

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Studijní program: Doktorský studijní program v biomedicině  
Studijní obor: Zobrazovací metody v lékařství



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**MUDr. Mária Gregová**

**Morfologická, imunohistochemická a molekulární analýza  
leiomyocelulárních nádorů ženského pohlavního systému.**

*Morphological, immunohistochemical, and molecular analysis of  
leiomyocellular tumors of the female reproductive system.*

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.

Praha, 2022

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 22. 3. 2022

Mária Gregová

.....  
podpis

**Identifikační záznam:**

GREGOVÁ, Mária. Morfologická, imunohistochemická a molekulární analýza leiomyocelulárních nádorů ženského pohlavního systému. [Morphological, immunohistochemical and molecular analysis of leiomyocellular tumors of the female reproductive system]. Praha 2022, 123 stran, 27 příloh. Doktorská disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Školitel Dunder, Pavel

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Pavlovi Dundrovi, Ph.D. za důsledné vedení a cenné rady při zpracování a psaní práce, RNDr. Ivaně Stružinské, Ph.D. za rady v oblasti molekulární patologie a svému manželovi za trpělivost.

Disertační práce byla vypracována v rámci doktorského studijního programu v biomedicíně na Ústavu patologie 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v letech 2017-2022 s podporou grantových projektů Ministerstva zdravotnictví ČR (projekt RVO-VFN 64165).

**Obor:** Zobrazovací metody v lékařství

**Předseda oborové rady:** doc. MUDr. Andrea Burgetová, Ph.D., MBA

**Školící pracoviště:** Ústav patologie 1. LF UK a VFN, Studničkova 2, Praha 2, 128 00

**Autor:** MUDr. Mária Gregová

**Školitel:** prof. MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.

## Seznam použitých zkratek

<i>ALK</i>	gen ALK (Anaplastic lymphoma kinase)
ALK	kináza anaplastického lymfomu
<i>ATRX</i>	gen ATRX (Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked)
bp	pár bazí (base pair)
<i>CDKN2A</i>	gen CDKN2A (Cyclin dependent kinase inhibitor 2A)
cDNA	komplementární DNA
CL	celulární leiomyom/y
<i>COL4A5</i>	gen COL4A5 (Collagen type IV alpha 5 chain)
<i>COL4A6</i>	gen COL4A6 (Collagen type IV alpha 6 chain)
ER	estrogenové receptory
FFPE	materiál fixovaný ve formolu a zalitý do parafinu (formalin-fixed paraffin-embedded)
<i>FH</i>	gen FH (Fumarate hydratase)
G	oblasti bez přítomností bizarních jader v LBN
<i>GLUT1</i>	gen GLUT1 (Glucose transporter protein type 1)
HGVS	Human Genome Variation Society
<i>HIF1-<math>\alpha</math></i>	gen HIF1- $\alpha$ (Hypoxia-inducible factor 1 - alpha)
HLRCC	syndrom hereditární leiomyomatózy a renálního karcinomu
<i>HMGA1</i>	gen HMGA1 (High Mobility Group AT-Hook 1)
<i>HMGA2</i>	gen HMGA2 (High Mobility Group AT-Hook 2)
HPF	zorné pole velkého zvětšení (obj. 40, zvětšení 400x)
IHC	imunohistochemie, imunohistochemický/á
Ki-67	imunohistochemický marker pro proliferační aktivitu
LBN	leiomyom/y s bizarními jádry

LG ESS	low grade endometriální stromální sarkom/y
LMS	leiomyosarkom/y
<i>MED12</i>	gen MED12 (Mediator complex subunit 12)
MKN-O	mezinárodní klasifikace onkologických nemocí
ML	mitoticky aktivní leiomyom
mRNA	messenger RNA (informační/mediátorová RNA)
NGS	sekvenování nové generace (next generation sequencing)
<i>NTRK</i>	geny NTRK (neurotrophic tyrosine kinase)
p16	protein p16
p53	protein p53
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
PD-1	programed cell death 1
PD-L1	programmed death-ligand 1
PHD	prolylhydroxyláza
PHH3	Fosfo-histon H3
PR	progesteronové receptory
qPCR	kvantitativní PCR
R	oblasti s přítomností bizarních jader v LBN
<i>RB1</i>	gen RB1 (Retinoblastoma 1)
2SC	S-(2-sukcino)-cystein
STUMP	hladkosvalový nádor nejistého maligního potenciálu
TMA	tkáňový mikročip (tissue microarray)
<i>TP53</i>	gen TP53 (Tumor protein p53)
UL	klasický leiomyom/y
<i>VEGF</i>	gen VEGF (Vascular endothelial growth factor)

WHO Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)

**Klíčová slova:** LBN, CL, FH, HLRCC, tumorigeneze, imunohistochemie, mutační analýza, prediktivní markery, prognostické markery

## OBSAH

---

1. ÚVOD .....	9
1.1. Mezenchymové nádory vycházející z hladké svaloviny .....	9
1.1.1. Epidemiologie .....	9
1.1.2. Klinické příznaky .....	10
1.1.3. Patogeneze.....	11
1.1.4. Makroskopický obraz.....	13
1.1.5. Mikroskopický obraz.....	14
1.1.6. Léčba .....	15
1.2. Leiomyom s bizarními jádry .....	16
1.3. Celulární leiomyom.....	18
1.4. Fumarát hydratáza .....	19
1.5. Vybrané prognostické a prediktivní markery .....	24
2. VYMEZENÍ CÍLŮ PRÁCE.....	30
3. MATERIÁL A METODIKA .....	32
3.1. Výběr souboru .....	32
3.2. Morfologická analýza leiomyomů s bizarními jádry a celulárních leiomyomů.....	33
3.3. Imunohistochemická analýza hladkosvalových nádorů .....	35
3.3.1. Imunohistochemická analýza s protilátkou FH (anti-FH).....	35
3.3.2. Imunohistochemická analýza s dalšími protilátkami .....	36
3.3.2.1. Protilátky hladkosvalové diferenciaci .....	36
3.3.2.2. Stanovení biologické povahy leiomyocelulárních nádorů .....	37
3.3.2.3. Imunohistochemická exprese potenciálně prediktivních markerů .....	38
3.4. Molekulární analýza.....	39
3.5. Statistická analýza .....	42
4. VÝSLEDKY .....	42
4.1. Klinická data leiomyomů s bizarními jádry a celulárních leiomyomů .....	42
4.2. Morfologické zhodnocení leiomyomů s bizarními jádry .....	44
4.3. Morfologické zhodnocení celulárních leiomyomů .....	47
4.4. Imunohistochemické vyšetření.....	48
4.4.1. FH (anti-FH).....	48
4.4.2. Další analyzované protilátky .....	50
4.4.2.1. Imunohistochemické markery hladkosvalové diferenciaci .....	50
4.4.2.2. Pomocné markery při stanovení biologické povahy leiomyocelulárních nádorů .....	50
4.4.2.3. Imunohistochemická exprese potenciálně prediktivních markerů .....	53



4.5. Molekulární analýza.....	54
5. DISKUZE.....	58
6. ZÁVĚR.....	73
7. ABSTRAKT.....	77
8. SUMMARY .....	79
9. LITERATURA.....	82
10. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA .....	100

# 1. ÚVOD

---

## 1.1. Mezenchymové nádory vycházející z hladké svaloviny

Mezenchymové nádory hladkosvalové diferenciace patří mezi nejčastější nádory ženského vnitřního genitálu, které postihují převážně děložní tělo. Podle biologických vlastností rozdělujeme nádory na benigní (leiomyomy), maligní (leiomyosarkomy) a nádory nejistého maligního potenciálu (STUMP – smooth muscle tumour of uncertain malignant potential). Mezi další lokality vzniku hladkosvalových nádorů patří kůže, gastrointestinální trakt, močový systém a další oblasti, kde se vyskytují buňky hladké svaloviny.

### 1.1.1. Epidemiologie

Leiomyomy dělohy patří mezi nejčastější nádory těla děložního a jsou diagnostikovány převážně ve středním věku, kolem 40-45 let; leiomyomy s bizarními jádry (LBN) se mohou vyskytovat již o dekádu dříve (Kurman RJ. et al, 2019). U žen v druhé dekádě se incidence pohybuje kolem 4,3 na 1000 žen, naproti tomu u žen ve čtvrté dekádě je to 22,5 na 1000 žen (Kubinová K. et al., 2013). Leiomyomy se častěji vyskytují u afroamerických žen a méně u bílé rasy (Kurman RJ. et al, 2019). S ohledem na zastoupení jednotlivých morfologických subtypů, v 90 % se jedná o běžné leiomyomy (UL) (konvenční; obvyklého typu), v 10 % jde o speciální varianty (Cree IA. et al., 2020) [tabulka 1].

Leiomyosarkomy (LMS) jsou nejčastější sarkomy děložního těla (~ 40-50 %), představují však pouze 1-2 % všech maligních nádorů této oblasti (Cree IA. et al., 2020). Ve srovnání s benigním protějškem se vyskytují zhruba o dekádu později, kolem 50-55 let (Abeler VM. et al., 2009; Giuntoli RL. 2nd et al., 2003).

Tabulka 1: Přehled hladkosvalových nádorů ženského genitálu

<b>Histologický typ</b>	<b>MKN-O</b>
<b>LEIOMYOM</b>	
klasický typ	8890/0
lipoleiomyom	8890/0
apoplektický leiomyom	8890/0
hydropický leiomyom	8890/0
disekující leiomyom	8890/0
celulární leiomyom	8892/0
myxoidní leiomyom	8896/0
epiteloidní leiomyom	8891/0
leiomyom s bizarními jádry	8893/0
metastázující leiomyom	8898/1
<b>STUMP</b>	8897/1
epiteloidní STUMP	8891/1
myxoidní STUMP	8896/1
vřetenobuněčný STUMP	8896/1
<b>LEIOMYOSARKOM</b>	8890/3
vřetenobuněčný LMS	8891/3
epiteloidní LMS	8891/3
myxoidní LMS	8896/3

legenda: MKN-O – mezinárodní klasifikace onkologických nemocí, STUMP – hladkosvalový nádor nejistého maligního potenciálu, LMS – leiomyosarkom

### 1.1.2. Klinické příznaky

Klinická prezentace leiomyomů závisí na jejich počtu, velikosti a lokalizaci (Bukulmez O. et Doody KJ., 2006), část z nich bývá asymptomatická. Nejčastějšími příznaky jsou abnormální vaginální krvácení vyskytující se zejména u submukózních nádorů a tlak v podbřišku s bolestivostí. Intramurální leiomyomy způsobují tvarové deformity dělohy, naopak subserózní pendulující leiomyomy mohou podlehnout torzi a infarzaci. Submukózní leiomyomy někdy protrudují přes cervikální kanál až do pochvy. Přítomnost leiomyomů může způsobit komplikace v souvislosti s těhotenstvím, a to spontánní potraty, poškození plodových obalů, dystokii ramének při porodu, poporodní krvácení a jiné. V neposlední řadě může dojít k sekundární infekci nádoru, což vyústí v horečku, leukocytózu a další zánětlivé příznaky (Kurman RJ. et al, 2019).

Pacientky s LMS mají nespecifické příznaky v podobě abnormálního vaginálního krvácení, pánevní bolesti či pocitu tumorózní masy (Giuntoli RL. 2nd et al., 2003; Cree IA. et

al., 2020). Gastrointestinální a urogenitální symptomatologie se objevuje při regionálně pokročilejším procesu. Méně často se objevuje hemoperitoneum z důvodu ruptury tumoru. Při metastatickém rozsevu mohou být přítomny i další příznaky, například dušnost při plicních metastázách nebo paraneoplastický syndrom (Cree IA. et al., 2020).

### 1.1.3. Patogeneze

Většina leiomyomů vzniká z jedné transformované somatické mezenchymové buňky. Při souběžném výskytu více nádorů (*uterus myomatosus*) může být společný původ doplněn dalšími sekundárními subklonálními genetickými aberacemi (Mehine M. et al., 2015). Mezi nejčastější molekulární změny patří mutace genů *MED12* (*Mediator complex subunit 12*), *FH* (*Fumarate hydratase*), *HMGA2* (*High Mobility Group AT-Hook 2*), *HMGA1* (*High Mobility Group AT-Hook 1*) a delece krátkého raménka chromozomu 1 (1p) [tabulka 2]. Změny v těchto genech jsou u jednotlivých nádorů vzájemně se vylučující. Méně časté alterace zahrnují chromozomální 7q22 delecii (*CUX1*) a 22q delecii (*DEPDC5* a *SMARCB1*) (Cree IA. et al., 2020; Kurman RJ. et al., 2019). Gen *DEPDC5* byl popsán jako potenciálně nový tumor supresorový gen, který hraje roli v progresi děložních leiomyomů, data však doposud nejsou jednoznačná (Mehine M. et al., 2015).

S ohledem na LBN a celulární leiomyomy (CL) nebyly specifické molekulární změny dlouho známé a data jsou poměrně limitovaná. Recentní studie ukazují, že LBN sdílejí některé genetické změny s UL, ale také s LMS, nicméně jejich frekvence se liší (Liegł-Atzwanger B. et al., 2016; Mäkinen N. et al., 2017; Barker KT. et al., 2006). Výrazně patrný rozdíl je zejména v alteracích genu *FH* (germinálních i somatických), včetně aberantní (chybějící) exprese jeho proteinu, které byly popsány hlavně u LBN, ale u UL a LMS jsou vzácné (Mäkinen N. et al., 2017; Lehtonen R. et al., 2004; Harrison WJ. et al., 2016; Ylisaukko-oja SK. et al., 2006). U CL jsou alterace ve výše uvedených genech zastoupeny s jinou frekvencí.

Mutace genu *MED12* je popsána v cca 5-16 % CL (Mäkinen N. et al., 2013; Mäkinen N. et al., 2017), *HMGA2* overexprese 0-32 % (Äyräväinen A. et al., 2020; Mäkinen N. et al., 2017) a mutace v genu *FH* 0-2,5 % (Äyräväinen A. et al., 2020; Barker KT. et al., 2002; Mäkinen N. et al., 2017). Pouze v jedné studii byla mutace *FH* prokázána v 1/25 případů CL (4 %) (Mäkinen N. et al., 2017). Další literárně popsanou aberací je delece krátkého raménka (p) chromozomu 1, kterou lze nalézt až ve 25 % případů CL (Christacos NC. et al., 2006; Hodge JC. et al., 2014).

U LMS bylo popsáno množství molekulárních abnormalit, včetně komplexních numerických a strukturálních chromozomálních aberací, ale žádná není specifická. Mezi nejčastější patří mutace genů *TP53*, *ATRX* a *MED12* [tabulka 3] (Cree IA. et al., 2020; An Y. et al., 2017; Yang CY. et al., 2015; Mäkinen N. et al., 2016). Bylo prokázáno, že pacienti s LMS s mutací genu *ATRX* mají horší přežití než pacienti bez této mutace (Yang CY. et al., 2015). *ATRX* mutované LMS vykazovaly alternativní prodloužení telomer (alternative lengthening telomeres (ALT), „ALT phenotype“) a tím pádem nesmrtnost nádorových buněk (Yang CY. et al., 2015; Mäkinen N. et al., 2016). Stanovení stavu genu *ATRX* může mít v budoucnosti prognostický i prediktivní význam. Tzv. „ALT fenotyp“ je pozorován v různých nádorech, což naznačuje, že inhibitory ATR, které byly nedávno objeveny, by mohlo být možné v budoucnu používat pro léčbu tumorů s deficitem *ATRX*, a mohly by tedy představovat potenciální novou terapeutickou možnost i pro pacienty s LMS (Mäkinen N. et al., 2016).

Recentní studie navíc ukazují, že LMS jsou heterogenní skupina, kterou lze rozdělit do 2 typů dle přítomnosti různých molekulárních abnormalit. Subtyp I, low grade děložní LMS, je charakterizovaný nadměrnou expresí genů ovlivňující funkci hladkého svalstva, jako jsou *LMOD1*, *SLMAP*, *MYLK* a *MYH11*. Naproti tomu subtyp II, high grade děložní LMS, je

charakterizován nadměrnou expresí genů zapojených do cesty epitelomezenchymové tranzice, jako jsou *CDK6*, *MAPK13* a *HOXA1* (An Y. et al., 2017).

Tabulka 2: Frekvence molekulárních alterací u leiomyomů (převzato z WHO klasifikace nádorů ženského genitálu, 2020)

gen	<i>MED12</i>	<i>HMGA2</i> a <i>HMGAI</i>	<i>COL4A5</i> a <i>COL4A6</i>	<i>FH</i>
frekvence	70 %	25-29 %	4 %	1 %

legenda: *MED12* – mediator complex subunit 12, *HMGA2* – high mobility group AT-hook 2, *HMGAI* – high mobility group AT-hook 1, *COL4A5* – collagen type IV alpha 5 chain, *COL4A6* – collagen type IV alpha 6 chain, *FH* – fumarate hydratase

Tabulka 3: Frekvence molekulárních alterací u leiomyosarkomů (převzato z WHO klasifikace nádorů ženského genitálu, 2020)

gen	<i>TP53</i>	<i>ATRX</i>	<i>MED12</i>
frekvence	~ 30 %	~ 25 %	~ 20 %

legenda: *TP53* – tumor protein p53, *ATRX* – alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked, *MED 12* – mediator complex subunit 12

#### 1.1.4. Makroskopický obraz

Leiomyomy se většinou vyskytují vícečetně, vzácněji jde o solitární léze. Jsou dobře ohraničené od okolní tkáně, ale nemají vlastní pouzdro. Jedná se o nádory tuhé konzistence, na řezu bílé, bílo-růžové či bílo-šedé barvy, s fascikulární úpravou. Většinou nejsou patrné hemoragie ani nekrózy. V části případů, převážně u objemných nádorů, se může vyskytnout nekróza, která je způsobená ischemií nádoru (ischemický / hyalinní typ nekrózy), s patrnými následky jejího hojení (jizvení, hyalinizace, siderofágy). Kromě toho se ve speciálních subtypech leiomyomů může vyskytovat makroskopicky odlišný vzhled nádorové tkáně, např. apoplektický leiomyom bude výrazně hemoragický, což může souviset s terapií progesterony; myxoidní leiomyom bude gelatinózní konzistence; lipoleiomyom bude obsahovat žluté oblasti tvořené tukovou tkání, atd.

LMS jsou většinou solitární, měkké nádorové masy, na řezu masitého vzhledu s četnými ložisky hemoragie a nekrózy. Průměrná velikost nádoru je 10 cm, ale až 25 %

nádorů může být < 5 cm. Ohraničení sarkomu od okolní tkáně je většinou neostré, s infiltrativním typem růstu.

### 1.1.5. Mikroskopický obraz

Diagnóza hladkosvalových nádorů je založena na pečlivém zhodnocení makroskopických a zejména mikroskopických kritérií. Stanovení biologické povahy se opírá o 3 základní histologické parametry, zahrnující přítomnost / nepřítomnost nádorového typu nekrózy, přítomnost / nepřítomnost signifikantních jaderných atypií, a počet mitóz. Diferenciálně diagnostická rozvaha pro zařazení hladkosvalových nádorů dle biologických vlastností je uvedena v tabulce 4.

Vzhledem k možné nádorové heterogenitě u leiomyocelulárních nádorů platí, že spolehlivé mikroskopické zhodnocení léze je možné pouze v případě kompletně vyšetřené léze, nikoliv při odběru materiálu z kyretáže nebo core-cut biopsie. I přes neustálý rozvoj znalostí týkajících se molekulárních aberací v současné době nejsou k dispozici spolehlivé molekulární markery rozlišující mezi benigními a maligními hladkosvalovými nádory.

Tabulka 4: Histologická kritéria pro diagnózu hladkosvalových nádorů dělohy (převzato z Kurman R.J. et al, 2019)

<b>Nekróza, nádorový typ</b>	<b>Jaderné atypie</b>	<b>Počet mitóz na 10 HPF</b>	<b>Diagnóza</b>
přítomna	difúzní, střední / těžké	různý	LMS
přítomna	žádné / mírné	≥ 10	LMS
přítomna	žádné / mírné	< 10	STUMP
nepřítomná	difúzní, střední / těžké	≥ 10	LMS
nepřítomná	difúzní, střední / těžké	< 10	STUMP
nepřítomná	žádné / mírné	< 5	LM
nepřítomná	žádné / mírné	5-20	ML
nepřítomná	fokální, střední / těžké	≥ 5	STUMP
nepřítomná	fokální, střední / těžké	< 5	LBN

legenda: LMS – leiomyosarkom, STUMP – hladkosvalový nádor nejistého maligního potenciálu, LM – klasický leiomyom, ML – mitoticky aktivní leiomyom, LBN – leiomyom s bizarními jádry

### 1.1.6. Léčba

Leiomyomy jsou často zcela asymptomatické a léčbu nevyžadují. K terapii se obvykle přistupuje až u symptomatických nádorů, nebo u nádorů, které by mohly způsobit obtíže v těhotenství. Další indikací k léčebnému zákroku může být i nejistota týkající se biologické povahy nádoru, např. u klinického stavu tzv. rychle rostoucího leiomyomu. Druh léčby závisí na více faktorech, včetně lokalizace nádoru, jeho velikosti a věku pacientky. Mezi nejčastější terapeutické výkony patří myomektomie a hysterektomie. Jako další se využívá hormonální léčba antagonisty gonadotropinu (GnRHa), kteří snižují hladinu estrogenu desenzitizací hypofýzy, což má za následek zmenšení leiomyomů, zmenšení objemu dělohy a zmírnění symptomů pacientky (Kurman RJ. et al, 2019; Marsh EE. et Bulun SE., 2006). V neposlední řadě mohou být leiomyomy léčeny ischemizací (embolizace či ligace děložních tepen), která vede k involuci nádoru (Marshburn PB. et al., 2006). Pokud po ischemizační léčbě dojde k hysterektomii/myomektomii, mohou být při bioptickém vyšetření zastiženy oblasti ischemického typu nekrózy, která musí být odlišena od nádorového typu nekrózy. Kromě toho se v krevních cévách, ale i mimo ně, může nacházet embolizační materiál (Dundr P. et al, 2006).

Optimální léčba u pacientek s diagnózou LBN není ani v dnešní době jednoznačná. Důvodem je zejména:

1. jde o pacientky věkové skupiny kolem 30-40 let, které často nedokončily své reprodukční plány.

2. diagnóza LBN může být stanovena z kyretáže či parciální resekce (morcelace) nádoru, a tudíž nelze s jistotou stanovit, zda je k bioptickému vyšetření dodán kompletní materiál.

3. morfologický nález může být sekundárně modifikován předchozí terapií; hormonální léčba a embolizační terapie způsobují ischemický typ nekrózy, který v časných



fázích může napodobovat nádorový typ nekrózy a LBN může být zaměněn za STUMP, případně i LMS.

4. v minulosti převládal názor, že LBN je nádor nejasného biologického potenciálu, nicméně novější studie ukazují, že jde o nádor s benigním chováním. Riziko recidivy onemocnění se pohybuje v rozmezí 0-18 % (Ly A. et al., 2013; Mills AM. et al., 2013). Maligní chování LBN nebylo doposud popsáno. V současné době se zdůrazňuje, že u pacientek v reprodukčním věku je možný konzervativní léčebný přístup (Sung CO. et al., 2009; Croce S. et al., 2014; Ly A. et al., 2013; Boudová B. et al., 2019).

