

Diagnostika pacientov s Lynchovým syndrómom

RNDr. Katarína Závodná, PhD.^{1,2}, Ing. Ľudmila Vavrová¹, MUDr. Olívia Hamidová¹, Mgr. Ján Markus, PhD.^{1,3}, RNDr. Michal Konečný, PhD.^{1,5}, doc. MUDr. Karol Kajo, PhD.^{4,6}, RNDr. Regína Lohajová Behulová, PhD.^{1,2}

¹Oddelenie lekárskej genetiky, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

²Ústav genetiky a molekulovej medicíny Viliama Izakoviča, Lekárska fakulta, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

³MatTek IVLSL, Bratislava

⁴Ústav patológie SZU a OÚSA, Onkologický ústav sv. Alžbety, Bratislava

⁵GHC GENETICS SK, s. r. o., Univerzitný vedecký park Univerzity Komenského, Bratislava

⁶Ústav experimentálnej onkológie, Biomedicínske centrum SAV, Bratislava

Ciel: Cieľom práce bolo opísať možnosti genetického testovania slovenských pacientov na Onkologickom ústave sv. Alžbety.

Materiál a metódy: Pacienti s diagnostikovaným kolorektálnym karcinómom boli testovaní pomocou MSI analýzy a vo vybraných prípadoch sa pristúpilo aj k testovaniu zárodočných mutácií v *MMR* génoch.

Výsledky: U 771 pacientov s kolorektálnym karcinómom bola vykonaná MSI analýza, pričom MSI pozitívny status boli zistený v 104 prípadoch, 266 pacientov bolo testovaných na prítomnosť zárodočnej mutácie v *MMR* génoch (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), pričom v 31 prípadoch bola zistená zárodočná mutácia.

Záver: Genetické testovanie pri Lynchovom syndróme pomáha pacientom a lekárom pri výbere vhodnej liečby a takisto zachytiť medzi príbuznými jedincov s mutáciou, ktorým je následne ponúkaný špeciálny preventívny manažment.

Kľúčové slová: nádory hrubého čreva, dedičnosť, hereditárny nepolypózny karcinóm hrubého čreva (Lynchov syndróm), DNA, mutácie, „mismatch“ reparačné gény (*MMR*)

Diagnosics of patients of Lynch Syndrome

Aim: This paper describes the possibilities of genetic testing in Slovak patients with suspected Lynch syndrome at our workplace.

Material and methods: The DNA of patients diagnosed with colorectal cancer was assessed for MSI, and in selected cases for the presence of *MMR* germline mutations.

Results: A total of 771 patients with colorectal tumors were tested for MSI status and the MSI positive status (MSI-H or MSI-L) was identified in 104 of them. Subsequently, 266 patients were tested for germline mutations in *MMR* genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*), and a germline mutation was identified in 31 of them.

Conclusion: Genetic screening of patients with Lynch syndrome leads to improvements in health outcomes among *MMR* gene mutation carriers and members of their family. Clinicians now have a simple and accessible means of determining if an individual is a carrier of Lynch syndrome-associated genetic mutations.

Key words: colorectal cancer, inheritance, hereditary non-polyposis colon cancer (Lynch syndrome), DNA, mutations, mismatch repair genes (*MMR*)

Onkológia (Bratisl.), 2017; roč. 12(6): 414–420

Úvod

Výskyt nádorov hrubého čreva a konečníka (kolorekta) celosvetovo narastá a v krajinách strednej Európy predstavuje najčastejšiu malignitu. Kolorektálne karcinómy sa vyskytujú v dvoch formách: sporadické a dedične podmienené, pričom väčšinu kolorektálnych karcinómov tvoria sporadické formy. Asi 5 – 10 % zo všetkých prípadov nádorov hrubého čreva a konečníka patrí k dedičným typom nádorov. Najčastejšou formou je tzv. Lynchov syndróm (LS), ktorý je spôsobený zárodočnými mutáciami v génoch zodpovedných za opravu chybné spárovaných báz („mismatch“ reparačných génoch – *MMR* génoch). Záchyt pacientov so suspektným Lynchovým syndrómom je veľmi dôležitý z hľadiska samotnej diagnostiky, liečby a manažmentu pacienta.

Karcinómy hrubého čreva (CRC) patria medzi najčastejšie nádorové ochorenia vo vyspelých krajinách a Slovensko v tomto smere netvorí žiadnu výnimku. V našej krajine predstavuje CRC najčastejšie nádorové ochorenie s výskytom viac ako 3 400 nových prípadov ročne a incidenciou 58,7/100 000 obyvateľov (1). Typickým znakom CRC je vysoká morbidita a mortalita a z toho dôvodu sa kladie veľký dôraz na rozvoj účinnej prevencie. Hoci sa kolonoskopia ukazuje ako pomerne účinná metóda na skrining polypov v hrubom čreve, „ochota“ ľudí uvedomiť si možnosť vzniku CRC a následne podstúpiť uvedenú vyšetrovaciu metódu je veľmi nízka. Táto skutočnosť nastoľuje otázku, ako zlepšiť prevenciu CRC. Jednou z možností je snaha identifikovať vysokorizikové skupiny ľudí, medzi ktoré patria osoby s dedičnými formami CRC.

Okrem sporadickej formy časť spektra CRC reprezentujú dedičné formy (5 – 10 % zo všetkých CRC nádorov), z ktorých sú najznámejšie a najlepšie opísané familiárna adenomatózna polypóza (FAP) a hereditárny nepolypózny karcinóm kolorekta (HNPCC, Lynchov syndróm). FAP sa klinicky prejavuje vznikom stoviek až tisícok polypov v hrubom čreve a diagnostikuje sa okolo 27. roku života. Ochorenie je indukované zárodočnými mutáciami v *APC* géne (*adenomatous polyposis coli*). Pri LS sa ako premaligne štádium takisto vyskytujú polypy, ale v menšom počte (často iba jeden). Priemerný vek, kedy sa manifestuje ochorenie, je 45 rokov (2) a zárodočné mutácie sú lokalizované v génoch „mismatch“ opravy DNA (angl. Mismatch DNA Repair, *MMR*). Prevalencia LS je medzi 1 : 2 000 až 1 : 660 a z uvedených dôvodov sa zaraďuje

medzi takzvané zriedkavé choroby (ORPHA: 144) (23).

