusual case of MAP presenting with multiple cutaneous sebaceous neoplasms closely imitating Muir-Torre syndrome (MTS), a phenotypic variant of the more common hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC), or Lynch syndrome (LS).

### CASE REPORT

The patient was a 76-year-old white male with a history of adenocarcinoma of the rectosigmoidum at the age of 38 removed by an abdominoperitoneal amputation. One year later, a total colectomy with a permanent ileostomy was performed because of multiple colonic polyps. At the age of 69, several pink or yellowish papules on the face appeared (Figs. 1A, B), and at the age of 75, a verrucous lesion on the trunk occurred.

According to the patient, there was no other family history of cancer or intestinal/colorectal polyposis. Nonetheless, after the diagnosis of MAP was confirmed by molecular genetic investigations (vide infra), the children of the patient were also investigated. The patient had 2 sons and 1 daughter, aged 50, 44, and 47 years retrospectively, who had neither cutaneous lesions nor any large bowel changes on a colonoscopic examination. However, the daughter harbored the same germline *MUTYH* mutation in exon 9.

### MATERIAL AND METHODS

The removed tissue was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. The paraffin blocks were cut into 5- $\mu$ m-thick sections and stained with hematoxylin & eosin. Immunohistochemical staining for *MLH1* (clone G168-728; Ventana), *PMS2* (clone EPR 3947; CELL MARQUE), *MSH2* (clone G219-1129; Ventana), and *MSH6* (clone 44; Ventana) was performed according to a standard protocol. An appropriate positive and negative control was used.

### DNA Extraction

After obtaining patients' consent, DNA from peripheral blood was extracted using DNA NucleoSpin Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. Quality and amplifiability of isolated DNA was examined by amplification of control genes in a multiplex PCR.<sup>4</sup>

### MMR Genes Mutation Analysis

From lesional and normal skin tissues, DNA was isolated according to the manufacturer's supplementary protocol for formalin fixed paraffin embedded (FFPE) samples (Purification of genomic DNA from FFPE tissue using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit and Deparaffinization

From the \*Sikl's Department of Pathology, Medical Faculty in Pilsen, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic; †Bioptical Laboratory, Pilsen, Czech Republic; and ‡Department of Dermatology, Regional Hospital, Sumperk, Czech Republic.

Supported in part by the Charles University Research Fund (project number SVV-2016-No. 260 282).

The authors declare no conflict of interests.

Reprints: Dmitry V. Kazakov, MD, PhD, Sikl's Department of Pathology, Medical Faculty Hospital, Charles University, Alej Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic (e-mail: kazakov@medima.cz).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.





**FIGURE 1.** A and B, Multiple pink and yellowish papules on the face.

Solution). Genomic DNA was isolated from the peripheral blood using the QIAAsymphony DNA DSP Mini Kit. Concentration and purity of isolated DNA was measured using NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc, Wilmington, DE). DNA integrity was examined by amplification of control genes in a multiplex PCR.

**Mutation Analysis**

Mutation analysis of the *MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, and *MSH6* genes was performed using Sanger sequencing. Whole coding sequence and exon–intron junctions were amplified by PCR. Each 22 µL PCR consisted of 11 µL of Fast Start PCR Master Mix (QIAGEN), 1.8 µL of 5 µM forward and reverse primer mix, 8 µL of PCR-grade water, and 1.3 µL of template DNA (50–100 ng/µL). The following amplification program was used: initial denaturation at 95°C/10 minutes, then 40 amplification cycles (95°C/60 s, 60°C/60 s, 72°C/60 s), and final extension at 72°C/7 minutes. The size of all PCR products was confirmed on 2% agarose gel electrophoresis.

Mutation analysis of the *MUTYH* gene was performed using Sanger sequencing (Table 1). Whole coding sequence and exon–intron junctions were amplified by PCR. Each 25 µL PCR consisted of 12.5 µL of FastStart PCR Master Mix (QIAGEN), 1 µL of 10 µM forward and reverse primer mix, 10.2 µL of PCR-grade water, and 1.3 µL of template DNA (50–100 ng/µL). The following amplification program was used: initial denaturation at 95°C/9 minutes, then 35 amplification cycles (95°C/60 s, 62°C/60 s, 72°C/60 s), and final extension at 72°C/7 minutes. The size of all PCR products was confirmed on 2% agarose gel electrophoresis. All filtered variants were annotated using HGVS nomenclature according to transcripts *NM\_001048171.1*.

Specific PCR products were first purified with the AMPure magnetic particles (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, Beverly, MA), then added into the sequencing reactions using the Big Dye Terminator Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), and subsequently purified with the CleanSEQ magnetic particles (Agencourt) according to the original manufacturer’s protocols. Electrophoretograms were obtained on an automated genetic

analyzer ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) at a constant voltage of 13.2 kV for 20 minutes. Analyzed sequences were compared to the appropriate reference sequences.

**MLPA Test**

The SALSA MS-MLPA kits P003, P072, P008, and ME011 (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) were used to examine large deletions, duplications, and aberrant methylation in the *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2* genes according to the manufacturer’s instructions. The PCR products were separated by capillary electrophoresis using ABI 3130XL

**TABLE 1.** Table of Used Primers

<b>MUTYH Gene</b>		
Primer sequence 5'- 3'	Forward/reverse	Exon(s)
TACTCTGGGAAGCCGCTC	F	1
AGACAGCAGAACACGGAGGC	R	
GGCCTCAAAATTTGGCCTC	F	2
CTTTCATGGCCAATGAGCCT	R	
GCTACACACAATTACA	F	3–4
TAACTCTGGTCTG		
CCTGCATCCATCCGGTATAGTAGT	R	
GCAGGTGAGCAGTGTCTCAT	F	5–7
CTACCACCTGATTGGAGTGCAA	R	
CACAGGAGGTGAATCAACTCTGG	F	8–9
AGCAGAGCTCCTTTCAGACA	R	
CAGTCTGGTAGGATGTTGGG	F	10–11
ACCTAGAGAGTGGGCTTTGGC	R	
GCCCCTAAAGCCCTCTTGG	F	12–13
TGTGGATATAGCCTCAAAAGCCA	R	
GGCCTATTTGAACCCCTTGAC	F	14
TGCAGTCAACCGAGATAGCG	R	
GCCTGGCCAAAAAAGCATATT	F	15
GAACTATTCCTCCCTCCAGTGAAG	R	
GATTTGCATTTTtaggacaattCGA	F	16
TCACTTGAGGCCAGAATCACCT	R	

Table of used primers.

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Genetic Analyzer (Applied Biosystems), and the output data were analyzed with “Coffalyser.net” software (MRC-Holland).

### Microsatellite Instability (MSI) Analysis

For microsatellite instability (MSI) status determination, we analyzed 5 mononucleotide markers (BAT-25, BAT-26,

NR-21, NR-24, and MONO-27) using the “MSI Analysis System” kit (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer’s instructions. The PCR products were separated by capillary electrophoresis using ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), and the output data were analyzed with GeneMapper software (Applied Biosystems).

**TABLE 2.** Morphological, Immunohistochemical, and Molecular Biological Characterization of all Studied Lesions

Dg	Location	Histological Peculiar Features	IHC of MMR Proteins	MSS/MSI	Genetic Testing From Tumorous Tissue
Sebaceous adenoma	Face, NOS	Prominent holocrine secretion, granulomatous reaction	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>NRAS:</b> c.181C>A, p.(Gln61Lys) <b>BRAF:</b> negative <b>MLH1 promotor methylation:</b> negative <b>MSH2, MSH6:</b> negative
Sebaceous adenoma	Forehead	Intratumoral heterogeneity, peritumoral lymphocytes, small mucinous areas, prominent holocrine secretion, small cyst spaces, surface ulceration	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>NRAS:</b> c.181C>A, p.(Gln61Lys) <b>BRAF:</b> negative
Sebaceous adenoma	Scalp	Prominent holocrine secretion,	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>KRAS:</b> c.34G>T, p.(Gly12Cys)
Sebaceous adenoma	Eyebrow	Prominent holocrine secretion,	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>KRAS:</b> negative
Sebaceous adenoma	Sternum	Typical	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>KRAS:</b> negative
Sebaceous adenoma	Forehead	Keratoacanthoma-like	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>KRAS:</b> negative <b>BRAF:</b> negative
Sebaceous adenoma	Above left ear	Typical	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>KRAS:</b> negative <b>BRAF:</b> negative
Sebaceous adenoma	Face, NOS	Peritumoral lymphocytes, prominent holocrine secretion, small to large cystic spaces, reticulated type of seborrheic keratosis	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>KRAS:</b> NA
Sebaceous adenoma	Face, NOS	Peritumoral lymphocytes	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>KRAS:</b> NA
Low-grade sebaceous carcinoma	Forehead	Intratumoral heterogeneity, peritumoral lymphocytes, squamous metaplasia, surface ulceration	In well differentiated parts: MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules, otherwise normal expression	MSS	<b>KRAS:</b> negative
Sebaceous adenoma	Left ear	Peritumoral lymphocytes	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	MSS	<b>KRAS:</b> negative
Sebaceous adenoma	Trunk	Peritumoral lymphocytes, prominent holocrine secretion, multiple small cystic spaces	MSH6 peripheral expression and central loss in sebaceous lobules	NA	<b>KRAS:</b> negative
Well-differentiated squamous cell carcinoma	Ear	Typical	ND	ND	ND

Biallelic heterozygous mutations of the *MUTYH* gene were found in blood DNA (c.692G>A, p.(Arg231His) in exon 9 and c.1145G>A, p.(Gly382Asp) in exon 13). IHC, immunohistochemistry; MSS, microsatellite stable; MSI, microsatellite instable; NA, not analyzed; ND, not done; NOS, not otherwise specified.



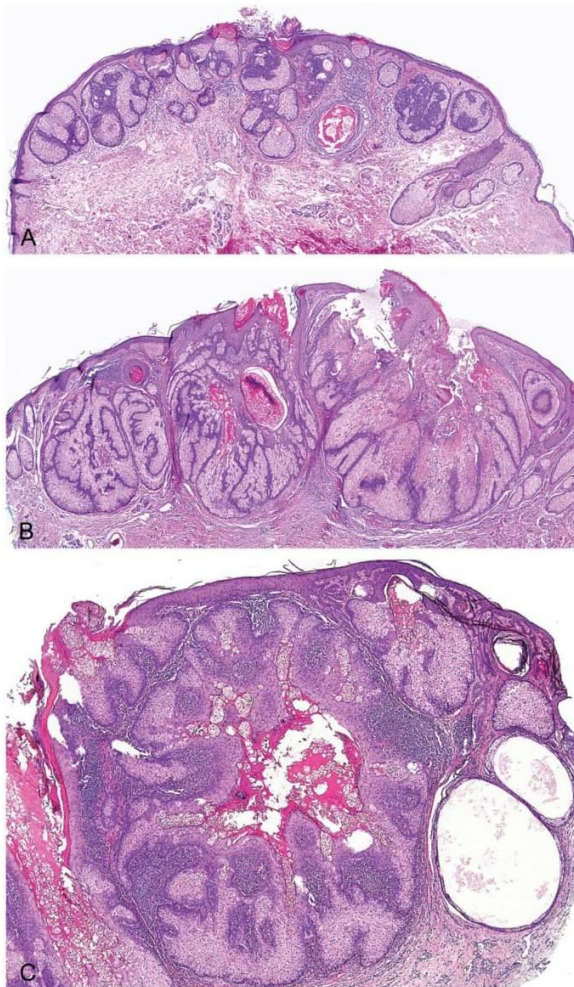
### MLH1 Promoter Aberrant Methylation Analysis

Tumor DNA samples were subjected to bisulfite conversion ("EZ DNA Methylation-Gold Kit;" Zymo Research, Burlington, ON, Canada) and methylation-specific PCR targeting the *MLH1* promoter according to Chan et al.<sup>6</sup>

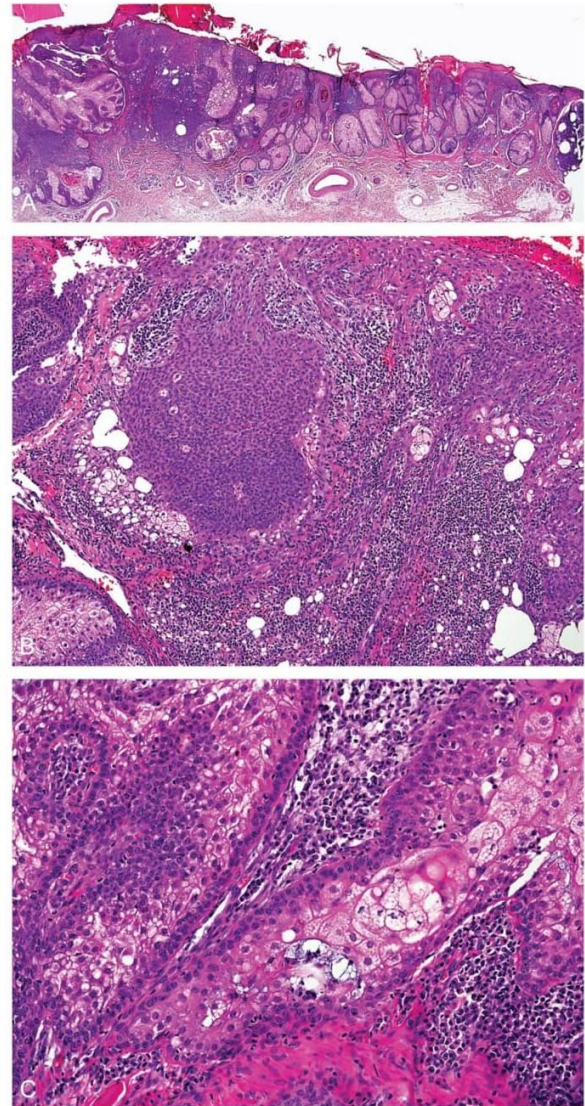
### Next Gene Sequencing

Mutation analysis of hotspot regions of 50 oncogenes and tumor suppressor genes was analyzed using the Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies, part of Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) on the Ion Torrent Personal Genome Machine. Extracted DNA (10 ng) was

amplified and adapters were ligated using the AmpliSeq library preparation kit. Sequencing beads were templated and enriched using the Template OT2 200 Kit and sequenced by means of the Sequencing kit 200 v2 (Life Technologies, Carlsbad, CA) according to manufacturer's protocols. Signal processing, mapping, and quality control were performed with Torrent Suite v.4.4.3 (Life Technologies). Sequence variants were called using Ion Reporter v4.6 using AmpliSeq CHPv2 single sample workflow and default settings. The variants were subsequently



**FIGURE 2.** A and B, Sebaceous adenomas. Both lesions exhibit a typical multilobular architecture with several neoplastic lobules. C, A detail of a sebaceous adenoma with a prominent holocrine secretion and a conspicuous hole within neoplastic sebaceous lobules. In the vicinity of the sebaceous adenoma, a reticulated (adenoid) seborrheic keratosis could be detected.



**FIGURE 3.** A, A relatively large sebaceous adenoma with focal surface ulceration. B, In a detail examination, a striking intratumoral heterogeneity and a dense peritumoral infiltrate of lymphocytes could be seen. C, Also, a small mucinous area in sebaceous lobules was focally identified.



filtered to include only exonic, nonsynonymous variants with allele frequency higher than 5%. All filtered variants were annotated using the HGVS nomenclature according to transcripts NM\_005359.5 and NM\_002524.4 of the *KRAS* and the *NRAS* genes, respectively.

### Reverse Hybridization Analysis

Analysis of 29 mutations in the *KRAS* gene and 22 mutations in the *NRAS* gene was performed using the commercial diagnostic CE IVD kit KRAS XL StripAssay and NRAS XL StripAssay (ViennaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria) according to the manufacturer's instructions.

## RESULTS

### Histopathological Findings

A total of 13 lesions removed from the head<sup>■</sup> and trunk<sup>■</sup> were microscopically investigated. One lesion located on the ear was well-differentiated squamous cell carcinoma, whereas the remaining tumors represented adnexal neoplasms with sebaceous differentiation. Of these, 11 neoplasms were sebaceous adenomas, whereas the remaining one represented low-grade sebaceous carcinoma and was located on the forehead. Locations of the 11 sebaceous adenomas included the face, not otherwise specified,<sup>■</sup> forehead,<sup>■</sup> ear,<sup>■</sup> scalp,<sup>■</sup> eyebrow,<sup>■</sup> and trunk<sup>■</sup> (Table 2).

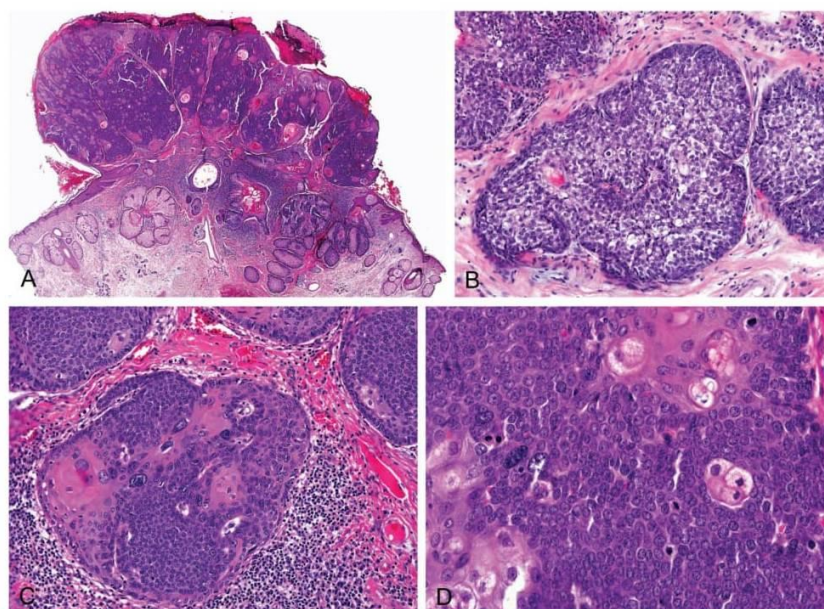
Microscopically, all sebaceous adenomas manifested a multilobular architecture with several contiguous pyriform or elongated lobules with a direct connection to the overlying epidermis (Figs. 2A, B). The individual neoplastic lobules consisted of 1 to 2 peripheral layers of small basaloid germinative cells, whereas the more central mature sebocytes had multivacuolated cytoplasm and scalloped nuclei. In 6 lesions,

degeneration of centrally located cells and conspicuous holocrine secretion resulted in variably sized cystic spaces (Fig. 2C). One sebaceous adenoma manifested certain intratumoral heterogeneity in the sense that the more differentiated areas with numerous mature sebocytes were intermingled with areas composed of only immature sebaceous cells (Figs. 3A, B). In 5 cases, a dense peritumoral lymphocytic infiltrate was noted. Foci of squamous metaplasia were noted in one sebaceous adenoma, and in another case, multiple small deposits of mucus (Fig. 3C) were present amidst the sebaceous neoplastic lobules. In one case, a granulomatous reaction was observed around sebaceous lobules of the sebaceous adenoma. In the vicinity of one sebaceous adenoma, a reticulated (adenoid) seborrheic keratosis was found (Fig. 2C).