Metodou volby léčby LMS je hysterektomie; odpověď na chemoterapii a radioterapii je limitovaná. Prognóza onemocnění je přímo úměrná stadiu onemocnění, celkově se 5leté přežití uvádí kolem 15-25 % (Cree IA. et al., 2020). Poněkud lepší přežití je u stadia I-II, kde se 5leté přežití pohybuje kolem 40-70 % (Cree IA. et al., 2020; Pelmus M. et al., 2009). Prognóza se v tomto stadiu zhoršuje s vyšší mitotickou aktivitou či prokázanou lymfovaskulární invazí (Pelmus M. et al., 2009).

## **1.2. Leiomyom s bizarními jádry**

LBN je vzácný subtyp leiomyomu, který byl poprvé popsán v roce 1994. Na morfologické úrovni byl LBN v té době definován přítomností středních či výrazných jaderných atypií, přítomností < 10 mitóz na 10 HPF (obj. 40) a nepřítomností koagulačního (nádorového) typu nekrózy (Bell SW. et al., 1994). V té době se jednalo o jednotku, která byla zařazena do nádorů s nízkým maligním potenciálem. V průběhu následujících let se pojmenování léze měnilo od atypického leiomyomu s nízkým rizikem rekurence, přes pouze atypický leiomyom, pleomorfní leiomyom až po symplastický leiomyom a zjistilo se, že navzdory přítomnosti jaderných atypií jde o jednotku benigní biologické povahy, která i v případě recidiv není spojována s úmrtím pacienta. Podle nové WHO klasifikace nádorů ženského genitálu z roku 2020 je nynější terminologie této léze pouze LBN nebo

sympplastický leiomyom. Označení atypický leiomyom s nízkým rizikem rekurence se nyní používá pro hladkosvalový nádor nejistého maligního potenciálu – STUMP (Cree IA. et al., 2020). WHO klasifikace také nově definuje LBN jako nádor, který je ostře ohraničený od okolního myometria. Nádorové buňky mají většinou vzhled jako u klasického leiomyomu, v různém počtu a distribuci jsou však patrná bizarní jádra (fokálně, multifokálně či difúzně), mohou být patrné nukleární pseudoinkluze, setřelý („smudge“) chromatin, mitózy v počtu < 5/10 HPF, cytoplazma bývá eozinofilní, může obsahovat globulární struktury. Dále mohou být zastížena karyorektická či pyknotická jádra, která imitují mitotické figury a mohou vést ke stanovení nesprávné diagnózy LMS. Vylučujícím znakem diagnózy LBN je přítomnost koagulačního typu nekrózy (Cree IA. et al., 2020). Podobné morfologické znaky můžeme najít i u nově vyčleněné jednotky, fumarát-hydratáza (FH) deficientního leiomyomu (Cree IA. et al., 2020). U FH–deficientního leiomyomu jsou přítomné somatické či germinální mutace genu *FH* (fumarát hydratáza), které vedou ke ztrátě jeho funkce, což je u germinálních mutací podkladem vzniku syndromu hereditární leiomyomatózy a renálního karcinomu (HLRCC) (Cree IA. et al., 2020).

Recentní studie ukazují, že LBN jsou heterogenní skupinou a dále dochází k jejich subtypizaci na základě morfologických, imunohistochemických a genetických rysů. Zatím jsou vyčleněny 2 skupiny LBN s odlišnými genetickými aberacemi. U první skupiny (typ I) část LBN vykazuje mutace genu *FH*, kdežto druhá skupina (typ II) vykazuje často mutace v genech *TP53* a *RBI* [tabulka 5] (Bennett JA. et al., 2017; Ubago JM. et al., 2016; Zhang Q. et al., 2017). Morfologicky jsou u LBN prvního typu v nádorových buňkách přítomna velká okrouhlá či oválná jádra, hladká jaderná membrána, jemný vezikulární chromatin a eozinofilní jadérko. U druhého typu LBN jsou jádra protáhlá, větěnitá, s nepravidelnými jadernými membránami, s hrubým kondenzovaným chromatinem, s žádnými nebo zcela nepatrnými jadérky (Ubago JM. et al., 2016). U typu I je na imunohistochemické úrovni

popsána ztráta exprese FH a přítomnost exprese 2SC (S-(2-sukcino)-cystein), tzn. aberantní imunohistochemický profil FH-/2SC+, což signalizuje mutace v genu *FH* (Bennett JA. et al., 2017; Ubago JM. et al., 2016). LBN s normálním imunohistochemickým profilem, tzn. FH+/2SC-, většinou vykazují alterace v genu *TP53* nebo *RBI* (Kurman RJ. et al, 2019).

Tabulka 5: Rozdělení LBN dle jaderných znaků

histologické znaky	LBN typ I	LBN typ II
tvár jader	okrouhlá, pravidelná	protáhlá, vřetenitá
jaderná membrána	hladká	nepravidelná
jadérka	prominentní, velká	malá nebo žádná
chromatin	jemný, vezikulární, disperzní	hrubý, kondenzovaný

### 1.3. Celulární leiomyom

CL je vzácná varianta leiomyomu charakterizovaná „významně“ vyšší buněčností ve srovnání s okolním myometriem (Oliva E. et al., 1995; Cree IA. et al., 2020). Morfologické znaky jsou dobře definovány (Oliva E. et al., 1995; Cree IA. et al., 2020). Typicky jde o hypercelulární nádory, fascikulárně uspořádané, s hustě nakupenými buňkami. Nádorové buňky mají vřetenitý tvar a menší množství cytoplazmy. Jaderné atypie nejsou přítomny, mitózy se vyskytují zcela sporadicky. Krevní cévy jsou typicky velké, tlustostěnné (silnostěnné), mohou být dilatované. Dále jsou ve stromatu patrné tzv. štěrbiny („clefts“), které představují komprimované krevní cévy či tkáňové artefakty. Ve srovnání s jinými leiomyomy se u CL poměrně často vyskytuje neostře ohraničení vůči okolnímu myometriu. Okraje jsou zvlněné a někdy mohou dokonce vykazovat i infiltrativní rysy. Popisovaná je i přítomnost menších satelitních CL v okolí hlavního nádoru, která může budít dojem infiltrativní invaze. Diferenciální diagnostika CL zahrnuje zejména endometriální stromální nádory. Odlišení mezi CL a endometriálním stromálním uzlem (ESN) nemá žádný klinický dopad, avšak rozlišení mezi CL a low grade endometriálním stromálním sarkomem (LG ESS) je zcela zásadní. Endometriální stromální nádory jsou, stejně jako CL, hypercelulární nádory,

kteře podobně jako u CL mají poměrně pravidelná jádra a vysoký nukleocytoplazmatický poměr. Mohou být spatřeny mitotické figury. Oproti CL jsou však endometriální stromální nádory, s výjimkou specifických morfologických variant, tvořené oválnými, a nikoliv vřetenitými buňkami. Charakteristickým znakem endometriálních stromálních nádorů je také přítomnost malých arteriol obklopených vírovitě uspořádanými nádorovými buňkami. Velké silnostěnné cévy a štěrby („clefts“) typické pro CL většinou chybí.

#### 1.4. Fumarát hydratáza

Gen *fumarát hydratáza* (*FH*, *fumaráza*) je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 1 na pozici 43 (1q42.3-q43), kóduje enzym fumarát hydratázu (*FH*), který má 2 izoformy, a to mitochondriální a cytosolickou. Obě izoformy katalyzují hydrataci fumarátu na L-malát, liší se pouze tím, že mitochondriální isoforma má iniciální mitochondriální signální peptid (Alam NA. et al., 2005; Picaud S. et al., 2011). Cytosolická isoforma je zapojena do metabolismu fumarátu v cytosolu buňky. Mitochondriální isoforma katalyzuje přeměnu fumarátu na L-malát v citrátovém cyklu (Krebsův cyklus) jako součást centrální aerobní respirace.

Germinální homozygotní *FH* mutace (*FH* deficeince) se klinicky projevuje progredující neonatální encefalopatií, psychomotorickou retardací, hypotonií, cerebrálními malformacemi či atrofií mozku, a většina postižených umírá v první dekádě života (Alam NA. et al., 2005). U pacientů s germinální heterozygotní *FH* mutací může dojít v průběhu života k tzv. „second hit“ somatické mutaci druhé alely a tím k inaktivaci obou alel (Schmidt LS. et Linehan WM., 2014). Při inaktivaci obou alel dochází k redukci nebo kompletní ztrátě funkce enzymatické aktivity proteinu, nedochází k přeměně fumarátu na L-malát, což vede k akumulaci fumarátu.

Přesný mechanismus tumorigeneze při mutacích v genu *FH* není zcela objasněn, nicméně se předpokládá, že *FH* funguje jako tumor supresorový gen. Existuje více teorií vycházejících z předpokladu, že základním mechanismem je zvýšená hladina fumarátu, který

má funkci onkoproteinu. Zvýšená akumulace fumarátu vede k jeho transportu z mitochondrií do cytoplazmy. V cytoplazmě mohou zvýšené hladiny fumarátu kompetitivně inhibovat funkci prolylhydroxylázy hypoxií indukovaného faktoru (HIF), což vede k akumulaci HIF. Se zvýšenými hladinami podtypu HIF1- $\alpha$  jsou cílové geny HIF, jako jsou *VEGF* a *GLUT1*, transkripčně aktivovány, dochází ke zvýšené proliferaci buněk a jejich rezistenci k apoptóze, dále dochází ke zvýšené vaskularizaci a transportu glukózy do nádorových buněk FH-deficientních nádorů (obr. 1). Tento fenomén bývá popisován jako „pseudohypoxie“ (Llamas-Velasco M. et al., 2016; Wei JJ., 2016; Linehan WM. et Rouault TA., 2013; Schmidt LS. et Linehan WM., 2014; Lameirinhas A. et al., 2019). Další hypotéza, jak vysvětlit funkci *FH* jako tumor supresorového genu je jeho hypermutabilita, převážně v souvislosti s oxidačním stresem (Llamas-Velasco M. et al., 2016; Tomlinson IP. et al., 2002). V posledních letech se objevila hypotéza, že akumulace fumarátu u FH-deficientních leiomyomů vede k aktivaci cílových genů, například onkogenního transkripčního faktoru *NRF2* (*nukleární erytroidní faktor 2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (Mehine M. et al., 2016).

Germinální mutace mají různou klinickou manifestaci, včetně syndromu HLRCC. U pacientů s HLRCC je zvýšené riziko vzniku leiomyomů (děložních a kožních) a renálního karcinomu, nejčastěji papilárního, který je v době diagnózy až u 50 % pacientů generalizovaný (Tomlinson IP. et al., 2002; Wei MH. et al., 2006; Launonen V. et al., 2001). Výskyt leiomyomů může předcházet vzniku renálního karcinomu i o několik let, a proto je správná diagnostika s rozpoznáním jejich charakteristických, avšak ne zcela specifických rysů, důležitá. Na podkladě morfologie leiomyomu však nelze diagnózu syndromu HLRCC stanovit, patolog může pouze vyjádřit možnou souvislost, nutná je vždy korelace s klinickým obrazem a u indikovaných případů dovyšetření klinickým genetikem. Ne u všech pacientů s HLRCC se však leiomyomy vyvinou, v dostupných publikacích je uveden výskyt děložních leiomyomů u 80 % pacientů a kožních leiomyomů u 75 % pacientů (Lehtonen HJ. et al., 2006;

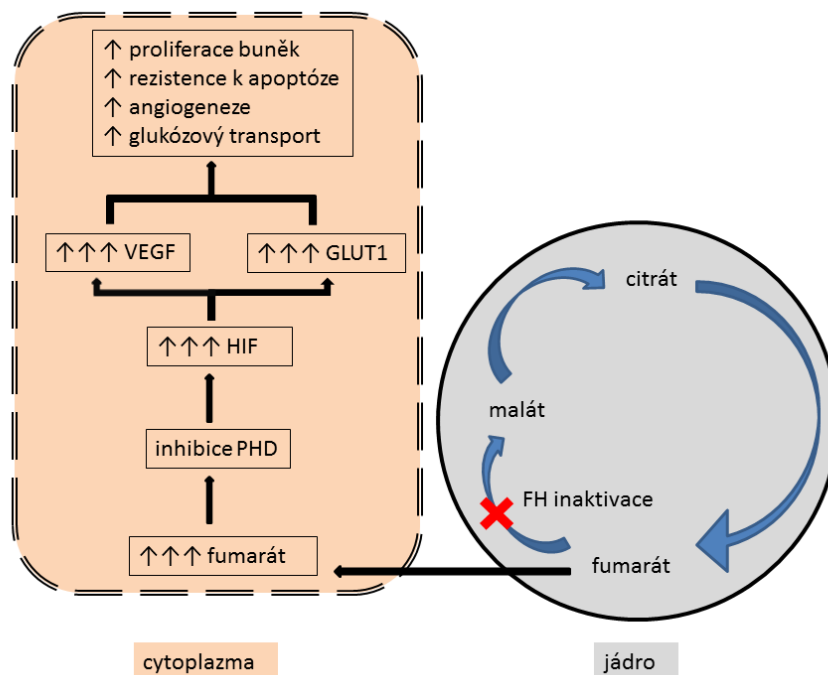
Sanz-Ortega J. et al., 2013; Toro JR. et al., 2003; Wei MH. et al., 2006). Kožní leiomyomy se obvykle vyskytují kolem 25. roku věku, zatímco děložní leiomyomy se vyskytují průměrně asi o 5 let později a jsou charakteristicky mnohočetné (Kurman RJ. et al, 2019). Renální karcinomy se vyvinou kolem věku 45 let (Toro JR. et al., 2003; Gardie B. et al., 2011; Merino MJ. et al., 2007; Launonen V. et al., 2001; Harrison WJ., 2016). HLRCC syndrom představuje syndrom se širokou fenotypickou variabilitou, od asymptomatického až po letální, a jeho přesná incidence není známa (Sanz-Ortega J. et al., 2013).

V recentním přehledovém článku bylo shrnuto 97 prací publikovaných do konce roku 2019, které zahrnují 672 pacientů s HLRCC. Kožní leiomyomy byly popsány u 474 z nich (71,5 %) s průměrným věkem 28 let. Leiomyomy dělohy byly zastiženy u 356 (83 %) a byly diagnostikovány průměrně ve věku 32 let, nicméně nejmladší pacientce bylo pouhých 17 let. Většina pacientek podstoupila hysterektomii průměrně kolem 35. roku věku, nejmladší bylo pouze 19 let. Renální karcinom byl diagnostikován u 189 pacientů (34,9 %), z toho v polovině případů již bylo onemocnění generalizované. Diagnóza renálního karcinomu byla stanovena průměrně ve věku kolem 36 let, ale nejmladší pacientce bylo v době diagnózy pouze 11 let (Chayed Z. et al., 2021).

Germinální mutace genu *FH* nejsou spojovány pouze s HLRCC, ale méně často také s nádory z Leydigových buněk, ovariálními mucinózními cystadenomy a cerebrálními kavernózními hemangiomy (Llamas-Velasco M. et al., 2016; Carvajal-Carmona LG. et al., 2006). Velice sporadicky se může bialelická mutace nacházet také u karcinomu prsu, karcinomu močového měchýře, také u benigních nádorů jako je adrenální kortikální adenom, nebo u nenádorových lézí typu renálních cyst (Lehtonen HJ. et al., 2006). Kromě germinálních mutací byly sporadické mutace *FH* popsány u paragangliomu, feochromocytomu, neuroblastomu, gliomu, ependymomu, osteosarkomu, Ewingova sarkomu a adrenokortikálního karcinomu (Scagliola E. et al., 2020, obr. 2).

Somatické mutace genu *FH*, které se mohou vyskytnout u 1-3 % leiomyomů, jsou častější než germinální. Při rozhodování, kteří pacienti by případně měli podstoupit germinální testování, je třeba vzít v úvahu nejen imunohistochemické a morfologické vlastnosti děložního leiomyomu, ale také klinické charakteristiky pacientek. Nejvíce pravděpodobná přítomnost germinální mutace je u pacientek, které mají solitární objemný FH-deficientní leiomyom a jeho výskyt je před 35-40. rokem věku, zejména jsou-li přítomné také kožní leiomyomy (Kurman RJ. et al, 2019).

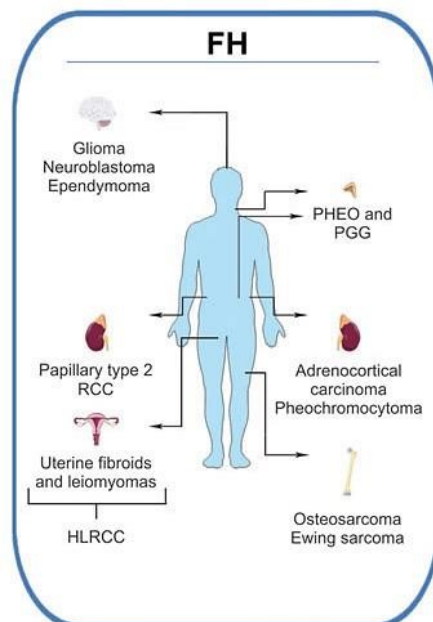
Sledovat stav genu *FH* můžeme nepřímo pomocí imunohistochemických protilátek anti-FH (FH) a anti-2SC. Zvýšená hladina fumarátu modifikuje cysteinové zbytky v mnoha proteinech, což vede ke zvýšené proteinové sukcinaci a produkci S-(2-sukcino)-cysteinu (2SC). Ztráta enzymatické aktivity *FH* se většinou na imunohistochemické úrovni projevuje ztrátou exprese FH a pozitivním výsledkem vyšetření s protilátkou anti-2SC (Trpkov K. et al., 2016; Bennett JE. et al., 2017; Joseph NM. et al., 2015; Zhang Q. et al., 2018). Imunohistochemické vyšetření s protilátkami FH a 2SC se zdá být pro identifikaci ztráty FH aktivity vysoce specifické (Buelow B. et al., 2016).



Obr. 1: Mechanismus tumorigeneze při defektu *FH*, tzv. „pseudohypoxie“

Zjednodušený model citrátového cyklu a patogeneze tumorigeneze při defektu fumarát hydratázy.

legenda: *FH* – fumarát hydratáza, *PHD* – prolylhydroxyláza, *HIF* – hypoxií indukovaný faktor, *VEGF* – vaskulární endoteliální růstový faktor, *GLUT1* – glukózový transporter 1



Obr. 2: Možnosti postižení různých orgánů při germinální či somatické mutaci v genu *FH* (převzato od Scagliola E. et al., 2020)

legenda: PHEO – feochromocytom, PGG – paragangliom, RCC – karcinom z renálních buněk, HLRCC – syndrom hereditární leiomyomatózy a renálního karcinomu



## 1.5. Vybrané prognostické a prediktivní markery

Stanovení biologické povahy hladkosvalových nádorů má zásadní roli v dalším managementu pacientek. Stanovení biologické povahy je založeno na zhodnocení morfologických znaků, v některých případech však může být nápomocné imunohistochemické vyšetření s využitím exprese panelu vhodných protilátek. Toto vyšetření může mít význam zvláště u hraničních lézí. V některých případech (např. kvalitativní a kvantitativní limit materiálu) je stanovení biologické povahy i přes zhodnocení všech dostupných parametrů velice obtížné. Mezi nejčastěji používané imunohistochemické markery patří hormonální receptory (ER, PR), protein p16 produkovaný tumor supresorovým genem *CDKN2A*, protein p53 produkovaný tumor supresorovým genem *TP53* a stanovení proliferace (Ki-67 index).

V posledních letech je u nádorů různého typu při prokázání určitých molekulárních aberací či pozitivním výsledku prediktivních imunohistochemických vyšetření dostupná biologická (cílená) terapie. Vzhledem k vzácnému výskytu některých těchto aberací jsou znalosti o jejich přesné incidenci u četných nádorů doposud limitované. Mezi námi analyzované markery vyšetřované imunohistochemickou expresí patří NTRK a ALK. Kromě toho jsme se jako na další prediktivní biomarker zaměřili na expresi PD-L1.

### Prognostické markery ER, PR, Ki-67, p16, p53

Estrogenové receptory (ER) a progesteronové receptory (PR) hrají významnou roli v patologii ženského pohlavního systému i v patologii mléčné žlázy. ER poprvé identifikoval Elwood V. Jensen na Chicagské univerzitě v roce 1958 (Jensen E., 2012). Walter s kolektivem v roce 1985 zjistili, že gen *ER (ESR1)* leží na chromozomu 6 (Walter P. et al., 1985) a pomocí hybridizace *in situ* s cDNA obsahující kódující sekvenci pro ER byla v roce

1986 přiřazená genu přesná lokalizace: 6q24-q27 (Gosden JR. et al., 1986). PR jsou kódovány genem *PGR*, který je lokalizován na chromozomu 11 (11q22) (Law ML. et al., 1987).

ER se v klidovém stavu nacházejí v cytosolu, ale po aktivaci ligandu jsou schopny translokovat se do buněčného jádra a vázat se na DNA, čímž regulují aktivitu různých genů. Jedná se tedy o tzv. ligandem aktivovaný transkripční faktor (Levin ER., 2005). Kromě tohoto genomického účinku mají ER také negenomický účinek (regulují genovou expresi bez přímé vazby na DNA). K tomu dochází prostřednictvím proteinových interakcí s jinými transkripčními faktory v jádře, nebo účinky ER mohou vést ke změně funkce cytoplazmatických proteinů, a tak regulovat genovou expresi (Björnström L. et Sjöberg M., 2005). Estrogen díky ER reguluje růst, vývoj a fyziologii lidského reprodukčního systému; ovlivňuje neuroendokrinní, kosterní, tukový a kardiovaskulární systém (Lee HR. et al., 2012; Deroo BJ. et Korach KS., 2006). ER se také podílejí na tumorigenezi některých nádorů, např. mléčné žlázy, ovaria, dělohy, prostaty či kolorektálního karcinomu. Asi nejlépe prozkoumaná je oblast karcinomu mléčné žlázy, kde byly navrženy 2 možné hypotézy tumorigeneze. První je, že vazba estrogenu na ER stimuluje proliferaci buněk mléčné žlázy, se zvýšením buněčného dělení a replikace DNA, což vede ke zvýšenému výskytu mutací. Druhá hypotéza předpokládá, že při metabolismu estrogenu vznikají produkty, které působí genotoxicky. Výsledkem obou procesů je narušení buněčného cyklu, apoptózy a reparace DNA (Deroo BJ. et Korach KS., 2006).

ER neslouží jenom jako marker prognostický (vyšší exprese u lépe diferencovaných nádorů), ale u části nádorů i jako marker prediktivní s možností cílené léčby – antihormonální terapie (antagonisté ER – tamoxifen či inhibitory aromatázy – anastrozol).

Protein Ki-67 je jaderný marker, který je spojen s buněčnou proliferací. Bývá přítomen ve všech aktivních fázích buněčného cyklu (G1, S, G2 a mitóza), ale chybí v klidových buňkách (G0 fáze). Používá se tedy jako marker pro stanovení tzv. růstové frakce cílené

buněčné populace (Scholzen T. et Gerdes J., 2000). Podíl nádorových buněk pozitivních s Ki-67 do určité míry koreluje s agresivitou nádorového onemocnění, obecně značí horší prognózu, na druhé straně však může být marker lepší odpovědi na případnou terapii. Protilátka byla vytvořena imunizací myších jader buněčnými liniemi Hodgkinova lymfomu (L428). Název Ki-67 je odvozen od německého města Kiel, číslo značí pořadí původního klonu v 96jamkové destičce (Gerdes J. et al., 1983).