Hereditárny nepolypózny karcinóm kolorekta ako prvý opísal v jednej rodine Aldred Warthin v roku 1895 (publikoval v roku 1913) a tento prípad následne zrevidoval v roku 1971 Henry Lynch (Lynchov syndróm), ktorý určil jeho dedičný charakter (3). Pre ochorenie je charakteristické postihnutie viacerých generácií nádormi hrubého čreva alebo aj extrakolonickými nádormi, medzi ktoré patria: nádory maternice, vaječníkov, žalúdka, tenkého čreva, hepatobiliárneho traktu, mozgu a močovej sústavy (4), ďalším charakteristickým znakom je nižší vek nástupu ochorenia. U niektorých pacientov boli zistené synchronne (súčasny výskyt viacerých nádorov) a metachronne nádory (opakovaný výskyt nádorov na rôznych miestach s časovým odstupom).

Histopatologická charakteristika LS nádorov

Kolorektálne karcinómy pri LS vznikajú z adenómov, ktoré sú častejšie sesilné, s vilóznou architektonikou a vysokým stupňom dysplázie. Tieto adenómy sa vyznačujú zvýšenou infiltráciou lymfocytmi a zníženou apoptickou aktivitou v porovnaní so sporadickými adenómami. Transformácia z adenómu do invazívneho CRC pri LS je rýchla (približne 2 – 3 roky). Prognóza CRC pri LS je lepšia v porovnaní so sporadickými karcinómami a je vysvetľovaná výraznejšou hostiteľskou odpoveďou (5).

Histologicky sú LS-asociované nádory charakterizované častejšou nadprodukciou hlienu, prítomnosťou buniek pečatného prsteňa, infiltráciou lymfocytmi a reakciou pripomínajúcou Crohnovu chorobu.

Až 70 % nádorov je v pravej (proximálnej) časti hrubého čreva, pričom sporadické nádory sa vyvíjajú predovšetkým v ľavej (distálnej) časti hrubého čreva (6).

Molekulárno-genetická charakteristika LS nádorov

Lynchov syndróm (hereditárny nepolypózny karcinóm kolorekta – HNPCC) patrí medzi autozomálne dominantné dedičné ochorenie, pričom pacienti s mutáciou majú predispozíciu na vznik kolorektálneho karcinómu (CRC) alebo ďalších extrakolonických nádorov (adenokarcinómy endometria, žalúdka, karcinómy vaječníkov, močového traktu, tenkého čreva, nádory mozgu a kože).

Lynchov syndróm je spôsobený zárodočnými mutáciami v génoch „mismatch“ reparač-

Tabuľka 1. Medzinárodné klinické kritériá na testovanie pacientov so suspektným Lynchovým syndrómom

Názov	Kritériá
Amsterdamské kritériá I (AC I)	Najmenej traja príbuzní s kolorektálnym karcinómom, pričom všetky tieto kritériá musia byť splnené: <ul style="list-style-type: none"> ■ jeden z nich je prvostupňový príbuzný ostatných dvoch ■ sú postihnuté najmenej dve po sebe idúce generácie ■ minimálne jedna postihnutá osoba má menej ako 50 rokov ■ musí byť vylúčená FAP
Amsterdamské kritériá II (AC II)	Najmenej traja príbuzní s LS-asociovaným nádorom (črevo, endometrium, tenké črevo, močovod, obličky). Musia byť splnené všetky Amsterdamské kritériá I.
Bethesda kritériá (BG)	<ul style="list-style-type: none"> ■ Pacienti s nádormi z rodiny, ktorá spĺňa Amsterdamské kritériá ■ Pacienti s dvomi LS - asociovanými nádormi, zahrňujúce synchronne aj metachronne kolorektálne tumory alebo asociované extrakolonické nádory (v endometriu, vaječníkoch, žalúdku, hepatobiliárnom systéme, tenkom čreve alebo karcinóm obličkovej panvičky z prechodného epitelu, resp. močovodu) ■ Pacienti s kolorektálnym nádorom, ktorí majú prvostupňového príbuzného s kolorektálnym nádorom a/alebo s LS-asociovaným extrakolonickým nádorom a/alebo s kolorektálnym adenómom; jeden z nádorov je diagnostikovaný vo veku < 45 rokov a adenóm diagnostikovaný vo veku < 40 rokov ■ Pacienti s kolorektálnym alebo endometriálnym karcinómom diagnostikovaným vo veku < 45 rokov ■ Pacienti s pravostranným kolorektálnym karcinómom s nediferencovaným histopatologickým vzorom (solídny/kribriiformný), ktorý je diagnostikovaný vo veku < 45 rokov ■ Pacienti s kolorektálnym karcinómom s prstencovitými bunkami, ktorý je diagnostikovaný vo veku < 45 rokov (> 50 % prstencovitých buniek) ■ Pacienti s kolorektálnymi adenómami, ktoré sú diagnostikované vo veku < 40 rokov
Revidované Bethesda kritériá (RBG)	<ul style="list-style-type: none"> ■ Pacient má menej ako 50 rokov ■ Pacient má viaceré synchronne alebo metachronne LS-asociované tumory ■ Pacient má menej ako 60 rokov a má kolorektálny karcinóm s mikroskopickými charakteristikami nádorov s mikrosatelitovou nestabilitou (MSI) ■ Pacient má jedného alebo viacerých prvostupňových príbuzných vo veku ≤ 50 rokov s LS-asociovanými tumormi ■ Pacient má dvoch alebo viac prvostupňových alebo druhostupňových príbuzných, ktorí mali LS- asociovaný tumor v akomkoľvek veku

ného systému (*MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2, MLH3, MSH3*), ktorý sa zúčastňuje na oprave chybné zaradených báz, tzv. „mismatchov“.

Význam a úloha genetickej ambulancie

V prípade, ak lekár prvého kontaktu alebo lekár špecialista (napr. gastroenterológ, chirurg, gynekológ, atď.) zaznamená v ambulancii pacienta s viacnásobným výskytom nádorových ochorení v rodine, alebo viacnásobným výskytom nádorov u pacienta a tieto ochorenia sú diagnostikované v nízkom veku (pod 50 rokov), je vhodné uvedeného pacienta odporučiť ku klinickému genetikovi na genetickú konzultáciu. Klinický genetik v ambulancii zhodnotí osobnú a rodinnú anamnézu a stanoví predbežnú genetickú diagnózu. Dôležitý fakt je, že podľa aktuálnych poznatkov nie je v prípade každého nádorového ochorenia známy gén, ktorý sa spája s jeho predispozíciou. V prípade LS sú známe gény asociované s uvedeným syndrómom (7).