The low-grade extraocular sebaceous carcinoma appeared as an exophytic asymmetric ulcerated lesion composed of a multinodular proliferation of basaloid epithelial cells with atypia and mitotic figures showing a various degree of sebaceous differentiation, resulting a striking intratumoral heterogeneity (Figs. 4A–D). Multiple foci of squamous metaplasia were present, and focally peritumoral stromal lymphocytes were seen.

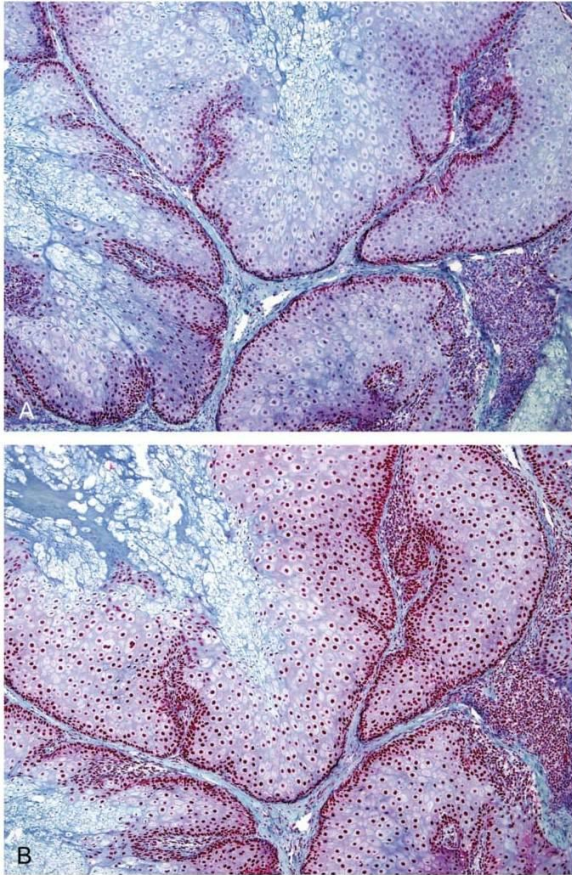
### Immunohistochemical Findings

Immunohistochemically, all sebaceous neoplasms (1 sebaceous carcinoma, 11 sebaceous adenomas) were examined for expression of MMR proteins. All lesions expressed MSH2, MLH1, and PMS2 protein. With respect to MSH6 protein staining, all sebaceous adenomas showed a peculiar gradient profile in the sense that staining was partly or completely absent in the center of the neoplastic sebaceous lobules, whereas nuclear MSH6 expression was clearly detectable at the periphery of the neoplastic lobules (Figs. 5A, B). In the low-grade sebaceous carcinoma,



**FIGURE 4.** A, A whole-mount of low-grade sebaceous carcinoma. B–D, A close-up view showed cytologic details including cellular and nuclear pleomorphism and increased mitotic rate. A cellular pleomorphism was evident in undifferentiated basaloid cells and in those with multivacuolated cytoplasm. Focal areas of squamous metaplasia could be recognized.





**FIGURE 5.** Immunohistochemical staining for MMR proteins. A, The tumor cells show reduced nuclear expression of MSH6 protein (with positive internal control) in the sense that staining is partly or completely absent in the center of the neoplastic sebaceous lobules, whereas nuclear MSH6 expression is clearly detectable at the periphery of the neoplastic lobules. B, There is no deficiency for MSH2.

MSH6 was lost in the central parts of the neoplastic nodules composed of mature sebocytes; whereas in poorly differentiated basaloid areas, MSH6 expression was present both in the peripheral and central parts of the neoplastic nodules. In all cases, a valid positive control was present (ie, peritumoral lymphocytes, intact adnexa, and epidermis).

### Molecular Biologic Findings

#### **MMR Genes Molecular Analysis of Peripheral Blood and Tumor (FFPE) DNA, Microsatellite Instability (MSI) Analysis, and MLH1 Promoter Aberrant Methylation Analysis**

Neither germline mutations nor large deletions/duplications in *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2* were found in the DNA purified from the peripheral blood using Sanger sequencing and MLPA tests.

Similarly, no microsatellite instability (MSI), no aberrant methylation of *MLH1* promoter, and no somatic mutations of *MSH2* and *MSH6* (the latter was tested in one sebaceous adenoma coming from the face) were found in the DNA purified from the FFPE tumor samples.

#### **MUTYH Gene Molecular Analysis of Peripheral Blood DNA**

Biallelic heterozygous mutations were found: c.692G>A, p.(Arg231His) in exon 9 and c.1145G>A, p.(Gly382Asp) in exon 13 of the *MUTYH* gene (Fig. 6).

#### **RAS Genes Molecular Analysis of Tumor (FFPE) DNA**

A *KRAS* mutation G12C (c.34G>T, p.Gly12Cys) was detected in one sebaceous adenoma located on the scalp, and a *NRAS* mutation Q61K (c.181C>A, p.Gln61Lys) was found in 2 different sebaceous adenomas located on the face and forehead using reverse hybridization analysis and next gene sequencing.

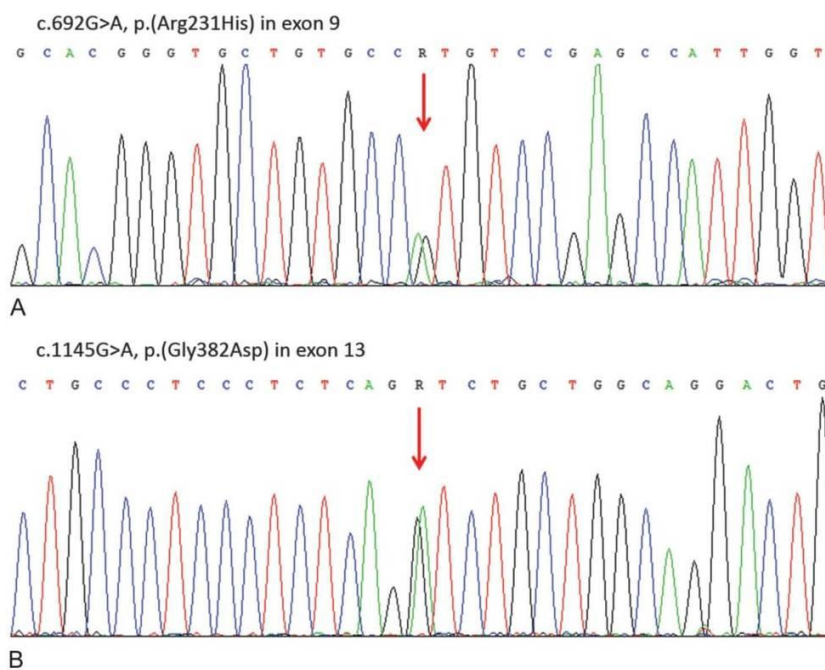
### DISCUSSION

MAP is a recessively inherited disorder characterized by a high risk of colorectal cancer. The penetrance of colorectal cancer in MAP patients at the age of 60 years was estimated to be 43%–100%.<sup>28</sup> Most biallelic *MUTYH* carriers develop dozens to a few hundreds of colorectal polyps.<sup>9</sup> However, occasional MAP patients who have a colorectal carcinoma due to biallelic *MUTYH* mutations present with no more than one synchronous polyp. There have also been rare reports of patients with a colorectal carcinoma without association with polyps.<sup>24</sup> Colorectal adenomas or colorectal cancer usually in this condition become symptomatic between the fourth and seventh decade of life.<sup>10</sup> Regarding the colonic findings, the main differential diagnosis is the attenuated or atypical form of familial adenomatous polyposis (FAP). However, the spectrum of extracolonic lesions in MAP seems to be more similar to that seen in LS but is less striking.<sup>11</sup>

Extracolonic lesions in MAP include small bowel lesions including duodenal polyposis (adenomas) and duodenal carcinoma, gastric, endometrial, breast, ovarian, bladder cancer, and cutaneous sebaceous gland tumors. Additionally, lesions typically seen in FAP have been also reported in a very small number of patients diagnosed as MAP (ie, lipomas, congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium, osteomas, jaw-bone cyst, epidermoid cyst, desmoid tumor, and pilomatricomas).<sup>9</sup>

Sebaceous tumors of the skin (ie, sebaceous adenoma, sebaceoma, extraocular sebaceous carcinoma) are relatively rare in a general population but are a well-known feature of the MTS.<sup>7</sup> Clinical features suggestive of MTS include the occurrence of multiple sebaceous tumors, relatively young age (<50 years), and extrafacial location. From a histopathological prospective, sebaceous tumors associated with MTS can manifest cystic alterations, keratoacanthoma-like configuration, mucinous changes, intratumoral and intertumoral heterogeneity, and intratumoral and peritumoral lymphocytes, the features that should raise a suspicion for a syndromic association.<sup>7,12</sup> Immunohistochemically, reduction or loss of





**FIGURE 6.** Sequence analysis of *MUTYH* gene. The mutations of the *MUTYH* gene are indicated by arrow.

MMR proteins is a feature. As some of the above clinicopathological features were encountered in our patient, the main differential diagnostic consideration was MTS. However, no pathogenic germline mutation in *MMR* genes was found. Because of ambiguous immunohistochemical studies (absence of MSH6 protein expression in central parts of the neoplastic lobules) and microsatellite stability, one sebaceous adenoma was tested for the presence of *MSH2* and *MSH6* somatic mutations with a negative result. Thus, MTS was excluded. Subsequently, taking into account the patient's history of colorectal lesions, *MUTYH* genetic testing was performed, yielding a biallelic germline mutation, and the diagnosis of MAP was rendered.

We reviewed the literature on sebaceous lesions in MAP and were able to find only few papers describing association between MAP and sebaceous tumors of the skin.<sup>10,13-17</sup> In 2005, Ponti et al<sup>13</sup> described a patient with multiple sebaceous tumors on the face and neck histologically presented sebaceous adenomas and sebaceous hyperplasia as an extracolonic manifestation of MYH-related attenuated polyposis. Skin tumors were microsatellite stable and showed normal expression of MMR proteins. In 2007, Barnetson et al identified among 225 endometrial cancer patients one proband with biallelic *MUTYH* mutation having also a sebaceous carcinoma on the face. Neither immunohistochemistry of MMR proteins nor microsatellite stability/instability testing was performed.<sup>14</sup> In 2009, Kumar et al described a case of multiple facial lesions histologically diagnosed as sebaceous adenomas in a patient with homozygous mutation in the *MUTYH* gene. Immunohistochemical expression of MMR proteins and microsatellite stability/instability were not tested.<sup>15</sup> In the same year, Vogt et al

published results of a European multicenter study of a large cohort of MAP patients (a total of 276 patients from 181 unrelated families originating from Germany, United Kingdom, and Netherlands). Of the 276 patients, 5 were found to have a sebaceous neoplasm (sebaceous adenoma and "sebaceous epithelioma").<sup>16</sup> In 2010, Guillén-Ponce et al described a patient with biallelic *MUTYH* germline mutation who had a sebaceous adenoma on the face. No additional testing of the cutaneous lesion was done.<sup>16</sup> In 2014, Castillejo et al<sup>17</sup> identified among 225 Lynch-like syndrome patients a person having a *MUTYH* mutation and a sebaceous adenoma on the face. In none of the above-mentioned papers was a histological picture of the sebaceous lesions provided.

The *MUTYH* gene located on chromosome 1 locus 1p34, along with other genes, belongs to the DNA repairing system so-called "Base Excision Repair." This gene encodes a critical protein member of the DNA base-excision-repair system. Oxidation of DNA leads to the formation of 8-oxo-6,7,8-dihydroxy-2 deoxyguanosine. This nucleotide mispairs with adenine resulting in somatic G:C > T:A transversions.<sup>18,19</sup> The *MUTYH* protein prevents these transversions by scanning the newly synthesized DNA strand for any mispaired adenines, with guanines or 8-oxo-6,7,8-dihydroxy-2 deoxyguanosine, and excising them.<sup>4</sup> *MUTYH* has been shown to cooperate with another protein involved in DNA repair, namely MSH6. On a molecular level, it has been demonstrated that *MUTYH* is physically associated with the MSH2/MSH6 complex via the MSH6 subunit. The *MSH6* binding site is mapped to a conserved region in the *MUTYH* gene and the binding and glycosylase activities of *MUTYH* are enhanced by the MSH6.<sup>4</sup> Whether the above association



of MUTYH and MSH6 proteins can result in a peculiar staining pattern seen in sebaceous tumors in our patient remains speculative and should be studied in larger series.

The occurrence of tumors usually associated with LS in MAP (ie, sebaceous gland tumors, colorectal, endometrial, and ovarian cancers) may reflect shared aspects of pathophysiology. Both the mismatch-repair and the base-excision-repair pathway are involved in the removal of oxidative DNA damage, partly in different ways, partly in a synergistic manner.<sup>10,19,20</sup>

Up to 64% of MAP colorectal adenomas and carcinomas show a specific somatic *KRAS* transversion c.34G>T (p.G12C), an alteration typically associated with oxidative DNA damage.<sup>21–23</sup> It has been suggested that *KRAS* c.34G>T somatic prescreening followed by *MUTYH* mutation analysis might be useful to identify patients with atypical MAP (ie, patients presenting with less than 10 adenomas or familial mismatch repair proficient colorectal carcinomas with less than 10 or no concomitant adenomas).<sup>23</sup> Among cutaneous sebaceous tumors in our patient, we identified this specific *KRAS* transversion p.G12C only in one sebaceous adenoma. The significance of this finding is not clear.

Recently, so-called Lynch-like syndrome (LLS) has been described, including patients who manifest MSI cancer showing abnormal MMR proteins expression on immunohistochemistry but are not linked to germline mutations or somatic methylation of MMR genes.<sup>24</sup> The potential explanations for tumors showing MSI but no DNA MMR germline mutation include: (1) unknown germline mutations in genes other than the DNA MMR genes that can drive MSI; (2) an existing germline mutation/large deletion in the DNA MMR genes not identified by commonly used detection methods; and (3) another genetic process within the neoplasm other than germline mutation coupled with the second allele inactivation or biallelic hypermethylation of *MLH1*. According to Mesenkamp et al,<sup>25</sup> the last possibility is the cause at least half of LLS cancers. The most common 2-hit combination was a mutation coupled with loss of heterozygosity (LOH), followed by 2 somatic mutations. Another study leading by Sourrouille et al<sup>26</sup> identified the somatic and germline mosaicism by de novo mutation in *MSH2*, and double somatic hits leading to MSI colorectal tumors in LLS patients. Another group of authors, having used next-generation sequencing, screened *MMR* gene in 18 MSI-H sebaceous tumors and found mutations in 17 samples. In 12 samples, an acquired somatic mutation was detected, 7 of them were associated with additional somatic alterations such as LOH or multiple mutations, suggesting somatic second hits.<sup>27</sup> The data raise the question whether MAP belongs to heterogeneous LLS group. It is known that MMR deficiency is not a feature of MAP<sup>2,28–30</sup> and only very few colorectal carcinomas from biallelic *MUTYH* carriers show MSI.<sup>28,30–33</sup> In 2014, Castillejo et al<sup>17</sup> showed a prevalence of 3.1% of MAP in the series of 225 patients with LLS.

In summary, we have described a MAP patient with multiple cutaneous sebaceous tumors, a clinicopathological constellation closely resembling MTS. It is important to be aware of an overlap of MAP with Lynch's syndrome and its phenotypic variant, that is, MTS. In a case of failure to identify a pathogenic germline mutation in MMR genes in

a patient with a clinical phenotype suggestive MTS, the *MUTYH* testing should be included in the diagnostic work-up. Further studies are needed to characterize the clinicopathological spectrum of cutaneous lesions in MAP and the relationship of the latter to so-called Lynch-like syndrome.