Protein p16 byl poprvé popsán v roce 1993 (Serrano M. et al., 1993). Je kódován genem *CDKN2A* (9p21.3) a jeho základní funkce je zpomalení buněčného cyklu při přechodu z G1 do S fáze, čímž působí jako nádorový supresor. Cyklus dělení eukaryotických buněk je regulován rodinou proteinkináz známých jako cyklin-dependentní kinázy (CDK). Protein p16 je inhibitor CDK, váže se na CDK4, která normálně stimuluje buněčný cyklus, nicméně po vazbě p16 je její funkce zablokována. Tímto způsobem p16 řídí dělení buněk (Serrano M. et al., 1993; Nobori T. et al., 1994; Stone S. et al., 1995). Delece genu *CDKN2A* může mít za následek nedostatečný nebo nefunkční protein p16, což vyústí v zrychlení buněčného cyklu se zvýšeným rizikem vzniku nádoru.

Tumor supresorový gen *TP53* byl popsán koncem sedmdesátých let minulého století (Soussi T., 2010) a je lokalizován na krátkém raménku chromozomu 17 (17p13.1) (Isobe M., 1986). Gen *TP53* má větší množství funkcí, ve vztahu k onkogenezi působí jako „strážce genomu“ tím, že reguluje buněčný cyklus. V případě poškození buněčné DNA brání jeho produkt, protein p53, dalšímu dělení buněk, reguluje transkripci genů nutných k opravě DNA a v případě nemožnosti opravy navozuje samodestrukci poškozené buňky (apoptózu) (Stein Y. et al., 2019). Kromě výše uvedených buněčných a molekulárních účinků má p53 antitumorózní účinek na tkáňové úrovni tím, že inhibuje angiogenezi. To se děje na 3 úrovních: 1. interferuje s regulátory nádorové hypoxie, jako je *HIF1* a *HIF2*; 2. inhibuje

produkci faktorů podporujících angiogenezi; a 3. přímo zvyšuje produkci inhibitorů angiogeneze (Teodoro JG. et al., 2007; Assadian S. et al., 2012).

### Prediktivní markery NTRK, ALK, PD-L1

Geny pro neurotrofní receptory s tyrosin kinázovou aktivitou - *NTRK* (*NTRK1*, *NTRK2* a *NTRK3*) se podílejí na normálním vývoji neuronů a kódují proteiny kinázy tropomyosinového receptoru (TRK), tradičně známé jako TRKA, TRKB a TRKC pro neurotrofin. V nedávné době byly identifikovány translokace genů *NTRK* u různých typů nádorů dospělých i dětských pacientů, které hrají roli v jejich tumorigenezi. Incidence aberací genu *NTRK* je v nádorech obecně velice nízká, pohybuje se do 1 % (Büchler T. et al., 2020; Demetri GD. et al., 2020). Výjimkou jsou některé vzácné typy nádorů, jako je sekreční karcinom prsu, sekreční karcinom mamárního typu (MASC) slinných žláz a gliové nádory, kde se incidence pohybuje 96 %, 89 % a 3 % (Büchler T. et al., 2020). U nádorů dělohy byla recentně popsána jednotka sarkomu s *NTRK* fúzí, která je v současné době považovaná za variantu fibrosarkomu dělohy, nikoliv leiomyosarkomu (Chiang S. et al., 2018).

Vzhledem k nízké incidenci aberací genů *NTRK* se v rámci diagnostiky s výše uvedenými výjimkami v první řadě využívá screeningové imunohistochemické vyšetření s protilátkou pan-TRK. Některé studie poukazují na vysokou míru senzitivity 75-88 % a specificity 81-96 %, jiné však zdůrazňují nízkou specificitu a u každého imunohistochemicky pozitivního případu je nutné molekulární dovyšetření (Demetri GD. et al., 2020).

U nádorů s prokázanou přestavbou genů *NTRK* se k léčbě mohou využít inhibitory kinázy tropomyosinového receptoru (TRKi), které ovlivňují tuto signální dráhu (Demetri GD. et al., 2020).

Gen *ALK* je lokalizován na chromozomu 2 (2p23.2-p23.1) a kóduje receptor s tyrosinkinázovou aktivitou zvaný kináza anaplastického lymfomu (ALK). ALK receptorová

tyrosinkináza je exprimována ve vyvíjejícím se centrálním nervovém systému a v normálních tkáních dospělého pacienta má minimální či žádnou expresi (Pulford K. et al., 1997; Davis LE. et al., 2019). Aktivace kinázy vede k zapojení signálních drah, které ovlivňují růst, dělení a zrání buněk, a tím se podílí na procesu tumorigeneze. Chromozomální přestavby genu *ALK* vedou ke vzniku fúzních genů, které způsobují nadměrnou transkripci genu *ALK*. Tyto změny jsou popisovány např. u anaplastického velkobuněčného lymfomu (Morris SW. et al., 1994; Pulford K. et al., 1997), zánětlivého myofibroblastického tumoru (Davare MA. et al., 2015) a asi 5 % adenokarcinomu plic (Katayama R. et al., 2015).

U pacientů s prokázanými aberacemi genu *ALK* (zlom genu *ALK*) se nabízí možnost cílené terapie inhibitory ALK kinázy (např. crizotinib).

PD-1 je receptor na povrchu buněk kódovaný genem *PDCDI* lokalizovaným na chromozomu 2 a řadí se mezi tzv. kontrolní body imunitního systému (checkpoints). Je exprimován hlavně v aktivovaných T a B lymfocytech, makrofázích, NK buňkách, dendritických buňkách a plazmatických buňkách (Keir et al., 2008). Jedním z ligandů receptoru PD-1 je PD-L1, což je transmembránový glykoprotein vyskytující se v širokém spektru buněk, včetně buněk nádorových, který hraje důležitou roli v inhibici imunitního systému. Bylo prokázáno, že vazba PD-1/PD-L1 hraje významnou roli v inhibici imunitní odpovědi v nádorovém mikroprostředí (Chen L., 2004; Zou W. et Chen L., 2008). Nádorové buňky exprimující PD-L1 tak mají schopnost vyhnout se imunitnímu systému. V posledních letech je proto věnována velká pozornost inhibici vazby PD-1/PD-L1. Blokádou vazby PD-1/PD-L1 dochází k zabránění inhibičního signálu, k obnovení účinnosti imunitních mechanismů a ke zvýšení protinádorové aktivity imunitního systému (Zatloukalová P. et al., 2016). Mezi první nádory léčené imunoterapií se zařadil pokročilý metastazující melanom, renální karcinom, nemalobuněčný karcinom plic a karcinomy močového měchýře (Brahmer JR. et al., 2012; Topalian SL. et al., 2012; Topalian SL. et al., 2014). Spektrum nádorů je však

v současné době podstatně širší a problematika imunoterapie zaznamenává poměrně rychlý rozvoj. Zcela sporadicky se objevují i publikace či jednotlivá kazuistická sdělení o významu PD-1/PD-L1 v sarkomech (Vargas AC. et al., 2020).

S ohledem na hodnocení exprese PD-L1 je nutno zdůraznit, že existují různé postupy hodnocení. Jedná se o TPS (pozitivita nádorových buněk), CPS (kombinované pozitivní skóre) a IC (pozitivita imunitních buněk). Zároveň jsou definovány různé klinicky významné hranice positivity, které se však mění v závislosti na diagnóze, použitém způsobu hodnocení a v neposlední řadě i vazbě na konkrétní lék. Existuje i více imunohistochemických protilátek, které lze pro diagnostiku použít. Aktuálně se hodnocení TPS standardně využívá u karcinomu plic (NSCLC), hodnocení CPS u karcinomů žaludku a gastroezofageální jankce, dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku, karcinomu prsu, děložního hrdla a uroteliálního karcinomu. Hodnocení IC pak u karcinomu prsu a uroteliálního karcinomu.

## 2. VYMEZENÍ CÍLŮ PRÁCE

---

Práce je zaměřena na komplexní analýzu nejčastějších nádorů ženského genitálu mezenchymového původu vznikajících z hladké svaloviny, tedy leiomyocelulárních nádorů, se zacílením na 2 vzácné varianty, LBN a CL. LBN může na morfoloické úrovni napodobovat LMS a může být s touto diagnózou zaměněn, což může zásadně ovlivnit management pacientek. U CL má zásadní klinický význam diferenciální diagnóza s LG ESS. Jako srovnávací soubory byly vybrány 2 skupiny nádorů, a to UL a LMS.

Cílem práce je analýza LBN, CL, UL a LMS na úrovni morfoloické, imunohistochemické a molekulárně-bioloické. V naší práci se zaměřujeme na zhodnocení přínosu využití jednotlivých metod v diferenciální diagnóze těchto nádorů, možného objasnění tumorigeneze nádorů, při stanovení prognózy a predikování odpovědi na léčbu. U skupiny LBN jsou sledované parametry korelovány s relevantními klinickými daty. Na imunohistochemické úrovni je cílem sledovat expresi vybraného panelu protilátek u všech popsaných skupin. V oblasti molekulárních analýz je práce zacílena hlavně na posouzení změn genu pro fumarát hydratázu (*FH*), dále jsou u CL sledovány alterace v genech *MED12* a *HMGA2*, a delece krátkého raménka chromozomu 1.

Cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

- 1) podpoření hypotézy benigní bioloické povahy LBN
- 2) provedení detailní morfoloické analýzy LBN a CL
- 3) bližší ozřejmění tumorigeneze LBN se zaměřením na gen *FH*, na úrovni imunohistochemické i molekulární. Srovnání získaných dat s kontrolním souborem (CL, UL, LMS)
- 4) ozřejmění tumorigeneze CL

- 5) zhodnocení významu využití imunohistochemické protilátky FH (anti-FH) jako screeningové metody k identifikaci mutací genu *FH*
- 6) zhodnocení významu exprese vybraných imunohistochemických protilátek v kontextu morfologického nálezu v diferenciální diagnostice mezi benigními a maligními hladkosvalovými nádory, a dále mezi nádory jiné histogeneze
- 7) imunohistochemická analýza prognostických a prediktivních markerů, se zaměřením na LMS

Výsledky naší práce týkající se některých vymezených cílů byly publikovány v následujících článcích:

**publikace s IF**

**Gregová M**, Hojný J, Němejcová K, Bártů M, Mára M, Boudová B, Laco J, Krbal L, Tichá I, Dundr P. Leiomyoma with Bizarre Nuclei: a Study of 108 Cases Focusing on Clinicopathological Features, Morphology, and Fumarate Hydratase Alterations. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(3):1527-1537. doi: 10.1007/s12253-019-00739-5. (IF2020=3.201)

Dundr P, **Gregová M**, Hojný J, Krkavcová E, Michálková R, Němejcová K, Bártů M, Hájková N, Laco J, Mára M, Richtárová A, Zima T, Stružinská I. Uterine cellular leiomyomas are characterized by common HMGA2 aberrations, followed by chromosome 1p deletion and MED12 mutation: morphological, molecular, and immunohistochemical study of 52 cases. *Virchows Arch.* 2021 Oct 9. doi: 10.1007/s00428-021-03217-z. (IF2020=4,064)



### 3. MATERIÁL A METODIKA

---

#### 3.1. Výběr souboru

Případy LBN a LMS byly získány z archivů bioptických vzorků vyšetřovaných v rámci rutinního provozu na Ústavu patologie 1. LF UK a VFN v Praze a Fingerlandova ústavu patologie LF UK a Fakultní nemocnice v Hradci Králové v období 1998-2017. Všechny zahrnuté případy byly podrobeny revizi, během které byla ověřena diagnóza v souladu s aktuální WHO klasifikací nádorů ženského genitálu. Případy UL a CL byly získány z archivu Ústavu patologie 1. LF UK a VFN.

Analyzovaný soubor představovalo 108 LBN, 52 CL, 50 UL a 68 LMS. Ve skupině LMS byly kromě nádorů ženského genitálu (n= 44) zahrnuty i nádory kůže, močového měchýře, plic, dutiny ústní, žaludku, nadvarlete a orbity (n= 24).

Relevantní klinická data u LBN byla získaná z nemocničních informačních systémů. Jednalo se převážně o informace týkající se věku patientek, klinických symptomů, vlastního nádoru (počet, velikost – korelace se sonografickým vyšetřením), charakteru výkonu (hysterektomie, myomektomie) a v neposlední řadě výskytu rekurencí, metastáz nebo úmrtí. Klinicko-patologická data u CL zahrnovala věk patientek, operační výkon, velikost a hmotnost nádoru. Morfologické, imunohistochemické a molekulární analýzy byly provedeny na archivních blocích po předchozí fixaci tkáně v 10% roztoku formolu a následném zalití tkáně do parafínu (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE). Morfologické hodnocení bylo provedeno na celotkáňových řezech z FFPE bloků o tloušťce 4  $\mu$ m, barvených hematoxylin-eosinem, se zhodnocením více parametrů (bližší viz kapitola morfologická analýza). Pro imunohistochemické analýzy byly z celotkáňových řezů FFPE vybrány a označeny vhodné oblasti bloku pro výrobu tkáňových mikročipů (tissue microarray – TMA). Z každého dárcovského (donor) bloku byla s využitím nástroje TMA Master (3DHISTECH Ltd., Budapešť, Maďarsko) vyvrtána 2-4 jádra (každé o průměru 2 mm), která byla následně

použita ke konstrukci složeného tkáňového mikročipu. V případě LBN byly po identifikaci a označení oblastí vyvrtána 4 jádra; 2 jádra z oblasti s bizarními jádry a 2 jádra z oblasti mimo bizarní jádra (= oblasti vzhledu UL), za účelem samostatného imunohistochemického vyhodnocení odlišných partií nádoru. U 9 případů toto nebylo možné z důvodu chybění některé z oblastí (nebyla zastížena místa UL). V případech CL, UL a LMS byla vyvrtána 2 jádra z každého případu.

Imunohistochemické analýze exprese FH bylo celkem podrobena 252 vzorků nádorové tkáně, které zahrnovaly 108 LBN, 52 CL, 50 UL a 42 LMS. Imunohistochemické vyšetření s rozšířeným panelem IHC protilátek (CD10, IFITM1, smoothelin, transgelin, ER, PR, Ki-67, p16, p53, pan-NTRK, ALK, PD-L1, PHH3) bylo provedeno celkem u 226 vzorků (108 LBN, 50 UL a 68 LMS), část vyšetření byla provedena také u 52 CL (CD10, IFITM1, smoothelin, transgelin, pan-TRK, ALK).

Molekulární analýzy byly provedeny z celotkáňových řezů z makrodisekovaných reprezentativních oblastí nádoru, se zhodnocením procentuálního zastoupení nádorových buněk v makrodisekované tkáni. Molekulární analýzy genu *FH* byly úspěšně provedeny celkem u 152 vzorků (53 LBN, 32 CL, 47 UL a 20 LMS). Molekulární analýzy genů *MED12*, *HMG2* a chromozomální přestavby chromozomu 1 byly úspěšně provedeny na DNA úrovni ve 32 případech CL a na RNA úrovni ve 38 případech CL.

### **3.2. Morfologická analýza leiomyomů s bizarními jádry a celulárních leiomyomů**

Mikroskopické hodnocení LBN bylo provedeno na celotkáňových řezech barvených hematoxylin-eosinem. Hodnoceny byly následující parametry:

- a) ohraničení léze
  - ostré
  - infiltrativní
- b) celularita nádoru

- nízká (nižší než u UL)
- střední (přibližně stejná jako u UL)
- vysoká (vyšší než u UL)
- c) denzita bizarních jader
  - nízká (< 30 %)
  - střední ( $\geq 30$  a < 70 %)
  - vysoká ( $\geq 70$  %)
- d) distribuce bizarních jader
  - fokální ( $\leq 5$  fokusů bizarních jader, s využitím objektivu 20)
  - multifokální (distribuce nejednotná, > 5 fokusů bizarních jader, s využitím objektivu 20)
  - difúzní (přítomnost bizarních jader prakticky v celém nádoru)
- e) jaderné znaky
  - prominentní jadérka
  - eozinofilní jaderné pseudoinkluze
  - rozpadlá „karyorektická“ jádra
- f) další morfologické buněčné znaky
  - počet mitóz na 10 zorných polí velkého zvětšení
  - přítomnost eozinofilních globulí v cytoplazmě nádorových buněk („rhabdoid-like cells“)
- g) stromální znaky
  - vaskularita (malé tenkostěnné cévy, krevní parožnaté cévy, velké a tlusté krevní cévy)
  - vaskulární změny (fibrinoidní nekróza, vazivová obliterace lumen, perivaskulární zánětlivá infiltrace)
  - hydropické změny
  - hyalinizace
  - nekróza (ischemický typ, koagulační typ)

Na základě cytomorfologických jaderných znaků popsaných v práci Ubago a spol. z roku 2016 byl náš soubor 108 LBN dále rozdělen na 2 podskupiny, LBN typ I a LBN typ II. Pokud nádorové buňky vykazovaly jaderné znaky typické pro typ I i typ II, byl nádor zařazen do skupiny s více než 70% zastoupením jednoho z typu jader.

Mikroskopické hodnocení CL bylo provedeno identicky jako u LBN z celotkáňových řezů barvených hematoxylin-eosinem. Mezi základní vybrané hodnocené parametry patřily:

- a) ohraničení léze (ostré/infiltrativní)
- b) přítomnost / nepřítomnost tzv. štěrbin („clefts“)
- c) přítomnost / nepřítomnost tlustostěnných krevních cév
- d) přítomnost / nepřítomnost satelitních nodulů

### **3.3. Imunohistochemická analýza hladkosvalových nádorů**

Imunohistochemická analýza byla provedena na TMA řezech s využitím standardních řezů z FFPE bloků o tloušťce 2-3  $\mu\text{m}$ . Protilátky, klony, ředění, výrobce, barvicí technika a detekce jsou popsány v tabulce 6.

#### **3.3.1. Imunohistochemická analýza s protilátkou FH (anti-FH)**

Imunohistochemická exprese FH bývá v normální tkáni zachovalá. V případě negativity vyšetření (ztráta exprese FH) je nutno pomýšlet na možnost mutací v genu *FH*. Při vyšetření s protilátkou FH bylo jako pozitivní hodnoceno pouze granulární cytoplazmatické zbarvení v nádorových buňkách. Hodnocení bylo provedeno kvalitativně na základě intenzity zbarvení cytoplazmy ve 4 stupních: negativní (0) a pozitivní (1+, 2+ a 3+). Stupeň 0 znamenal úplnou nepřítomnost zbarvení nádorových buněk, stupeň 1+ slabé zbarvení, stupeň 2+ středně silné zbarvení a stupeň 3+ silné zbarvení cytoplazmy nádorových buněk. Jako vnitřní pozitivní kontrola v preparátu byla pozitivní reakce v endoteliálních buňkách krevních cév. U LBN byly samostatně hodnoceny oblasti s přítomností bizarních jader (R) a mimo tyto oblasti (G). Pokud byla zaznamenána ztráta exprese FH alespoň v jedné oblasti, případ byl hodnocen jako negativní.

### **3.3.2. Imunohistochemická analýza s dalšími protilátkami**

#### **3.3.2.1. Protilátky hladkosvalové diferenciace**

Mezi základní imunohistochemické protilátky „hladkosvalové diferenciace“ patří hladkosvalový aktin (SMA), desmin a h-caldesmon. Další komerčně dostupné protilátky pro hodnocení hladkosvalové diferenciace představuje např. smoothelin a transgelin. Benigní hladkosvalové léze, tzn. leiomyom a jeho varianty, exprimují hladkosvalové markery v naprosté většině případů ve většině nádorových buněk. Odlišná může být situace u LMS, kde se vyskytují případy s velmi nízkou expresí hladkosvalových markerů, či mohou být některé markery negativní. U části hladkosvalových nádorů se však může vyskytovat i exprese dalších imunohistochemických markerů, které jsou více specifické pro jednotky jiné než hladkosvalové diferenciace, např. endometriální stromální nádory různé biologické povahy (endometriální stromální nodul, endometriální stromální sarkom – low grade i high grade). Jedná se zejména o markery CD10 a IFITM1. V minulosti byla pozitivita CD10 pokládána za poměrně specifický marker endometriální stromální diferenciace, nicméně současné poznatky ukázaly, že exprese CD10 se vyskytuje i u části hladkosvalových lézí. Protilátka IFITM1 se zdá být více specifický marker endometriální stromální diferenciace, data jsou však poměrně limitovaná.

Naše práce se zaměřila na expresi recentně komerčně dostupných IHC protilátek proti smoothelinu a transgelinu, a dále CD10 a IFITM1.

Samotné zhodnocení výsledků imunohistochemického vyšetření bylo založeno na semikvantitativním zhodnocení procenta pozitivních nádorových buněk (0-100 %). U protilátek smoothelin a transgelin se hodnotila cytoplazmatická pozitivita; u CD10 membránová pozitivita a u IFITM1 byly hodnocena cytoplazmatická i membránová pozitivita. V případě imunohistochemického vyšetření HGMA2 byla jako nadměrná exprese (overexpres) hodnocena střední nebo silná jaderná exprese ve  $\geq 50$  % nádorových buněk.

### 3.3.2.2. Stanovení biologické povahy leiomyocelulárních nádorů

Stanovení biologické povahy leiomyocelulárních nádorů má zásadní roli v dalším managementu pacientek. Hledání vhodného biomarkeru/biomarkerů, které by byly různě zastoupeny v LMS a leiomyomech různých variant, je dokumentováno již koncem devadesátých let minulého století a má dva významy, diagnostický a prognostický. Základem při stanovení biologické povahy je však zhodnocení morfologických znaků nádoru. Imunohistochemické vyšetření má pouze pomocný význam, a to zejména u hraničních lézí. Nejčastěji používanými protilátkami jsou v tomto směru ER, PR, p16, p53 a hodnocení proliferací pomocí markeru Ki-67, případně PHH3 (marker značící mitózy). V naší práci jsme provedli imunohistochemickou expresi všech výše vyjmenovaných protilátek na souboru 108 LBN, 50 UL a 68 LMS.

U hormonálních receptorů (ER, PR) bylo hodnocení založeno na zhodnocení procenta pozitivních jader nádorových buněk (0-100 %). U protilátky p16 byla hodnocena distribuce cytoplasmatické a jaderné positivity nádorových buněk semikvantitativně jako negativní, nerovnoměrná (mozaikovitá, „patchy“) a difúzní. U protilátky p53 bylo hodnocení založeno na kombinaci rozsahu a intenzity positivity (1+, 2+ a 3+). Podle výsledků byla exprese rozdělena do 2 skupin: aberantní typ exprese (nad 70 % nádorových buněk s intenzitou 3+, nebo kompletně negativní) a divoký typ exprese (jakákoliv exprese nesplňující kritéria pro aberantní expresi). Proliferační marker Ki-67 byl hodnocen v 500 nádorových buňkách v místech s nejvyšší pozitivitou, tzv. hot spots (uvedeno v %). Imunohistochemická exprese PHH3 byla hodnocena jako počet pozitivních jader nádorových buněk (mitotických figur) na 10 zorných polí velkého zvětšení = 10 HPF (obj. 40).

### 3.3.2.3. Imunohistochemická exprese potenciálně prediktivních markerů

Do panelu námi studovaných biomarkerů jsme zvolili protilátky pan-TRK, ALK a PD-L1.