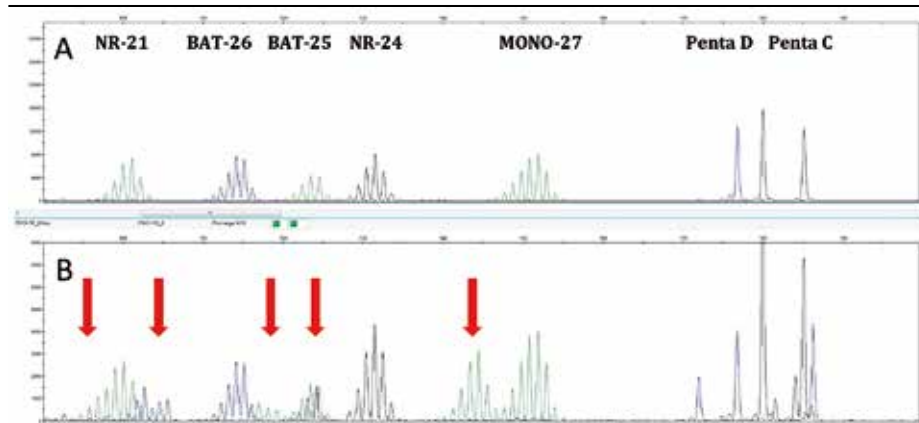
Snaha čo najlepšie identifikovať HNPCC suspektné rodiny viedla k vypracovaniu kritérií (tabuľka 1), ktoré umožňujú zlepšiť diagnostiku Lynchovho syndrómu. Vasen et al. (8) vypracovali prvé kritériá, tzv. Amsterdamské kritériá I, ktoré

boli následne modifikované na Amsterdamské kritériá II, pretože pôvodne nezohľadňovali výskyt extrakolonických tumorov v LS rodinách (9). V roku 1997 boli formulované Bethesda kritériá (10), ktoré zrevidovali v roku 2004 (11).

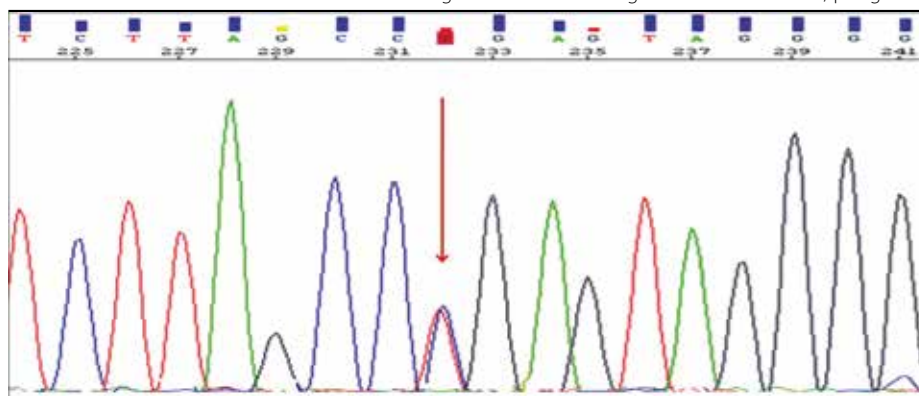
Ak pacient spĺňa medzinárodné indikačné kritériá (tabuľka 1), klinický genetik žiada molekulárne vyšetrenie DNA príslušných génov. Po ukončení analýzy DNA je pacient opäť pozvaný na konzultáciu ku klinickému genetikovi, ktorý mu interpretuje výsledok analýzy.

V rodinách, v ktorých sa identifikuje zárodočná mutácia u jedného člena rodiny (spravidla už postihnutého nádorovým ochorením), je možný cielený dôkaz tej istej mutácie aj u ostatných, väčšinou asymptomatických príbuzných. Asymptomatickí jedinci, u ktorých sa zistí zárodočná mutácia, sú následne zaradení do preventívneho programu včasného záchytu potenciálneho nádoru, ktorý absolvujú v odporučených časových intervaloch na príslušných zdravotníckych pracoviskách. Nositelia patologických mutácií v uvedených génoch majú zvýšené riziko vzniku karcinómu kolorekta (muži o 36 – 80 %, ženy o 18 – 76 %), a aj ďalších asociovaných nádorov ako napr. nádor endometria, vaječníkov, žalúdka, hepatobiliárneho traktu,

Obrázok 1. Príklad mikrosatelitovej instability. A: MSS nádor (nádor vyznačujúci sa mikrosatelitovou stabilitou), B: MSI-H nádor (nádor vyznačujúci sa mikrosatelitovou nestabilitou, nestabilné alely sú vyznačené červenou šípkou)



Obrázok 2. Príklad sekvenačného elektroforetogramu s mutáciou v gène *MSH2*: c.2131C>T, p.Arg711*



tenkého čreva, karcinómu obličkovej panvičky, mozgu a kože. Známy fakt je, že nie všetci jedinci s mutáciou musia aj ochoreť na nádorové ochorenie (ide o tzv. penetranciu génov zodpovedných za nádorové ochorenie, ktorá je pri LS približne 80 %). Na druhej strane, členovia rodiny, ktorí nie sú nositeľmi mutácie, sa nemusia zúčastňovať na takýchto špeciálnych vyšetreniach a ich riziko vzniku nádorového ochorenia sa rovná riziku vzniku daného nádorového ochorenia v bežnej populácii. Úlohou klinického genetika je aj v spolupráci s odbornými lekármi, ktorí sa starajú o pacientov s predispozíciou k nádorovým ochoreniam, navrhnuť program preventívnych prehliadok.

Imunohistochemická a molekulárno-genetická diagnostika pri Lynchovom syndróme

Na základe súčasnej úrovne poznatkov sa pri podozrení na LS a dostupnosti nádorového tkaniva analýza začína imunohistochemickým (IHC) vyšetrením proteínov MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2 v nádorovom tkanive a/alebo analýzou mikrosatelitovej instability (MSI) z DNA izolovanej z nádorového tkaniva pacienta.

Imunohistochemická analýza (IHC) MMR proteínov sa vykonáva na oddeleniach patoló-

gie. Väčšina mutácií MMR je spojená so stratou expresie MMR génov v jadrách nádorových buniek. Keďže MMR proteíny tvoria heterodiméry, strata expresie hlavného (obligátneho) génu (*MLH1* alebo *MSH2*) je sprevádzaná sekundárnou degradáciou proteínu v komplexe (*PMS2* alebo *MSH6*). Imunohistochemické vyšetrenie pomocou protilátok proti MMR proteínom (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*) umožňuje identifikáciu defektného proteínu, pričom výsledky IHC analýzy môžu byť využité v mutačnej analýze relevantného génu. Strata imunohistochemickej expresie *MLH1* a *PMS2* v nádorových bunkách poukazuje na kolorektálny karcinóm s mikrosatelitovou nestabilitou (MSI) (Lynchov syndróm alebo sporadickú formu kolorektálneho nádoru s MSI) (12).