## REFERENCES

- Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G: C->T: a mutations in colorectal tumors. *Nat Genet.* 2002;30:227–232.
- Lubbe SJ, Di Bernardo MC, Chandler IP, et al. Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with *MUTYH* mutation. *J Clin Oncol.* 2009;27:3975–3980.
- Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, et al. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96:1631–1634.
- Nielsen M, van Steenbergen LN, Jones N, et al. Survival of *MUTYH*-associated polyposis patients with colorectal cancer and matched control colorectal cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:1724–1730.
- van Dongen JJ, Langerak AW, Brüggemann M, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia.* 2003;17:2257–2317.
- Chan A, Broadus RR, Houlihan PS, et al. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol.* 2002;160:1823–1830.
- Kazakov DV, Michal M, Kacerovska D, et al. *Cutaneous Adnexal Tumors*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
- Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, et al. Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am J Hum Genet.* 2005;77:112–119.
- Nielsen M, Morreau H, Vasen HF, et al. *MUTYH*-associated polyposis (MAP). *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011;79:1–16.
- Vogt S, Jones N, Christian D, et al. Expanded extracolonic tumor spectrum in *MUTYH*-associated polyposis. *Gastroenterology.* 2009;137:1976–1985.
- Sereno M, Merino M, López-Gómez M, et al. MYH polyposis syndrome: clinical findings, genetics issues and management. *Clin Transl Oncol.* 2014;16:675–679.
- Kacerovska D, Cerna K, Martinek P, et al. *MSH6* mutation in a family affected by Muir-Torre syndrome. *Am J Dermatopathol.* 2012;34:648–652.
- Ponti G, Ponz de Leon M, Maffei S, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations. *Clin Genet.* 2005;68:442–447.
- Barnetson RA, Devlin L, Miller J, et al. Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer. *Clin Genet.* 2007;72:551–555.
- Ajith Kumar VK, Gold JA, Mallon E, et al. Sebaceous adenomas in an MYH associated polyposis patient of Indian (Gujarati) origin. *Fam Cancer.* 2008;7:187–189.
- Guillén-Ponce C, Castillejo A, Barberá VM, et al. Biallelic MYH germline mutations as cause of Muir-Torre syndrome. *Fam Cancer.* 2010;9:151–154.
- Castillejo A, Vargas G, Castillejo MI, et al. Prevalence of germline *MUTYH* mutations among Lynch-like syndrome patients. *Eur J Cancer.* 2014;50:2241–2250.
- Gu Y, Parker A, Wilson TM, et al. Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. *J Biol Chem.* 2002;277:11135–11142.
- Kairupan C, Scott RJ. Base excision repair and the role of *MUTYH*. *Hered Cancer Clin Pract.* 2007;5:199–209.
- Mazurek A, Berardini M, Fishel R. Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. *J Biol Chem.* 2002;277:8260–8266.
- Lipton L, Halford SE, Johnson V, et al. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res.* 2003;63:7595–7599.
- Jones S, Lambert S, Williams GT, et al. Increased frequency of the k-ras G12C mutation in MYH polyposis colorectal adenomas. *Br J Cancer.* 2004;90:1591–1593.

23. van Puijenbroek M, Nielsen M, Tops CM, et al. Identification of patients with (atypical) MUTYH-associated polyposis by KRAS2 c.34G > T prescreening followed by MUTYH hotspot analysis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Clin Cancer Res.* 2008;14:139–142.
24. Rodríguez-Soler M, Pérez-Carbonell L, Guarinos C, et al. Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. *Gastroenterology.* 2013;144:926–932.
25. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA, et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology.* 2014;146:643–646.
26. Sourrouille I, Coulet F, Lefevre JH, et al. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. *Fam Cancer.* 2013;12:27–33.
27. Joly MO, Attignon V, Saurin JC, et al. Somatic MMR gene mutations as a cause for MSI-H sebaceous neoplasms in Muir-Torre syndrome-like patients. *Hum Mutat.* 2015;36:292–295.
28. O'Shea AM, Cleary SP, Croitoru MA, et al. Pathological features of colorectal carcinomas in MYH-associated polyposis. *Histopathology.* 2008;53:184–194.
29. Nielsen M, de Miranda NF, van Puijenbroek M, et al. Colorectal carcinomas in MUTYH-associated polyposis display histopathological similarities to microsatellite unstable carcinomas. *BMC Cancer.* 2009;15:184.
30. Cleary SP, Cotterchio M, Jenkins MA, et al. Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study. *Gastroenterology.* 2009;136:1251–1260.
31. Colebatch A, Hitchins M, Williams R, et al. The role of MYH and microsatellite instability in the development of sporadic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2006;95:1239–1243.
32. Lefevre JH, Colas C, Coulet F, et al. MYH biallelic mutation can inactivate the two genetic pathways of colorectal cancer by APC or MLH1 transversions. *Fam Cancer.* 2010;9:589–594.
33. Morak M, Heidenreich B, Keller G, et al. Biallelic MUTYH mutations can mimic Lynch syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:1334–1337.



## KOŽNÍ TUMOR S NEOBVYKLOU MORFOLOGIÍ

### LICHEN SCLEROSUS PENISU ASOCIOVANÝ S NÁPADNOU AKUMULACÍ ELASTICKÝCH VLÁKEN S DIFERENCOVANOU PENILNÍ INTRAEPITELIÁLNÍ NEOPLÁZIÍ S PROGRESÍ DO INVAZIVNÍHO DLAŽDICOBUNĚČNÉHO KARCINOMU

#### ÚVOD

Nápadná akumulace elastických vláken v anogenitální oblasti je v této lokalizaci postihující střední až dolní část retikulární dermis vzácný a velmi neobvyklý nález, který byl původně označen jako „névus elasticus“ v roce 1990 Sánchezem Yusem, (43) který jej nedával do spojitosti s lichen sclerosus.

V roce 2014 Shiba (44) popsal 18 případů lichen sclerosus vulvy a 4 případy v extragenitální oblasti s nápadnou tvorbou elastických vláken ve střední až dolní části retikulární dermis. Podle této práce se nejedná o samostatnou jednotku „névus elasticus“, ale o reparativní proces spojený s úbytkem elastických vláken v papilární dermis.

#### KLINICKY

Jde o případ muže ve věku 70 let na glans penis s plochými, červenými skvrnami s nepravidelnými a neostrými okraji. Léze byla asymptomatická a přítomna 5 let.

#### HISTOLOGICKY

V excizích byly nalezeny histologické znaky lichen sclerosus, tj. pruhovité infiltráty lymfocytů a plasmocytů s malými ložisky krvácení, v horní dermis s depozity kolagenu a ztenčenou epidermis. Povrchový epitel, který byl fokálně ztenčený a místy naopak hyperplastický, vykazoval atypické keratinocyty v bazální vrstvě kompatibilní s diagnózou penilní intraepiteliální neoplázie diferencovaného typu (dPeIN). V některých řezech byly zastiženy struktury karcinomu in situ s ložisky již invazivního dlaždicobuněčného karcinomu.

Dysplastický epitel vykazoval imunohistochemicky nukleární p53 pozitivitu bazálních keratinocytů v nepřerušované řadě a reagoval negativně s protilátkou proti p16.

Ve střední a dolní části retikulární dermis se nacházely masivní eosinofilní pruhy vlnitých elastických vláken, které byly zvýrazněny histochemickým barvením van Gieson a barvením na elastiku. Nápadná byla akumulace elastických vláken kolem cévních lumen v hluboké části retikulární dermis.

#### ZÁVĚR

Naše práce dokumentuje neobvyklý případ lichen sclerosus penisu asociovaný s dPeIN s progresí do invazivního dlaždicobuněčného karcinomu a nápadnou akumulací elastických vláken v retikulární dermis. Histologický obraz alterace elastických vláken v anogenitální oblasti je velmi distinktní, avšak mechanismus tohoto jevu zůstává nejasný.

# Lichen sclerosus on the penis associated with striking elastic fibers accumulation (nevus elasticus) and differentiated penile intraepithelial neoplasia progressing to invasive squamous cell carcinoma

Denisa Kacerovska, MD, PhD,<sup>a,b</sup> Michal Michal, MD,<sup>a,b</sup> Milan Hora, MD, PhD,<sup>c</sup>  
Ladislav Hadravsky, MD,<sup>a</sup> and Dmitry V. Kazakov, MD, PhD<sup>a,b</sup>  
Pilsen, Czech Republic

**Key words:** differentiated type; elastic fibers; increase; invasive squamous cell carcinoma; lichen sclerosus; penile intraepithelial neoplasia.

Lichen sclerosus (LS) is a chronic disorder with a predilection for the anogenital area. In this anatomic area, a subset of human papillomavirus—negative neoplasms arise on the background of chronic inflammation, of which LS is the most common condition. Of these neoplastic associations, squamous intraepithelial neoplasias, including the differentiated (simplex) type of vulvar intraepithelial neoplasia and penile intraepithelial neoplasia (PeIN), are salient lesions.<sup>1</sup> A rare and unusual feature in LS is a conspicuous accumulation of elastic fibers in the level of the mid to lower part of the reticular dermis, sometimes strikingly apparent on hematoxylin-eosin—stained slides. This condition was originally termed *nevus elasticus*,<sup>2</sup> but in a recent study the authors considered the process as hyperplastic.<sup>3</sup> To our knowledge, there are only 3 published clinicopathologic reports describing this phenomenon.<sup>2–4</sup> With respect to the anatomic site, all previously published examples occurred on the vulva (with exception of 5 extragenital cases). We report, a case of penile LS accompanied with conspicuous elastic fibers. Additionally, there were areas of differentiated PeIN progressing into invasive squamous cell carcinoma.

## Abbreviations used:

LS: lichen sclerosus  
PeIN: penile intraepithelial neoplasia

## CASE REPORT

A 70-year-old man presented with a flat, red-colored patch with irregular and poorly defined margins on the glans penis. The surrounding skin showed a whitish hue (Fig 1). The lesion was asymptomatic and had been present for 5 years. A biopsy found features of PeIN and invasive squamous cell carcinoma, and a simple glansectomy was performed. The case is too recent for a meaningful clinical follow-up.

The removed tissue was fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. The paraffin tissue blocks were cut into 5- $\mu$ m-thick sections and stained with hematoxylin-eosin. Histochemical staining for elastic fibers (Verhoeff-van Gieson, Elastic Stain [Sigma-Aldrich]) was performed. Immunohistochemical staining for p16 (clone E6H4, dilution RTU, Ventana, Mannheim, Germany) and p53 (clone DO-7, dilution 1:400, Dako, Glostrup, Denmark) was performed according to standard protocol.

From Siki's Department of Pathology<sup>a</sup> and the Department of Urology,<sup>c</sup> Charles University in Prague, Medical Faculty in Pilsen and Bioptical Laboratory, Pilsen.<sup>b</sup>

Funding sources: The study was supported in part by Ministry of Health of the Czech Republic - DRO (Faculty Hospital in Pilsen - FNPI, 00669806); by the Charles University Research Fund (project number P36); and by Czech government research project MSM 0021620819.

Conflicts of interest: None declared.

Correspondence to: Dmitry V. Kazakov, MD, PhD, Siki's Department of Pathology, Charles University, Medical Faculty

Hospital, Alej Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic.  
E-mail: kazakov@medima.cz.

JAAD Case Reports 2015;1:163-5.

2352-5126

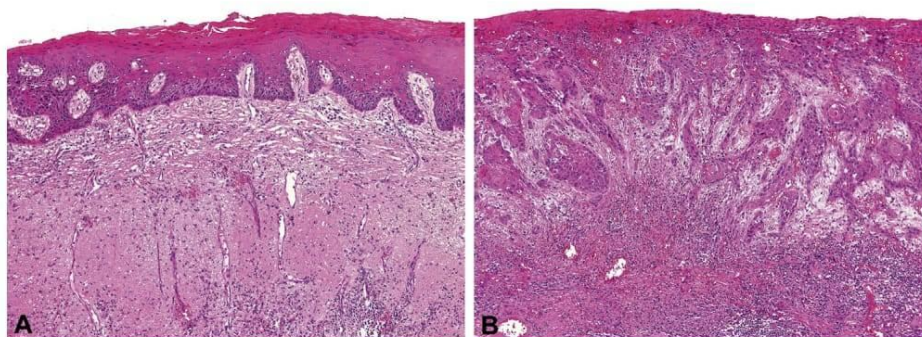
© 2015 by the American Academy of Dermatology, Inc. Published by Elsevier, Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jidcr.2015.03.004>





**Fig 1.** A flat, red-colored patch with irregular and poorly defined margins on the glans penis. The surrounding skin showed a whitish hue.



**Fig 2.** **A**, The epidermis showed focally mild hyperplastic areas with atypical keratinocytes in the basal cell layer compatible with differentiated PeIN. **B**, In several specimens, full-thickness atypia corresponding to carcinoma in situ and foci of invasive squamous cell carcinoma were found. (Hematoxylin-eosin stain.)

Microscopically, both the initial biopsy specimens and the specimens from glansectomy found histologic features of lichen sclerosus (ie, both a bandlike infiltrate composed of predominantly lymphocytes and plasma cells with small foci of hemorrhage and sclerotic collagen bundles with their homogenization in the superficial dermis). The epidermis showed focally thinning; in other areas it was hyperplastic with atypical keratinocytes in the basal cell layer compatible with differentiated PeIN (Fig 2, A). In several specimens, full-thickness atypia corresponding to carcinoma in situ was present and foci of invasive squamous cell carcinoma were also revealed (Fig 2, B). The dysplastic areas stained positively for p53 and were immunonegative for p16.

In the mid and reticular dermis there were striking areas of pink condensed finely fibrillary and wavy material, which histochemically stained deeply for Verhoeff-van Gieson and elastic stain confirming elastic etiology (Fig 3, A and B). This massive increase in elastic fibers in the mid and lower part of reticular dermis contrasted strikingly to their near absence in the superficial subepithelial tissues. Elastic stains also

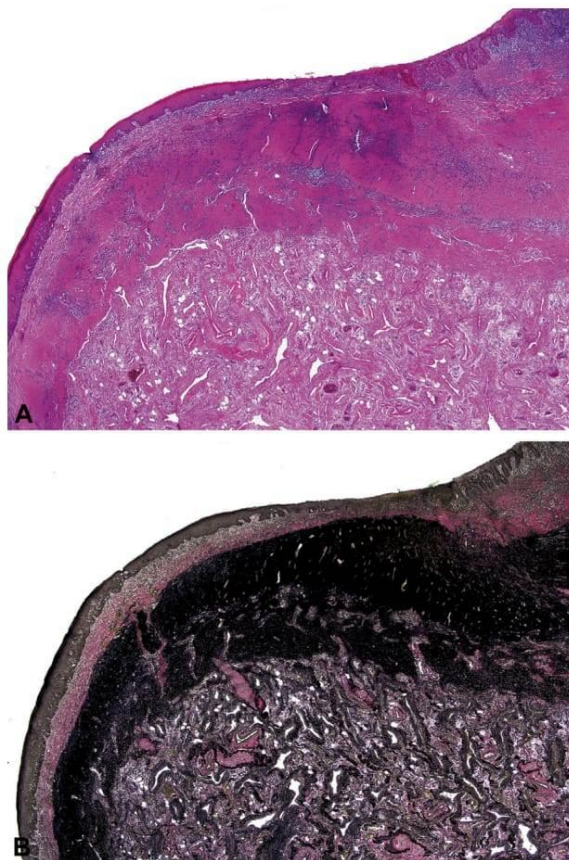
found increased presence of elastic fibers around blood vessels in the deeper portion of the dermis.

## DISCUSSION

Apart from collagen, an elastic fiber network is an important extracellular matrix component extending throughout the dermis. In the normal skin, elastic fibers in the reticular dermis are composed of a central core of amorphous, hydrophobic, cross-linked elastin surrounded by connective tissue microfibrils, the principal structural component of which is the glycoprotein fibrillin. In the papillary dermis, finer fibers containing less elastin are found, which are termed *elaunin fibers*.<sup>5</sup> Although the precise nature of the alteration of an extracellular matrix in LS is still poorly understood, Rahbari<sup>6</sup> in 1989 found a decrease in elastic fibers in LS.

The article reporting a strikingly increased number of elastic fibers in a case of vulvar LS was published in 1990 by Sánchez Yús et al.<sup>2</sup> The authors interpreted this case as nevus elasticus and considered this unusual feature to be unrelated to LS. Recently, a series of 18 cases of LS of the vulva and 4 cases of





**Fig 3.** **A**, In the mid and reticular dermis, there were striking areas of pink condensed finely fibrillary and wavy elastic material. (Hematoxylin-eosin stain.) **B**, Histochemical staining for elastic stain showed a massive increase in elastic fibers in the mid and reticular dermis contrasted strikingly to their near absence in the superficial subepithelial tissues. Elastic stains also showed increased presence of elastic fibers around blood vessels in the reticular portion of the dermis.

extragenital LS associated with increased amount of elastic fibers in the mid to lower part of the reticular dermis has been published.<sup>5</sup> In contrast to Sánchez Yus et al,<sup>2</sup> Shiba et al<sup>3</sup> suggested that this phenomenon is different from an authentic nevus elasticus and may represent a repair process related to the loss of elastic fibers in the upper part of the lesion. There is also on record a case of extragenital LS in a surgical scar with an elastic fibers increase.<sup>4</sup>

The most common elastic fiber alteration in the skin is solar elastosis caused by chronic or long-standing sun exposure. Occasionally, areas of solar elastosis may be sharply circumscribed with an

apparent increase of collagen bundles resembling the phenomenon discussed here. The very anatomic site, namely, the vulva and penis, however, almost excludes the possibility of sun exposure to play a role in the pathogenesis of the disease. Along this line, we are aware of cases of increased elastic fibers in the vagina (A. Selim, personal communication, October 2013). A case of unusual stromal elastosis associated with mammary-type tubulolobular carcinoma of the vulva has been reported.<sup>7</sup> Elastic changes in that case were analogous to those seen in the mammary parenchyma adjacent to a carcinoma.

In neither the original cases of Sánchez Yus et al<sup>2</sup> or in the series of Shiba et al<sup>3</sup> was there any case of epithelial dysplasia. Apart from the current case of differentiated PeIN, we have in our files 4 cases of vulvar lesions displaying a combination of LS, differentiated vulvar intraepithelial neoplasia, and increased elastic numbers. In other words, all our cases of LS associated with strikingly increased elastic fibers manifested dysplastic changes.

We describe a case of penile LS associated with conspicuous increase of elastic fibers and epithelial dysplasia. The histologic picture is distinctive, with a sandwich-like structure composed of the epithelium (normal or dysplastic), subepithelial homogenized and sclerotic area, and sharply demarcated deeper elastosis. The mechanism of alterations of elastic fibers is not currently known.

#### REFERENCES

1. Kokka F, Singh N, Faruqi A, et al. Is differentiated vulvar intraepithelial neoplasia the precursor lesion of human papillomavirus-negative vulvar squamous cell carcinoma? *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21:1297-1305.
2. Sánchez Yus E, Aguilar A, Requena L, et al. Nevus elasticus and lichen sclerosus et atrophicus on the vulva. *Cutis*. 1990;45:252-255.
3. Shiba Y, Ono K, Akiyama M, et al. Increase of elastic fibers in lichen sclerosus et atrophicus. *J Cutan Pathol*. 2014;41(8):646-649.
4. Allan A, Andersen W, Rosenbaum M, et al. Histologic features of lichen sclerosus et atrophicus in a surgical scar. *Am J Dermatopathol*. 1999;21:387-391.
5. Farrell AM, Dean D, Millard PR, et al. Alterations in fibrillin as well as collagens I and III and elastin occur in vulval lichen sclerosus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001;15:212-217.
6. Rahbari H. Histochemical differentiation of localized morphea-scleroderma and lichen sclerosus et atrophicus. *J Cutan Pathol*. 1989;16:342-347.
7. Fernandez-Figueras MT, Michal M, Kazakov DV. Mammary-type tubulolobular carcinoma of anogenital mammary-like glands with prominent stromal elastosis. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1224-1226.