Imunohistochemické hodnocení exprese pan-TRK bylo považováno za pozitivní při cytoplazmatické/jaderné expresi  $\geq 1$  % nádorových buněk. U protilátky ALK se hodnotil rozsah a intenzita cytoplazmatické exprese v nádorových buňkách (tzn. % zastoupení pozitivních nádorových buněk s intenzitou pozitivita 1+, 2+ a 3+). Exprese protilátky PD-L1 byla hodnocena pomocí TPS skóre (pozitivita nádorových buněk). Jako pozitivní byla hodnocena pouze membránová pozitivita nádorových buněk; hranice pozitivita byla stanovena na  $\geq 1$  %.

Tabulka 6 : Seznam použitých imunohistochemických protilátek

<b>protilátka</b>	<b>klon</b>	<b>ředění</b>	<b>výrobce</b>	<b>barvicí technika</b>	<b>detekce</b>
<b>FH</b>	polyklonální	1:500	Abcam, Cambrige, Velká Británie	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	En Vision FLEX (Agilent)
<b>Smoothelin</b>	R4A	1:50	Zeta Corporation, Sierra Madre, CA, USA	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>Transgelin</b>	2A10C2	1:300	Cell Marque, Roclin, CA, USA	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>CD10</b>	56C6	1:50	Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Německo	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>IFITM1</b>	polyklonální	1:300	Abcam, Cambrige, Velká Británie	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>HMGA2</b>	D1A7	1:400	Cell Signalling, Danvers, MA, USA	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	En Vision FLEX (Agilent)
<b>ER</b>	SP1	1:200	Zytomed Systems GmbH, Berlín, Německo	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView

<b>PR</b>	16	1:100	Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Německo	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>p16</b>	JC2	1:200	Diagnostic BioSystems Pleasanton, CA, USA	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>p53</b>	BP53-12	1:200	Zytomed Systems GmbH, Berlín, Německo	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>Ki-67</b>	MIB-1	1:100	Dako, Glostrup, Dánsko	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	UltraView
<b>pan-TRK</b>	EPR17341	1:100	Abcam, Cambrige, Velká Británie	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>PD-L1</b>	22C3	1:40	Dako, Glostrup, Dánsko	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>ALK</b>	D5F3	1:100	Cell Signalling, Danvers, MA, USA	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	OptiView
<b>PHH3</b>	polyklonální	1:100	Biocare Medical, Pacheco, CA, USA	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basilej, Švýcarsko)	UltraView

### 3.4. Molekulární analýza

Jako první byly provedeny molekulární analýzy genu *FH* u 108 LBN, 50 UL a 42 LMS. Genomická DNA byla izolována pomocí DNA Cobas® přípravné sady (Roche, Basilej, Švýcarsko) podle protokolu výrobce a poté spektrofotometricky kvantifikována pomocí přístroje NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Kvalita DNA byla zjištěna za použití 2% agarózové gelové elektroforézy a kontroly qPCR (5 × HOT FirePol EvaGreen HRM Mix NO ROX - Solis Biodyne, Tartu, Estonsko). Vzorky s nedostatečnou kvalitou DNA (Cp > 40) v kontrole amplicony velikostí 237 a 308 bp byly



z další analýzy vyloučeny, celkem šlo o 80 vzorků. DNA sekvenční analýza genu *FH* byla úspěšně provedena u 120 vzorků, a to 53 LBN, 47 UL a 20 LMS. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a přímé Sangerovo sekvenování bylo provedeno v celé kódovací oblasti (10 exonů) a přilehlých intronových sekvencích genu *FH*. Oblasti zájmu byly amplifikovány pomocí 5× HOT FirePol EvaGreen HRM Mix NO ROX (Solis Biodyne). BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) byl použit k sekvenační reakci. Separace byla provedena pomocí genetického analyzátoru ABI 3500 (Applied Biosystems). Vzhledem k limitaci metody Sangerova sekvenování jsme byli schopni detekovat pouze varianty s frekvencí nad 15 či 20 %. Odhad frekvence mutované alely byl možný ve srovnání s wild type alelou.

Všechny vzorky s mutacemi třídy 5/5 a 4/5 (patogenní nebo pravděpodobně patogenní) nebo vícečetnými nízkofrekvenčními varianty detekovanými dideoxy sekvenováním, které prošly hodnocením kvality DNA, byly opětovně sekvenovány pomocí sekvenace nové generace (NGS), aby se vyloučily možné falešně pozitivní detekce mutací v důsledku fixačních artefaktů nebo přítomnosti pseudogenů. Celkem se jednalo o 32 případů, z toho 18 LBN, 6 UL a 8 LMS. Jednotlivé vzorky určené pro panelovou NGS byly připraveny pomocí KAPA HyperPlus kitu dle SeqCap EZ protokolu (Roche NimbleGen), přičemž cílové genové sekvence byly obohaceny s využitím panelu na zakázku zhotovených SeqCap hybridizačních sond proti vícečetným cílům (257kbp panel cílových genů, NimbleGen, Roche, 89 genů nebo genových částí včetně celého kódování sekvence *FH*). Připravené knihovny byly sekvenovány pomocí přístroje NextSeq 500 (Illumina, San Diego, Kalifornie, USA) s využitím NextSeq 500/550 Mid Output Kitu v2.5 (150 cyklů). Základní nezpracovaná data získaná z panelového sekvenování byla demultiplexována, převedena do .fastq formátu a dále analyzována pomocí NextGENe v2.1.2 (Softgenetics) softwaru. Pokrytí vzorků v genu *FH* bylo v rozmezí 250-500x, což ukazuje dostatečnou citlivost metody NGS pro detekci mutací

s frekvencí > 5 %. Ve výsledcích jsou zahrnuty pouze varianty třídy 4 (varianta pravděpodobně patogenní) a 5 (varianta patogenní).

Molekulární analýzy 52 CL byly provedeny ve druhé době. Capture NGS analýza byla s ohledem na kvalitu materiálu možná u 32 případů na DNA úrovni a u 38 případů na RNA úrovni. Genomová DNA a RNA byly izolovány pomocí izolační sady DNA/RNA FFPE (ZymoResearch) podle protokolu výrobce. Kontrola kvality DNA byla provedena testem qPCR. Izolované vzorky celkové RNA byly charakterizovány pomocí kapilární elektroforézy (Fragment Analyser capillary electrophoresis system (AATI)) s použitím standardního RNA kitu. Komplementární DNA (cDNA) byla syntetizována z 2 µg celkové RNA. Panelová NGS byla připravena identicky jako výše popsána pomocí KAPA HyperPlus kitu podle protokolu KAPA HyperCapture (Roche) a vlastních hybridizačních sond (944 kbp cílové sekvence, včetně 765 kbp kódujících oblastí 300 genů). Vzorky RNA byly zpracovány amplikonem RNA NGS pomocí Archer FusionPlex Sarcoma Expanded Kit (ArcherDX) podle protokolu výrobce. Připravené knihovny byly sekvenovány pomocí přístroje NextSeq (Illumina) s využitím NextSeq500/550 High Output Kit v2.5 (300 cyklů). Variace počtu kopií (CNV) byla vyhodnocena pomocí algoritmu přístrojem NextGENe CNV Tool (Softgenetics), včetně delece 1q, mutací *MED12* a *FH*. Fúze byly vyhodnoceny z dat amplikonové RNA NGS pomocí softwaru Archer Analysis v5.1.7 (ArcherDX).

Komentář k hodnocení mutací:

Názvosloví variant mutací se řídí doporučeními Human Genome Variation Society (HGVS) a je založeno na referenční sekvenci NM\_000143.3. Nalezené mutace byly srovnávány s mutacemi nalezenými v dostupné literatuře nebo databázích (dpSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>; 1000 Genomes, <http://www.1000genomes.org/>; ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>; ESP, <http://varianttools.sourceforge.net/Annotation/>

EDS; COSMIC, <http://www.sanger.ac.uk/cosmic>; HGMD, <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/human-gene-mutation-database>).

Pro vyhodnocení nalezených mutací a jejich předpokládanému účinku byla využita metoda *in silico* Variant Effect Predictor (Ensemble; <http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>) (McLaren W. et al., 2016). Varianta byla považována za skutečně patogenní, pokud byla mutace identifikována jako patogenní v databázi ClinVar nebo pokud to naznačuje povaha mutace – zkrácení proteinového produktu (nonsense, frameshift, start loss, indels mutations). Varianta byla považována za pravděpodobně patogenní, pokud obsahovala alespoň šest z devíti *in silico* předpokládaného patogenního původu varianty (CADD, GERP ++, Mutation Assessor, Mutation Taster, Provean, SiPhy, VEST3, PolyPhen a SIFT).

### 3.5. Statistická analýza

K zhodnocení statistických přeměn byl použit Software STATISTICA 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA). K porovnání výsledků mezi nádorovými skupinami na základě imunohistochemické a klinicko-patologické proměnné byl použit Fisherův exact test nebo chí-kvadrát. Za statisticky významnou hodnotu byla považována p-hodnota  $< 0,05$ .

## 4. VÝSLEDKY

---

### 4.1. Klinická data leiomyomů s bizarními jádry a celulárních leiomyomů

Dostupná klinická data týkající se LBN jsou shrnuta v tabulce 7. V menším rozsahu jsou popsána také klinická data u CL. Věk patientek s LBN se pohyboval v rozmezí od 25 do 84 let, v průměru 43 let. Přibližně u poloviny patientek byla k dispozici klinická data, u druhé poloviny se je nepodařilo dohledat. U 80 % patientek s dostupnými klinickými daty bylo nejčastějším klinickým příznakem abnormální vaginální krvácení mimo cyklus (33 %) a

bolesti břicha či břišní diskomfort (8 %). Sporadicky se vyskytly případy hydronefrózy, protruze leiomyomu či jiné. Část pacientek z této skupiny byla asymptomatická (12 %). 104/108 (96 %) případů bylo lokalizováno v děložním těle, pouze 2/108 (2 %) byly lokalizovány v oblasti parametrií a u 2/108 (2 %) nebyla lokalita uvedena. V 62 % se jednalo o solitární léze, ve 38 % o léze vícečetné. Informace o operačním výkonu byla dostupná u 105 pacientek, z toho hysterektomií podstoupilo 60 z nich (57 %) a myomektomií 45 (43 %). Lokální rekurence byla popsána v 19 % (18/92), z toho 11 případů se dále biopticky neověřovalo, 2 pacientky měly lokální recidivu LBN, 4 UL a 1 mitotický aktivní leiomyom (ML). U 2 pacientek byl později diagnostikován LMS – u jedné vznikající ve vaginálním pahýlu 8 měsíců po hysterektomii, u druhé vzniklý v myometriu 7 let po myomektomii. Metastázy LBN nebyly pozorovány v žádném z případů. Žádná z našich pacientek neměla v osobní anamnéze renální neoplazii (sledování probíhalo od roku 1998 do roku 2017); ačkoli u jedné pacientky bylo v rodinné anamnéze uvedeno, že otec zemřel na generalizaci světlóbuňčného renálního karcinomu ve věku 61 let.

Tabulka 7: Klinická data u leiomyomů s bizarními jádry (LBN)

Klinické údaje	LBN n = 108	LBN typ I n = 72 (67 %)	LBN typ II n = 36 (33 %)
<b>Věk (průměr, roky)</b>	43	43	43
≤ průměr	67	52	15
> průměr	41	20	21
<b>Se symptomy</b>	50/63 (79,4 %)	33 (45,8 %)	17 (40,2 %)
<b>Operační výkon</b>			
hysterektomie	60/105 (57,1 %)	34 (47,2 %)	26 (72,2 %)
myomektomie	45/105 (42,9 %)	36 (50 %)	9 (25 %)
<b>Počet nádorů</b>			
solitární	59/96 (61,5 %)	38 (52,8 %)	21 (58,3 %)
vícečetné	37/96 (38,5 %)	27 (37,5 %)	10 (27,8 %)
<b>Rezidua/rekurence</b>	18/92 (19,6 %)	13 (18,1 %)	5 (13,9 %)
<b>Metastázy</b>	0	0	0

U pacientek s CL se věk pohyboval od 22 do 74 let, v průměru 43 let. Informace o operačním výkonu byla dostupná v 51 případech, z toho hysterektomií podstoupilo 25 z nich

(49 %) a myomektomii 26 (51 %). Velikost nádoru bylo možné zhodnotit pouze ve 23 případech a pohybovala se mezi 15-75 mm, v průměru 39,6 mm. Hmotnost nádoru byla hodnocena pouze po myomektomii u 19 případů, v průměru byla 104 g.

#### 4.2. Morfologické zhodnocení leiomyomů s bizarními jádry

Zhodnocení ohraničení léze od myometria bylo možné pouze u 68 případů, ve zbylých 40 případech nebyla zachycena přechodová zóna mezi nádorem a nenádorovou tkání. Všech 68 LBN (100 %) mělo expanzivní typ růstu, tzn. ostrou hranici vůči okolí. S ohledem na celularitu 98 % (106/108) nádorů vykazovalo střední a vysokou buněčnost, pouze 2 % (2/108) mělo buněčnost nízkou. Distribuce bizarních jader byla v nádorech heterogenní od difúzní (33 %), přes multifokální (56 %), po fokální (11 %) (obr. 3). Densita bizarních jader byla v 58 % nízká, 26 % střední a 16 % vysoká. Prominentní jádérka byla přítomna v 53 % a ve 33 % byly zastiženy eozinofilní jaderné pseudoinkluze. Počet mitóz se pohyboval v rozmezí 0-4/10 HPF (obj. 40), s distribucí 73 % (0/10 HPF), 19 % (1/10 HPF), 4 % (2/10 HPF), 2 % (3/10 HPF) a 3 % (4/10 HPF). V 18 % bylo hodnocení počtu mitóz komplikováno přítomností karyorektických jader (obr. 4A). Kondenzace cytoplazmy do podoby tzv. globoidních tělísek („rhabdoid-like cells“) byla pozorována v 56 % případů (obr. 4B). Regresivní změny v podobě edému, hyalinizace a vystupňovaných hydropických změn se vyskytovaly ve 31 %, 33 % a téměř 4 %. Ischemický typ nekrózy nebo suspekce na ischemický typ nekrózy byla zaznamenána ve 4,6 %. Cévní zásobení ve stromatu v podobě tzv. parožnatých krevních cév jsme pozorovali v 69 % případů (obr. 4C).

Na základě jaderných znaků byl soubor rozdělen na 72 případů LBN typ I (67 %, obr. 5A) a 36 případů LBN typ II (33 %, obr. 5B).

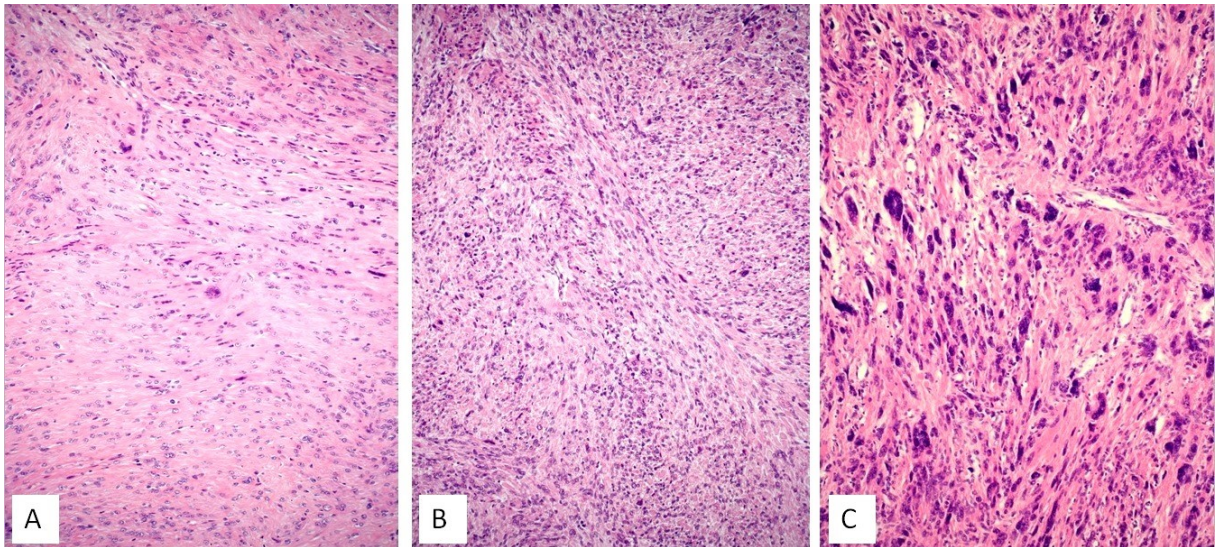
Skupina LBN typ I častěji obsahovala prominentní jádérka ( $\chi^2 = 20,23$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$ ) a „rhabdoid-like cells“ ( $\chi^2 = 21,77$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$ ) ve srovnání se skupinou LBN typ II.

V našem souboru nebyl statisticky významný rozdíl mezi přítomností tzv. parožnatých krevních cév v typu I a typu II LBN.

Shrnutí všech morfologických znaků LBN je v tabulce 8.

Tabulka 8: Histopatologické zhodnocení leiomyomů s bizarními jádry (LBN)

Morfologické zhodnocení	LBN n = 108	LBN typ I n = 72 (67 %)	LBN typ II n = 36 (33 %)
<b>Ohraničení</b>			
ostré	68/68 (100 %)	41 (56,9 %)	27 (75 %)
infiltrující	0	0	0
<b>Buněčnost</b>			
nízká	2 (2 %)	1 (1,4 %)	1 (2,8 %)
střední	75 (69 %)	52 (72,2 %)	23 (63,9 %)
vysoká	31 (29 %)	19 (26,4 %)	12 (33,3 %)
<b>Denzita</b>			
nízká	63 (58 %)	44 (61,1 %)	19 (52,8 %)
střední	28 (26 %)	18 (25 %)	10 (27,8 %)
vysoká	17 (16 %)	10 (13,9 %)	7 (19,4 %)
<b>Distribuce</b>			
fokální	12 (11 %)	9 (12,5 %)	3 (8,3 %)
multifokální	60 (56 %)	42 (58,3 %)	18 (50 %)
difúzní	36 (33 %)	21 (29,2 %)	15 (41,7 %)
<b>Prominentní jádérka</b>			
Ano	57 (53 %)	49 (68 %)	8 (22,2 %)
Ne	51 (47 %)	23 (32 %)	28 (77,8 %)
<b>Eozinofilní jaderné pseudoinkluze</b>			
Ano	36 (33,3 %)	22 (30,6 %)	14 (38,9 %)
Ne	72 (66,7 %)	50 (69,4 %)	22 (61,1 %)
<b>Karyorektická jádra</b>			
Ano	19 (18 %)	10 (13,9 %)	9 (25 %)
Ne	89 (82 %)	62 (86,1 %)	27 (75 %)
<b>Mitotické figury</b>			
0/10 HPF	79 (73 %)	55 (76,4 %)	24 (66,6 %)
1/10 HPF	20 (19 %)	14 (19,4 %)	6 (16,6 %)
2/10 HPF	4 (4 %)	2 (2,8 %)	2 (5,6 %)
3/10 HPF	2 (2 %)	0 (0 %)	2 (5,6 %)
4/10 HPF	3 (3 %)	1 (1,4 %)	2 (5,6 %)
<b>Rhabdoid-like buňky</b>			
Ano	61 (56 %)	52 (72,2 %)	9 (25 %)
Ne	47 (44 %)	20 (27,8 %)	27 (75 %)
<b>Parožnaté cévy</b>			
Ano	74 (69 %)	51 (70,8 %)	23 (63,9 %)
Ne	34 (31 %)	21 (29,2 %)	13 (36,1 %)

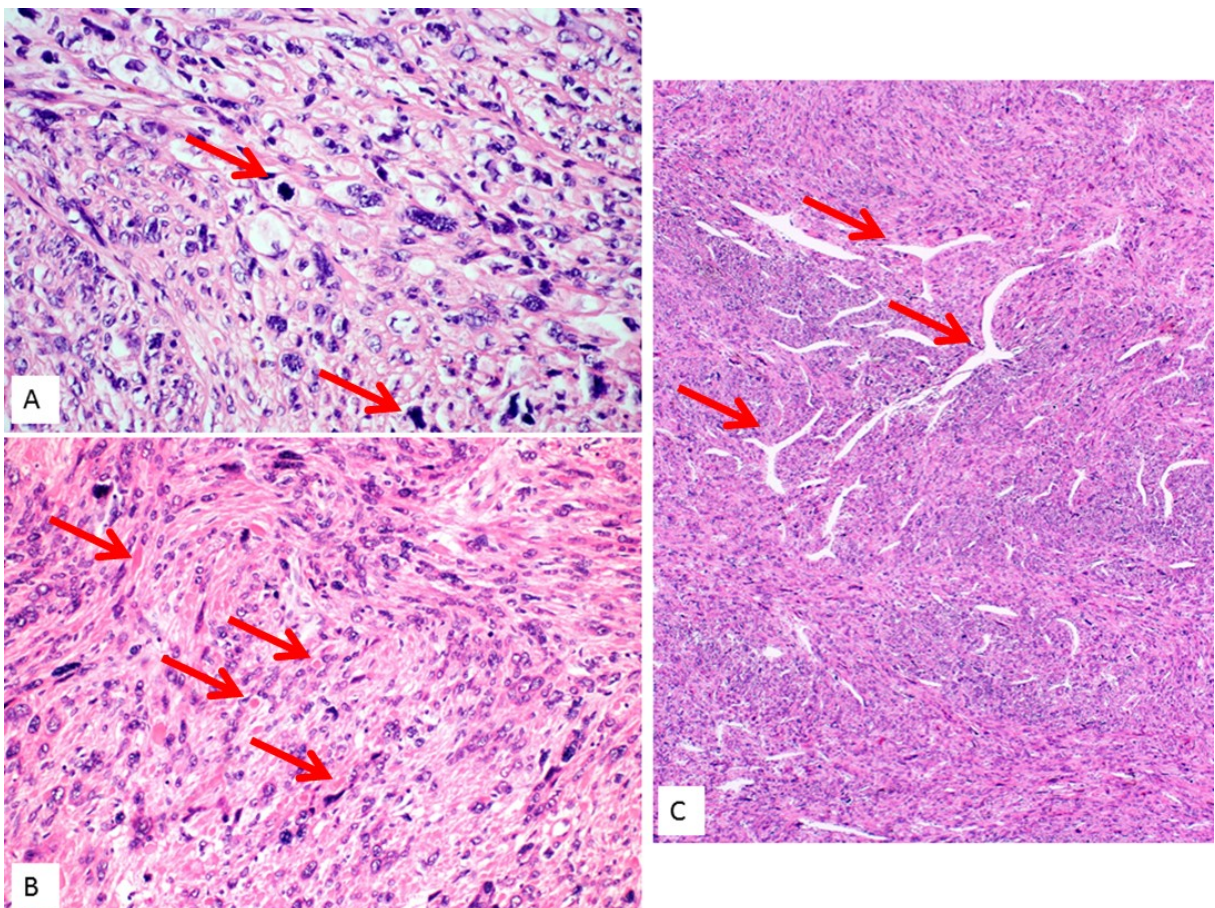


Obr. 3: LBN – distribuce bizarních jader (hematoxylin-eosin, zvětšení 200x)

A – fokální ( $\leq 5$  fokusů bizarních jader, s využitím objektivu 20).

B – multifokální ( $> 5$  fokusů bizarních jader, s využitím objektivu 20).