Proteíny „mismatch“ reparačného systému (MMR) vo forme multiproteínových komplexov rozpoznávajú a opravujú chyby (tzv. „mismatche“) vznikajúce pri replikácii DNA. Porucha v MMR systéme spôsobí tzv. mutátorový efekt, v ktorého dôsledku dochádza k zvyšovaniu mutácií v iných génoch celého genómu, čo následne vedie ku karcinogéze. Neschopnosť buniek odstraňovať genetické zmeny, ktoré vznikli po replikácii DNA sa dá pozorovať najmä v tzv. mikrosatelitových repetitívnych sekvenciách DNA.

Poruchy v génoch „mismatch“ reparačného systému vedú k zmenám v počte opakovaní týchto sekvencií (100- až 1 000-krát), čo sa označuje ako mikrosatelitová nestabilita (MSI) (13). MSI je často sprievodným javom LS asociovaných tumorov a práve z tohto dôvodu sa DNA vyšetrenie LS suspektných jedincov začína vyšetrením MSI (obrázok 1). Viac ako 90 % LS asociovaných nádorov sa vyznačuje MSI pozitivitou, kým iba 15 % sporadických CRC má tento znak (14, 15). Medzi MSI pozitívne nádory sa zaraďujú MSI-H a MSI-L nádory. MSI-high (MSI-H) statusom sa označuje nádorové tkanivo, ktoré má instabilné aspoň 2 z 5 vyšetovaných markerov, pričom v prípade MSI-low (MSI-L) pozitivy je nestabilný iba jeden z vyšetovaných markerov.

Vhodným markerom na selekciu sporadických MSI nádorov, ktoré sa vyznačujú stratou expresie *MLH1* a *PMS2* génov, je vyšetrenie prítomnosti mutácie p.V600E v gène *BRAF* alebo metylácie promótoru *MLH1* génu v nádorovom tkanive. V prípade nádoru s dokázanou MSI nestabilitou a prítomnosťou mutácie v gène *BRAF* alebo metylácie promótoru *MLH1* ide s vysokou pravdepodobnosťou o sporadický typ kolorektálneho karcinómu (11).

Ak vyšetrenie IHC poukazuje na stratu expresie niektorého z uvedených génov a/alebo je pozitívny test na MSI (MSI-H aj MSI-L), prístupuje sa k testovaniu zárodočných mutácií v génoch *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*. V súčasnosti sa na detekciu zárodočných mutácií používa predovšetkým priame sekvenovanie DNA (obrázok 2) a metóda MLPA (Multiplex Ligation-dependent probe amplification) vhodná na detekciu dlhých delécií a duplikácií. Skúsenosti s detekciou zárodočných mutácií v slovenských LS suspektných rodinách boli bohato demonštrované vo viacerých prácach slovenských autorov (6, 16, 17, 18, 19, 20).

Súbor pacientov

Diagnostiku Lynchovho syndrómu bola na našom pracovisku zavedená v roku 2010. Prvými vyšetreniami boli stanovenie mikrosatelitovej instability a dôkaz zárodočných mutácií v génoch *MLH1* a *MSH2*, v ktorých sa mutácie vyskytujú najčastejšie. Postupne bola diagnostika rozšírená o testovanie zárodočných mutácií v gène *MSH6* a *PMS2*, somatickej mutácie p.V600E v gène *BRAF* a metyláciu promótoru génu *MLH1*. Aktuálne ponúkané spektrum testov pri LS zodpovedá najnovším európskym trendom.

Od roku 2010 do konca roka 2016 boli analýzy týkajúce sa LS vykonané v heterogénnom súbore pacientov:

Pacienti s dostupným nádorovým materiálom

Na naše pracovisko bolo zaslaných 771 pacientov (358 mužov a 413 žien) s kolorektálnym karcinómom (bez vekového obmedzenia) s požiadavkou na uskutočnenie MSI analýzy. Pacienti boli na vyšetrenie zaslaní z ambulancií klinických genetikov ako aj onkológov. MSI analýza bola vykonaná s cieľom vyselektovať skupinu pacientov so suspektným Lynchovým syndrómom.

Z uvedeného súboru časť MSI pozitívnych pacientov bola testovaná na prítomnosť zárodočných mutácií v génoch *MMR* v závislosti od výsledku IHC analýzy (na základe straty expresie niektorého génu sa pristúpilo k sekvenovaniu konkrétneho génu). Detaily sú rozobraté v kapitole výsledky a diskusia.

Pacienti s nedostupným nádorovým materiálom

Dvestoosem pacientov, u ktorých nebolo možné z rôznych dôvodov zabezpečiť nádorový materiál, boli zaslaní z ambulancie klinických genetikov na základe genetickej konzultácie, kde bolo zhodnotené, že spĺňali AC-I/II alebo BG/RBG kritériá. Vzhľadom na nedostupnosť nádorového tkaniva nebolo možné vykonať MSI a IHC analýzu a bolo nutné testovať priamo zárodočné mutácie vo všetkých *MMR* génoch (na základe údajov z databázy InSight database boli najprv testované gény *MLH1* a *MSH2*, v ktorých sa nachádza väčšina mutácií, následne gény *MSH6* a *PMS2*).

Metódy

MSI analýza

MSI status v nádorovom tkanive bol testovaný pomocou fluorescenčnej multiplexnej PCR komerčným setom MSI Analysis System 1.2 (Promega). Pri MSI analýze sa testujú mikrosatelitové markery BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 a MONO-27. Ide o špecifické časti DNA, ktoré sa porovnávajú medzi nenádorovým a nádorovým tkanivom. Nádor je klasifikovaný ako MSI-H (high) v prípade, že je nestabilita pozorovaná aspoň v 2 z 5 vyšetrených markerov. Nádor je klasifikovaný ako MSI-L (low) v prípade, že je nestabilný jeden z 5 vyšetrených markerov. Nádor, ktorý sa nevyznačuje nestabilitou v žiadnom markeri, je označovaný ako MSS (mikrosatellite stable).