## MĚKKÉ TKÁNĚ

## ÚVOD

Měkké tkáně jsou definovány jako soubor neepiteliálních extraskeletálních struktur těla sloužící výhradně jako podpůrná tkáň mnoha orgánů, hemopoetické a lymfatické tkáně. Zahrnuje vazivovou, tukovou, svalovou tkáň, krevní a lymfatické cévy a periferní nervy.

Měkkotkáňové tumory představují velkou heterogenní skupinu nádorů. Tradičně se dělí histogeneticky podle původu tkáně, ze které vycházejí, např. fibrosarkom vychází z fibroblastu. Přesto poslední morfologické, imunohistochemické nálezy a výsledky z experimentů na zvířatech ukazují, že většina, ne-li všechny sarkomy vycházejí z primitivní multipotentní buňky, která nádorovou transformací podstupuje diferenciaci v jednu nebo více linií. To však nemění nic na terminologii. Po praktické stránce klasifikace založená na histogenezi nebo diferenciaci koreluje s mnoha klinickými údaji jako je lokalizace, typ růstu, mnohočetnost, recidivita, incidence a distribuce metastáz, odpověď na léčbu s prognózou a věk pacienta. (45)

Nádory podle WHO z roku 2013 dělíme na adipocytární, fibro/myofibroblastické, fibrohistiocytární, hladkosvalové, pericytární (perivaskulární), nádory kosterní svaloviny, vaskulární, chondro-osseální a dále na gastrointestinální stromální tumory, nádory nervových obalů a nádory nejasné diferenciaci.

Mezi fibro/myofibroblastické se řadí např. myxoinflamatorní fibroblastický sarkom. Mezi nádory nejasné diferenciaci např. pleomorfní hyalinizující angieketatický tumor.



## MĚKKOTKÁŇOVÉ TUMORY S ROZDÍLNÝMI FENOTYPY

### PLEOMORNÍ HYALINIZUJÍCÍ ANGIEKTATICKÉ TUMORY A MYXOINFLAMATORNÍ FIBROBLASTICKÉ SARKOMY

#### ÚVOD – PLEOMORFNÍ HYALINIZUJÍCÍ ANGIEKTATICKÝ TUMOR (PHAT)

Pleomorfní hyalinizující angiektatický tumor (PHAT) poprvé popsán Smithem v roce 1996 (46) je považován za lokálně agresivní low-grade nádor nejasné diferenciaci s vysokou predilekcí vzniku na dolních končetinách, především na kotníku nebo noze, bez doposud zdokumentovaného metastatického procesu, ale až s 50% rizikem recidivy. V několika případech byl zaznamenán přechod do high-grade myxofibrosarkomu. (47) (48) (49)

Histologicky je charakterizovaný tenkostěnnými dilatovanými krevními cévami ve vřetenobuněčném stromatu. Cévy jsou vystlány fibrinem, který vniká do stromatu, a vytváří tím oblasti hyalinizace. Stromální buňky mohou být vřetenobuněčné až pleomorfní a obsahují intranukleární inkluze a granula vyplněná hemosiderinem. Mitotická aktivita je nízká nebo chybí. Tumor může obsahovat zánětlivý infiltrát, obvykle mastocyty a často exprimuje CD34 a je S100 negativní.

#### ÚVOD – MYXOINFLAMATORNÍ FIBROBLASTICKÝ SARKOM (MIFS)

Myxoinflamatorní fibroblastický sarkom (MIFS) byl poprvé popsán současně 3 odlišnými kolektivy autorů v roce 1998 (50) (51) (52) jako low-grade měkkotkáňový tumor distálních končetin s vysokou tendencí k recidivám a nízkým metastatickým potenciálem. Další studie odhalily, že MIFS nemusí vznikat jen na dolních končetinách. Dále bylo zdokumentováno 6 případů s metastázami. (51) (53) (54) (55) (56)

Histologicky jde o tumor tvořený epitelooidními fibroblasty s makrojadérky, infiltrovaný výraznou smíšenou zánětlivou celulizací na různě myxoidním pozadím.

Recentně objevená rearanže genů *TGFBR3* a *MGEA5*, která se objevuje u části PHAT i MIFS, (57) a dále i velmi podobný klinický projev potvrzuje dlouho zvažované spojení mezi těmito jednotkami. Avšak doposud chyběla práce, která by byla zaměřena na porovnání shodných morfoloických znaků.

#### METODIKA

Devět případů PHAT bylo porovnáno s 23 případy s high-grade MIFS. Případy pocházely z plzeňského nádorového registru z let 1993 – 2015.

#### KLINIKA

Ačkoli PHAT vzniká především v akrálních částech dolních končetin, jen dva případy z našeho souboru se nacházely na kotníku a nártu. Tři případy se nacházely na proximálních částech dolních končetin a po jednom dále v jizvě na bříše, předloktí a v axile. Kromě případu v axile u žádného se neobjevila po extirpaci recidiva nebo maligní zvrát. Nejdelší follow-up byl 13 let. U případu lokalizovaného v axile se objevily 2 recidivy, u poslední navíc s transformací do MIFS.

U souboru MIFS se 14 případů nacházelo na dolních končetinách, 5 na horních. Avšak jen ve dvou případech šlo o akrální části. Většina se nacházela v proximálních částech končetin. Zbýlé 4 nádory byly dvakrát v axile a po jednom v sakrální oblasti a v jizvě 14 let po prsním karcinomu. Z 18 dostupných follow-upů u 9 pacientů došlo k metastatickému rozsevu a 7 pacientů zemřelo.

## HISTOLOGIE

U případů MIFS vedle blastických buněk nádoru s různým stupněm pleomorfismu a četnými atypickými a bizarními mitózami a nekrózami jsme v našem souboru použili 4 morfologická kritéria, která jsou podle našeho názoru pro MIFS vysoce specifická. Jde o:

1. Mozaikovitý vzhled způsobený střídáním oblastí nádorových buněk se zvýrazněnou buněčnou membránou a eozinofilní cytoplasmou s úseky nádorových buněk prostoupenými tenkými kolagenními vlákny s postupným přechodem v lokality prosáknuté extracelulárním hlenem až se vznikem hlenových jezírek s roztroušenými nekohezivními buňkami.
2. Lipoblastům podobné buňky bohatě vyplněné mucinem s intracytoplasmatickými septy připomínající fotbalový míč.
3. Velké polygonální bizarně vypadající buňky podobné Reed-Stenbergovým buňkám při Hodgkinově chorobě (RS-like buňky) s bohatou eozinofilní cytoplasmou a oválnými až pleomorfními solitárními, či mnohočetnými jádry s vezikulárně uspořádaným chromatinem a velkým jakoby inkludovaným jádrem.
4. Emperipolesis vyjádřená v různé míře: od nenápadných nádorových buněk obsahujících jednu nebo několik pohlčených inflamatorních buněk až po velké nádorové buňky s mnoho zánětlivými buňkami především polymorfonukleárních v cytoplasmě.

Tyto morfologické vlastnosti i zánětlivé pozadí byly u každého případu vyjádřeny různou měrou. U dvou případů high-grade MIFS jsme objevili další morfologické rysy: obraz vřetenobuněčného nediferencovaného sarkomu a diferenciace do maligní kartilaginózní tkáně. V bloku z plicní metastázy, který byl k dispozici u jednoho případu, se opět nacházel obraz vřetenobuněčného nediferencovaného sarkomu.

U všech případů PHAT jsme našli ve stromatu shodné morfologické rysy jako u MIFS, navíc však byly přítomné hyalinizované dilatované cévy. U třech případů PHAT byl mozaikovitý vzhled mírně porušen vzhledem k přítomnosti hypocelulárního a edematózního stromatu s výraznými depozity hemosiderinu. Příčinou přítomnosti hyalinizovaných a dilatovaných cév u PHAT může být dle našeho názoru samotný růst tumoru spolu s vysokým hydrostatickým tlakem na dolních končetinách často navíc ve spojení s venózní nedostatečností.

## IMUNOHISTOCHEMIE

Velmi nápomocným imunohistochemickým vyšetřením se ukázala být reakce s protilátkou Cyclin D1. Při jejím použití se jádra a o něco méně i cytoplazma většiny nádorových buněk MIFS i PHAT barvila pozitivně. Vzhledem k nespecifičnosti této protilátky však nebyla ani tak užitečná její pozitivita samotná, jako její schopnost zvýraznit emperipolézou. Inflamatorní buňky pohlčené v (imunohistochemicky pozitivní) cytoplasmě jednotlivých nádorových buněk se totiž touto protilátkou nebarví, a jsou tak mnohem lépe zřetelné než v běžném barvení hematoxylin-eosinem.

## ZÁVĚR

Naše práce dokazují, že MIFS (doposud považován za low-grade sarkom objevující se především na akrech končetin) je jednotkou, která zahrnuje celé spektrum lézí od low-grade a relativně indolentních nádorů až po high-grade tumory, v některých případech s možnou dediferenciací až do



nediferencovaných vřetenobuněčných či pleomorfních sarkomů s velmi agresivním biologickým chováním. Tyto tumory byly v minulosti diagnostikovány jako high-grade myxofibrosarkomy nebo myxoidní pleomorfní maligní fibrózní histiocytomy.

Identické genetické abnormality a velmi podobné klinické prezentace spolu s našimi nálezy založenými na shodných imunohistochemických a především histologických vlastnostech podporují myšlenku, že většina, ne-li všechny tumory diagnostikované jako PHAT jsou ve skutečnosti případy low-grade MIFS vykazující navíc morfologický rys v podobě angiektatických hyalinizovaných cév. Zdokumentované případy recidiv PHAT s transformací do high-grade myxofibrosarkomu (které u případů s dostupnou fotodokumentací dle našeho názoru odpovídají morfologii MIFS), tak podporují hypotézu, že tyto dvě jednotky jsou pouze morfologické varianty stejného tumoru.



## Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor revisited: all tumors manifest typical morphologic features of myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, further suggesting 2 morphologic variants of a single entity<sup>☆,☆☆</sup>



Michael Michal, MD<sup>a,\*</sup>, Dmitry V. Kazakov, MD<sup>b</sup>, Ladislav Hadravský, MD<sup>b</sup>, Abbas Agaimy, MD<sup>c</sup>, Marián Švajdler, MD<sup>b,d</sup>, Naoto Kuroda, MD<sup>e</sup>, Michal Michal, MD<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pathology, Charles University, Biomedical Center, Faculty of Medicine in Plzen and Charles University Hospital Plzen, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Pathology, Charles University, Medical Faculty and Charles University Hospital Plzen, Czech Republic

<sup>c</sup> Institute of Pathology, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

<sup>d</sup> Department of Pathology, Louis Pasteur University Hospital, Kosice, Slovakia

<sup>e</sup> Red Cross Hospital Kochi, Kochi, Japan

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor  
Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma  
Soft tissues

### ABSTRACT

We describe 9 cases of pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor (PHAT). Recently described TGFBR3 and MGEA5 gene rearrangements in these tumors have confirmed the long-hypothesized link between PHAT and another soft tissue entity, the myxoinflammatory fibroblastic sarcoma (MIFS). Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma and PHAT share the same translocation and in addition have a very similar clinical presentation. However, to our best knowledge, no study has ever addressed the striking morphologic similarities between MIFS and PHAT. Our findings based on histological criteria suggest that most, if not all, tumors diagnosed as PHAT might, in fact, represent examples of MIFS that, in addition to a conventional MIFS morphology, manifest aberrant angiectatic hyalinized vessels.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor (PHAT), first described in 1996 by Smith et al [1], is currently considered a low-grade, locally aggressive neoplasm of uncertain lineage with a high predilection for the lower extremity. Although as much as 50% of lesions recur locally, no metastases have so far been documented. Nonetheless, the progression to a myxofibrosarcoma-like sarcoma has been described in several cases [2–4]. While working on another project on a high-grade variant of myxoinflammatory fibroblastic sarcoma (MIFS) [5], we came across a recurrent PHAT initially diagnosed as myxofibrosarcoma. Thanks to our current better knowledge of the wide spectrum of MIFS's morphology, when we re-reviewed both biopsies again, it became obvious that both the original and the recurrent lesions show typical cytological features of MIFS, albeit the recurrent tumor harbored prominent cytological atypia. This surprising finding compelled us to review all 13 cases filed as PHATs from our files, which resulted in further noteworthy observations. With the exception of 4 cases, all the

remaining 9 lesions contained cells morphologically indistinguishable from MIFS on the background of predominant features of PHAT characterized by thin-walled angular ectatic vessels surrounded by perivascular hyaline material.

In this study, we report a series of 9 lesions originally diagnosed as PHAT, which, based on our histological criteria for MIFS, all most likely represent examples of the latter tumor, merely having an additional component of aberrant angiectatic hyalinized vessels.

### 2. Materials and methods

The 9 cases of PHAT constituting the subject of this study were retrieved from the authors' files; they came from the period between the years 1993 and 2015. The clinical information was extracted from the registry records, and follow-up data were obtained from attending clinicians. To retrieve the cases, we searched our consultation registry files using keywords, including *pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor*, *PHAT*, *myxoid malignant fibrous histiocytoma*, and *myxofibrosarcoma*. This search yielded altogether 13 specimens which were reviewed to confirm the diagnosis. Upon revision, 2 cases were excluded for their incompatible morphology, of which one was reminiscent of low-grade fibromyxoid sarcoma with prominent vessels rather than a PHAT and the second one was reclassified as myxofibrosarcoma, not otherwise specified. In another case, we were not able to render any final diagnosis, and the

<sup>☆</sup> This study was supported by the National Sustainability Program I (NPU I) No. LO1503 provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic.

<sup>☆☆</sup> The authors have no funding or conflicts of interest to disclose.

\* Corresponding author at: Department of Pathology, Charles University, Medical Faculty and Charles University Hospital Plzen, Alej Svobody 80, 304 60 Pilsen, Czech Republic. Tel.: +420 603792671.

E-mail address: michael.michal@medima.cz (M. Michal).



remaining excluded tumor lacked any clinical information. In all but 2 cases, paraffin blocks or unstained reserve slides were available for the study.

For conventional microscopy, tissues were fixed in formalin, routinely processed, embedded in paraffin, cut into 4- $\mu$ m-thick sections, and stained with hematoxylin-eosin (H&E).

For immunohistochemical studies, 4- $\mu$ m-thick sections were cut from paraffin blocks, mounted on slides coated with 3-aminopropyltriethoxy-silane (Sigma, St Louis, MO), deparaffinized in xylene, and rehydrated in descending grades (100% to 70%) of ethanol. Sections were then subjected to heat-induced epitope retrieval by immersion in a CC1 solution at pH 8.0 at 95°C. Endogenous peroxidase was blocked by a 5-minute treatment with 3% hydrogen peroxide in absolute methanol. The slides were then stained by immunostainer BenchMark ULTRA (Roche, Switzerland). The immunohistochemical analysis was performed using a Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical System, Inc, Tucson, AZ).

The following primary antibodies were used: Cyclin D-1 (polyclonal, Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA; monoclonal) and Cyclin D-1 (monoclonal, SP4, Dako, Glostrup, Denmark). The primary antibodies were visualized using the enzymes alkaline phosphatase or peroxidase as detecting systems (both purchased from Ventana Medical System, Inc, Tucson, AZ).

### 3. Results

The clinical features are summarized in Table 1. The patients were 5 women and 3 men, and in the remaining case, the sex was unknown. The age of the patients at the time of diagnosis ranged from 53 to 76 years (mean, 62.9 years). Follow-up was available for 4 patients, of whom 1 suffered multiple recurrences. No metastases occurred. The average duration of follow-up was 5.9 years (range, 0.4–14 years). Locations were available for 8 tumors and included soft tissues of the lower extremity [4] and 1 each of the axilla, forearm, inguinal area, and the abdomen. The patient with the inguinal lesion had a history of inguinal hernia, and the tumor was initially suspected to represent recurrent hernia. The patient with abdominal lesion had been operated on for a colorectal carcinoma 13 years ago; the PHAT developed 4 cm away from the colostoma scar. The tumor size ranged from 2 to 7.5 cm in the largest dimension, with a mean size of 5.0 cm.

All PHATs in this series matched our cytological and histological criteria for MIFS used in our previous publication concerning this tumor [5], merely adding the hyalinized, ectatic vessel to the morphologic picture (Fig. 1). The inclusion morphologic criteria were as follows: (1) Presence of mats of neoplastic cells with eosinophilic cytoplasm having accentuated cell membranes, with thin collagen fibers

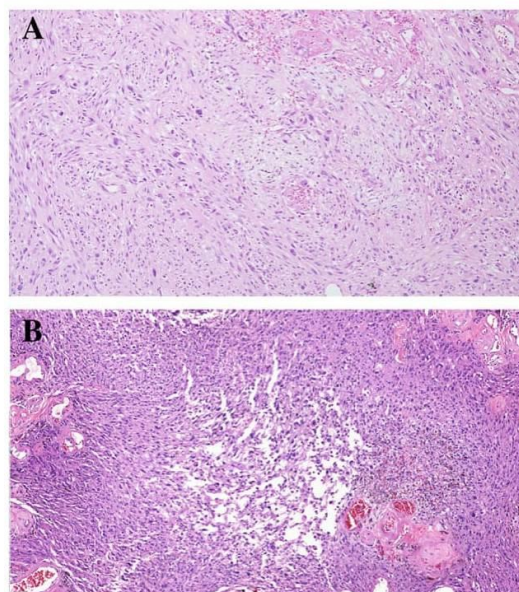


Fig. 1. Cell composition of tumor in between the ectatic vessels is identical to the myxoinflammatory fibroblastic sarcoma (A and B) (H&E, 100 $\times$ ).