C – difúzní (přítomnost bizarních jader téměř v celém nádoru).

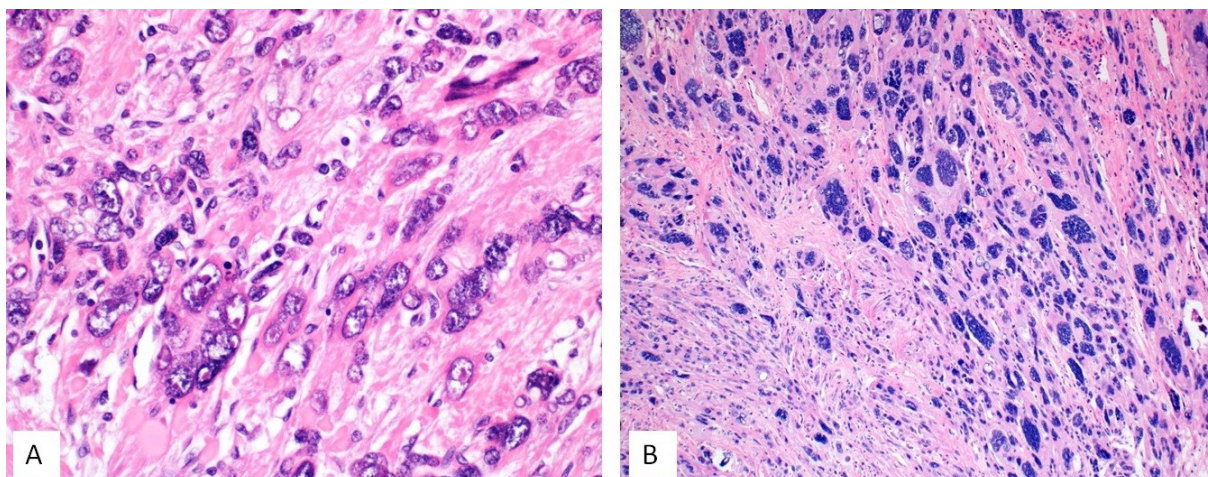


Obr. 4: LBN (hematoxylin-eosin)

A – karyorexe (zvětšení 400x).

B – globoidní eozinofilní cytoplazma v nádorových buňkách (tzv. „rhabdoid-like cells“, zvětšení 200x).

C – parožnaté cévy ve stromatu nádoru (zvětšení 40x).



Obr. 5: LBN typ I a typ II (hematoxylin-eosin)

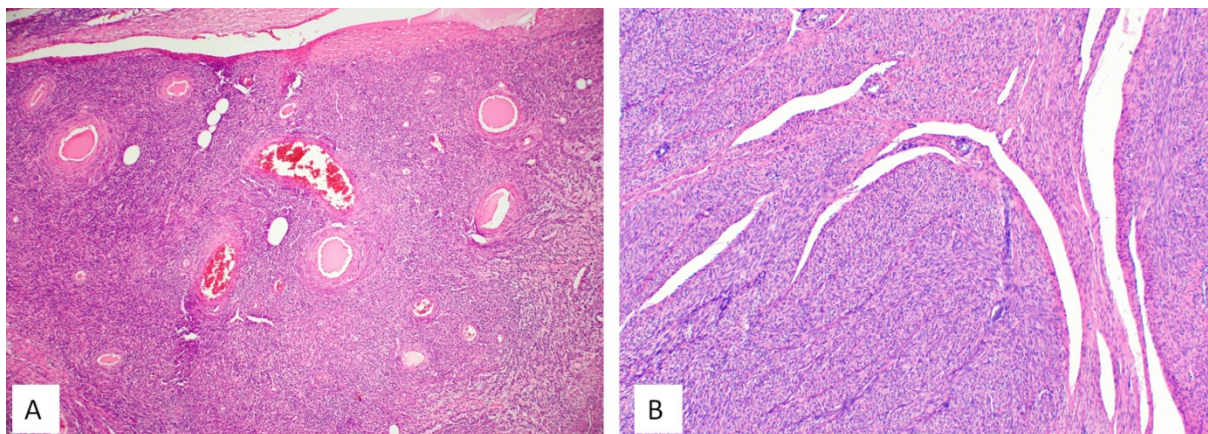
A – LBN typ I (zvětšení 400x): nádorové buňky s velkými okrouhlými či oválnými jádry, hladkou jadernou membránou, jemným vezikulárním chromatinem a prominentními eozinofilními jádérky.

B – LBN typ II (zvětšení 100x): nádorové buňky s protáhlými či vřetenitými jádry, s nepravidelnými jadernými membránami, s hrubým kondenzovaným chromatinem a žádnými nebo zcela nepatrnými jádérky.

#### 4.3. Morfologické zhodnocení celulárních leiomyomů

Ohraničení CL od myometria bylo hodnotitelné u 29/52 případů (56 %), z toho pouze v 8 případech byla hranice ostrá (27,5 %). Ve zbylých 21 případech bylo rozhraní neostré, u 2 případů až v podobě infiltrativního typu růstu. U 2/27 případů byly pozorovány tzv. satelitní noduly. Tzv. štěrbinovité prostory („clefts“) typické pro CL byly pozorovány ve 48/52 vzorků (92,3 %) a tlustostěnné krevní cévy v 51 případech (51/52, 98 %) (obr. 6).





Obr. 6: CL (hematoxylin-eosin)

A – hypercelulární léze, fascikulárně uspořádané vřetenité nádorové buňky bez atypií, tlustostěnné krevní cévy (zvětšení 100x).

B – štěrbinovité prostory („clefts“) (zvětšení 100x).

#### 4.4. Imunohistochemické vyšetření

##### 4.4.1. FH (anti-FH)

Imunohistochemické vyšetření s protilátkou FH bylo provedeno u všech vyšetřovaných lézích (LBN, CL, UL a LMS); komplexní přehled výsledků je v tabulce 9 a příklad pozitivní a negativní imunohistochemické exprese na obr. 7. U LBN jsme se zaměřili na samostatné zhodnocení oblastí s přítomností bizarních jader (R) a mimo tyto oblasti (G).

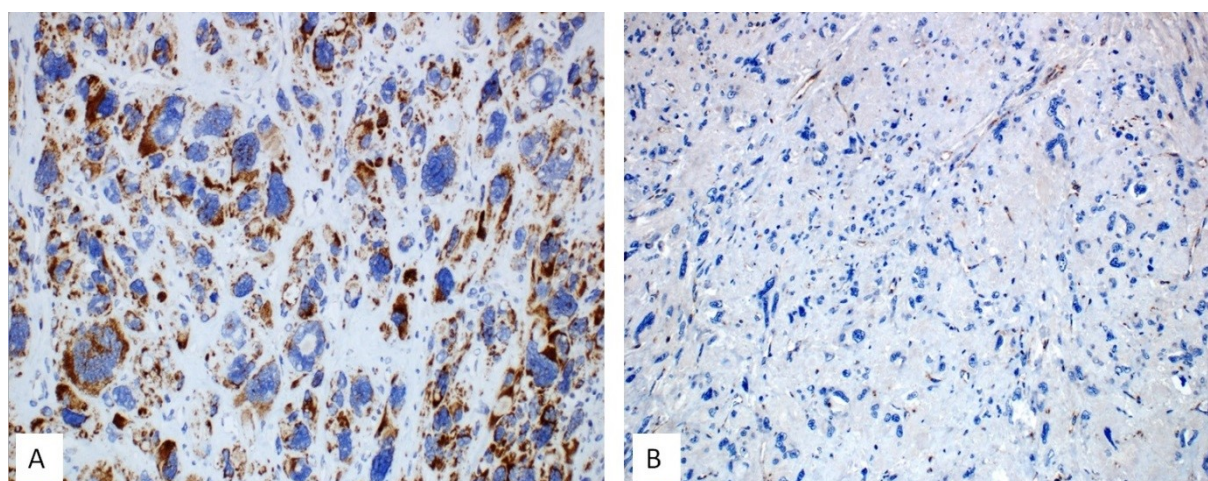
Imunohistochemická analýza prokázala ztrátu exprese FH u 67/108 (62 %) případů LBN (alespoň v jedné oblasti, tzn. R- nebo G-). V 97/108 (90 %) případů byla exprese v obou hodnotitelných lokalitách shodná. V 8/108 (7 %) případů, oblast G nemohla být vyhodnocena kvůli přítomnosti difuzních bizarních jader (chybění oblastí typického leiomyomu). U 3/108 (3 %) případů LBN byla zaznamenána odlišná exprese v různých oblastech: R versus G (n = 2) nebo různá exprese FH ve stejné lokalitě R (n = 1; R-, R+, G nejsou přítomny) [tabulka 10].

Ve skupině LBN typ I vykazovalo ztrátu exprese FH 76 % lézí (55/72), což bylo statisticky signifikantně častější ve srovnání s 33 % (12/36) ve skupině LBN typ II ( $\chi^2 = 18,89$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$ ). Ve skupině UL byla ztráta exprese FH pozorována pouze ve 2 % (1/50) případů. Ve skupině CL a LMS nebyla ztráta exprese pozorována v žádném vzorku.

Tabulka 9: Imunohistochemická exprese FH v různých lézích

<b>FH IHC exprese</b>	<b>LBN typ I</b>	<b>LBN typ II</b>	<b>LBN</b>	<b>UL</b>	<b>CL</b>	<b>LMS</b>
počet	72	36	108	50	52	42
negativní	55 (76 %)	12 (33 %)	67 (62 %)	1 (2 %)	0	0
pozitivní	17 (24 %)	24 (66 %)	41 (38 %)	49 (98 %)	52 (100 %)	42 (100 %)

legenda: FH – fumarát hydratáza, IHC – imunohistochemické vyšetření, LBN – leiomyom s bizarními jádry, UL – klasický leiomyom, CL – celulární leiomyom, LMS – leiomyosarkom



Obr. 7: LBN - imunohistochemické vyšetření s protilátkou FH (zvětšení 200x)

A – pozitivní (zachována cytoplazmatická imunohistochemická exprese FH).

B – negativní (ztráta imunohistochemické exprese FH, pozitivní vnitřní kontrola v endoteliích krevních cév).

Tabulka 10: Imunohistochemická exprese FH u LBN v odlišných oblastech R a G

<b>LBN: IHC vyšetření R a G oblasti</b>	<b>hodnocení IHC</b>	<b>108 LBN</b>
R-, G-	negativní	59 (54,6 %)
R-, G0	negativní	5 (4,6 %)
R-, G+	negativní	2 (1,9 %)
R+, G+	pozitivní	38 (35,2 %)
R+, G0	pozitivní	3 (2,8 %)
R-, R+, G0	negativní	1 (0,9 %)

legenda: FH – fumarát hydratáza, IHC – imunohistochemické vyšetření, LBN – leiomyom s bizarními jádry, R – oblasti nádoru s přítomností bizarních jader, G – oblasti v nádoru mimo bizarní jádra (= oblasti UL), G0 – nepřítomnost oblasti G v nádoru, +/- - negativní / pozitivní exprese FH

#### 4.4.2. Další analyzované protilátky

##### 4.4.2.1. Imunohistochemické markery hladkosvalové diferenciace

Imunohistochemická exprese některých „hladkosvalových markerů“ je u LMS signifikantně nižší, u jiných markerů jsou však literární data poměrně limitovaná a exprese smoothelinu nebyla u hladkosvalových lézí dělohy doposud analyzována. Přehled výsledků analyzovaných protilátek je v tabulce 11. U UL byla imunohistochemická exprese smoothelinu a transgelinu ve 48 % a 98 %; u LBN v 61 % a 99 %, u CL v 61,5 % a 96,1 %, a u LMS pouze ve 14,7 % a 71 %. Při srovnání těchto dvou protilátek se transgelin jeví jako více senzitivní marker.

V případě dalších markerů byla u UL exprese CD10 a IFITM1 ve 12 % a 18 %; u LBN 9,3 % a 9,3 %, u CL v 65,4 % a 36,5 %, a u LMS ve 24,5 % a 32,4 %.

Imunohistochemická exprese HMGA2 byla prokázána v 23/52 případech CL (44,2 %), z toho u 19 případů (19/52, 36,5 %) byla klasifikována jako overexprese ( $\geq 50$  % nádorových buněk).

Tabulka 11: Imunohistochemická exprese „hladkosvalových“ a dalších markerů

<b>protilátka</b>	<b>UL (n = 50)</b>	<b>LBN (n = 108)</b>	<b>CL (n = 52)</b>	<b>LMS (n = 68)</b>
	pozitivní (%)	pozitivní (%)	pozitivní (%)	pozitivní (%)
<b>smoothelin</b>	24 (48)	66 (61,1)	32 (61,5)	10 (14,7)
<b>transgelin</b>	49 (98)	107 (99)	50 (96,1)	48 (71)
<b>CD10</b>	6 (12)	10 (9,3)	34 (65,4)	18 (24,5)
<b>IFITM1</b>	9 (18)	10 (9,3)	19 (36,5)	22 (32,4)

legenda: UL – klasický leiomyom, LBN – leiomyom s bizarními jádry, CL – celulární leiomyom, LMS – leiomyosarkom

##### 4.4.2.2. Pomocné markery při stanovení biologické povahy leiomyocelulárních nádorů

Kompletní výsledky imunohistochemického vyšetření pomocných markerů při stanovení biologické povahy hladkosvalových lézí jsou shrnuty v tabulce 12.

V našem souboru vykazovalo vysokou expresi ER a PR 86-99 % případů UL a LBN, ale pouze 28-36 % LMS.

Imunohistochemická exprese p16 byla zcela negativní ve 14 % UL, 3,7 % LBN a 10,3 % LMS. Co se týče pozitivní exprese, tak v benigních lézích byla zastižena převážně nerovnoměrná (tzv. mozaikovitá či „patchy“), u UL to bylo ve 100 % vzorků, u LBN v 88,5 %. U LMS byla mozaikovitá exprese p16 pozorována pouze ve 23 %, v této skupině výrazně převyšoval difúzní typ exprese, a to v 77 %. Exprese p53 byla divoká (wild type) u 96 % UL, 96,3 % LBN a u 39,7 % LMS. Difúzní typ exprese p16 a aberantní exprese p53 se tedy častěji vyskytují u LMS, při jejich využití v praxi je však nutné si uvědomit, že tyto markery nejsou zcela specifické, v naší studii 11,5 % LBN vykazovalo difúzní expresi p16 a 3,7 % aberantní typ exprese p53.

Proliferační aktivita (Ki-67 index) byla ve všech případech UL a LBN < 1 % (v absolutních číslech se pozitivita pohybovala u UL v rozmezí 0-9 pozitivních jader nádorových buněk na 500 buněk a u LBN 0-10 pozitivních jader nádorových buněk na 500 buněk). Ve skupině LMS byl index Ki-67 heterogenní, < 1 % (16,2 %), 1-5 % (64,7 %), 6-10 % (10,3 %) a  $\geq 11$  % (8,8 %), přičemž nejvyšší počet pozitivních jader nádorových buněk na 500 buněk činil 87.

Při použití imunohistochemického markeru PHH3, který značí mitózy, se počet PHH3 pozitivních buněk pohyboval v rozmezí 0-7/10 HPF u UL, 0-8/10 HPF u LBN a 0-176/10 HPF u LMS. Více než 5 PHH3 pozitivních buněk na 10 HPF bylo zastiženo u 2 % UL, 2 % LBN a 72 % LMS.

Tabulka 12: Imunohistochemická exprese markerů pomocných při stanovení biologické povahy hladkosvalových lézí

protilátka		UL (n = 50)	LBN (n = 108)	LMS (n = 68)
<b>ER</b>	pozitivní (%)	43 (86)	95 (88)	25 (36,7)
<b>PR</b>	pozitivní (%)	47 (94)	107 (99)	19 (28)
<b>p16</b>	pozitivní (%)	43 (86)	104 (96,3)	61 (89,7)
	patchy	43/43 (100 %)	92/104 (88,5 %)	14/61 (23 %)
	difúzní	0/43 (0 %)	12/104 (11,5 %)	47/61 (77 %)
	negativní (%)	7/50 (14)	4/108 (3,7)	7/68 (10,3)
<b>p53</b>	divoký	48/50 (96 %)	104/108 (96,3 %)	27/68 (39,7 %)
	aberrantní	2/50 (4 %)	4/108 (3,7 %)	41/68 (60,3 %)
<b>Ki-67</b>	< 1 %	50 (100 %)	108 (100 %)	11 (16,2 %)
	1-5 %	0	0	44 (64,7 %)
	6-10 %	0	0	7 (10,3 %)
	≥ 11 %	0	0	6 (8,8 %)
<b>PHH3</b>	0	10 (80 %)	92 (85 %)	6 (9 %)
	1-5	9 (18 %)	14 (13 %)	13 (19 %)
	6-10	1 (2 %)	2 (2 %)	14 (21 %)
	> 10	0 (0 %)	0 (0 %)	35 (51 %)

legenda: ER – estrogenové receptory, PR – progesteronové receptory, p16 – protein p16, p53 – protein p53, Ki-67 – marker proliferační aktivity, PHH3 – protilátka značící mitózy (fosfohiston H3)

Srovnání výsledků imunohistochemické exprese vybraných protilátek pomocných při stanovení biologické povahy hladkosvalových lézí v naší studii a v souhrnem přehledovém článku z roku 2021 je uvedeno v tabulce 13.

Tabulka 13: Výsledky exprese IHC protilátek s významem při stanovení biologické povahy nádorů (uvedeno v %)

	Dundr et al.			naše studie		
	UL	LBN	LMS	UL	LBN	LMS
ER	89	73	39	86	88	37
PR	96	98	44	94	99	28
p16*	0	22	60	0	12	77
p53**	0	12	45	4	4	60

legenda: UL – klasické leiomyomy, LBN – leiomyomy s bizarními jádry, LMS – leiomyosarkomy, \* – difúzní bloková pozitivita, \*\* – aberrantní typ exprese

Při srovnání imunohistochemických výsledků a výsledků molekulárního vyšetření ve skupině LBN je zřetelné, že u prvního typu LBN je častější přítomnost mutací v genu *FH*, kdežto u druhého typu jsou častější mutace genů *TP53* a *CDKN2A*. Více než 5 PHH3

pozitivních buněk na 10 HPF bylo zastiženo pouze ve skupině LBN typu II (2/36, 5,6 %), ve skupině LBN typu I se nenašel žádný takový případ.

V tabulce 14 je srovnání imunohistochemických výsledků a výsledků molekulárního vyšetření genu *FH* u LBN typu I a typu II.

Tabulka 14: Imunohistochemické srovnání exprese vybraných protilátek mezi LBN typ I a II

	LBN typ I (n= 72), %	LBN typ II (n= 36), %
ER	89	86
PR	11	14
p16*	6,9	<b>19,4</b>
p53**	2,8	<b>5,6</b>
PHH3		
0/10 HPF	88,9	77,8
1-5/10 HPF	11,1	16,7
6-10/10HPF	0	<b>5,6</b>
>10/10HPF	0	0
mutace <i>FH</i>	<b>35</b>	16

legenda: ER – estrogenové receptory, PR – progesteronové receptory, p16 – protein p16, p53 – protein p53, PHH3 – protilátka značící mitózy (fosfo-histon H3), *FH* – gen fumarát hydratáza

#### 4.4.2.3. Imunohistochemická exprese potenciálně prediktivních markerů

Do skupiny námi studovaných markerů jsme zařadili pan-TRK, ALK a PD-L1 [tabulka 15].

Expres pan-TRK byla prokázána u 8 % UL (intenzita positivity 1+ až 2+), u 5,6 % LBN (intenzita positivity 1+), u 9,6 % CL a u 10,3 % LMS (intenzita positivity se pohybovala od 1+ až po 3+). Expres ALK byla zastižena pouze ve skupině LMS, a to ve 3 případech (4,4 %). V rámci semikvantitativního hodnocení byla pozitivita prokázána v 40 %, 70 % a 80 % nádorových buněk a intenzita se pohybovala od slabé až po silnou (1+ až 3+). Imunohistochemická exprese PD-L1 byla prokázána pouze ve skupině LMS, a to ve 2 případech (TPS 40 % a 80 %).

Tabulka 15: Exprese prediktivních biomarkerů v hladkosvalových lézích

<b>protilátka</b>	<b>UL (n = 50)</b>	<b>LBN (n = 108)</b>	<b>CL (n = 52)</b>	<b>LMS (n = 68)</b>
	pozitivní (%)	pozitivní (%)	pozitivní (%)	pozitivní (%)
<b>pan-TRK</b>	4 (8)	6 (5,6)	5 (9,6)	7 (10,3)
<b>ALK</b>	0	0	0	3 (4,4)
<b>PD-L1</b>	0	0	-	2 (2,9)

#### 4.5. Molekulární analýza

Sekvenční analýza byla u LBN primárně provedena pomocí přímého Sangerova sekvenování. Výsledky vykazovaly vysoký počet detekovaných mutací v genu *FH* (243) s vysokým procentuálním zastoupením substitucí C>T nebo G>A (97/243; 40 % a 93/243; 38 %). Tyto substituce bývají častokrát popisovány v souvislosti s fixačními artefakty (pravděpodobně při deaminaci, která vznikla fixací materiálu). Většina z těchto substitucí (82 % C>T a 62 % G>A) vykazovala nízkou frekvenci výskytu (menší než 25 %) na Sangerových elektroforeogramech. Kromě toho bylo detekováno několik nízkofrekvenčních mutací v mnoha dalších vzorcích. Pro vyloučení možné falešně pozitivní detekce mutací v důsledku artefaktů fixace nebo existujících pseudogenů *FH* byly případy pozitivní v Sangerovém sekvenování znovu sekvenovány pomocí NGS. Celkem se jednalo o 32 případů, z toho 18 LBN, 6 UL a 8 LMS. Výsledky mezi sekvenací NGS a Sangerovou metodou byly porovnány a bylo zjištěno, že nízkofrekvenční varianty mutací (varianty, jejichž signál byl méně než jedna třetina signálu divokého typu na elektroforeogramu) nebyly potvrzeny pomocí NGS. Proto byly tyto varianty považovány za artefakty, které byly společně se pseudogenovými variantami odfiltrovány.

Při analýze NGS dat bylo zaznamenáno mapování čtení do oblastí mimo kódující sekvenci genu *FH*, což vedlo k identifikaci dvou pseudogenů *FH*. Pseudogen fumarát hydratázy 1 (FHP1) byl již popsán (HGNC: 39442; Entrez Gene ID: 100873790), zahrnuje reverzně transkribovanou sekvenci mRNA *FH* exonu 7-10 (NCBI Ref Seq: NG\_032302.2), je lokalizovaný na chromozomu 13q14.11 a vykazuje 95% homologii. My jsme popsali další

kopii tohoto pseudogenu vykazující 89% homologii s *FH*, která dosud v databázích uvedena nebyla. Porovnáním sekvence pseudogenu s lidským genomem za použití BLAST/BLAT jsme určili lokalizaci této nové varianty pseudogenu na chromozomu 5p13.2.

Sekvenace odhalila 57 alterací genu *FH* u 39/120 lézí, včetně 56 jednonukleotidových polymorfismů a jedné komplexní patogenní varianty (c. [278T> C; 282delA; 284C> G], s. [1193Thr; Ala95ValfsTer5]). Z nalezených 57 alterací bylo 6 truncačních mutací (protein zkracujících, 6/57, 10,5 %), 25 missense (mutace měnící smysl, 25/57, 43,9 %), 8 silent mutací (mutace nemění smysl, 5/57, 14 %) a 17 mutací v nekódujících oblastech (non-coding, 17/57, 29,8 %).