Testovanie somatickej mutácie p.V600E v géne *BRAF* a metylácie promótoru *MLH1*

Dôkaz mutácie p.V600E v géne *BRAF* a stanovenie metylácie promótoru *MLH1* sme testovali

u pacientov s MSI-H statusom a stratou expresie *MLH1* a *PMS2*. V prípade nádoru vyznačujúceho sa prítomnosťou mutácie v géne *BRAF* a/alebo prítomnosťou metylácie *MLH1* promótoru ide o sporadický CRC, a nie o nádor asociovaný s Lynchovým syndrómom. Detekciu somatických mutácií v géne *BRAF* a metyláciu *MLH1* promótoru analyzujeme z nádorovej DNA. Mutácie v géne *BRAF* testujeme pomocou PCR analýzy a následnej SNaPshot analýzy (SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix, Thermo Fisher Scientific). Na stanovenie metylácie *MLH1* promótoru bol použitý komerčný set MLPA (SALSA MLPA ME011 Mismatch Repair genes probemix, MRC-Holland).

Priame sekvenovanie DNA a interpretácia získaných údajov

Mutácie v *MMR* génoch (všetky exóny a príslušné intróny génov *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) boli testované z DNA izolovanej z periférnej krvi pomocou priameho sekvenovania DNA použitím genetického analyzátoru ABI 3130, resp. ABI 3500 (Applied Biosystem, USA). Ak sa identifikuje v DNA určitý variant, jeho efekt je zhodnotený na základe rôznych dostupných databáz (napr. <http://insight-group.org/variants>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, <https://www.ensembl.org/>), prípadne na základe dostupnej literatúry. Ak sa uvedený variant v databáze a literatúre nenachádza, pristupujeme k použitiu bioinformatických nástrojov ako napr. PolyPhen, SIFT, ktoré na základe počítačových algoritmov určujú predpokladaný efekt daného identifikovaného variantu v DNA. V prípade, že je efekt variantu nejednoznačný, je možné odporučiť, aby klinický genetik navrhol pacientovi a jeho príbuzným segregačnú analýzu daného variantu v rodine.

Výsledky

MSI analýza

MSI analýzou bolo od roku 2010 do roku 2016 vyšetrených 771 pacientov s karcinómom kolorekta. V danom súbore sme MSI-H status zistili u 81 pacientov (10,5 %), MSI-L status u 23 pacientov (3 %). MSS statusom sa vyznačovalo 667 pacientov (86,5 %), (tabuľka 2). Celkový počet pozitívnych pacientov (MSI-H a MSI-L) bol 104 (13,5 %). Zo súboru 104 MSI pozitívnych pacientov bolo 58 pacientov následne analyzovaných na mutácie v *MMR* génoch. Nádory uvedených pacientov sa vyznačovali aj stratou expresie niektorého *MMR* génu a nebola u nich dokázaná mutácia v géne *BRAF* a metylácia v promótoru *MLH1*. Pacienti s nádorom vyznačujúcim sa MSS

Tabuľka 2. Porovnanie počtu analyzovaných MSI vzoriek v rokoch 2010 – 2016

Počet vzoriek	Roky 2010 – 2016
Počet pacientov spolu	771
Pacienti s MSI-H statusom	81 (10,5 %)
Pacienti s MSI-L statusom	23 (3 %)
Pacienti s pozitívnym MSI statusom (MSI-H a MSI-L)	104 (13,5 %)
Pacienti s MSS statusom	667 (86,5 %)

Tabuľka 3. Počet pacientov vyšetrených na prítomnosť mutácie v *MMR* génoch od roku 2010 – 2016

Počet pacientov	Roky 2010 – 2016
Počet pacientov spolu	266
Mutácia v géne <i>MLH1</i>	16 (6,0 %)
Mutácia v géne <i>MSH2</i>	9 (3,4 %)
Mutácia v géne <i>MSH6</i>	6 (2,2 %)
Mutácia v géne <i>PMS2</i>	0 (0 %)
Nezistené mutácie	234 (88 %)

statusom a IHC analýzou bez zmeny expresie niektorého génu neboli analyzovaní na prítomnosť/nepítomnosť zárodočných mutácií.

Analýza metylácie promótoru *MLH1*

Metylácia *MLH1* promótoru bola stanovená u 40 pacientov s nádorom kolorekta, ktoré sa vyznačovali MSI-H statusom a stratou expresie *MLH1* génu. V danom súbore sme metyláciu zistili u 17 pacientov (42,5%), 23 kolorektálnych nádorov pacientov (57,5 %) bolo bez metylácie.

Analýza mutácií v *MMR* génoch

Do skupiny pacientov, u ktorých sa testovali zárodočné mutácie pomocou priameho sekvenovania DNA v *MMR* génoch, boli zaradení:

1. pacienti s nádorom, ktorý sa vyznačoval MSI pozitivitou a boli vyselektovaní zo súboru 771 pacientov zaslaných na MSI analýzu (celkovo 58 pacientov),

2. pacienti, ktorí mali nedostupný nádor (celkovo 208 pacientov), ale spĺňali medzinárodné kritériá pre pacientov so suspektným LS. Z toho vyplýva, že celkový počet pacientov analyzovaných na mutácie v *MMR* génoch bol 266.

Mutácie v géne *MLH1* boli zistené u 16 pacientov (6,0 %). Deväť jedincov malo mutáciu v géne *MSH2* (3,4 %). *MSH6* gén bol mutovaný iba u 6 pacientov (2,2 %). Doteraz sme neidentifikovali mutáciu v géne *PMS2* (tabuľka 3).

Pacienti s nádorom vyznačujúcim sa MSS statusom a negatívnym výsledkom IHC (bez zmeny expresie niektorého génu) neboli analyzovaní na prítomnosť/nepítomnosť zárodočných mutácií.