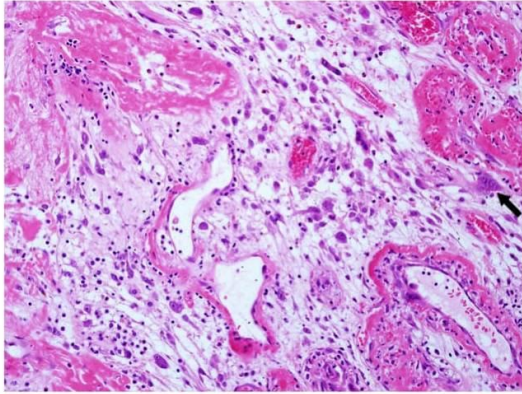
permeating between the neoplastic cells often creating mosaiclike appearances (Fig. 1A). These areas had gradual transitions to less cohesive foci, in which the extracellular mucous substance began to percolate between cells, with appearances reminiscent of “dilapidated brick wall” in areas where larger amounts of extracellular mucin have produced pools containing scattered individual neoplastic cells (Fig. 1B). However, the above-described stroma so typical for MIFS differed slightly in 3 of our cases of PHAT where it was more hypocellular and edematous (Fig. 2.), usually with prominent hemosiderin deposition. In addition, in some cases, there were groups of foam cells present in the stroma. (2) Presence of lipoblastlike cells with an ample, distended, mucin-filled cytoplasm, compartmentalized by a variable number of intracytoplasmic bridges or septa, thus remotely resembling soccer balls (Fig. 3). (3) Occurrence of large, polygonal, bizarre ganglionlike cells similar to those seen in Hodgkin disease, also called *RS-like cells*. These cells possessed an oval nucleus with vesicular chromatin and a large, inclusionlike

Table 1  
Main clinicopathologic features and follow-up.

Age/sex	Size (cm)	Location	Therapy	Recurrence and therapy	Metastasis	Follow-up
1 57/F	5 cm	Scar on the abdomen	E	N	N	NED in 8-y follow-up after the extirpation
2 66/F	6 $\times$ 5.5 $\times$ 3.5 cm	Thigh	E	N	N	NED in 13-y follow-up after the extirpation
3 76/F	$\varnothing$ 3.5 cm	Axilla	E	2 $\times$ in 31 mo (as myxoinflammatory fibroblastic sarcoma), E	N	NED in 7-y follow-up after the last re-extirpation
4 62/F	4.5 $\times$ 4 $\times$ 2 cm	Ankle	E	N	N	NED in 3-y follow-up after the extirpation
5 63/M	4 $\times$ 3.5 $\times$ 2.5 cm	Forearm	E	NA	NA	NA
6 64/F	3 $\times$ 3 $\times$ 2.2 cm	Instep	NA	NA	NA	NA
7 53/M	7.7 $\times$ 5.5 $\times$ 4.5 cm	Thigh	E	N	N	DONR (colorectal adenocarcinoma) 4 y after the extirpation
8 62/M	$\varnothing$ 5.9 cm	Inguinal area, history of inguinal hernia	E	N	N	NED in 3 mo after the extirpation
9 NA	NA	Soft tissue, not specified	NA	NA	NA	NA

Abbreviations: DONR: died of nonrelated causes, NA: not available, NED: no evidence of disease, E: extirpation.





**Fig. 2.** The typical MIFS-like stroma differed slightly in 3 of our cases of PHAT where it was more hypocellular and edematous. Binucleated, multinucleated, and pleomorphic cells often with prominent nuclei resembling Reed-Sternberg cells in Hodgkin disease can be seen (arrow) (H&E, 200 $\times$ ).

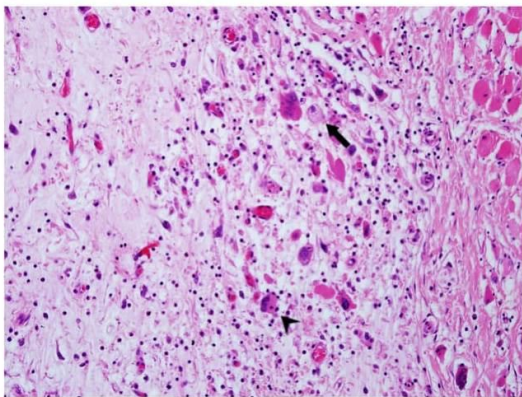
nucleolus and an ample deeply eosinophilic cytoplasm; binucleated, multinucleated, or more pleomorphic forms of these cells were also present [6] (Fig. 2). (4) Presence of cells with emperipolesis of varying degree (Figs. 3 and 4).

#### 4. Immunohistochemical finding

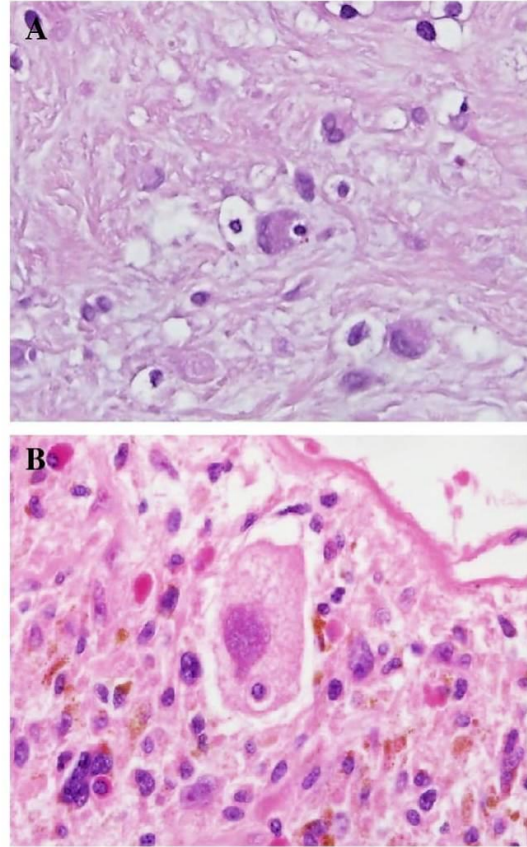
The most interesting feature was the positivity with antibodies (both polyclonal and monoclonal) to Cyclin D1 in all but 1 case. In most tumors, the Cyclin D1 antibodies stained strongly the nuclei and less so the cytoplasm of most or all of the neoplastic cells. In a few cases, only the nuclei of the tumor cells were Cyclin D1 positive with weak or no cytoplasmic staining. Cyclin D1 immunostaining was very helpful in disclosing cells with inconspicuous emperipolesis, revealing Cyclin D1-negative nonneoplastic cells being engulfed within Cyclin D1-positive cytoplasm of tumor cells [5].

#### 5. Discussion

The fact that MIFS may contain areas similar to PHAT and both of them have a very similar clinical presentation has been addressed in the recent literature [7,8]. Moreover, Carter et al [8] recently proved that, in a significant proportion of cases, they also share the same



**Fig. 3.** Lipoblastlike cells with an ample, distended, mucin-filled cytoplasm, compartmentalized by a variable number of intracytoplasmic septa occasioning a resemblance to soccer balls (arrow). Cell with emperipolesis (arrowhead) (H&E, 200 $\times$ ).



**Fig. 4.** One of the most specific hallmarks of MIFS/PHAT is, in our opinion, the presence of emperipolesis (A and B) (H&E, 400 $\times$ ).

TGFBR3 and MGEA5 gene rearrangements, further establishing a link between these 2 entities. Our findings based on histological criteria suggest that most if not all tumors diagnosed as PHAT might, in fact, represent examples of MIFS that, in addition to a conventional MIFS morphology, manifest aberrant angiectatic hyalinized vessels. This vascular change can be theoretically initiated by the tumor growth itself, possibly being more likely to occur at the lower extremities, where high hydrostatic pressure and often concomitant venous insufficiency are present, but this will remain a subject of further research. The possibility that vascular changes in PHAT represent solely a histologic pattern and not a true neoplasm or that MIFS and most of the cases of PHAT represent a different morphologic manifestation of a single entity has already been raised by other authors [7–9]. That would also explain why some authors described cases showing features of PHATs recurring as myxofibrosarcomas because the recurrence in most cases might, in fact, be high-grade MIFS, and most of these reported lesions might have represented primarily a low-grade MIFS associated with morphologically prominent ectatic hyalinized vessels. We also assume that tumors depicted in several publications described as PHAT might, in fact, be examples of MIFS [2,4].

As mentioned above, all specimens in our study exhibited all characteristics of conventional MIFS. Aside from the myxoinflammatory background, so-called RS-like cells, and lipoblastlike cells, another feature that we consider specific is the gradual loss of the cellular cohesion as depicted and described above. Interestingly, the presence of lipoblastlike cells typical of MIFS in the early PHAT was noticed already by Suarez-Vilela and Izquierdo-García [10]. These features were observed in most



of the 50 cases of low-grade (our unpublished observations) and 23 cases of high-grade MIFS currently filed in our registry. However, the above-described stroma so typical for MIFS differed slightly in 3 of our cases of PHAT where it was more hypocellular and edematous, usually with prominent hemosiderin deposition. In addition, in some cases, there were groups of foam cells present in the stroma. All of these are in our view attributable to the common presence of stromal hemorrhage resulting from the traumatization of ectatic large vessels.

One of the most specific hallmarks of MIFS/PHAT is, in our opinion, the presence of emperipolesis. We think that the occurrence of this morphologic epiphenomenon is generally highly underestimated in MIFS. For example, Laskin et al [7] found cells with emperipolesis in only about 10% of their cases of MIFS. Emperipolesis in tumors so far designated as PHAT has in fact not been described, but a meticulous search will almost invariably reveal at least few numbers of inconspicuous cells showing discrete emperipolesis of only one or a few individual cells. Notably, in our institution, we never make a diagnosis of MIFS, either low grade or high grade, if the cells with emperipolesis are not present in the tumor. In our experience, emperipolesis occurs rarely in soft tissue tumors, and inclusion of this diagnostic criterion into the histopathologic definition of MIFS makes the diagnosis much more specific. Interestingly, when we reviewed 7 cases in our files coded with the index word *emperipolesis* and for which no definitive diagnosis in the past was made, 5 cases were reclassified as MIFS, 1 lesion was reclassified as Rosai-Dorfman disease, and only for the last remaining case was a definitive diagnosis still not rendered. Emperipolesis is much easier found with the help of immunohistochemistry. The antibody to Cyclin D1 is very useful in this regard. These immunostains easily reveal Cyclin D1 intensely stained cells having in their cytoplasm engulfed Cyclin D1-negative nonneoplastic inflammatory cells. Despite the fact that the constant presence of Cyclin D1 is by far not unique for MIFS, as it was reported in other tumors such as epithelioid sarcoma [11], chondroid lipoma [12], intranodal palisaded myofibroblastoma [13], microcystic stromal tumor of the ovary [14,15], endometrial stromal sarcomas with YWHAE-FAM22 rearrangement [16], clear cell sarcoma of the kidney [17], mantle cell lymphoma [18], and others, we strongly advocate the use of this antibody to better visualize emperipolesis. One of a very few relevant differential diagnoses in this area of pathology is extranodal, primary soft tissue Rosai-Dorfman disease, in which emperipolesis is also invariably found. However, this histiocytic disorder presents with a different morphology, and the tumor cells are, in contrast to MIFS, practically always S100 protein positive.

In summary, we report 9 cases of PHAT which, in our view, based on histomorphologic criteria, merely represent a morphologic variant of MIFS. Apart from the hyalinized vessels, the only difference between these 2 entities might be seen in the stromal component, which in about half of the cases of PHAT is more hypocellular and edematous. The identical gene rearrangement of TGFBR3 and

MGEA5 in a significant proportion of cases of PHAT and MIFS lends further support to the proposition that these 2 entities are likely morphologic variants of the same tumor.

## References

- [1] Smith ME, Fisher C, Weiss SW. Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor of soft parts. A low-grade neoplasm resembling neurilemmoma. *Am J Surg Pathol* 1996;20:21–9.
- [2] Illueca C, Machado I, Cruz J, Almenar S, Noguera R, Navarro S, et al. Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor: a report of 3 new cases, 1 with sarcomatous myxofibrosarcoma component and another with unreported soft tissue palpebral location. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20:96–101.
- [3] Kazakov DV, Pavlovsky M, Mukensnabl P, Michal M. Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor with a sarcomatous component recurring as high-grade myxofibrosarcoma. *Pathol Int* 2007;57:281–4.
- [4] Mitsushashi T, Barr RJ, Machtinger LA, Cassarino DS. Primary cutaneous myxofibrosarcoma mimicking pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor (PHAT): a potential diagnostic pitfall. *Am J Dermatopathol* 2005;27:322–6.
- [5] Michal M, Kazakov DV, Hadravský L, Kinkor Z, Kuroda N, Michal M. High-grade myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: a report of 23 cases. *Ann Diagn Pathol* 2015;19:157–63.
- [6] Kinkor Z, Mukensnabl P, Michal M. Inflammatory myxohyaline tumor with massive emperipolesis. *Pathol Res Pract* 2002;198:639–42.
- [7] Laskin WB, Fetsch JF, Miettinen M. Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: a clinicopathologic analysis of 104 cases, with emphasis on predictors of outcome. *Am J Surg Pathol* 2014;38:1–12.
- [8] Carter JM, Sukov WR, Montgomery E, Goldblum JR, Billings SD, Fritchie KJ, et al. TGFBR3 and MGEA5 rearrangements in pleomorphic hyalinizing angiectatic tumors and the spectrum of related neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2014;38:1182–92.
- [9] Capovilla M, Birembaut P. Primary cutaneous myxofibrosarcoma mimicking pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor (PHAT): a potential diagnostic pitfall. *Am J Dermatopathol* 2006;28:276–7 [author reply 277–278].
- [10] Suarez-Vilela D, Izquierdo-Garcia FM. Lipoblast-like cells in early pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor. *Am J Surg Pathol* 2005;29:1257–9 [author reply 1259].
- [11] Lin L, Hicks D, Xu B, Sigel JE, Bergfeld WF, Montgomery E. Expression profile and molecular genetic regulation of cyclin D1 expression in epithelioid sarcoma. *Mod Pathol* 2005;18:705–9.
- [12] de Vreeze RS, van Coevorden F, Boerrigter L, Nederlof PM, Haas RL, Bras J, et al. Delineation of chondroid lipoma: an immunohistochemical and molecular biological analysis. *Sarcoma* 2011;2011:638403.
- [13] Laskin WB, Lasota JP, Fetsch JF, Felisak-Golabek A, Wang ZF, Miettinen M. Intranodal palisaded myofibroblastoma: another mesenchymal neoplasm with CTNNB1 (beta-catenin gene) mutations: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 18 cases. *Am J Surg Pathol* 2015;39:197–205.
- [14] Oliva E, Young RH. Stromal tumours of the ovary: an update. *Diagn Histopathol* 2014;20:376–84.
- [15] Irving JA, Lee CH, Yip S, Oliva E, McCluggage WG, Young RH. Microcystic stromal tumor: a distinctive ovarian sex cord-stromal neoplasm characterized by FOXL2, SF-1, WT-1, Cyclin D1, and beta-catenin nuclear expression and CTNNB1 mutations. *Am J Surg Pathol* 2015;39:1420–6.
- [16] Lee CH, Ali RH, Rouzbahman M, Marino-Enriquez A, Zhu M, Guo X, et al. Cyclin D1 as a diagnostic immunomarker for endometrial stromal sarcoma with YWHAE-FAM22 rearrangement. *Am J Surg Pathol* 2012;36:1562–70.
- [17] Mirkovic J, Calicchio M, Fletcher CD, Perez-Atayde AR. Diffuse and strong cyclin D1 immunoreactivity in clear cell sarcoma of the kidney. *Histopathology* 2015;67:306–12.
- [18] Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994;84:2726–32.



## High-grade myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: a report of 23 cases <sup>☆</sup>



Michael Michal, MD <sup>a,\*</sup>, Dmitry V. Kazakov, MD, PhD <sup>a</sup>, Ladislav Hadravský, MD <sup>a</sup>, Zdeněk Kinkor, MD, PhD <sup>a</sup>, Naoto Kuroda, MD <sup>a</sup>, Michal Michal, MD <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pathology, Charles University, Medical Faculty and Charles University Hospital Plzen, Plzen, Czech Republic

<sup>b</sup> Red Cross Hospital Kochi, Kochi, Japan

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

High-grade myxoinflammatory fibroblastic sarcoma

Undifferentiated sarcoma

Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor

Chondrosarcoma

Soft tissues

### ABSTRACT

We describe 23 cases of high-grade myxoinflammatory fibroblastic sarcoma (MIFS). The patients were 15 women and 8 men, with the age ranging at the time of diagnosis from 39 to 93 years (mean, 64.3 years; median, 66 years). Follow-up was available for 18 patients, of whom 9 developed metastatic disease; 7 of these died. Most tumors showed a predilection for the soft tissues of the extremities, with 14 cases involving the lower limb and 5 the upper extremity. However, in both sites, the acral parts were affected in only 1 case each. Of the 4 remaining tumors, 2 were found in axilla, 1 was found in sacral area, and 1 developed in the scar on the breast, 14 years after previous excision of a mammary carcinoma and subsequent local irradiation. The tumor size ranged from 1.3 cm to as much as 30 cm in the largest dimension with a mean size of 8.3 cm. Histologically, the tumors were characterized by occurrence of 3 types of characteristic cells, including (1) lipoblast-like cells with an ample, distended, mucin-filled cytoplasm compartmentalized by a variable number of intracytoplasmic septa, thus remotely resembling soccer balls; (2) large, polygonal, bizarre ganglion-like cells similar to those seen in the Hodgkin disease, also called Reed-Sternberg-like cells. Within an ample, deeply eosinophilic cytoplasm, there was an oval nucleus with vesicular chromatin and a large, inclusion-like nucleolus. Binucleated, multinucleated, or more pleomorphic forms of these cells were also present; (3) cells with emperipolesis of variable sizes, ranging from very inconspicuous neoplastic cells containing only one to a few engulfed cells to conspicuous large ones having many inflammatory cells, usually polymorphonuclear leukocytes admixed with various numbers of some lymphoid cells, within the cytoplasm. Quite often, we found elements that combined the histologic features of all the above 3 characteristic tumor cell types. In 2 tumors, we found an additional undifferentiated spindle cell sarcoma component, whereas in another tumor, a chondrosarcomatous moiety was evident. For comparison, we studied 10 cases of pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor (PHAT) of soft tissues. Based on the identification of morphological changes typical for MIFS within most of the cases of PHAT, we suggest that most cases of PHAT represent examples of MIFS merely having hyaline ectatic vessels.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma (MIFS) is an entity simultaneously described in 1998 by 3 different groups of authors under various names [1–3] as a low-grade soft tissue tumor of distal extremities with a high propensity for local recurrence. As further studies have shown, this tumor may not be restricted to acral sites, and apart from local recurrence, 6 cases with metastatic disease have been documented in the literature so far [3–7]. Nonetheless, in spite of these publications, MIFS is still generally considered a low-grade neoplasm [6] with a very low metastatic potential.