Ze všech 57 identifikovaných alterací bylo 51 variant unikátních (48 bylo detekováno jednou, 2 byly detekovány ve dvou vzorcích, 1 byla detekována u 5 vzorků). Z těchto 51 unikátních variant bylo 24 variant již v databázích popsáno a 27 variant bylo nových.

Zhodnocení funkčního dopadu zjištěných alterací bylo pomocí databáze ClinVar a *in silico* detekce. Patogenní varianty dle ClinVar nebo truncační mutace byly nalezeny u 7/53 LBN (13 %). Patogenní (třída 5/5) nebo pravděpodobně patogenní (třída 4/5) mutace byla stanovena metodou *in silico* u 8/53 LBN (15 %). V celkovém zhodnocení byla patogenní nebo pravděpodobně patogenní mutace genu *FH* nalezena u 15/53 (28,3 %) LBN; z toho 12/34 (35 %) u LBN typu I a 3/19 (16 %) u LBN typu II.

Při srovnání imunohistochemického vyšetření s molekulárními analýzami byla u 45 % LBN (13/29) s detekovanou ztrátou exprese *FH* na proteinové úrovni nalezena i mutace genu *FH*. Mutace genu *FH* se kromě toho vyskytla i u 2/24 případů se zachovalou expresí *FH* (8 %) [tabulka 16].

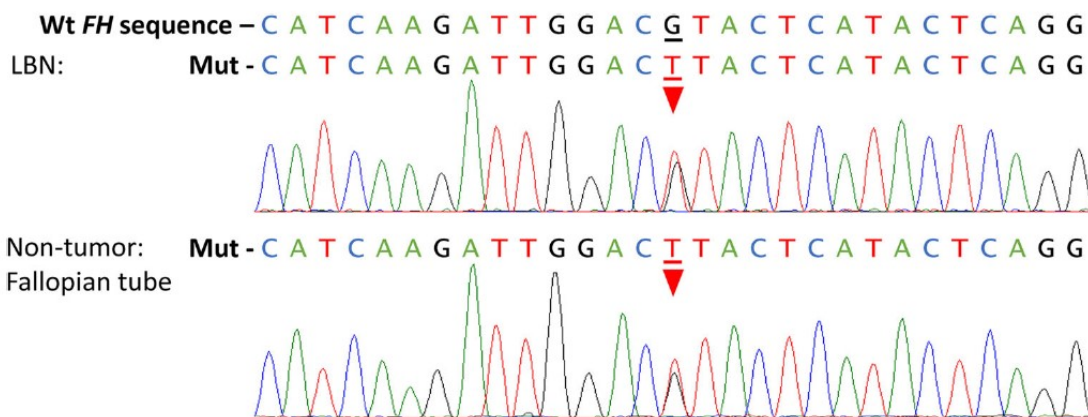


Tabulka 16: Srovnání IHC vyšetření FH s molekulárními analýzami genu *FH*

Výsledky IHC a molekulárního vyšetření	LBN, n = 108	LBN typ I n = 72 (67 %)	LBN typ II n = 36 (33 %)
Počet případů s mutací FH / pozitivní IHC	2/24 (8 %)	1/11 (9 %)	1/13 (8 %)
Počet případů s mutací FH / negativní IHC	13/29 (45 %)	11/23 (48 %)	2/6 (33 %)

Souhrnně tedy byly patogenní či pravděpodobně patogenní mutace (tj. mutace třídy 5/5 a 4/5) detekovány u 15/53 (28,3 %) LBN, ale v žádném případě UL (0/47) nebo LMS (0/20).

Zjištěné varianty byly převážně somatického původu, prokázána však byla i 1 germinální patogenní varianta *FH* v exonu 5 (c.698G> T, p.R233L; frekvence mutované alely 50 %; obr. 8), která byla nalezena u pacientky ve věku 36 let. Tato varianta se nachází v sekvenci aktivní katalytické domény (Lyase\_1) *FH* a byla již popsána v několika publikacích a databázích spojených se syndromem HLRCC. Analýza metodou *in silico* svědčila pro patogenní povahu varianty.



Obr. 8: Sekvenační analýza genu *FH*.

Germinální patogenní mutace v exonu 5 genu *fumarát hydratázy* NM\_000143,3: c 698 G>T; p. (Arg233Leu); rs121913123. Heterozygotní varianta byla detekována v LBN a také v odpovídající nenádorové tkáni (děložní tuba).

U 3 případů LBN s diskrepancí ve výsledcích imunohistochemického vyšetření mezi oblastmi s bizarními jádry a mimo ně byly výsledky molekulárního vyšetření následující: u prvního případu (R-, G+) byly prokázány 2 pravděpodobně patogenní (missense) mutace v exonu 8 (p. G389R - frekvence mutované alely 35 % a p.P410L - frekvence mutované alely 30 %). U druhého případu (R-, G0) a ve třetím případě (R-, R+) nebyly nalezeny žádné mutace genu *FH*.

Při NGS analýze 52 CL (32 na úrovni DNA a 38 na úrovni RNA) byla ve 3/32 případech (9,4 %) prokázána mutace genu *MED12*, v 6/31 případech (19,3 %) heterozygotní delece chromozomu 1p a v 5/38 vzorků (13,2 %) přestavba genu *HMGA2*. Všechny případy s přestavbou genu *HMGA2* vykazovaly imunohistochemickou overexpresi *HMGA2*. Fúzní partneři byli identifikováni na úrovni mRNA ve třech případech: (i) *HMGA2* (exon 3)-*C9orf92* (exon 4); (ii) *HMGA2* (exon 5)-*PBX1* (exon 3); a (iii) *RAD51B* (exon 8)-*HMGA2* (exon 2). Ve zbývajících 2 případech nebyl detekován žádný fúzní partner. Patogenní mutace genu *FH* nebyly zjištěny v žádném vzorku.

Ve 29 vyšetřovaných vzorcích (29/52), které byly současně vhodné pro kompletní imunohistochemickou i DNA a RNA NGS analýzu (mutace *MED12*, overexprese *HMGA2*, přestavba *HMGA2*, exprese *FH* a mutace *FH*, delece chromozomu 1p), byly všechny zastižené aberace unikátní a vzájemně se vylučovaly. Výsledky imunohistochemických a NGS analýz u CL jsou shrnuty v tabulce 17.

Tabulka 17: Výsledky imunohistochemických a molekulárních analýz u CL

	HMGA2 IHC overexprese	delece chromozomu 1p	mutace <i>MED12</i>
CL (n = 52)	36,5 %	19,3 %	9,4 %

## 5. DISKUZE

---

Leiomyomy jsou nečastější benigní nádory dělohy, jejichž diagnostika je ve většině případů jednoduchá. Minorita nádorů, zejména speciálních morfologických subtypů, však vykazuje určité rysy, které mohou způsobovat diferenciálně diagnostické problémy. Mezi tyto subtypy, které představují asi 10 % všech leiomyomů dělohy, patří i LBN; dalšími subtypy jsou například CL, ML, myxoidní leiomyom a epiteloidní leiomyom. LBN představuje vzácný subtyp leiomyomu. V recentní práci, která se zaměřila na follow-up pacientek s diagnózou LBN po myomektomii diagnostikovaných v letech 2002-2017, bylo hodnoceno celkem 1680 pacientek, z toho pouze u 37 (2,2 %) byla stanovena diagnóza LBN (Boudová B. et al., 2019). Doposud publikované studie většinou zahrnují řádově desítky případů LBN, nebo jde pouze o kazuistická sdělení (Liegl-Atzwanger B. et al., 2016; Ubago JM. et al., 2016; Bennett JA. et al., 2017; Croce S. et al., 2014; Dastranj Tabrizi A. et al., 2015; Kefeli M. et al., 2018; Liang Y. et al., 2015; Ly A. et al., 2013; Sung CO. et al., 2009; Zhang Q. et al., 2018; Kalogiannidis I. et al., 2016). Naše práce zahrnující 108 případů je s ohledem na velikost jeden z dosud největších publikovaných souborů.

LBN byl poprvé popsán v roce 1994 (Bell SW. et al., 1994). Terminologie této léze se opakovaně měnila, starší názvy zněly atypický leiomyom s nízkým rizikem rekurence, atypický leiomyom, pleomorfnní leiomyom a také symplastický leiomyom. Současná WHO klasifikace nádorů ženského genitálu z roku 2020 uvádí pouze 2 akceptovatelné termíny, a to LBN nebo symplastický leiomyom (Cree IA. et al., 2020). I přes terminologické změny, morfologická diagnostická kritéria nastavená v roce 1994 přetrvávají s mírnými odchylkami dodnes. V roce 1994 byl LBN definován jako hladkosvalový nádor s přítomností středně těžkých až těžkých jaderných atypií, s výskytem < 10 mitóz na 10 HPF, bez přítomnosti koagulačního typu nekrózy (Bell SW. et al., 1994). Recentní WHO klasifikace nádorů

ženského genitálu definuje LBN jako hladkosvalový nádor s bizarními jádry v různém počtu a distribuci (fokálně, multifokálně či difúzně), s mitózami v počtu < 5/10 HPF a nepřítomností koagulačního typu nekrózy (Cree IA. et al., 2020). Popsány jsou navíc také další doplňující morfológické znaky, jako jsou karyorektická či pyknotická jádra, jaderné pseudoinkluze, vezikulární nebo hrubý jaderný chromatin, eozinofilní cytoplazma a globoidní cytoplazmatická tělíska (Cree IA. et al., 2020). Zdůrazněno je, že karyorektická jádra nesmí být mylně interpretována jako mitózy, což by mohlo vést k chybné diagnóze LMS. Některé uvedené morfológické znaky můžeme najít i u CL, UL a u nově vyčleněné jednotky, FH-deficientního leiomyomu (Cree IA. et al., 2020), u kterého bývají prokázány somatické či germinální mutace *FH*. Dle nejnovějších studií se zdá, že LBN představuje heterogenní skupinu nádorů, jejichž jedna část je asociována s alteracemi v genu *FH*, u druhé části se častěji vyskytují alterace v genech *TP53* a *RBI* (Bennett JA. et al., 2017; Ubago JM. et al., 2016; Zhang Q. et al., 2017).

V naší práci jsme provedli komplexní retrospektivní klinicko-patologickou, morfológickou, imunohistochemickou a molekulární analýzu LBN. Z molekulárního hlediska jsme se zaměřili hlavně na stanovení genetických a epigenetických změn genu *FH*, které jsou v recentních publikacích považovány za součást tumorigeneze části LBN. Kromě toho se u LBN s alteracemi v genu *FH* u části pacientů může jednat o manifestaci HLRCC, přičemž vznik leiomyomů může předcházet vzniku renálního karcinomu i o několik let. Proto jsme se zaměřili i na možnost využití imunohistochemického vyšetření s protilátkou FH (anti-FH) jako screeningové metody k odhalení pacientů s mutací genu *FH*.

Problematika biologické povahy LBN byla v literatuře opakovaně diskutována. V minulosti se na LBN nahlíželo jako na nádor s nízkým maligním potenciálem nebo nádor nejasné či neznámé biologické povahy. Většina pacientek proto podstupovala jako kurativní výkon hysterektomie, a to i přes skutečnost, že se jednalo často o mladší pacientky

v reprodukčním věku. Dostupné publikace s delším sledováním pacientek však ukazují, že většina LBN vykazuje benigní chování (Sung CO. et al., 2009; Croce S. et al., 2014; Ly A. et al., 2013). Navzdory této skutečnosti je nutno zdůraznit, že část LBN sdílí některé morfologické a molekulární znaky s LMS, což může při jejich diagnostice způsobovat problémy. Některé práce vzhledem k tomu také zpochybňují, že LBN je nádor s výraznými „degenerativními“ buněčnými/jadernými atypiiemi a vyslovují hypotézu, že by se mohlo jednat o nádor s potenciálním maligním chováním, resp. že by mohlo docházet k jeho progresi do LMS. LBN by tak představoval prekurzorovou lézi (Liegl-Atzwanger B. et al., 2016; Mäkinen N. et al., 2017). Nadále tedy přetrvávají určité nejistoty týkající se biologické povahy těchto lézí. I když je na LBN v současné době nahlíženo jako na léze benigní, literární data jsou poměrně limitovaná a většina pacientek je nadále léčena hysterektomií. Rozsáhlejší studie sledující pacientky léčené myomektomií chybí (Sung CO. et al., 2009; Croce S. et al., 2014).

Z našeho souboru 108 pacientek byla dostupná follow-up data u 92 případů a lokální rekurence byla popsána u 18 z nich (19,6 %), z toho 11 nebylo histologicky ověřeno. U 7 biopticky ověřených recidiv se ve 2 z nich jednalo opět o LBN (28,6 %), ve 4 o UL (57,1 %) a v 1 případě o ML (14,3 %). Kromě toho u 2 pacientek byl následně diagnostikován LMS. V jednom případě vzniklý ve vaginálním pahýlu 8 měsíců po hysterektomii, ve druhém případě vzniklý 7 let po myomektomii v děloze. Metastatický rozsev nebyl pozorován v žádném z případů.

Nejstarší práce, která poukazuje na přítomnost lokálních recidiv, se objevuje již v roce 1994, kdy Peters a kolektiv hodnotili 15 hladkosvalových nádorů klasifikovaných jako nádory s nejistým biologickým chováním, a ve 27 % došlo k recidivě onemocnění. Jednalo se o nádory s mírnými až středně těžkými buněčnými atypiiemi a přítomností 5-10 mitóz na 10 HPF. Nebyla však uvedena zmínka o přítomnosti či absenci koagulačního typu nekrózy, a

tedy je diskutabilní, jestli se ve všech případech opravdu jednalo o LBN (Peters WA. 3rd et al., 1994).

Recidivy LBN po hysterektomii a myomektomii popisují také autoři jiné studie na souboru 51 pacientek. Hysterektomii podstoupilo 34 pacientek a myomektomii 17 pacientek. Z pacientek léčených hysterektomií byla pozorována 1 recidiva (2,9 %) v podobě LBN v retroperitoneu po 87,5 měsících, zbývající pacientky byly bez recidivy. Ve skupině pacientek po myomektomii byla u 3 pacientek (18 %) popsána recidiva v podobě LBN. U 2 pacientek se jednalo o lézi diagnostikovanou v následné hysterektomii, 1 pacientka podstoupila opakovanou myomektomii následně se 2 úspěšnými těhotenstvími (Ly A. et al., 2013). Recidiva LBN byla popsána také v jiné studii ve 2 z 35 případů LBN (5,7 %), v 1 z těchto případů se jednalo o recidivu extrauterinní (Mills AM. et al., 2013). Pouze v jedné práci zahrnující 59 případů LBN nebyla popsána žádná recidiva onemocnění, i zde se jednalo o pacientky buď po hysterektomii (42), nebo po myomektomii (17) (Croce S. et al., 2014).

V porovnání našich výsledků s výsledky jiných studií lze konstatovat, že u části pacientek může dojít k recidivě onemocnění, v našem případě byla četnost výskytu rekurencí 19,6 %.

I přes výskyt recidiv nebylo v literatuře popsáno úmrtí pacienta v přímé souvislosti s LBN. Naše výsledky i výsledky dalších publikovaných studií tedy podporují názor, že i když LBN vykazuje na morfologické úrovni jaderné atypie a na molekulární úrovni určité podobnosti s LMS, jedná se o lézi benigní. Vzhledem k uvedenému se tedy u pacientek přejících si zachování fertility jeví myomektomie jako adekvátní léčebná metoda. Ve studii 37 pacientek s LBN po myomektomii sledovaných v rámci naší nemocnice bylo zaznamenáno úspěšné těhotenství ve 23 případech (Boudová B. et al. 2019).

Z pohledu patologa je důležité správné morfologické zhodnocení léze. LBN se vyznačuje přítomností bizarních jader, nesmí být zastižen koagulační typ nekrózy a počet mitóz musí být  $< 5/10$  HPF. Definujícím znakem této varianty je tedy přítomnost bizarních

jader. V našem souboru byla denzita bizarních jader různá; nízká, střední i vysoká, 58 %, 26 %, resp. 16 %. Distribuce bizarních jader byla fokální, multifokální a difúzní v 11 %, 56 % a 33 %. Denzita bizarních jader v jednotlivých publikacích se pohybovala v rozmezí nízké (5-48 %), střední (32-62 %) a vysoké (20-33 %). Identická situace je i s distribucí bizarních jader, která může být fokální (26-39 %), multifokální (44 %), difúzní (30-69 %) (Croce S. et al., 2014; Ubago JM. et al., 2016; Bennett JA. et al., 2017). Z publikovaných výsledků i našich dat tedy vyplývá, že přítomnost bizarních jader může být v nádoru i ve velice malém množství a stanovení diagnózy tedy může být v některých případech i z tohoto pohledu obtížné.

S ohledem na výskyt koagulačního typu nekrózy, která představuje vylučující kritérium pro diagnózu LBN, je důležité její odlišení od ischemického typu nekrózy. V našem souboru se ischemická nekróza vyskytla ve 4,6 % případů (5/108). V jedné práci byla nekróza detekována až ve 36 %, navíc byla i multifokální (Croce S. et al., 2014).

Posledním z hlavních morfologických kritérií je stanovení počtu mitóz. Podle současných diagnostických kritérií musí být počet mitóz  $< 5/10$  HPF, jinak je léze klasifikována buď jako STUMP (5-9/10 HPF), nebo jako LMS ( $\geq 10/10$  HPF). V našem souboru nebyly u 73 % případů zastíženy žádné mitózy, 1/10 HPF byla u 19 % případů, 2/10 HPF u 4 % případů, 3/10 HPF u 2 % případů a 4/10 HPF u 3 % případů. Dle současných diagnostických kritérií počet mitóz  $\geq 5/10$  HPF vylučuje diagnózu LBN, nicméně v pracích publikovaných před tímto datem je popsáno několik publikací s vyšším počtem mitóz. V práci autorů z roku 2016 počet mitóz kolísal od  $< 1/10$  HPF (8 %), přes 1-5/10 HPF (82 %), až po  $> 5/10$  HPF (10 %) (Ubago JM. et al., 2016). V jiné práci z roku 2014 byl počet mitóz  $< 2/10$  HPF v 63 %, 2-5/10 HPF v 19 % a v 5 % byl  $> 5/10$  HPF, konkrétně 6-7/10 HPF (Croce S. et al., 2014). Hodnocení počtu mitóz může být v některých případech LBN velice obtížné, zejména z důvodu výskytu karyorektických či pyknotických jader, která lze snadno mylně

interpretovat jako mitózy. V tomto ohledu může být nápomocné imunohistochemické vyšetření s protilátkou PHH3 (Liang Y. et al., 2015; Pang SJ. et al., 2015). Mitózy značené protilátkou PHH3 jsou snadno pozorovatelné a umožňují rychlou identifikaci oblastí s nejvyšší mitotickou aktivitou (tzv. „hot spots“). V práci Lianga, která zahrnovala 15 UL, 32 LBN a 15 LMS, je patrná statisticky významná odchylka v expresi PHH3 mezi popsányými kategoriemi, kde exprese > 5 PHH3 pozitivních buněk na 10 HPF byla pozorována u 80 % LMS, 16 % LBN a pouze u 0,67 % UL (Liang Y. et al., 2015). Podobně Mills a jeho spolupracovníci prokázali > 5 PHH3 pozitivních buněk na 10 HPF u 46 % LMS a pouze u 2,78 % LBN (Mills AM. et al., 2013). V našem souboru se exprese PHH3 pozitivních nádorových buněk na 10 HPF pohybovala v rámci 0-7/10 HPF u UL, 0-8/10 HPF u LBN a 0-176/10 HPF u LMS. Více než 5 PHH3 pozitivních buněk na 10 HPF bylo zastiženo u 2 % UL, 2 % LBN a 72 % LMS. Nutné je však zdůraznit, že v kategorii LMS bylo 28 % nádorů, které vykazovaly nízkou expresi PHH3, tzn. 0-5/ 10 HPF. Naše výsledky jsou v souladu s dosavadními publikacemi a poukazují na skutečnost, že imunohistochemické vyšetření s protilátkou PHH3 může být při stanovení počtu mitóz nápomocné, a to zejména při odlišení mezi pravou mitózou a jejím napodobovatelem různého původu. V současné době by však vyšetření PHH3 nemělo být použito při stanovení počtu mitóz na 10 HPF za účelem stanovení biologické povahy leiomyocelulárních nádorů, nastavené algoritmy vycházejí z hodnocení preparátů barvených hematoxylin-eosinem a literární data poukazují na fakt, že počet mitóz hodnocených s použitím PHH3 je vyšší, což by u části nádorů měnilo jejich klasifikaci.

Mezi dalšími hodnocenými morfologickými znaky byly cytologické charakteristiky jader nádorových buněk, podle kterých lze LBN zařadit do 2 kategorií, LBN typ I a typ II. První skupina je dle literárních údajů výrazněji spjatá s alteracemi v genu *FH*. V recentně popsané práci na 60 LBN bylo zastoupení obou skupin přibližně rovnoměrné, 53 % typ I a 47 % typ II



(Ubago JM. et al., 2016). V našem souboru byl více zastoupený typ I, který představoval 67 % lézí.

Mezi pomocné mikroskopické znaky LBN patří přítomnost eozinofilních cytoplazmatických globulí a parožnatých krevních cév („staghorn vessels“). Tyto znaky však nejsou specifické pro LBN a mohou se vyskytovat i u jiných lézí. Například eozinofilní cytoplazmatické globule lze nalézt i u UL, kde se však vyskytují pouze asi u 2 % případů (Dundr P. et al., 2006). Výskyt těchto globulí u LBN je však podstatně častější, publikované práce popisují jejich přítomnost u 48 %, resp. 41 % případů (Ubago JM. et al., 2016; Croce S. et al., 2014). V našem souboru jsme je našli u 56 % případů.

Molekulární aberace vyskytující se u LBN nejsou přesně známy, problematikou se zabývalo pouze limitované množství studií. Recentně však byly popsány zejména aberace v genu *FH*. V studii 77 případů LBN se autoři zaměřili na identifikaci změn genu *FH* zhodnocením exprese imunohistochemických protilátek FH a 2SC (Zhang Q. et al., 2018). Výsledky jejich studie ukázaly aberantní imunohistochemickou expresi (FH-/2SC+) u 51 % LBN, z toho u 21 % byly potvrzené mutace genu *FH*. V naší studii byla ztráta exprese FH zastižena u 67/108 (62 %) případů a mutace genu *FH* u 15/53 (28,3 %) případů. Z 15 našich případů s alteracemi v genu *FH* bylo 80 % LBN typ I (12/15) a 20 % LBN typ II (3/15). Imunohistochemickou ztrátu exprese FH jsme pozorovali u 76 % LBN typ I a 33 % LBN typ II. Tyto výsledky korelují s výše zmíněnou prací, ve které ztráta exprese FH byla popsána u 82,5 % LBN typ I a u 16,2 % LBN typ II (Zhang Q. et al., 2018). Imunohistochemická protilátka 2SC není v současné době komerčně dostupná, proto jsme ji na našem souboru pacientek nemohli použít.