Tabuľka 4. Spektrum zistených patologických mutácií spolu s osobnou anamnézou, kritériami a MSI a IHC statusom v rodinách testovaných na OÚSA od roku 2010 – 2016

Č. Pac.	OA	Kritériá	MSI	IHC MMR	Mutácia
1	CRC (47 r.)	BG	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MLH1: c.210_213delAGAA
2	CRC (26 r.)	AC-I	nedostupný materiál	strata <i>MH1/PMS2/</i>	MLH1: c.1772_1775delATAG
3	CRC (50 r.)	AC-I	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MSH2: c.1360_1367delATAGAAGinsTTCT
4	CRC (45 r.)	AC-I	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MLH1: c.531_532GG>CT
5	CRC (55 r.)	RBG	MSI-H	nedostupný materiál	MLH1: c.350C>T
6	CRC (48 r.)	AC-I	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MLH1: del ex5-6
7	zdravý (sestra CRC-35 r.)	BG	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MSH2: c.2211-1G>C
8	CRC (36 r.)	AC-I	MSI-H	nedostupný materiál	MLH1: c.531_532GG>CT
9	CRC (35 r.)	AC-I	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MLH1: c.1459C>T
10	Nejasná OA a RA	Nejasná OA a RA	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MSH6: c.3261insC
11	CaMa (65 r.)	BG	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MLH1: c.1149delG
12	EnCa (32 r.) CRC (43 a 49 r.)	AC-I	MSI-H	strata <i>MH1/PMS2/MSH2/MSH6</i>	MLH1: c.2136G>A
13	EnCa (50 r.)	AC-I	MSI-H	nedostupný materiál	MSH2: del ex1-7
14	CRC (46 r.)	BG	MSI-H	bez straty	MLH1: c.2265G>C
15	Nejasná OA a RA	Nejasná OA a RA	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MSH2: c.2042A>C
16	EnCa (49 r.)	BG	MSI-H	strata <i>MH1/PMS2/</i>	MLH1: c.1210_1211delCT,
17	CRC (44 r.)	AC-I	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MSH2: c.261delT
18	CRC (45 r.)	AC-I	MSI-H	strata <i>PMS2</i>	MLH1: c.2041G>A
19	CRC (27 r.)	BG	nejednoznačný materiál	nejednoznačný materiál	MSH2: del 1-3
20	CRC (63 r.)	AC-II	MSI-H	strata <i>MH1/PMS2/</i>	MLH1: c.199T>G
21	CRC (37 r.)	AC-II	nedostupný materiál	strata <i>MSH6</i>	MSH6: c.3437A>G
22	Nejasná OA a RA	Nejasná OA a RA	nedostupný materiál	nedostupný materiál	MSH2: dup 5-6 MSH2
23	EnCa (38 r.)	BG	deg.DNA	strata <i>MSH6/PMS2</i>	MSH6: c.2065G>C,
24	CRC (34 r.)	BG	MSI-H	strata <i>MH1/PMS2/</i>	MLH1: c.35_46del12
25	CRC (29 r.)	BG	MSS	strata <i>MSH6</i>	MSH6 c.516dupA
26	CRC (43 r.) seminóm (43 r.)	AC-I	MSI-H	strata <i>MH1/PMS2/</i>	MLH1: c.1644C>A,
27	CRC (79 r.)	AC-II	MSI-H	strata <i>MSH2/MSH6</i>	MSH2 del ex3-5
28	CRC (35 r.)	BG	MSI-H	strata <i>MSH2/MSH6</i>	MSH2: del ex1-16
29	CRC (57 r.)	RBG	MSI-H	strata <i>MSH6</i>	MSH6: c.3261delC
30	EnCa (36 r.)	AC-II	MSI-H	strata <i>MH1/PMS2/</i>	MLH1: c.307-2A>C
31	CRC (54 r.)	RBG	MSI-L	nedostupný materiál	MSH6: c.3263dup

Analýza spektra zistených mutácií

Spektrum zistených patologických mutácií spolu s diagnostickými kritériami, MSI a IHC statusom je zaznamenané v tabuľke 4. Určenie patologického efektu danej mutácie bolo vykonané podľa spomenutých prístupov, pričom v tabuľke sú uvedené iba mutácie s patologickým efektom.

Diskusia

Cieľom predloženej práce bolo opísať skúsenosti s diagnostikou Lynchovho syndrómu na našom pracovisku a zhodnotiť súbor pacientov zaslaných na naše pracovisko v priebehu rokov 2010 – 2016 na základe klinických kritérií, MSI statusu, resp. výsledkov IHC analýzy pri geneticky potvrdenom Lynchovom syndróme a spektra zistených mutácií.

Identifikáciu LS suspektných pacientov je vhodné začínať už priamo na oddeleniach patológie pomocou IHC analýzy MMR proteínov, keďže práve tu je možné urobiť efektívny záchyt všetkých LS suspektných kolorektálnych tumorov. Každý kolorektálny tumor by mal byť vyšetrený aj pomocou MSI analýzy (26, 27, 28). Uvedený postup sme zvolili aj na našom pracovisku. Považujeme za vhodné vykonávať aj IHC analýzu pri všetkých CRCa tumoroch, keďže význam IHC analýzy je v priamej identifikácii génu, ktorý má byť testovaný.

Informácie v literatúre poukazujú na fakt, že pacienti, ktorých nádory mali MSS status, môžu mať stratu expresie génu *MSH6*, čo je možné určiť pomocou IHC analýzy (23). Ide o tzv. LS „atypické rodiny“. V našom testovanom súbore je možné takýto nádor pozorovať pri pacientovi č. 25. Nádor pacienta sa vyznačoval MSS stavom, avšak IHC analýza poukázala na stratu expresie *MSH6* génu. Následne bola u pacienta identifikovaná zárodočná mutácia v géne *MSH6* (tzv. „atypická LS rodina“ – diskutované neskôr). Vzhľadom na uvedenú skutočnosť považujeme za prínosné testovať všetky CRC nádory na MSI status a aj pomocou IHC analýzy. Uvedeným spôsobom je možné zachytiť väčší súbor LS suspektných CRC nádorov.

Zo súboru 771 pacientov sa MSI pozitívnym statusom (MSI-L aj MSI-H status) vyznačovalo 104 (13,5 %) pacientov. Uvedené dáta zodpovedajú informáciám v odbornej literatúre, ktoré uvádzajú, že približne 10 – 15 % kolorektálnych nádorov má MSI pozitívny status (12, 22, 25).

Testovanie IHC a MSI statusu u všetkých pacientov s kolorektálnym nádorom umožňuje daných pacientov lepšie stratifikovať. Pacientom s kolorektálnym nádorom vyznačujúcim sa stra-

tou expresie niektorého MMR génu a MSI pozitívnym statusom je vhodné ponúknuť konzultáciu v ambulancii klinického genetika, pretože môže ísť o Lynchov syndróm. Na druhej strane u pacientov bez straty expresie MMR génov a s MSS nádorom s vysokou pravdepodobnosťou nejde o Lynchov syndróm, ale o sporadický typ CRC (v prípade silnej rodinnej anamnézy môže ísť o iný hereditárny nádorový syndróm, čo je na posúdení klinického genetika). Z nášho testovaného súboru 771 nádorov pacientov na MSI analýzu sa 104 vyznačovalo MSI pozitívnym statusom. 58 pacientov zo 104 navštívilo ambulanciu klinického genetika s cieľom následnej analýzy MMR génov.