In this study, we present the largest series of 23 cases of MIFS with a high-grade morphology, along with an extensive clinical and follow-up data in most cases and novel important immunohistochemical findings.

### 2. Materials and methods

The 23 cases constituting the subject of the study were retrieved from the Pilsen Tumor Registry; they came from the period between years 1993 and 2014. The clinical information was extracted from the registry records, and follow-up data were obtained from attending clinicians. To retrieve the cases, we searched our consultation registry files using key words, including “myxoinflammatory fibroblastic sarcoma,” “myxoid malignant fibrous histiocytoma,” “undifferentiated sarcoma,” “myxofibrosarcoma,” “emperipolesis,” and “inflammatory myxohyaline tumor.” The retrieved cases were reviewed to confirm the diagnosis. Seventeen cases were selected from the consultations files, further 3 cases were added from the routine practice, and another 3 neoplasms were accidentally discovered while reviewing biopsies for other

<sup>☆</sup> The authors have no funding or conflicts of interest to disclose.

\* Corresponding author at: Department of Pathology, Charles University, Medical Faculty and Charles University Hospital Plzen, Alej Svobody 80, 304 60 Plzen, Czech Republic. Tel.: +420 603792671.

E-mail address: michael.michal@medima.cz (M. Michal).



**Table**  
Main clinicopathologic features and follow-up

	Age/sex	Size (cm)	Location	Therapy	Recurrence and therapy	Metastasis	Follow-up
1	47/M	Ø 5.5	Thigh	E, CH, A	N	Y—Subinguinal lymph node (discovered synchronously as the primary)	NED in 1-y follow-up
2	59/F	4.5 × 4.2 × 3	Lower leg	E	1× in 10 mo, E, A	N	NED in 1-y follow-up
3	81/M	30 × 15 × 10	Thigh	E	1× in 15 mo, E, A	Y—2 y after the first extirpation in the right acetabulum with the generalization into the lungs	DOMD in 2 y after the first extirpation
4	66/F	7.6 × 6 × 1.5	Elbow	E	3× in 1 y, E, A, CH, AMP	Y—1 y after the first extirpation in the left axillary lymph node, generalization into the lungs	DOMD in 2 y after the first extirpation
5	76/F	4.5 × 2 × 1.8	Lower leg	E	1× in 10 mo, AMP	Y—generalization into the lungs 1 y after the extirpation	DOMD in 2 y after the first extirpation
6	75/M	2.5 × 2 × 1.3	Forearm	E	N	N	NED in 3 y follow-up after the first extirpation
7	69/M	Ø 10	Axilla	NA	NA	NA	NA
8	53/F	Ø 4	Forearm	E	N	Y—generalization into the lungs 1 y after the extirpation	DOMD in 2 y after the first extirpation
9	82/F	ND	Thigh	NA	NA	NA	NA
10	54/M	Ø 9	Thigh	E	1× in 6 mo, E, CH, AMP	Y—14 mo after the first extirpation generalization into the both sides of axillary lymph nodes and lungs	DOMD in 2 y after the first extirpation
11	54/M	7 × 4 × 2	Knee	E	4× in 6 y, E, CH, AMP	N	NED in 4 y follow-up after the leg amputation
12	89/F	NA	Shank	NA	NA	NA	DONR 2 y after the diagnosis—generalization of colorectal cancer
13	47/F	Ø 8	Dorsal foot	CH, AMP	N	N	NED in 7 y follow-up after the leg amputation
14	69/F	4.5 × 3 × 3	Sacral area	E	NA	Y—into the lungs	DOMD in 1 mo after the first extirpation
15	93/F	ND	Lower leg	NA	NA	Y—into the lung	DONR in 11 y after the diagnosis
16	52/M	ND	Elbow	E	5× in 11 mo, E	N	NED in 16-y follow-up after the last re-extirpation
17	39/F	8 × 5.6 × 3.2	Dorsal hand	E	1× in 2 y, E, A	N	NED in 13-y follow-up after the last re-extirpation
18	76/F	Ø 3	Axilla	E	2× in 31 mo, E	N	NED in 7-y follow-up after the last re-extirpation
19	68/F	8 × 6 × 2.5	Breast—postirradiation	NA	NA	NA	Recent case
20	53/F	10 × 6 × 6	Gluteal region	E	4× in 4 y	Y—into the lung	DOMD 4 y after the first extirpation
21	53/F	26 × 15 × 10	Thigh	E, CH, A, AMP	N	N	NEORM in 9-y follow-up
22	59/M	Ø 4	Thigh	E	N	N	NEORM in 2-y follow-up
23	66/F	Ø 2	Lower leg	NA	NA	NA	Recent case

Abbreviations: DOMD, died of metastatic disease; DONR, died of nonrelated causes; NA, not available; NED, no evidence of disease; E, extirpation; CH, chemotherapy; A, actinotherapy; AMP, amputation; Y, yes; NEORM, no evidence of recurrence or metastasis.

purposes. In all but 1 case, paraffin blocks or unstained paraffin-embedded recuts were available.

For conventional microscopy, the excised tissues were fixed in formalin, routinely processed, embedded in paraffin, cut into 4- $\mu$ m-thick sections, and stained with hematoxylin and eosin.

### 3. Immunohistochemistry

For immunohistochemical studies, 4- $\mu$ m-thick sections were cut from paraffin blocks, mounted on slides coated with 3-aminopropyltriethoxysilane (Sigma, St Louis, MO), deparaffinized in xylene, and rehydrated in descending grades (100%–70%) of ethanol. Sections were then subjected to heat-induced epitope retrieval by immersion in a CC1 solution at pH 8.0 at 95°C. Endogenous peroxidase was blocked by a 5-minute treatment with 3% hydrogen peroxide in absolute methanol. The immunohistochemical analysis was performed using a Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical System, Inc, Tucson, AZ).

The following primary antibodies were used: CD34 (monoclonal, QBEnd/10; Dako, Glostrup, Denmark), smooth muscle actin (monoclonal, 1A4; Dako), ALK (monoclonal, ALK-01; Ventana Medical Systems), cyclin D1 (polyclonal; Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA; monoclonal), cyclin D1 (monoclonal, SP4; Dako), PRAME (polyclonal; Novus

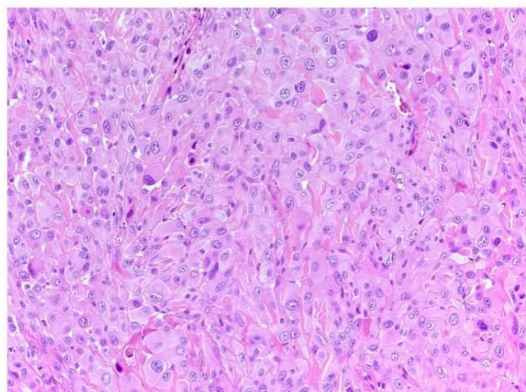
Biologicals, Littleton, CO). The primary antibodies were visualized using the enzymes alkaline phosphatase or peroxidase as detecting systems.

### 4. Results

The clinical features are summarized in Table. The patients were 15 women and 8 men, with the age at the time of diagnosis ranging from 39 to 93 years (mean, 64.3 years; median, 66 years). Follow-up was available for 18 patients, of whom 9 developed metastatic disease and 7 of these patients died. The average duration of follow-up was 6.6 years (range, 1–18 years). Most tumors showed a predilection for the soft tissues of the extremities, with 14 cases occurring on the lower limbs and 5 involving the upper extremity. However, in both sites, the acral parts were affected in only 1 case each, whereas a majority of tumors involved more proximal sites. Of the 4 remaining tumors, 2 were found in axilla, 1 was found in sacral area, and 1 developed in the scar on the breast, 14 years after previous excision of a mammary carcinoma and subsequent local irradiation. The tumor size ranged from 1.3 to 30 cm in the largest dimension, with a mean size of 8.3 cm.

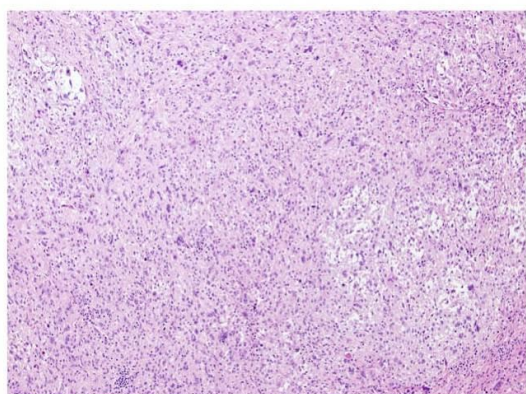
Aside from the obvious prerequisite of blastic tumor cells with a high degree of pleomorphism notable at first sight with numerous atypical to



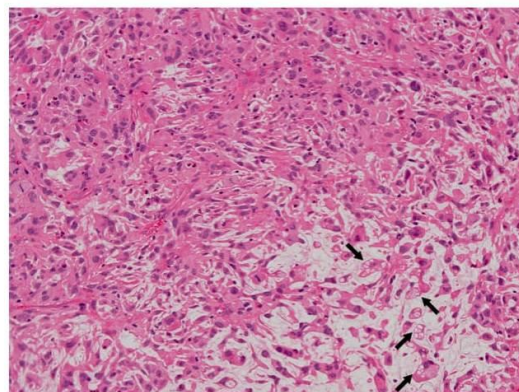


**Fig. 1.** Mats of neoplastic cells with eosinophilic cytoplasm and prominent cytoplasmic membranes. Note collagen fibers permeating between the neoplastic cells creating a resemblance of a mosaic (hematoxylin and eosin, original magnification  $\times 200$ ).

bizarre mitoses and frequent foci of necrosis, the inclusion criteria in our series were exclusively based on the fulfilling of 4, in our view, highly specific histopathologic features of MIFS. The first one was characterized by mats of neoplastic cells with eosinophilic cytoplasm having accentuated cell membranes, whereas thin collagen fibers permeating between the neoplastic cells often created a resemblance to a mosaic (Fig. 1). These areas had gradual transitions to less cohesive foci, in which the extracellular mucous substance began to percolate between cells (Fig. 2). In foci where larger amounts of extracellular mucin were present, the cells further separated producing mucin pools with scattered individual cells bearing a resemblance to a “dilapidated brick wall” (Fig. 3). The other 3 characteristic features of MIFS are the occurrence of 3 different types of cells, which in our view might represent different stages of the development of a single cell population, namely, (1) lipoblast-like cells with an ample, distended, mucin-filled cytoplasm, compartmentalized by a variable number of intracytoplasmic septa, thus remotely resembling soccer balls (Fig. 3); (2) large, polygonal, bizarre ganglion-like cells similar to those seen in Hodgkin disease, also called Reed-Sternberg (RS)-like cells. Within an ample deeply eosinophilic cytoplasm, there was an oval nucleus with vesicular chromatin and a large, inclusion-like nucleolus. Binucleated, multinucleated, or more pleomorphic forms of these cells were also present [8] (Fig. 4); (3) cells with emperipolesis of variable sizes, ranging from very inconspicuous neoplastic cells containing only one or a few engulfed cells to conspicuous large ones having many inflammatory cells, usually



**Fig. 2.** Focal dyscohesive areas with the mucous substance between cells are present (hematoxylin and eosin,  $\times 100$ ).

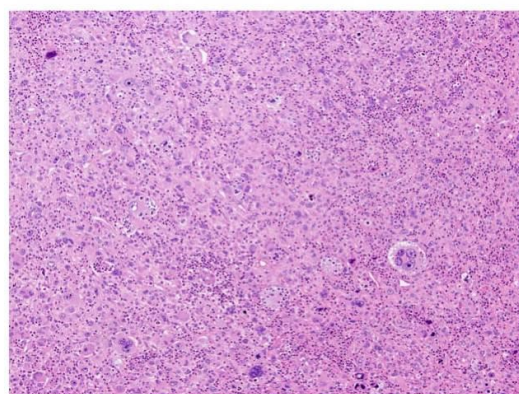


**Fig. 3.** Areas with copious mucin in which dyscohesive cell growth resulted in a scatter of individual cells in mucin pools remotely resembling a “dilapidated brick wall.” Lipoblast-like cells with an ample, distended, mucin-filled cytoplasm, compartmentalized by a variable number of intracytoplasmic septa occasioning a resemblance to soccer balls (arrows). Nuclei of some cells are out of the plane of the section and, therefore, not visible. Note also numerous atypical mitotic figures (hematoxylin and eosin,  $\times 200$ ).

polymorphonuclear leukocytes admixed with various numbers of some lymphoid cells, within the cytoplasm (Fig. 5A). Sometimes these cells with emperipolesis contained virtually hundreds of engulfed polymorphonuclear leukocytes in their cytoplasm (Fig. 5B). Quite often, we found large neoplastic cells that combined the histologic features of all these 3 characteristic tumor cell types (Fig. 6).

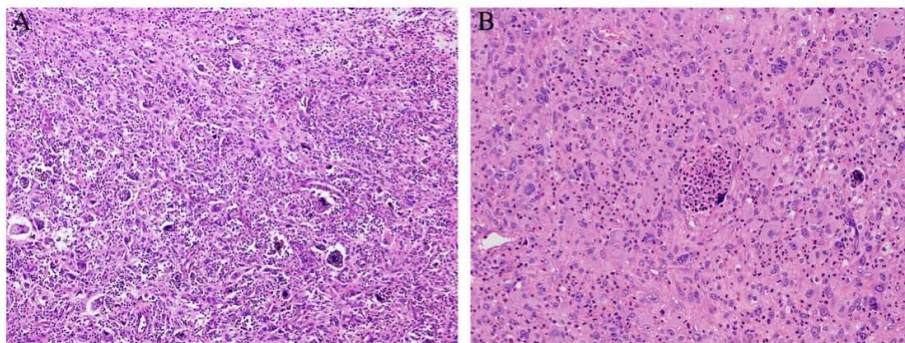
Variations in the aforementioned specific histopathologic features as well as in the appearances of an inflammatory background were not striking, creating thus a relatively homogenous group. However, certain cases presented with additional microscopic features. In case 4, in addition to the typical histologic appearance of high-grade MIFS, not different from other cases in our series, there was an area of spindle cell type of undifferentiated sarcoma (Fig. 7). Case 19 contained the same high-grade MIFS and spindle cell undifferentiated sarcoma as in case 4, in addition to an area of a low-grade MIFS (Fig. 8A and B). A noteworthy clinical feature of case 19 was the location of the tumor in the scar 14 years after previous excision of a mammary carcinoma and subsequent local irradiation. In case 21, along with usual parts of high-grade MIFS (Fig. 9A), foci with malignant cartilaginous differentiation were encountered (Fig. 9B).

From the 9 metastatic cases in our study, the microscopic slide from a metastatic mass in the lungs was also available (case 14), showing an



**Fig. 4.** Binucleated, multinucleated, and pleomorphic cells often with prominent nuclei resembling RS cells in Hodgkin disease can be seen (hematoxylin and eosin,  $\times 100$ ).



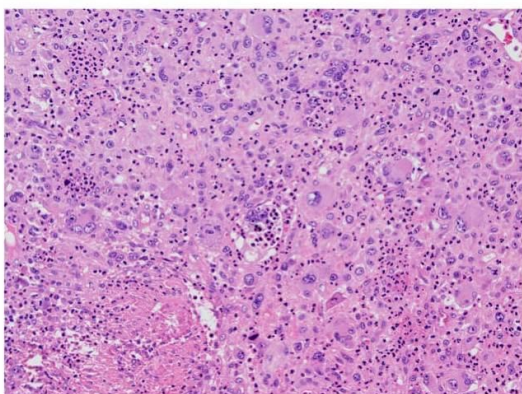


**Fig. 5.** Cells with emperipolesis of variable sizes, ranging from inconspicuous neoplastic cells containing one to only a few engulfed cells (A) to large conspicuous ones having many inflammatory cells within the cytoplasm (A and B). Some cells with emperipolesis contained virtually hundreds of engulfed polymorphonuclear leukocytes in their cytoplasm (B center) (hematoxylin and eosin,  $\times 100$  [A] and  $\times 200$  [B]).

undifferentiated high-grade spindle cell sarcoma containing occasional pleomorphic giant cells (Fig. 10). Other metastases were not available for histopathologic review. Interestingly, undifferentiated spindle cell component in cases 4 and 19 and metastatic undifferentiated high-grade spindle cell tumor to the lungs in case 14 were morphologically uncharacteristic, devoid of any of the above-described 3 cell types typical of MIFS.

### 5. Immunohistochemical finding

The most interesting feature was the overall positivity with antibodies (both polyclonal and monoclonal) to cyclin D1 in all cases. In most tumors, the cyclin D1 antibodies stained strongly the nuclei and less so the cytoplasm of most or all of the neoplastic cells. In a few cases, only the nuclei of the tumor cells were cyclin D1 positive with weak or no cytoplasmic staining. Cyclin D1 immunostaining was very helpful in disclosing cells with inconspicuous emperipolesis, revealing cyclin D1-negative nonneoplastic cells being engulfed by cyclin D1-positive tumor cells (Fig. 11). Positivity with PRAME was present in most cases, often revealing the cells with emperipolesis similar to cyclin D1. In contrast to cyclin D1, the reaction with PRAME was much weaker, and heavily stained background often hampered a reliable identification of neoplastic cells and their distinction from the background. Smooth muscle actin stained only a proportion of cells in 1 case, and CD34 stained the spindle cell sarcoma component in another tumor. ALK staining was always negative.