Výsledky imunohistochemických a molekulárních metod nasvědčují tomu, že LBN typ I a LBN typ II představují odlišné jednotky s jinou cestou tumorigeneze (Ubago JM. et al., 2016). LBN typ I vzniká nejčastěji v souvislosti s alteracemi genu *FH*, u LBN typu II jsou

častější změny v genech *TP53*, *CDKN2A*, *HMGA2* a *MED12*. Jedno z možných vysvětlení je, že LBN typ II vzniká na podkladě UL. Výsledky naší studie tuto možnost podporují, ve skupině LBN typu I jsme prokázali mutaci v genu *FH* u 35 % případů, zatímco u LBN typu II pouze v 16 %. Kromě toho ve skupině LBN typu II jsme imunohistochemicky prokázali difúzní pozitivitu p16 a aberantní typ exprese p53 v 19,4 % a 5,6 %, ve skupině LBN typu I to bylo pouze v 6,9 % a 2,8 % případů.

Ve studii 1583 nádorů hladké svaloviny dělohy (182 LBN, 1058 UL, 57 CL, 61 epiteloidních leiomyomů a 226 LMS), byla ztráta exprese FH zjištěna pouze u 86 případů (5,43 %). Ve skupině LBN byla četnost nejvyšší (37,3 %), u UL byla pouze u 1,6 % případů, u CL v 1,8 % případů, a u epiteloidních leiomyomů v 1,6 % případů. Všechny LMS měly expresi FH zachovalou (Miettinen M. et al., 2016). Molekulární analýza byla v této studii provedena pouze u 16 případů se ztrátou exprese FH a s dostatečně kvalitní DNA, z toho v 50 % byly nalezeny mutace genu *FH*. Obdobné výsledky jsme prokázali i v naší studii, kde byla ztráta exprese FH u LBN v 62 %, u UL ve 2 % a u LMS v 0 %.

Studie zabývající se komplexní imunohistochemickou analýzou zaměřenou na stanovení diferenciaci nádoru prokázaly u LMS poměrně často expresi markerů dříve nahlížených jako markery endometriální stromální diferenciaci, naopak exprese „hladkosvalových markerů“ může být limitovaná s ohledem na její rozsah i spektrum exprimovaných markerů. Poměrně často byla u LMS popsána exprese markeru CD10 (55 %) a IFITM1 (30 %), tedy markerů „endometriální stromální“ diferenciaci. Z hladkosvalových markerů je často zastížena exprese transgelinu (80-100 %), který se kromě vysoké senzitivity zdá být i marker s vysokou specificitou, data jsou však poměrně limitovaná (Dundr P. et al., 2021; Tawfik O. et al., 2014; Robin YM. et al., 2013). Znalost variability imunohistochemického profilu LMS je v rámci diferenciální diagnostiky důležitá, chybné vyhodnocení exprimovaných markerů může vést ke stanovení špatné diagnózy. V našem

souboru 68 LMS byla exprese CD10 zastižena ve 24,5 %, IFITM1 ve 32,4 %, transgelinu v 71 % a dosud u těchto nádorů nevyšetřovaného markeru smoothelinu ve 14,7 %.

Další hladkosvalovou lézí, která podobně jako LMS může vykazovat poměrně značné odchylky od „typického“ imunohistochemického profilu hladkosvalové diferenciaci, je CL. Vzhledem k tomu, že nejdůležitější diferenciálně diagnostickou jednotkou, která připadá u CL v úvahu je LG ESS, je znalost morfologie a imunohistochemického profilu obou lézí zásadní. S ohledem na expresi jednotlivých markerů u CL je nutno zdůraznit skutečnost, že markery „endometriální stromální diferenciaci“ CD10 a IFITM1 jsou u CL exprimovány ve vysokém procentu případů. Historicky prvním markerem „endometriální stromální“ diferenciaci je CD10, jehož exprese je u LG ESS přítomna asi v 87 % případů. Přestože exprese CD10 byla zpočátku pokládána s ohledem na potvrzení endometriální stromální diferenciaci za vysoce specifickou, následné studie ukázaly, že se nejedná o marker specifický a jeho exprese byla popsána asi u 20-40 % CL (Chu PG. et al., 2001; McCluggage WG. et al., 2001; Zhao W. et al., 2021). Oproti nádorům s endometriální stromální diferenciací, u kterých je exprese CD10 často silně intenzivní a difúzní, je exprese u CL často spíše fokální a slabá. V našem souboru CL vykazovalo expresi CD10 65,4 % případů, nicméně pouze v 9,6 % byla exprese signifikantní ( $\geq 50$  % nádorových buněk). Imunohistochemická exprese novějšího markeru „endometriální stromální“ diferenciaci IFITM1 byla u CL hodnocena pouze v omezeném počtu studií. Ve studii zahrnující 16 CL byla slabá exprese IFITM1 pozorována ve 43,7 % (Parra-Herran CE. et al., 2014). V recentní práci z roku 2021 zahrnující 33 případů CL byla exprese IFITM1 popsána v 18,2 % (Zhao W. et al., 2021). V našem souboru 52 CL byla exprese IFITM1 prokázána ve 36,5 %, avšak pouze v jednom případě byla exprese zastižena ve  $\geq 50$  % buněk. Při diagnostice endometriálních stromálních nádorů tedy vykazuje vyšetření s protilátkou IFITM1 vyšší senzitivitu a specifitu (86,7 % a 81,8 %) než CD10 (63,3 % a 78,8 %) (Zhao W. et al., 2021). Výsledky naší studie však prokázaly, že při zohlednění

rozsahu exprese je specificita IFITM1 pro endometriální stromální diferenciaci podstatně vyšší než literárně udávaná.

Hledání vhodných markerů, které by měly přínos při stanovení biologické povahy hladkosvalových lézí, započalo již koncem devadesátých let minulého století (Hall KL. et al., 1997; Zhai YL. et al., 1999). Následovalo poměrně velké množství dalších studií, optimální panel imunohistochemických protilátek, který by s jistotou rozlišil mezi benigní a maligní lézí, se však nepodařilo doposud nalézt. Analýzu dat z jednotlivých studií komplikuje fakt, že hranice positivity pro jednotlivé markery jsou často významně rozlišné. V obecné úrovni však studie ukazují, že exprese hormonálních receptorů klesá od benigních nádorů směrem k maligním, a naopak exprese p16 a p53 má opačnou tendenci (Dastranj T. A. et al., 2015; Maltese G. et al., 2018; Zhang Q. et al., 2017). Studie 22 leiomyomů a 31 LMS prokázala u leiomyomů expresi ER v 95,5 % a PR ve 100 %, u LMS pouze ve 41,9 %, resp. 38,2 %. V této práci autoři hodnotili také expresi p16 a p53, a prokázali signifikantně „vyšší pozitivitu“ u LMS – 45,2 %, resp. 58,1 %, než u leiomyomů – 4,5 %, resp. 9,1 %; interpretace těchto výsledků je však obtížná z důvodu chybění jednoznačného stanovení hranice positivity, resp. vyšší positivity dle metodiky (Maltese G. et al., 2018). Jiná studie popsala u LMS ztrátu exprese ER a PR v 65 % a 75 % případů (Zhang Q. et al., 2017). V recentně publikovaném přehledovém článku byly podány souhrnné výsledky různých studií zaměřených na imunohistochemickou analýzu exprese ER, PR, p16 a p53 u různých skupin leiomyocelulárních nádorů ženského genitálu (Dundr P. et al., 2021). Výsledky poukazují na fakt, že využití uvedených imunohistochemických vyšetření může mít význam u hladkosvalových vřetenobuněčných lézí, avšak část LBN má na této úrovni některé společné znaky s LMS a využití zejména p16 a p53 je v diferenciální diagnostice mezi LBN a LMS limitované. U vřetenobuněčných lézí by mohlo mít imunohistochemické vyšetření význam při hodnocení lézí spadajících do kategorie STUMP. Některé práce popisují signifikantně vyšší

expresi Ki-67, p16 a p53 u pacientů s vyšším rizikem recidivy onemocnění STUMP, nicméně v metodice nepopisují IHC vyhodnocení výsledků protilátek, a proto je i interpretace těchto dat svízelná (Huo L. et al., 2020).

Metaanalýza čítající 661 pacientů s hladkosvalovými nádory dělohy prokázala, že difúzní exprese p16 je významně vyšší u LMS, než u leiomyomů a jejich variant ( $p < 0,001$ ), a také byla prokázána korelace exprese p16 s vyšší mírou rizika recidivy onemocnění ( $p = 0,019$ ) (Cao HY et al., 2017).

Zásadně důležitou se v poslední době s rozvojem nových terapeutických možností stává problematika prediktivního testování. U mezenchymálních nádorů dělohy je však význam prediktivního testování omezen na několik definovaných jednotek vykazujících specifické terapeuticky ovlivnitelné molekulární aberace, znalosti týkající se dalších lézí, včetně hladkosvalových, jsou však velmi limitované. Jedním z potenciálně prediktivních markerů, jehož data jsou s ohledem na výskyt u LMS v literatuře limitovaná, je exprese pan-TRK. V našem případě byla exprese tohoto markeru prokázána u 8 % UL, 5,5 % LBN a 10,3 % LMS. Výsledky však nebyly dále analyzovány pomocí molekulárních metod a vzhledem k tomu, že imunohistochemické vyšetření je poměrně nespecifické, se ke skutečné incidenci přestavby genů *NTRK* nelze s jistotou vyjádřit. Tato oblast si však zasluhuje další výzkum a možnost využití léčby inhibitory kinázy tropomyosinového receptoru (TRKi) u části LMS by byla důležitá i s ohledem na fakt, že LMS jsou chemo- a radiorezistentní.

Dalším potenciálně prediktivním markerem je ALK. V rozsáhlejší studii zahrnující téměř 400 LMS z různých lokalit byla identifikována přestavba genu *ALK* u 2,4 % případů (Davis LE. et al., 2019). Dále se v literatuře objevují jednotlivá kazuistická sdělení o přítomnosti změn genu *ALK* u LMS (Testa S. et al., 2021). V naší práci jsme na imunohistochemické úrovni prokázali expresi ALK u 4,4 % LMS. K jednoznačnému potvrzení možné přestavby genu *ALK* by však

bylo nutné provést molekulární vyšetření. U žádného případu UL, CL a LBN nebyla exprese ALK prokázána.

Zcela sporadicky se v literatuře objevují práce zaměřené na problematiku exprese PD-1/PD-L1 u sarkomů. Ve studii z roku 2020 byla analyzována exprese PD-L1 u 522 sarkomů. PD-L1 exprese (TPS,  $\geq 1$  %) byla identifikována u 31 % nediferencovaných pleomorfních sarkomů, 29 % angiosarkomů, 26 % rhabdomyosarkomů, 18 % myxofibrosarkomů, 11 % LMS a 10 % dediferencovaných liposarkomů (Vargas AC. et al., 2020). S ohledem na expresi PD-L1 u hladkosvalových nádorů dělohy jsou literární data velmi limitovaná. V jedné studii zahrnující 39 hladkosvalových nádorů dělohy (23 LMS, 8 STUMP, 7 LBN, 11 UL) byla exprese PD-L1 přítomna u 70 % LMS a 14 % LBN, naopak všechny případy STUMP a UL byly negativní (Shanes ED. et al., 2019). V našem souboru pacientek byla exprese PD-L1 prokázána pouze ve 2 děložních LMS (2,9 %), a to ve 40 % a 80 % nádorových buněk. V skupině UL a LBN nebyl pozitivní ( $\geq 1$  %) žádný případ. Naše data jsou tedy oproti uvedené studii významně odlišná, v tuto chvíli se však vzhledem k absenci dalších studií zaměřených na uvedenou problematiku nelze k frekvenci výskytu exprese PD-L1 u LMS vyjádřit a zapotřebí jsou další studie.

Studie zabývající se problematikou molekulárních aberací u leiomyocelulárních lézí dělohy prokázaly, že existují 3 základní molekulární subtypy leiomyomů, jejichž frekvence výskytu je mezi jednotlivými subtypy odlišná. Tyto aberace zahrnují změny genu *HMGA2* (přestavby vedoucí k nadměrné transkripci genu s overexpresí proteinu HMGA2), vyskytující se přibližně u 20-30 % UL (Bertsch E. et al., 2014; Mäkinen N. et al., 2017; Äyräväinen A. et al., 2020). Dále jsou to mutace genu *MEDI2* vyskytující se v 60–70 % UL a mutace genu *FH*, kterou lze nalézt u přibližně 1 % všech leiomyomů, nicméně u LBN se vyskytuje s četností 20-30 %. (Zhang Q. et al., 2018; Ubago JM. et al., 2016; Mäkinen N. et al., 2013; Lehtonen R. et al., 2004; Nibert M. et Heim S., 1990). V naší studii jsme se zaměřili i na problematiku

molekulárních aberací vyskytujících se u CL. Podle literárních údajů převažuje u CL overexprese HMGA2 (10-32 %), následována delecí krátkého raménka chromozomu 1 (do 25 %) a mutacemi v genu *MED12* (5-16 %). Velice vzácně jsou pozorovány mutace genu *FH*. V našem souboru 52 CL byla overexprese HMGA2 zastižena ve 34,6 %, delece 1p chromozomu v 19,3 % a mutace genu *MED12* v 9,4 %. Všechny aberace byly vzájemně se vylučující a případy s delecí 1p tedy nejspíše představují samostatný molekulární subtyp. Alterace genu *FH* nebyly v našem souboru nalezeny.

Výsledky naší práce týkající se problematiky mutací genu *FH* jsou ve shodě s literárními daty, která potvrzují výrazně vyšší incidenci mutací v genu *FH* u skupiny LBN. V našem souboru LBN byla prokázána patogenní či pravděpodobně patogenní varianta *FH* u 28,3 %. V studii analyzující 72 LBN byla mutace genu *FH* prokázána u 21 % případů (Zhang Q. et al., 2018). V jiné studii zahrnující 18 případů byla mutace *FH* ve 33,3 % (Mäkinen N. et al., 2017).

Mutace v genu *FH* mohou být germinálního i somatického původu. Germinální mutace v genu *FH* jsou spojeny se syndromem HLRCC. U rodin s výskytem HLRCC je prokázána germinální mutace *FH* přibližně v 60 % (Lehtonen R. et al., 2004). Leiomyomy děložního těla či kožní leiomyomy u pacientů s HLRCC vnikají v nižším věku. Jedna studie se zaměřila na soubor 194 pacientek s výskytem leiomyomů před 40. rokem věku. Tyto nádory byly analyzovány na molekulární úrovni se zaměřením na průkaz mutace *FH*, která byla nalezena v 5 případech (2,6 %). Na morfologické úrovni vykazovaly 4/5 případů typické rysy popsané u LBN typ I. Všech 5 nádorů vykazovalo pozitivitu barvení s protilátkou 2SC; u 2/5 byla prokázána ztráta exprese FH (Joseph NM. et al., 2015).

Jiná studie se zaměřila na problematiku leiomyomů u pacientek s HLRCC a na sporadické leiomyomy a prokázala, že mutace v genech *FH* a *MED12* se vzájemně vylučují. Celkem v rámci studie hodnotili 122 leiomyomů asociovaných s HLRCC a 66 sporadických leiomyomů. U HLRCC asociovaných leiomyomů byla u 92 % případů prokázána pomocí

imunohistochemického vyšetření s 2SC aberace *FH*. Ve zbylých 8 % případů této skupiny byla prokázána mutace genu *MED12*. Ve skupině sporadických leiomyomů byla u 55 % případů prokázána mutace genu *MED12* a v žádném případě nebyl mutován gen *FH*. Většina děložních leiomyomů je tedy u pacientek s HLRCC způsobena inaktivací genu *FH*, vyskytují se však i sporadické tumory vzniklé somatickými mutacemi genu *MED12* (Kämpjärvi K. et al. 2016).

Somatické mutace genu *FH* byly popsány i v jiných studiích. Například v jedné studii zahrnující 1152 neselektovaných děložních leiomyomů, 5 děložních leiomyomů u pacientů s HLRCC a 88 LMS byla u 1 % neselektovaných leiomyomů a u všech 5 případů leiomyomů u pacientů s HLRCC pozorována ztráta imunohistochemické exprese *FH*. Všechny LMS v této studii měly expresi *FH* zachovalou. Při bližší analýze neselektovaných leiomyomů se ztrátou exprese *FH* však nebyla v žádném případě prokázána germinální mutace genu *FH* (Harrison WJ. et al., 2016).

V souhrnu 3 studií je popsána mutace genu *FH* u 0,7 % neselektovaných děložních leiomyomů (2/282), přičemž ani jeden z nich nebyl asociován s germinální mutací (Barker KT. et al., 2002; Barker KT. et al., 2006; Lehtonen R. et al., 2004).

V jiné práci zabývající se problematikou inaktivace *FH* při sporadické tumorigenezi autoři analyzovali kromě nádorů jiného histologického typu i 153 neselektovaných děložních leiomyomů, u kterých detekovali ztrátu heterozygosity *FH* u 5 (3,3 %) případů. Z těchto 5 případů byla somatická mutace detekována ve 2 případech, ve zbylých 3 případech se našla germinální mutace (Lehtonen R. et al., 2004).

S ohledem na potenciální využití imunohistochemického vyšetření jako screeningové metody pro detekci přítomnosti mutace genu *FH* je důležitá znalost sensitivity a specificity tohoto vyšetření. Ve studii z roku 2015 byla vyslovena teorie, že pozitivní imunohistochemické barvení s protilátkou 2SC je senzitivní a specifické pro detekci alterací v genu *FH*, zatímco



ztráta exprese FH je specifická, avšak není dostatečně senzitivní. V této studii byla exprese FH nalezena i u případů s missense mutacemi v genu *FH* (Joseph NM. et al., 2015). V našem souboru byla mutace třídy 4/5 genu *FH* nalezena v 13/29 (45 %) LBN se ztrátou imunohistochemické exprese FH (FH-) a u 2/24 (8 %) LBN bez ztráty imunohistochemické exprese FH (FH+). Senzitivita imunohistochemického vyšetření s protilátkou FH byla v naší studii 87 % a specifická 58 % (negativní prediktivní hodnota = 92 %).

V jiné studii zahrnující 31 LBN byla provedena imunohistochemická (n=31) i sekvenční analýza (n=24). Aberantní imunohistochemický profil (FH-/2SC+ nebo FH+/2SC+) vykazovalo 17 případů (55 %). Sekvenční analýza provedena na 24 případech zahrnovala i 14 případů s aberantním imunohistochemickým profilem a ve 13/14 případech se potvrdili abnormality v genu *FH* (Bennett JA. et al., 2017).

Další studie se zabývala expresí FH v kožních leiomyomech u pacientů s HLRCC. Celkově autoři zhodnotili imunoprofil 96 kožních leiomyomů od 87 pacientů, přičemž 12 vzorků pocházelo od 7 pacientů s diagnózou HLRCC. Imunohistochemická exprese FH zůstala zachována v 85 případech, v 9 případech byla její ztráta, u 2 případů byl výsledek imunohistochemického vyšetření nejasný (velice slabá imunohistochemická exprese). Z 9 negativních případů bylo 7 vzorků od pacientů s HLRCC. Senzitivita imunohistochemického vyšetření s protilátkou FH pro diagnózu HLRCC byla v rámci této studie stanovena na 70 %, specifická na 97,6 % (Carter CS. et al., 2017).

V jiné studii zahrnující 42 hladkosvalových lézí (13 lézí u pacientů se suspekci nebo potvrzeným HLRCC, 20 sporadických kožních leiomyomů, 2 angioleiomyomy a 17 LMS) byla senzitivita imunohistochemického vyšetření s protilátkou FH 83,3 % a specifická 75 % (Llamas-Velasco M. et al., 2014). Celkově lze z dostupných studií zhodnotit, že senzitivita imunohistochemického vyšetření s protilátkou FH se pohybuje v rámci 70-87 % a specifická 58-97,6 %. Protilátku FH (anti-FH) lze tedy potenciálně využít jako screeningovou metodu

k odhalení pacientů s možným HLRCC, avšak v úzké korelaci s klinicko-patologickými daty. U suspektních případů je na podkladě klinické indikace nutné dovyšetření lékařským genetikem.

## 6. ZÁVĚR

---

Cílem naší práce byla morfologická, imunohistochemická a molekulární analýza vybraných leiomyocelulárních nádorů dělohy, zejména se zaměřením na dva vzácné subtypy – LBN a CL. LBN představuje asi 2 % všech benigních hladkosvalových nádorů dělohy a vzhledem k vzácnosti této diagnózy jsou počty případů v jednotlivých studiích obvykle omezené, celkově bylo doposud analyzováno ve všech pracích zabývajících se jejich problematikou asi 400 případů. Náš soubor 108 pacientek s diagnózou LBN je tedy poměrně unikátní a představuje jeden z dosud největších publikovaných souborů. Výskyt CL je o něco vyšší, odhaduje se na 5 % všech benigních leiomyocelulárních nádorů dělohy, přesto jsou však literární data zabývající se jejich problematikou poměrně omezená.

Výsledky naší studie týkající se LBN potvrdily skutečnost, že navzdory znepokojivým cytologickým znakům se tyto léze chovají benigně, i když mohou recidivovat. Metodou volby může být u pacientek fertilitu zachovávající výkon, nikoliv tedy nutně hysterektomie. Výsledky naší studie podporují teorii, že LBN jsou heterogenní skupina lézí, které lze rozdělit na 2 základní skupiny, typ I a typ II, jejichž morfologický nálezný koreluje s přítomnými molekulárními aberacemi. U LBN typu I jsou častým nálezem alterace genu *FH*, většinou somatické; naproti tomu u LBN typu II jsou častým nálezem alterace v genu *TP53*, *CDKN2A*, *MED12*, *HMGA2*. Germinální mutace genu *FH* jsou asociovány se syndromem HLRCC. Vzhledem k tomu, že leiomyomy vyskytující se u tohoto syndromu mají určité specifické morfologické i imunohistochemické rysy a obvykle předcházejí vzniku karcinomu ledviny, je

jejich správná diagnostika velmi důležitá a může upozornit na možnost tohoto syndromu, jehož přesná incidence není v populaci známá. Diagnostika leiomyocelulárních lézí založená na kombinaci morfologických a imunohistochemických znaků s využitím protilátky FH (anti-FH) by tedy mohla v definovaných případech posloužit jako vhodná a dostupná screeningová metoda. Senzitivita imunohistochemického vyšetření s protilátkou FH se pohybuje kolem 70-87 % a specificita 58-97,6 %.

U mezenchymových nádorů dělohy je základním aspektem bioptické diagnostiky stanovení jejich histogeneze a biologické povahy léze. Ke stanovení histogeneze pomáhá kromě morfologického a imunohistochemického vyšetření v nejednoznačných případech také molekulární analýza. Většina leiomyomů vykazuje „typický“ imunohistochemický profil s expresí hladkosvalových markerů, nicméně hlavně u části CL a LMS se může vyskytnout částečná ztráta exprese těchto markerů či dokonce jejich negativita. Navíc se může u těchto jednotek vyskytnout i exprese dalších markerů, které nejsou charakteristické pro hladkou svalovinu. Typickým příkladem je exprese CD10, která je historicky vnímána jako základní marker „endometriální stromální“ diferenciaci. Bylo však prokázáno, že se nejedná o specifický marker, a exprese CD10 se může vyskytnout i u nádorů s hladkosvalovou diferenciací, zejména CL a LMS. Imunohistochemická exprese novějšího markeru „endometriální stromální“ diferenciaci IFITM1 se zdá být v tomto kontextu o něco specifičtější, nicméně literární data jsou limitovaná. Oproti nádorům s endometriální stromální diferenciací je však exprese CD10 a IFITM1 v hladkosvalových nádorech často spíše fokální a slabá. Znalost variability imunohistochemického profilu mezenchymových lézí je v rámci diferenciální diagnostiky důležitá, chybné vyhodnocení exprimovaných markerů může vést ke stanovení nesprávné diagnózy.