Testovanie všetkých pacientov s kolorektálnym nádorom priamo po operácii predstavuje efektívnejší záchyt pacientov so suspektným Lynchovým syndrómom ako záchyt pacientov v ambulancii klinického genetika, kde sa dostane iba časť suspektných pacientov. Uvedený trend testovania možno sledovať vo svete a je na mieste, aby bol zavedený aj na celom Slovensku, nielen na našom pracovisku (26, 27, 28).

Vzhľadom na fakt, že nie všetci pacienti s nádormi vyznačujúcimi sa MSI-H stavom, sú LS suspektní, je vhodné vyselektovať sporadické nádory na základe pozitívneho (sporadický nádor) alebo negatívneho metylačného statusu MLH1 promótoru (pravdepodobne LS). V našom testovanom súbore sa až 42,5 % nádorov vyznačovalo metyláciou MLH1 promótoru. Uvedení pacienti neboli následne analyzovaní na prítomnosť zárodočných mutácií, čo je finančne veľmi efektívne. Pozitívny metylačný status MLH1 promótoru predstavuje efektívny test, ako u pacientov s MSI-H statusom a stratou expresie génu *MLH1* odlíšiť sporadické CRC od CRC asociovaných s Lynchovým syndrómom (12).

Spomínané analýzy, ako sú MSI, IHC, metylácia MLH1 promótoru, slúžia ako prvotné testy na zachytenie LS suspektných pacientov. Avšak samotné potvrdenie LS diagnózy je možné až v prípade, že sa identifikuje zárodočná mutácia v niektorom z MMR génov. V súbore 266 LS suspektných pacientov (1. pacienti s nádorom, ktorí sa vyznačovali MSI pozitívnosťou a boli vyselektovaní zo súboru 771 pacientov zaslaných na MSI analýzu (celkovo 58 pacientov) a 2. pacienti, ktorí mali nedostupný nádor (celkovo 208 pacientov), sme vyšetrovali zárodočné mutácie v génoch *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*. Mutáciu v niektorom z MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*) génov sme dokázali u 31 jedincov (11,6 %). Mutácie v géne *PMS2* sme v súbore našich testovaných pacientov nezistili. Nami zaznamenané dáta zodpovedajú

informáciám v odborných databázach (www.insight-group.org) a literatúre (28, 29, 30). Vo veľkej štúdii, ktorá zahrnovala viac ako 4 500 pacientov, mali záchyt mutácií na úrovni 12 %, čo koreluje s frekvenciou mutácií v našom súbore (29). Najvoľnejšie RBG (pacient má jedného alebo viacerých prvostupňových príbuzných vo veku ≤ 50 rokov s LS-asociovanými tumormi alebo pacient má dvoch alebo viac prvostupňových alebo druhostupňových príbuzných, ktorí mali LS-asociovaný tumor v akomkoľvek veku) umožňujú do testovania na LS zaradiť aj pacientov, ktorých nádor môže byť sporadický. V našom súbore bolo až 208 pacientov, ktorí mali nedostupný tumor a nebolo možné vykonať MSI, IHC analýzu a zistiť už v prvom kroku, či ide o nádor, ktorý je alebo nie je asociovaný s LS syndrómom.

V uvedenom súbore 31 pacientov s potvrdenou kauzálnou mutáciou spĺňalo striktné kritériá (AC-I alebo AC-II) pre Lynchov syndróm 15 pacientov a 13 pacientov spĺňalo voľnejšie BG alebo RBG kritériá. Vek nástupu prvého nádorového ochorenia v uvedenom súbore pacientov bol od 26 rokov po 79 rokov. Priemerný vek nástupu bol 44,2 roku, čo zodpovedá údajom v odbornej literatúre, kde je priemerný vek nástupu v 45. roku života pacientov (2). U 22 pacientov bol diagnostikovaný kolorektálny karcinóm, 5 pacientok malo diagnostikovaný karcinóm endometria a u jednej pacientky bol diagnostikovaný karcinóm prsníka. V prípade troch rodín sa nám nepodarilo získať jednoznačné informácie o osobnej a rodinnej anamnéze.

V súbore 31 pacientov so zistenou zárodočnou mutáciou sme pre nedostupnosť nádorového tkaniva nemohli určiť MSI a IHC status v 15 prípadoch. U 16 pacientov vyšetrených na MSI status sme u 14 pacientov dokázali MSI-H, u jedného MSI-L a taktiež jeden sa vyznačoval MSS statusom. Zaujímavosť je, že pacienti, ktorých nádory mali MSI-L a MSS status, mali zistenú zárodočnú mutáciu v géne *MSH6*, čo takisto koreluje s odbornou literatúrou (23). Odborná literatúra uvádza, že osobitnou kategóriou medzi LS rodinami sú tzv. „atypické rodiny“, ktoré nespĺňajú Amsterdamské kritériá. Tieto rodiny sa vyznačujú „potlačeným“ fenotypom s výrazne nižšou penetranciou a relatívne vyšším vekom vzniku karcinómov v porovnaní s „typickými“ HNPCC rodinami. Kým pre „typické“ HNPCC rodiny je väčšinou charakteristická mutácia v géne *MLH1* alebo *MSH2* a MSI, „atypické“ rodiny môžu mať mutáciu v géne *MSH6* a ich tumory sa nemusia vyznačovať MSI (22). Z uvedeného vyplýva, že v diagnostickej praxi má význam pri pacientoch s kolorektálnym karcinómom testovať nielen MSI status, ale aj IHC stav.

Spektrum zistených zárodočných mutácií bolo takéto: 16 pacientov malo mutáciu v géne *MLH1*, 9 pacientov malo mutáciu v géne *MSH2* a u 6 sme zistili mutáciu v géne *MSH6*. V uvedenom súbore testovaných pacientov sme pozorovali z hľadiska efektu mutácie na sekvenciu DNA: substitúcie (14 pacientov), delécie (7 pacientov), inzercie/duplikácie (3 pacienti), inzerčno-delečné mutácie (1 pacient) a aj mutácie postihujúce niekoľko exónov (6 pacientov).

Ak sa v rodinách zistila u pacienta/probanda kauzálna mutácia, ostatným príbuzným bola ponúknutá možnosť genetickej analýzy zameranej na dôkaz danej mutácie. Prínosom určenia kauzálnej mutácie zodpovednej za vznik LS je možnosť vyselektovať z asymptomatických príbuzných skupinu jedincov s mutáciou (pre-dispozíciou na nádorové ochorenie), ktorým je ponúknutý špeciálny preventívny program zameraný na včasnú diagnostiku nádorového ochorenia.