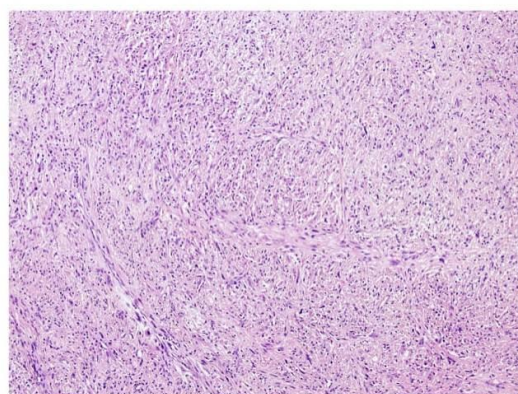
**Fig. 6.** The cell in the center of the picture combines all characteristics by manifesting emperipolesis, RS-like nuclei, and compartmentalization of the cytoplasm filled with mucin (hematoxylin and eosin,  $\times 200$ ).

### 6. Discussion

To the best of our knowledge, the 23 cases of high-grade MIFS described in this article represent the first large series, although individual allusions to MIFS and its relation to a high-grade sarcoma can be rarely found in the literature. These 23 cases of high-grade MIFS were found beside approximately 50 low-grade MIFSs in our consultation of Pilsen Tumor Registry files. The large number of otherwise rare high-grade MIFSs can be explained by the selective bias caused by the consultation character of a majority of the included tumors.

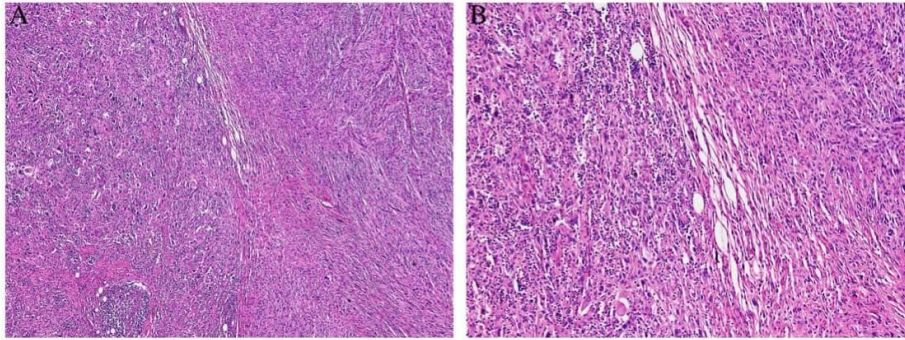
There are on record more putative high-grade MIFS that were published all as case reports. In 2009, Hallor et al [7] included in their study myxoid spindle cell/pleomorphic sarcoma with MIFS features. Later, a case of myxofibrosarcoma recurring as MIFS was published [9]. Eventually, in 2013, Solomon et al [10] reported MIFS progressing to a highly anaplastic sarcoma, which metastasized. Metastatic cases of MIFS available in the literature were either described as having the same appearance as the primary tumor [4] or showed higher cytological atypia and cellularity [3]. Unfortunately, no representative microphotograph from a metastatic lesion was provided, precluding further comments.

As mentioned above, all specimens in our study exhibited all characteristics of conventional MIFS, along with a high-grade cytology. Aside from myxoid and inflammatory background, so-called RS-like cells and lipoblast-like cells, another feature that we consider specific is the gradual change in the cellular cohesion as depicted and described above. This change and variations thereof are seen in most of the



**Fig. 7.** Case 4. An area within a tumor featuring undifferentiated spindle cell sarcoma lacking any signs of MIFS present elsewhere in the specimens (hematoxylin and eosin,  $\times 100$ ).





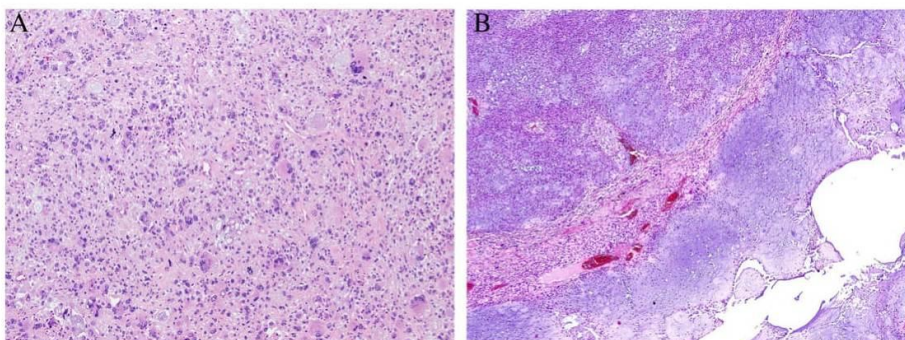
**Fig. 8.** An area showing high-grade MIFS (A and B, left side) in case 19 abruptly transforming into undifferentiated spindle cell sarcoma (A and B, right side) (hematoxylin and eosin,  $\times 100$  [A] and  $\times 200$  [B]).

high-grade lesions of our series and were present in all 50 cases of low-grade MIFS available in our registry as well (unpublished observation). However, one of the most specific hallmarks of this type of sarcoma is, in our opinion, the presence of emperipolesis. We think that the occurrence of this morphologic epiphenomenon is generally highly underestimated in MIFS among pathologists as well as in the publications. For example, Laskin et al [6] found cells with emperipolesis in only about 10% of their cases. Although large cells with high amount of engulfed inflammatory cells easily recognizable at the first sight are usually present only focally or may be absent, a meticulous search will almost invariably reveal at least few numbers of inconspicuous cells showing discrete emperipolesis of only one or a few individual cells. Notably, in our institution, we never make a diagnosis of MIFS, either low grade or high grade, if the cells with emperipolesis are not present in the tumor. In our experience, emperipolesis occurs rarely in soft tissue tumors, and inclusion of this diagnostic criterion into the histopathologic definition of MIFS makes the diagnosis highly specific. Interestingly, when we reviewed 7 cases in our files coded with the index word “emperipolesis” and for which no definitive diagnosis in the past was made, 5 cases were reclassified as MIFS; 1 lesion as Rosai-Dorfman disease; and only for the last remaining case, no definitive diagnosis was still rendered. Emperipolesis is much easier found with the help of immunohistochemistry. The recently introduced antibody PRAME and especially cyclin D1 are very useful in this regard. These immunostains easily reveal cyclin D1 intensely stained cells (and less often PRAME-positive cells) having in their cytoplasm engulfed cyclin D1–negative nonneoplastic inflammatory cells. Despite the fact that the constant presence of cyclin D1 is not unique for MIFS, as it was reported in other tumors such as chondroid lipoma [11], microcystic stromal tumor of the ovary [12], intranodal palisaded myofibroblastoma [13], endometrial stromal sarcomas with YWHAЕ-FAM22 rearrangement [14], mantle cell

lymphoma [15], and others, we greatly advocate the use of these antibodies (especially cyclin D1) to visualize emperipolesis, which is a very important and according to us defining diagnostic feature, allowing one to differentiate MIFS from nearly all known soft tissue neoplasms. One of a very few relevant differential diagnoses in this area of pathology is extranodal, primary soft tissue Rosai-Dorfman disease, in which such emperipolesis is also invariably found. However, this histiocytic disorder presents with a different morphology, and the tumor cells are, in contrast to MIFS, practically always S-100 protein positive. The immunohistochemical positivity of MIFS with antibody to PRAME is important to have in mind because this antibody was introduced to soft tissue pathology as being relatively specific for myxoid liposarcomas [16].

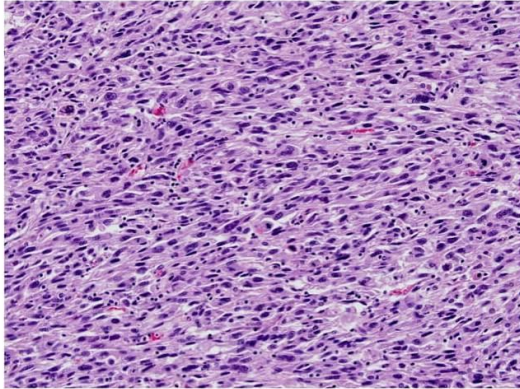
The remarkable features of cases in our series, most of our tumors were not located on the acral parts of the extremities, as is usual for low-grade MIFS, and they were considerably larger than a majority of these neoplasms in acral locations, can be easily explained by the fact that a growing neoplastic mass involving hands and feet is usually noticed earlier by the patients, who due to growing discomfort seek the medical attention much sooner compared to cases when such a mass is localized more proximally. We observed a similar phenomenon with minute synovial sarcomas. Most small synovial sarcomas under the size of 1 cm in our registry involved hands and feet, especially the fingers [17]. Thus, theoretically, a more proximal location provides more time for a tumor to grow and to be noted and increase the chance of acquiring larger size. This may allow a low-grade MIFS time to evolve into a high-grade MIFS and occasionally produce even a completely undifferentiated sarcoma component.

The same patterns of both spindle cell dedifferentiation as seen in our cases 4 and 19 and even chondroid differentiation as seen in our case 21 can occur in liposarcomas [18], and indeed, case 21 was



**Fig. 9.** In case 21, typical picture of high-grade MIFS (A) changes into areas with malignant cartilaginous differentiation (B) (hematoxylin and eosin,  $\times 200$  [A] and  $\times 100$  [B]).



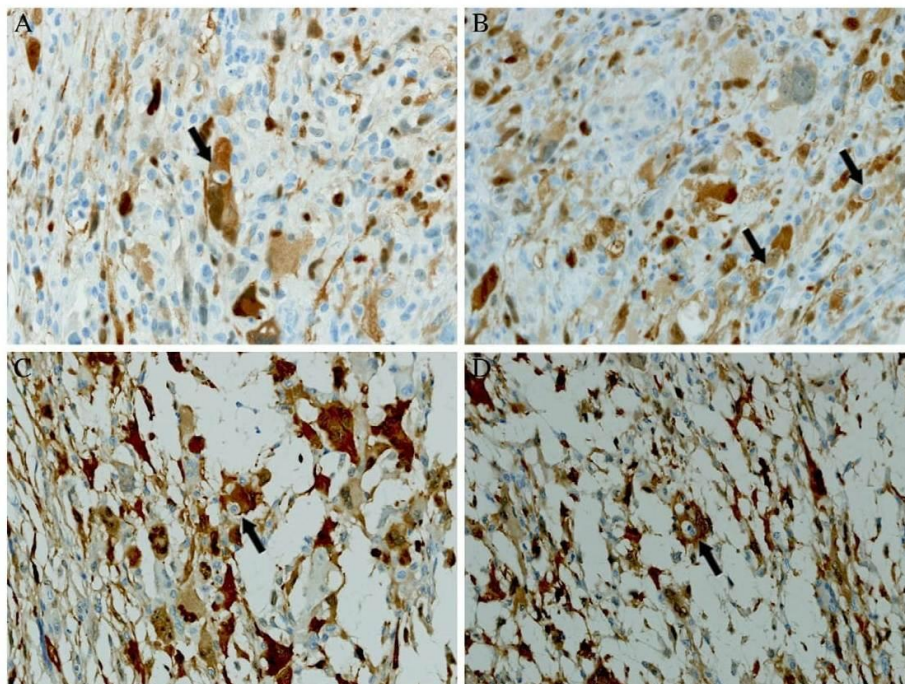


**Fig. 10.** In case 14, metastatic tumor in the lung showing undifferentiated high-grade spindle cell sarcoma containing occasional pleomorphic giant cells (hematoxylin and eosin,  $\times 400$ ).

identified by us while reviewing cases of myxoid liposarcomas associated with chondromatous differentiation retrieved from our consultation tumor registry recently.

Another very interesting case was added to our series after reexamining a case from our registry that was published in the past by 2 of the authors of this article (DVK and MM) in 2007 [19]. It was described as pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor (PHAT) and later recurred under the diagnosis of myxofibrosarcoma grade 2. Interestingly, the same progression of PHAT to myxofibrosarcoma or its synchronous occurrence with other mesenchymal neoplasms has also been described by other authors [20–23]. However, thanks to our current

better knowledge of MIFS's morphology, when we re-reviewed both biopsies again, it became obvious that both lesions show typical features of low-grade MIFS in the original excision, with the recurring high-grade lesion harboring additionally cytologic atypia. This surprising finding compelled us to review all 10 PHATs from our registry files, which resulted in further noteworthy observations. With the exception of 2 cases, all the remaining 8 lesions contained cells morphologically indistinguishable from MIFS on the background of predominant features of PHAT characterized by thin-walled angular ectatic vessels surrounded by perivascular hyaline material [24]. We performed the same immunohistochemical analysis as with our study of MIFS specimens, and it yielded a similar staining pattern, with cyclin D1 and PRAME being positive in all cases of PHAT. The fact that MIFS may contain areas similar to PHAT [6,25], both of them have a very similar clinical presentation and share certain genetic alterations [25], is already well known in the literature. Our findings suggest that most tumors diagnosed as PHAT might, in fact, represent the examples of MIFS that, in addition to a conventional MIFS morphology, produce aberrant angiectatic hyalinized vessels. This vascular change could be theoretically initiated by the tumor growth itself, possibly being more likely to occur at the lower extremities, where high hydrostatic pressure and often concomitant venous insufficiency are present, but this will remain a subject of further research. The possibility that vascular changes in PHAT represent solely a histologic pattern and not a true neoplasm or that MIFS and PHAT represent a different morphologic manifestation of a single entity has already been raised by other authors [6,20,25]. That would also explain why some authors described cases showing features of PHATs recurring as myxofibrosarcomas because the recurrence in most cases might, in fact, be high-grade MIFS and most of these reported lesions might have represented primarily a low-grade MIFS associated with morphologically prominent ectatic hyalinized vessels. We also assume that tumors depicted in several publications described as PHAT might, in fact, be examples of MIFS [21,23].



**Fig. 11.** Cyclin D1 immunostaining revealing cyclin D1-negative engulfed nonneoplastic cells within the cytoplasm of cyclin D1-positive neoplastic cells (arrows). Staining for cyclin D1 is very helpful in disclosing cells with emperipolesis in cases this feature is subtle and not readily appreciable (cyclin D1 counterstained with hematoxylin,  $\times 200$ ).



In summary, myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, being so far considered as a low-grade sarcoma occurring mostly on acral sites, is an entity that encompasses the whole spectrum of lesions ranging from low-grade and relatively indolent neoplasms to high-grade tumors or entirely undifferentiated spindle cell/pleomorphic sarcoma with an aggressive biological behavior, examples of which used to be diagnosed in the past as high-grade myxofibrosarcomas or myxoid/pleomorphic malignant fibrous histiocytomas. Most cases of PHAT might represent a low-grade MIFS associated with morphologically prominent ectatic hyalinized vessels; ergo before the diagnosis of PHAT is made, wide sampling is mandatory, and a careful search for diagnostic features of MIFS should be performed. Immunostaining for cyclin D1 is recommended to identify emperipolesis typical for MIFS.

## References

- [1] Montgomery EA, Devaney KO, Giordano TJ, Weiss SW. Inflammatory myxohyaline tumor of distal extremities with vicroyte or Reed-Sternberg-like cells: a distinctive lesion with features simulating inflammatory conditions, Hodgkin's disease, and various sarcomas. *Mod Pathol* 1998;11:384–91.
- [2] Michal M. Inflammatory myxoid tumor of the soft parts with bizarre giant cells. *Pathol Res Pract* 1998;194:529–33.
- [3] Meis-Kindblom JM, Kindblom LG. Acral myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: a low-grade tumor of the hands and feet. *Am J Surg Pathol* 1998;22:911–24.
- [4] Sakaki M, Hirokawa M, Wakatsuki S, Sano T, Endo K, Fujii Y, et al. Acral myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: a report of five cases and review of the literature. *Virchows Arch* 2003;442:25–30.
- [5] Hassanein AM, Atkinson SP, Al-Quran SZ, Jain SM, Reith JD. Acral myxoinflammatory fibroblastic sarcomas: are they all low-grade neoplasms? *J Cutan Pathol* 2008;35:186–91.
- [6] Laskin WB, Fetsch JF, Miettinen M. Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: a clinicopathologic analysis of 104 cases, with emphasis on predictors of outcome. *Am J Surg Pathol* 2014;38:1–12.
- [7] Hallor KH, Sciot R, Staaf J, Heidenblad M, Rydholm A, Bauer HC, et al. Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11–12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. *J Pathol* 2009;217:716–27.
- [8] Kinkor Z, Mukensnabl P, Michal M. Inflammatory myxohyaline tumor with massive emperipolesis. *Pathol Res Pract* 2002;198:639–42.
- [9] Chiu HY, Chen JS, Hsiao CH, Tsai TF. Transformation of myxofibrosarcoma into myxoinflammatory fibroblastic sarcoma. *J Dermatol* 2012;39:422–4.
- [10] Solomon DA, Antonescu CR, Link TM, O'Donnell RJ, Folpe AL, Horvai AE. Hemosiderotic fibrolipomatous tumor, not an entirely benign entity. *Am J Surg Pathol* 2013;37:1627–30.
- [11] de Vreeze RS, van Coevorden F, Boerrigter L, Nederlof PM, Haas RL, Bras J, et al. Delineation of chondroid lipoma: an immunohistochemical and molecular biological analysis. *Sarcoma* 2011;2011 [Article ID 638403, 5 pages].
- [12] Oliva E, Young RH. Stromal tumours of the ovary: an update. *Diagn Histopathol* 2014;20:376–84.
- [13] Laskin WB, Lasota JP, Fetsch JF, Felisiak-Golabek A, Wang ZF, Miettinen M. Intranodal palisaded myofibroblastoma: another mesenchymal neoplasm with CTNNB1 (beta-catenin gene) mutations: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular genetic study of 18 cases. *Am J Surg Pathol* 2015;39:197–205.
- [14] Lee CH, Ali RH, Rouzbahman M, Marino-Enriquez A, Zhu M, Guo X, et al. Cyclin D1 as a diagnostic immunomarker for endometrial stromal sarcoma with YWHAE-FAM22 rearrangement. *Am J Surg Pathol* 2012;36:1562–70.
- [15] Bosch F, Jares P, Campo E, Lopez-Guillermo A, Piris MA, Villamor N, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood* 1994;84:2726–32.
- [16] Hemminger JA, Toland AE, Scharshmidt TJ, Mayerson JL, Guttridge DC, Iwenofu OH. Expression of cancer-testis antigens MAGEA1, MAGEA3, ACRBP, PRAME, SSX2, and CTAG2 in myxoid and round cell liposarcoma. *Mod Pathol* 2014;27:1238–45.
- [17] Michal M, Fanburg-Smith JC, Lasota J, Fetsch JF, Lichy J, Miettinen M. Minute synovial sarcomas of the hands and feet: a clinicopathologic study of 21 tumors less than 1 cm. *Am J Surg Pathol* 2006;30:721–6.
- [18] Panoussopoulos D, Theodoropoulos G, Lazaris AC, Papadimitriou K. Focal divergent chondrosarcomatous differentiation in a primary pleomorphic liposarcoma and expression of transforming growth factor beta. *Int J Surg Pathol* 2004;12:79–85.
- [19] Kazakov DV, Pavlovsky M, Mukensnabl P, Michal M. Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor with a sarcomatous component recurring as high-grade myxofibrosarcoma. *Pathol Int* 2007;57:281–4.
- [20] Capovilla M, Birembaut P. Primary cutaneous myxofibrosarcoma mimicking pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor (PHAT): a potential diagnostic pitfall. *Am J Dermatopathol* 2006;28:276–7 [author reply 277–278].
- [21] Illueca C, Machado I, Cruz J, Almenar S, Noguera R, Navarro S, et al. Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor: a report of 3 new cases, 1 with sarcomatous myxofibrosarcoma component and another with unreported soft tissue palpebral location. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012;20:96–101.
- [22] Folpe AL, Weiss SW. Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor: analysis of 41 cases supporting evolution from a distinctive precursor lesion. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1417–25.
- [23] Mitsuhashi T, Barr RJ, Machtinger LA, Cassarino DS. Primary cutaneous myxofibrosarcoma mimicking pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor (PHAT): a potential diagnostic pitfall. *Am J Dermatopathol* 2005;27:322–6.
- [24] Smith ME, Fisher C, Weiss SW. Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor of soft parts. A low-grade neoplasm resembling neurilemoma. *Am J Surg Pathol* 1996;20:21–9.
- [25] Carter JM, Sukov WR, Montgomery E, Goldblum JR, Billings SD, Fritchie KJ, et al. TGFBR3 and MGEA5 rearrangements in pleomorphic hyalinizing angiectatic tumors and the spectrum of related neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2014;38:1182–992.



## ZÁVĚR

Doktorská dizertační práce uzavírá mé postgraduální studium z oboru patologie. Během studia jsem splnil jeho cíle. Se spoluautory jsme identifikovali a zdokumentovali případy neobvyklých tumorů kůže a měkkých tkání v rámci dědičných syndromů, s neobvyklým biologickým chováním, s minoritní kauzální spojitostí s příslušným onemocněním a rozdílnými fenotypy.

Případy byly publikovány ve čtyřech časopisech s impakt faktorem (u jednoho s hlavním autorstvím), jednom zahraničním recenzovaném časopise a čtyřech českých recenzovaných časopisech.

## BIBLIOGRAFIE

1. **ŠTORK, JIŘÍ.** *Dermatologie.* Praha : Galén, 2013.
2. **KAZAKOV DV, MICHAL M, KACEROVSKA D, McKEE PH.** *Cutaneous Axonal Tumors.* Philadelphia : Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
3. **COHEN PR, KOHN SR, KURZROCK R.** Association of sebaceous gland tumors and internal malignancy: the Muir-Torre syndrome. *Am J Med.* 1991, Sv. 90:606-13.
4. **SOUTH CD, HAMPEL H, COMERAS I, WESTMAN JA, FRANKEL WL, de la CHAPELLE A.** The frequency of Muir-Torre syndrome among Lynch syndrome families. *J Natl Cancer Inst.* 2008, Sv. 0;100(4):277-81, Feb.
5. **RISHI K, FONT RL.** Sebaceous gland tumors of the eyelids and conjunctiva in the Muir-Torre syndrome: a clinicopathologic study of five cases and literature review. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 2004, Sv. 20:31-6.
6. **STOCKL FA, DOLMETSCH AM, CODERE F, BURNIER MN, Jr.** Sebaceous carcinoma of the eyelid in an immunocompromised patient with Muir-Torre syndrome. *Can J Ophthalmol.* 1995, Sv. 30:324-6.
7. **GRAHAM R, McKEE P, McGIBBON D, HEYDERMAN E.** Torre-Muir syndrome. An association with isolated sebaceous carcinoma. *Cancer.* 1985, Sv. 55:2868-73.
8. **SCHWARTZ RA, TORRE DP.** The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. *J Am Acad Dermatol.* 1995, Sv. 33:90-104.
9. **RUTTEN A, BURGDORF W, HUGEL H, et AL.** Cystic sebaceous tumors as marker lesions for the Muir-Torre syndrome: a histopathologic and molecular genetic study. *Am J Dermatopathol.* 1999, Sv. 21:405-13.
10. **BURGDORF WH, PITHA J, FAHMY A.** Muir-Torre syndrome. Histologic spectrum of sebaceous proliferations. *Am J Dermatopathol.* 1986, Sv. 8:202-8.
11. **D, NAYLOR.** Seboacanthoma. *Arch Dermatol.* 1961, Sv. 84(4):642-644.
12. **FAHMY A, BURGDORF WH, SCHOSSER RH, PITHA J.** Muir-Torre syndrome: report of a case and reevaluation of the dermatopathologic features. *Cancer.* 1982, Sv. 49:1898-903.
13. **LYNCH HT, KRUSH AJ.** Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer.* 1971, Sv. Jun;27(6):1505-11.
14. **MEYER LA, BROADDUS RR, LU KH.** Endometrial cancer and Lynch syndrome: clinical and pathologic considerations. *Cancer Control.* 2009, Sv. 16:14-22.
15. **SCHULMANN K, BRASCH FE, KUNSTMANN E, et AL.** HNPCC-associated small bowel cancer: clinical and molecular characteristics. *Gastroenterology.* 2005, Sv. 128:590-9.
16. **GOECKE T, SCHULMANN K, ENGEL C, et AL.** Genotype-phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. *J Clin Oncol.* 2006, Sv. 24:4285-92.



17. **CAPELLE LG, van GRIEKEN NC, LINGSMA HF, et AL.** Risk and Epidemiological Time Trends of Gastric Cancer in Lynch Syndrome Carriers in The Netherlands. *Gastroenterology*. 2009, Sv. Feb;138(2):487-92.
18. **AKHTAR S, OZA KK, KHAN SA, WRIGHT J.** Muir-Torre syndrome: case report of a patient with concurrent jejunal and ureteral cancer and a review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 1999, Sv. 41:681-6.
19. **SPARR JA, BANDIPALLIAM P, REDSTON MS, SYNGAL S.** Intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas with loss of mismatch repair in a patient with Lynch syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2009, Sv. 33:309-12.
20. **OMAN SA, BALLINGER L, CERILLI LA.** Small cell carcinoma: arising in Lynch syndrome: a previously undocumented occurrence. *Int J Surg Pathol*. 2009, Sv. 17:46-50.
21. **BELLIZZI AM, FRANKEL WL.** Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol*. 2009, Sv. 16:405-17.
22. **KRUSE R, RUTTEN A, LAMBERTI C, et AL.** Muir-Torre phenotype has a frequency of DNA mismatch-repair-gene mutations similar to that in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families defined by the Amsterdam criteria. *Am J Hum Genet* 1998. 1998, Sv. 63:63-70.
23. **YUEN ST, CHAN TL, HO JW, et AL.** Germline, somatic and epigenetic events underlying mismatch repair deficiency in colorectal and HNPCC-related cancers. *Oncogene*. 2002, Sv. 21:7585-92.
24. **MATHIAK M, RUTTEN A, MANGOLD E, et AL.** Loss of DNA mismatch repair proteins in skin tumors from patients with Muir-Torre syndrome and MSH2 or MLH1 germline mutations: establishment of immunohistochemical analysis as a screening test. *Am J Surg Pathol*. 2002, Sv. 26:338-43.
25. **SHIA J, TANG LH, VAKIANI E, et AL.** Immunohistochemistry as first-line screening for detecting colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: a 2-antibody panel may be as predictive as a 4-antibody panel. *Am J Surg pathol*. 2009, Sv. 33:1639-45.
26. **ORTA L, KLIMSTRA DS, QIN J, et AL.** Towards identification of hereditary DNA mismatch repair deficiency: sebaceous neoplasm warrants routine immunohistochemical screening regardless of patient's age or other clinical characteristics. *Am J Surg Pathol*. 2009, Sv. 33:934-44.
27. **PONTI G, LOSI L, Di GREGORIO C, et AL.** Identification of Muir-Torre syndrome among patients with sebaceous tumors and keratoacanthomas: role of clinical features, microsatellite instability, and immunohistochemistry. *Cancer*. 2005, Sv. 103:1018-25.
28. **MACHIN P, CATASUS L, PONS C, et AL.** Microsatellite instability and immunostaining for MSH-2 and MLH-1 in cutaneous and internal tumors from patients with the Muir-Torre syndrome. *J Cutan Pathol*. 2002, Sv. 29:415-20.
29. **CHUNG DC, RUSTGI AK.** The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med*. 2003, Sv. 138:560-70.

30. **MANGOLD E, PAGENSTECHE C, LEISTER M, et AL.** A genotype-phenotype correlation in HNPCC: strong predominance of msh2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. *J Med Genet.* 2004, Sv. 41:567-72.
31. **DOMINGO E, LAIHO P, OLLIKAINEN M, et AL.** BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet.* 2004, Sv. 41:664-8.
32. **KIDAMBI TD, BLANCO A, van ZIFFLE J, TERDIMAN JP.** Constitutional MLH1 methylation presenting with colonic polyposis syndrome and not Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2016, Sv. Apr;15(2):275-80.
33. **JM, CARETHERS.** Differentiating Lynch-like from Lynch Syndrome. *Gastroenterology.* 2014, Sv. Mar;146(3):602-604.
34. **ARNOLD A, PAYNE S, FISHER S, et AL.** An individual with Muir-Torre syndrome found to have a pathogenic MSH6 gene mutation. *Fam Cancer.* 2007, Sv. 6:317-21.
35. **KACEROVSKA D, CERNA K, MARTINEK P, GROSSMANN P, MICHAL M, RICAR J, KAZAKOV DV.** MSH6 mutation in a family affected by Muir-Torre syndrome. *Am J Dermatopathol.* 2012, Sv. 34(6):648-52.
36. **LIGTENBERG MJ, KUIPER RP, CHAN TL, GOOSSENS M, HEBEDA KM, VOORENDT M, LEE TY, BODMER D, HOENSELAAR E, HENDRIKS-CORNELISSEN SJ, TSUI WY, KONG CK, BRUNNER HG, VAN KESSEL AG, YUEN ST, VAN KRIEKEN JH, LEUNG SY, HOOGERBRUGGE N.** Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet.* 2009, Sv. Jan;41(1):112-7.
37. **MESENKAMP AR, VOGELAAR IP, van ZEIST-STAMS WA, GOOSSENS M, OUCHENE H, HENDRIKS-CORNELISSEN SJ, KWINT MP, HOOGERBRUGGE N, NAGTEGAAL ID, LIGTENBERG MJ.** Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology.* 2014, Sv. Mar;146(3):643-646.
38. **JOLY MO, ATTIGNON V, SAURIN JC, DESSEIGNE F, LEROUX D, MARTIN-DENAVIT T, GIRAUD S, BONNET-DUPEYRON MN, FAIVRE L, AUCLAIR J, GRAND-MASSON C, AUDOYNAUD C, WANG Q.** Somatic MMR gene mutations as a cause for MSI-H sebaceous neoplasms in Muir-Torre syndrome-like patients. *Hum Mutat.* 2015, Sv. Mar;36(3):292-5.
39. **DUSEK M, HADRAVSKY L, CERNA K, STEHLIK J, SVAJDEL R, KOKOSKOVA B, DUBOVA M, MICHAL M, DAUM O.** Diagnóza Lynchova syndromu od patologa. *Klin Onkol.* 2016, Sv. 29(3):1-7.
40. **J, JÄRVINEN HEIKKI.** Ten years after testing for Lynch syndrome: Cancer incidence and outcome in mutation-positive and mutation-negative family members. *J Clin Oncol.* 2009, Sv. 27(28):4793-7.
41. **DAINA G, RAMOS L, OBRADORS A, RIUS M, MARTINEZ-PASARELL O, POLO A, DEL REY J, OBRADORS J, BENET J, NAVARRO J.** First successful double-factor PGD for Lynch syndrome: monogenic analysis and comprehensive aneuploidy screening. *Clin Genet.* 2013, Sv. 84(1):70-3.
42. **NIELSEN M, LYNCH H, INFANTE E, BRAND R.** MUTYH-associated polyposis. *Gene Reviws [Internet].* 2015.



43. **SÁNCHEZ YUS E, AGUILAR A, REQUENA L et AL.** Nevus elasticus and lichen sclerosus et atrophicus on the vulva. *Cutis*. 1990, Sv. 45:252-255.
44. **SHIBA Y, ONO K, AKIYAMA M et AL.** Increase of elastic fibers in lichen sclerosus et atrophicus. *J Cutan Pathol*. 2014, Sv. 41(8):646-649.
45. **ROSAI, JUAN.** *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. London : Elsevier Inc., 2011.
46. **SMITH ME, FISHER C, WEISS SW.** Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor of soft parts. A low-grade neoplasm resembling neurileioma. *Am J Surg Pathol*. 1996, Sv. 20:21-9.
47. **ILLUECA C, MACHADO I, CRUZ J, ALMENAR S, NOGUERA R, NAVARRO S, LLOMBART-BOSCH A.** Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor: a report of 3 new cases, 1 with sarcomatous myxofibrosarcoma component and another with unreported soft tissue palpebral location. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012, Sv. an;20(1):96-101.
48. **KAZAKOV DV, PAVLOVSKY M, MUKENSNABL P, MICHAL M.** Pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor with a sarcomatous component recurring as high-grade myxofibrosarcoma. *Pathol Int*. 2007, Sv. May;57(5):281-4.
49. **MITSUHASHI T, BARR RJ, MACHTINGER LA, CASSARINO DS.** Primary cutaneous myxofibrosarcoma mimicking pleomorphic hyalinizing angiectatic tumor (PHAT): a potential diagnostic pitfall. *Am J Dermatopathol*. 2005, Sv. Aug;27(4):322-6.
50. **MONTGOMERY EA, DEVANEY KO, GIORDANO TJ, et AL.** Inflammatory myxohyaline tumor of distal extremities with virocyte or Reed-Sternberg-like cells: a distinctive lesion with features simulating inflammatory conditions, Hodgkin's disease, and various sarcomas. *Mod Pat*. 1998, Sv. 11:384-391.
51. **M, MICHAL.** Inflammatory myxoid tumor of the soft parts with bizarre giant cells. *Pathology, research and practice*. 1998, Sv. 194:529-533.
52. **MEIS-KINDBLOM JM, KINDBLUM LG.** Acral myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: a low-grade tumor of the hands and feet. *Sm J Surg Pat*. 1998, Sv. 22:911-924.
53. **SAKAKI M, HIROKAWA M, WAKATSUKI S, et AL.** Acral myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: a report of five cases and review of the literature. *Virchows Arch*. 2003, Sv. Jan;442(1):25-30.
54. **HASSANEIN AM, ATKINSON SP, AL-QURAN SZ, JAIN SM, REITH JD.** Acral myxoinflammatory fibroblastic sarcomas: are they all low-grade neoplasms? *J Cutan Pathol*. 2008, Sv. Feb;35(2):186-91.
55. **LASKIN WB, FETSCH JF, MIETTINEN M.** Myxoinflammatory fibroblastic sarcoma: a clinicopathologic analysis of 104 cases, with emphasis on predictors of outcome. *Am J Surg Pathol*. 2014, Sv. Jan;38(1):1-12.
56. **HALLOR KH, SCIOT R, STAAF J, HEIDENBLAD M, RYDHOLM A, BAUER HC, ASTRÖM K, DOMANSKI HA, MEIS JM, KINDBLUM LG, PANAGOPOULOS I, MANDAHN N, MERTENS F.** Two genetic pathways, t(1;10) and amplification of 3p11-12, in myxoinflammatory fibroblastic sarcoma, haemosiderotic fibrolipomatous tumour, and morphologically similar lesions. *J Pathol*. 2009, Sv. Apr;217(5):716-27.

57. **CARTER JM, SUKOV WR, MONTGOMERY E, GOLDBLUM JR, BILLINGS SD, FRITCHIE KJ, FOLPE AL.** TGFBR3 and MGEA5 rearrangements in pleomorphic hyalinizing angiectatic tumors and the spectrum of related neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2014, Sv. Sep;38(9):1182-992.



## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

DNA - deoxyribonukleová kyselina, z angl. deoxyribonucleotide acid

dPeIN - diferencovaná penilní intraepiteliální neoplázie

CRC - kolorektální karcinomy

HNPCC - hereditární nepolypózní kolorektální karcinomy, z angl. hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma

LOH - ztráta heterozygosity, z ang. loss of heterozygosity

LS - Lynchův syndrom

MAP - *MUTYH* asociovaná polypóza

MIFS - myxoinflamatorní fibroblastický sarkom

MMR - mismatch repair

MPLA - multiplex ligation-dependent probe amplification

MSI - mikrostabilitně instabilní

MSS - mikrosatelitně stabilní

MTS - Muirův-Torreův syndrom

PGD - preimplantační genetická diagnostika

PHAT - pleomorfní hyalinizující angiektatický tumor

SVV - specifický vysokoškolský výzkum

WHO - Světová zdravotnická organizace, z angl. World Health Organization