Určenie patologickej mutácie v súbore slovenských LS rodín nám umožňuje zhodnotiť frekvencie mutácií v jednotlivých génoch a posúdiť celý súbor pacientov s identifikovanými mutáciami z hľadiska nádorového spektra, veku pacienta v čase diagnózy a spektra zárodočných mutácií. Všetky spomínané informácie nám ponúkajú ucelený pohľad na súbor doteraz vyšetrených slovenských rodín s LS syndrómom a víziu, ako by sa mala diagnostika tohto ochorenia na Slovensku realizovať.

Záver

Molekulárno-genetická DNA diagnostika Lynchovho syndrómu sa v posledných dvoch desaťročiach zlepšila (diagnostika sa urýchlila a zaviedli sa nové diagnostické postupy), z čoho má benefit nielen samotný pacient, ale predovšetkým jeho asymptomatickí príbuzní so zdedenou mutáciou. Asymptomatickým príbuzným s mutáciou sú ponúknuté špeciálne preventívne programy zamerané na včasný záchyt nádorového ochorenia. Okrem testovania IHC, MSI, kauzálnych mutácií v MMR génoch (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*) je možné u pacientov so závažnou rodinnou anamnézou zvážiť aj testovanie panelu génov, ktoré sú asociované s rôznymi onkologickými hereditárnymi syndrómami.

Literatúra

1. Hlavatý T, Lukáč L, Ďuriš I. Is There Any Role for Prevention Strategies for Colorectal Cancer Other Than Population-Based Screening? *Bratisl. Lek. Listy*. 2004; 105(5-6):215–224.
2. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic Susceptibility to Non-Polyposis Colorectal Cancer. *J. Med. Genet.* 1999;36(11):801–818.

3. Lynch HT, Krush AJ. Cancer Family „G“ Revisited: 1895-1970. *Cancer*. 1971;27(6):1505–1511.
4. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*. 1993;71(3):677–85.
5. Greenson, JK. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome). In: *Diagnostic pathology. Gastrointestinal*. Eds. Greenson JK. 2nd ed. Elsevier Philadelphia, 2016. 498–500 pp. ISBN: 978-0-323-37673-0.
6. Bartosova Z, Fridrichova I, Bujalkova M, et al. Novel MLH1 and MSH2 germline mutations in the first HNPCC families identified in Slovakia. *Hum. Mutat*. 2003;21(4):449.
7. Cohen SA, Leininger A. The genetic basis of Lynch syndrome and its implication for clinical practice and risk management. *The Application of Clinical Genetics*. 2014;7:147–158.
8. Vasen HF, Mecklin JP, Khan P, et al. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum*. 1991;34(5):424–425.
9. 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.
10. Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Pekka-Mecklin J, et al. Rectal Cancer Risk in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer After Abdominal Colectomy. International Collaborative Group on HNPCC. *Ann. Surg.* 1997;225(2):202–207.
11. 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.
12. Geiersbach KB, Samowitz MD. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*. 2011;135(10):1269–1277.
13. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, et al. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat. Genet.* 1994;6(3):273–281.
14. Helland A, Borresen-Dale AL, Peltomaki P, et al. Microsatellite Instability in Cervical and Endometrial Carcinomas. *Int. J. Cancer*. 1997;70(53):499–501.
15. Niessen RC, Berends MJ, Wu Y, et al. Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours associated with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut*. 2006;55(12):1781–1788.
16. Zavadna K, Bujalkova M, Krivulcik T, et al. Novel and recurrent germline alterations in the MLH1 and MSH2 genes identified in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients in Slovakia. *Neoplasma*. 2006;53(4):269–276.
17. Bujalkova M, Zavadna K, Krivulcik T, et al. Multiplex SNaPshot genotyping for detecting loss of heterozygosity in the mismatch-repair genes MLH1 and MSH2 in microsatellite-unstable tumors. *Clinical Chemistry*. 2008;54(11):1844–1854.
18. Zavadna K, Krivulcik T, Bujalkova M, et al. Partial loss of heterozygosity events at the mutated gene in tumors from MLH1/MSH2 large genomic rearrangement carriers. *BMC Cancer*. 2009;9:405.
19. Alemayehu A, Tomkova K, Zavadna K, et al. The role of clinical criteria, genetic and epigenetic alterations in Lynch-syndrome diagnosis. *Neoplasma*. 2007;54(5):391–401.
20. Alemayehu A, Sebova K, Fridrichova I. Redundant DNA methylation in colorectal cancers of Lynch-syndrome patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008;47(10):906–914.
21. Zavadna K, Milly M, Vavrova L, et al. Dedičné nádorové syndrómy. *Onkológia (Bratisl.)*. 2015;10(2):84–89.
22. Copija A, Waniczek D, Witkoš A, et al. Clinical significance and prognostic relevance of microsatellite instability in sporadic colorectal cancer patients. *In Int J Mol Sci*. 2017;18(1):107.
23. Nilbert M, Wikman FP, Hansen TV, et al. Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. *Fam. Cancer*. 2009;8(1):75–83.
24. ORPHANET: Available from: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>, Accessed April 15, 2017.
25. InSight database: Available from: <http://insight-group.org/variants>, Accessed April 30, 2017.
26. 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.
27. Piñol V, Castells A, Andreu M, et al. Gastrointestinal oncology group of the Spanish gastro-enterological association. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*. 2005;293(16):1986–1994.
28. Moreira L, Balaguer F, Lindor N, et al. EPI-COLON Consortium. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA*. 2012;308(15):1555–1565.
29. Kastrinos F, Balmaña J, Syngal S. Prediction models in Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2013;12(2):217–228.
30. Sunga AY, Ricker C, Espenschied CR, et al. *Cancer Heret*. 2017;2012-2013:1-7.
31. ClinVar database: Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>, Accessed April 30, 2017;1-7
32. Ensemble database: Available from: <https://www.ensembl.org/>, Accessed April 30, 2017.

Táto práca bola podporená projektovou aktivitou: „Vybudovanie Kompetenčného centra pre výskum a vývoj v oblasti molekulárnej medicíny“ ITMS kód Projektu: 26240220071.

RNDr. Katarína Zavadná, PhD.

Oddelenie lekárskej genetiky
Onkologický ústav sv. Alžbety
Heydukova 10, 812 50 Bratislava
katarina.zavadna@ousa.sk