Při stanovení biologické povahy hladkosvalových lézí je základem morfologické zhodnocení léze. Využití imunohistochemického vyšetření s protilátkami ER, PR, p16, p53 a Ki-67 má

omezený význam, nicméně může být pomocné. Výsledky naší práce korelují s výsledky dalších studií a potvrzují, že u LMS dochází ke snížení/ztrátě exprese ER a PR, a naopak ke zvýšené expresi p16 a p53. Využití imunohistochemického vyšetření v praxi je však v diferenciální diagnostice mezi LBN a LMS problematické, protože část LBN vykazuje společné znaky s LMS.

Studie tumorigeneze leiomyocelulárních nádorů dělohy prokázaly, že existují 3 základní řídicí mutace, a to v genech *MED12*, *HMGA2* a *FH*, podle jejichž výskytu se leiomyomy dělí do tzv. molekulárních subtypů. Nejlépe prostudovanou skupinou jsou UL, ve kterých jsou alterace genu *MED 12* prokázány v 60-70 %, *HMGA2* ve 20-30 % a *FH* v 1 %. Studie zabývající se touto problematikou u LBN a CL jsou však velice limitované. Na rozdíl od UL se u LBN mutace genu *FH* vyskytuje s výrazně vyšší četností, a to 20-30 %. Výsledky naší práce s výskytem ve 28,3 % LBN odpovídají doposud publikovanými studiím. Molekulární aberace vyskytující se u CL zahrnují overexpresi *HMGA2* (10-32 %), delecí krátkého raménka chromozomu 1 (do 25 %) a mutace v genu *MED12* (5-16 %). V našem souboru CL byla overexprese *HMGA2* zastižena ve 34,6 %, delece 1p chromozomu v 19,3 % a mutace genu *MED12* v 9,4 %. V žádném případě nebyly nalezeny změny genu *FH*. Na základě našich výsledků se vzhledem k tomu, že všechny námi detekované aberace byly vzájemně se vylučující, lze domnívat, že nádory s delecí 1p nejspíše představují samostatný molekulární subtyp. Význam molekulárního testování má dopady i na rutinní diagnostiku, může být použito v diferenciální diagnostice nejednoznačných případů s překryvnými znaky, zejména LBN versus LMS a CL versus LG ESS. U LMS je popsáno množství molekulárních abnormalit a mezi nejčastější patří mutace genů *TP53*, *ATRAX* a *MED12*. Poznatky o molekulárních aberacích vyskytujících se u endometriálních stromálních tumorů se rychle rozvíjejí a u části jsou nalezeny chromozomální přestavby genů zahrnujících *JAZF1*, *EPC1*, *CXorf67*, *BCOR* a další.

S rozvojem nových terapeutických možností se důležitou součástí diagnostiky stává i problematika prediktivního testování. Mezi námi studované markery jsme zařadili pan-TRK, ALK a PD-L1. Exprese pan-TRK a ALK byla prokázána v naší studii v 10,3 % a 4,4 % LMS. Tyto pozitivní případy však nebyly dále analyzovány pomocí molekulárních metod a vzhledem k tomu, že imunohistochemické vyšetření není zcela specifické, se ke skutečné incidenci přestavby genů *NTRK*, příp. *ALK* nelze s jistotou vyjádřit. Také incidence výskytu exprese PD-L1 v LMS je limitovaná, v jedné práci byla zastižena v 11 % LMS. Výsledky naší studie jsou poněkud odlišné, exprese PD-L1 jsme prokázali pouze ve 2 (2,9 %) děložních LMS. Samotná problematika prediktivního testování v sarkomech si však zasluhuje další výzkum a zapotřebí jsou další studie.

## 7. ABSTRAKT

---

### Úvod

Leiomyom s bizarními jádry (LBN) a celulární leiomyom (CL) patří mezi vzácné varianty hladkosvalových nádorů dělohy. V diagnostické praxi může u LBN dojít k záměně s leiomyosarkomem (LMS) a u CL hlavně s low grade endometriálním stromálním sarkomem (LG ESS). Při stanovení diagnózy je nutné pečlivé zhodnocení morfologických znaků, v některých hraničních případech nám může pomoci imunohistochemické (IHC) a molekulární vyšetření. Literární data týkající se molekulárně genetických alterací vyskytujících se u LBN a CL jsou limitovaná, ukazuje se však, že část těchto nádorů sdílí některé aberace s klasickými leiomyomy (UL) a LMS.

### Cíle

Cílem práce je prohloubení znalostí o hladkosvalových nádorech dělohy, zejména LBN a CL, jejich komplexní morfologické, IHC a molekulární zhodnocení. Cíle zahrnují: 1) podpoření hypotézy benigního chování LBN, 2) morfologickou analýzu LBN, 3) bližší ozřejnění tumorigeneze LBN se zaměřením na gen *fumarát hydratáza (FH)*, 4) ozřejnění tumorigeneze CL, 5) využití imunohistochemické protilátky FH jako screeningové metody k identifikaci mutací genu *FH*, 6) využití morfologického zhodnocení a výsledků IHC vyšetření k usnadnění diferenciálně diagnostické rozvahy mezi benigními a maligními hladkosvalovými nádory, a dále mezi nádory jiné histogeneze, 7) IHC analýzu prognosticko-prediktivních markerů, se zaměřením na LMS.

### Materiál a metody

Soubor obsahoval 108 LBN, 52 CL, 50 UL a 68 LMS. Bylo provedeno morfologické zhodnocení LBN a CL, u všech skupin IHC vyšetření s vybraným panelem protilátek.

Molekulární analýza byla provedena pomocí Sangerova sekvenování a NGS úspěšně u 53 LBN, 47 UL, 20 LMS a 38 CL.

## Výsledky

1) LBN se chovají benigně, mohou recidivovat, ale nemetastazují. 2) LBN lze rozdělit dle morfologie na 2 skupiny, typ I a II. 3) Ztráta IHC exprese FH byla zastižena v 62 % LBN a 2 % UL, ale v žádném případě CL a LMS. Molekulární analýzy prokázaly mutace genu *FH* u 28,3 % LBN (35 % u typu I, 16 % u typu II), ale v žádném případě UL, CL a LMS. 4) U CL v tumorigenezi převažuje overexprese genu *HMGA2* (34,6 %), následována delecí 1p chromozomu (19,3%) a mutací genu *MED12* (9,4 %). 5) Senzitivita IHC protilátky FH je 87 % a specifita 58 %. 6) Morfologické zhodnocení lézí je pro diagnostiku zásadní. U sporných případů lze v rámci diagnostiky využít IHC i molekulární analýzu, část lézí však může mít překryvný imunoprofil. 7) U části LMS jsme na IHC úrovni prokázali expresi některých potenciálně prediktivních markerů (pan-TRK 10,3 %, ALK 4,4 %, PD-L1 2,9 %), potřebné jsou však další studie.

## Závěr

Naše práce potvrdila, že LBN se i přes přítomnost jaderných abnormalit chovají benigně a jako terapeutický výkon lze pacientkám, zejména v případě požadavku na zachování fertility, doporučit myomektomii. Část hladkosvalových lézí dělohy může vykazovat expresi IHC markerů endometriální stromální diferenciace, např. CD10 a IFITM1, proto je znalost možné variability IHC profilu důležitá a jeho chybná interpretace může vést ke stanovení nesprávné diagnózy. V případě tumorigeneze hladkosvalových lézí jsou naše výsledky ve shodě s dosud publikovanými studiemi, ve skupině LBN dominuje přítomnost mutací genu *FH* (28,3 %) a ve skupině CL overexprese genu *HMGA2* (34,6 %). Tyto poznatky lze v určitých případech

využít v rámci diferenciální diagnostiky sporných lézí. Mutace genu *FH* u LBN bývají většinou somatického původu, minoritně se jedná o mutace germinální, které mohou být asociovány se syndromem hereditární leiomyomatózy a renálního karcinomu (HLRCC). Morfologické zhodnocení hladkosvalových lézí, včetně IHC vyšetření s protilátkou FH, by mohlo pomoci odhalit pacienty s možným HLRCC, nezbytná je však korelace s klinicko-patologickými daty a v indikovaných případech vyšetření klinickým genetikem. Senzitivita IHC vyšetření byla v naší studii 87 % a specificita 58 % (negativní prediktivní hodnota = 92 %). U částí LMS jsme na IHC úrovni prokázali expresi potenciálně terapeuticky ovlivnitelných biomarkerů (NTRK, ALK, PD-L1), v tomto ohledu je však zapotřebí dalšího výzkumu.

## 8. SUMMARY

---

### Introduction

Leiomyoma with bizarre nuclei (LBN) and cellular leiomyoma (CL) are rare variants of uterine smooth muscle tumors. In diagnostic practice, LBN can be mistaken for leiomyosarcoma (LMS), while CL may mimic low grade endometrial stromal sarcoma (LGESS). Careful evaluation of morphological features is necessary when making the diagnosis; in some borderline cases, immunohistochemical and molecular examinations may help. Literature data on molecular genetic alterations in LBN and CL is limited, but some of these tumors appear to share certain aberrations with classical leiomyomas (UL) and LMS.

### Aims

The aim of the work is to expand the knowledge about smooth muscle tumors of the uterus, especially LBN and CL, and perform a complex morphological, immunohistochemical (IHC),



and molecular evaluation of their features. The individual goals include: 1) confirmation of the hypothesized benign behaviour of LBN, 2) morphological analysis of LBN, 3) more detailed clarification of LBN tumorigenesis with a focus on the *fumarate hydratase (FH)* gene, 4) clarification of CL tumorigenesis, 5) the use of IHC FH antibody as a screening method to identify *FH* gene mutations, 6) the use of morphological evaluation and results of IHC examination to facilitate differential diagnostic balance between benign and malignant smooth muscle tumors, and also between tumors of other histogenesis, 7) IHC analysis of prognostic and predictive markers, focusing on LMS.

### **Material and methods**

The study cohort contained 108 cases of LBN, 52 cases of CL, 50 cases of UL, and 68 cases of LMS. Morphological evaluation of LBN and CL was performed, and IHC examination with a selected panel of antibodies was carried out in all tumor groups. Molecular analysis using Sanger sequencing and NGS was successfully performed in 53 LBN, 47 UL, 20 LMS, and 38 CL.

### **Results**

1) LBNs have a benign behaviour, as they may recur, but they do not metastasize. 2) LBNs can be divided according to morphology into 2 groups, type I and II. 3) Loss of IHC FH expression was found in 62% LBN and 2% UL, but in no cases of CL and LMS. Molecular analysis showed mutations in the *FH* gene in 28.3% of LBN (35% in type I, 16% in type II), but in no cases of UL, CL, and LMS. 4) In CL, the molecular aberrations are characterised mainly by HMGA2 gene overexpression (34.6%), followed by deletion of the 1p chromosome (19.3%) and mutation of the MED12 gene (9.4%). 5) The sensitivity of the FH antibody is 87% and the specificity 58%. 6) Careful morphological evaluation of these lesions is essential for

achieving a correct diagnosis. In controversial cases, IHC and molecular analysis can also be used, but some lesions may have an overlapping immunoprofile. 7) When analysing the LMS group, we demonstrated the expression of some potentially predictive markers at the IHC level (pan-TRK 10.3%, ALK 4.4%, PD-L1 2.9%), but further studies are needed.

## **Conclusion**

Our work confirmed that LBN, despite the presence of nuclear abnormalities, have a benign behaviour and as such myomectomy can be recommended to patients as a therapeutic procedure, especially in the cases when fertility needs to be preserved. Some uterine smooth muscle lesions may express IHC markers of endometrial stromal differentiation, such as CD10 and IFITM1, so the knowledge of possible variability of the IHC profile is important as misinterpretation may lead to misdiagnosis. When focusing on the tumorigenesis of smooth muscle lesions, our results are in agreement with previously published studies. In the LBN group, the presence of *FH* gene mutations represents the dominant finding (28.3%), while in the CL group HMGA2 gene overexpression predominates (34.6%). This knowledge can be used in certain cases in the differential diagnosis of controversial lesions. Mutations in the *FH* gene in LBN are usually of somatic origin with germinal mutations being rare, and may be associated with hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome (HLRCC). Morphological evaluation of smooth muscle lesions, including IHC examination with FH antibody, could help identify patients with possible HLRCC, but further correlation with clinicopathological data and (in indicated cases) referral to a clinical geneticist is necessary. In our study, the sensitivity of IHC FH examination was 87% and the specificity 58% (negative predictive value = 92%). We have demonstrated the expression of potentially therapeutically modifiable biomarkers (NTRK, ALK, PD-L1) in some LMS cases at the IHC level, but further research is needed in this regard.

## 9. LITERATURA

---

Abeler VM, Røyne O, Thoresen S, Danielsen HE, Nesland JM, Kristensen GB. Uterine sarcomas in Norway. A histopathological and prognostic survey of a total population from 1970 to 2000 including 419 patients. *Histopathology*. 2009 Feb;54(3):355-64. doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03231.x. PMID: 19236512.

Alam NA, Olpin S, Rowan A, Kelsell D, Leigh IM, Tomlinson IP, Weaver T. Missense mutations in fumarate hydratase in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Mol Diagn*. 2005 Oct;7(4):437-43. doi: 10.1016/S1525-1578(10)60574-0. PMID: 16237213; PMCID: PMC1888487.

An Y, Wang S, Li S, Zhang L, Wang D, Wang H, Zhu S, Zhu W, Li Y, Chen W, Ji S, Guo X. Distinct molecular subtypes of uterine leiomyosarcoma respond differently to chemotherapy treatment. *BMC Cancer*. 2017 Sep 11;17(1):639. doi: 10.1186/s12885-017-3568-y. PMID: 28893210; PMCID: PMC5594508.

Assadian S, El-Assaad W, Wang XQ, Gannon PO, Barrès V, Latour M, Mes-Masson AM, Saad F, Sado Y, Dostie J, Teodoro JG. p53 inhibits angiogenesis by inducing the production of Arresten. *Cancer Res*. 2012 Mar 1;72(5):1270-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2348. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22253229.

Äyräväinen A, Pasanen A, Ahvenainen T, Heikkinen T, Pakarinen P, Härkki P, Vahteristo P. Systematic molecular and clinical analysis of uterine leiomyomas from fertile-aged women undergoing myomectomy. *Hum Reprod*. 2020 Oct 1;35(10):2237-2244. doi: 10.1093/humrep/deaa187. PMID: 32829387.

Barker KT, Bevan S, Wang R, Lu YJ, Flanagan AM, Bridge JA, Fisher C, Finlayson CJ, Shipley J, Houlston RS. Low frequency of somatic mutations in the FH/multiple cutaneous leiomyomatosis gene in sporadic leiomyosarcomas and uterine leiomyomas. *Br J Cancer*. 2002 Aug 12;87(4):446-8. doi: 10.1038/sj.bjc.660502. PMID: 12177782; PMCID: PMC2376129.

Barker KT, Spendlove HE, Banu NS, Bridge JA, Fisher C, Shipley J, Garrett M, Manyonda I, Houlston RS. No evidence for epigenetic inactivation of fumarate hydratase in leiomyomas and leiomyosarcomas. *Cancer Lett.* 2006 Apr 8;235(1):136-40. doi: 10.1016/j.canlet.2005.04.017. Epub 2005 Jun 8. PMID: 15949892.

Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *Am J Surg Pathol.* 1994 Jun;18(6):535-58. PMID: 8179071.

Bennett JA, Weigelt B, Chiang S, Selenica P, Chen YB, Bialik A, Bi R, Schultheis AM, Lim RS, Ng CKY, Morales-Oyarvide V, Young RH, Reuter VE, Soslow RA, Oliva E. Leiomyoma with bizarre nuclei: a morphological, immunohistochemical and molecular analysis of 31 cases. *Mod Pathol.* 2017 Oct;30(10):1476-1488. doi: 10.1038/modpathol.2017.56. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28664937; PMCID: PMC5626591.

Bertsch E, Qiang W, Zhang Q, Espona-Fiedler M, Druschitz S, Liu Y, Mittal K, Kong B, Kurita T, Wei JJ. MED12 and HMGA2 mutations: two independent genetic events in uterine leiomyoma and leiomyosarcoma. *Mod Pathol.* 2014 Aug;27(8):1144-53. doi: 10.1038/modpathol.2013.243. Epub 2014 Jan 3. PMID: 24390224; PMCID: PMC4081525.

Boudová B, Mára M, Dundr P, Gregová M, Lisá Z, Kužel D. Uterine leiomyomas with bizarre nuclei: analysis of 37 cases after laparoscopic or open myomectomy. *Ceska Gynekol.* 2019 Summer;84(5):324-330. English. PMID: 31826627.

Björnström L, Sjöberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005 Apr;19(4):833-42. doi: 10.1210/me.2004-0486. Epub 2005 Feb 3. PMID: 15695368.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012 Jun 28;366(26):2455-65. doi: 10.1056/NEJMoa1200694. Epub 2012 Jun 2. PMID: 22658128; PMCID: PMC3563263.

Buelow B, Cohen J, Nagymanyoki Z, Frizzell N, Joseph NM, McCalmont T, Garg K. Immunohistochemistry for 2-Succinocysteine (2SC) and Fumarate Hydratase (FH) in Cutaneous Leiomyomas May Aid in Identification of Patients With HLRCC (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome). *Am J Surg Pathol*. 2016 Jul;40(7):982-8. doi: 10.1097/PAS.0000000000000626. PMID: 26945337.

Bukulmez O, Doody KJ. Clinical features of myomas. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2006 Mar;33(1):69-84. doi: 10.1016/j.ogc.2005.12.002. PMID: 16504807.

Büchler T, Dundr P, Fínek J, Kiss I, Matěj R, Melichar B, Michal M, Petruželka L. Practical instructions for testing and targeted therapy in adult patients with solid tumours with NTRK gene fusion in common clinical practice. *Klin Onkol*. 2020 Winter;33(6):414-419. English. PMID: 33685189.

Cao HY, Yang S, Wang S, Deng LY, Lou JY. Is differential expression of p16INK4a based on the classification of uterine smooth muscle tumors associated with a different prognosis? A meta-analysis. *Genet Mol Res*. 2017 Mar 22;16(1). doi: 10.4238/gmr16019481. PMID: 28340268.

Carvajal-Carmona LG, Alam NA, Pollard PJ, Jones AM, Barclay E, Wortham N, Pignatelli M, Freeman A, Pomplun S, Ellis I, Poulosom R, El-Bahrawy MA, Berney DM, Tomlinson IP. Adult leydig cell tumors of the testis caused by germline fumarate hydratase mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Aug;91(8):3071-5. doi: 10.1210/jc.2006-0183. Epub 2006 Jun 6. PMID: 16757530.

Carter CS, Skala SL, Chinnaiyan AM, McHugh JB, Siddiqui J, Cao X, Dhanasekaran SM, Fullen DR, Lagstein A, Chan MP, Mehra R. Immunohistochemical Characterization of Fumarate Hydratase (FH) and Succinate Dehydrogenase (SDH) in Cutaneous Leiomyomas for Detection of Familial Cancer Syndromes. *Am J Surg Pathol*. 2017 Jun;41(6):801-809. doi: 10.1097/PAS.0000000000000840. PMID: 28288038; PMCID: PMC5423817.

Cree IA. et al. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Female genital tumours. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2020 (WHO classification of tumours series, 5th ed. ; vol. 4)

Croce S, Young RH, Oliva E. Uterine leiomyomas with bizarre nuclei: a clinicopathologic study of 59 cases. *Am J Surg Pathol.* 2014 Oct;38(10):1330-9. doi: 10.1097/PAS.0000000000000249. PMID: 25140893.

Dastranj Tabrizi A, Ghojzadeh M, Thagizadeh Anvar H, Vahedi A, Naji S, Mostafidi E, Berenjian S. Immunohistochemical Profile of Uterine Leiomyoma With Bizarre Nuclei; Comparison With Conventional Leiomyoma, Smooth Muscle Tumors of Uncertain Malignant Potential and Leiomyosarcoma. *Adv Pharm Bull.* 2015 Dec;5(Suppl 1):683-7. doi: 10.15171/apb.2015.093. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26793616; PMCID: PMC4708041.

Davare MA, Tognon CE. Detecting and targetting oncogenic fusion proteins in the genomic era. *Biol Cell.* 2015 May;107(5):111-29. doi: 10.1111/boc.201400096. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25631473; PMCID: PMC5837291.

Davis LE, Nusser KD, Przybyl J, Pittsenbarger J, Hofmann NE, Varma S, Vennam S, Debiec-Rychter M, van de Rijn M, Davare MA. Discovery and Characterization of Recurrent, Targetable ALK Fusions in Leiomyosarcoma. *Mol Cancer Res.* 2019 Mar;17(3):676-685. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-18-1075. Epub 2018 Dec 5. Erratum in: *Mol Cancer Res.* 2019 Sep;17(9):1958. PMID: 30518629.

Demetri GD, Antonescu CR, Bjerkehagen B, Bovée JVMG, Boye K, Chacón M, Dei Tos AP, Desai J, Fletcher JA, Gelderblom H, George S, Gronchi A, Haas RL, Hindi N, Hohenberger P, Joensuu H, Jones RL, Judson I, Kang YK, Kawai A, Lazar AJ, Le Cesne A, Maestro R, Maki RG, Martín J, Patel S, Penault-Llorca F, Premanand Raut C, Rutkowski P, Safwat A, Sbaraglia M, Schaefer IM, Shen L, Serrano C, Schöffski P, Stacchiotti S, Sundby Hall K, Tap WD, Thomas DM, Trent J, Valverde C, van der Graaf WTA, von Mehren M, Wagner A, Wardelmann E, Naito Y, Zalberg J, Blay JY. Diagnosis and management of tropomyosin receptor kinase (TRK) fusion sarcomas: expert recommendations from the World Sarcoma Network. *Ann Oncol.* 2020 Nov;31(11):1506-1517. doi: 10.1016/j.annonc.2020.08.2232. Epub 2020 Sep 3. PMID: 32891793; PMCID: PMC7985805.

Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):561-70. doi: 10.1172/JCI27987. PMID: 16511588; PMCID: PMC2373424.

Dundr P, Mára M, Masková J, Fucíková Z, Povýsil C, Tvrđík D. Pathological findings of uterine leiomyomas and adenomyosis following uterine artery embolization. *Pathol Res Pract.* 2006;202(10):721-9. doi: 10.1016/j.prp.2006.07.001. Epub 2006 Sep 7. PMID: 16959435.

Dundr P, Gregová M, Němejcová K, Bártů M, Bennett RJ, Stružinská I. The value of immunohistochemical methods in diagnosing mesenchymal tumours of the uterus. *Cesk Patol.* 2021 Summer;57(2):86-95. English. PMID: 34275318.

Gardie B, Remenieras A, Kattygnarath D, Bombled J, Lefèvre S, Perrier-Trudova V, Rustin P, Barrois M, Slama A, Avril MF, Bessis D, Caron O, Caux F, Collignon P, Coupier I, Cremin C, Dollfus H, Dugast C, Escudier B, Faivre L, Field M, Gilbert-Dussardier B, Janin N, Leport Y, Leroux D, Lipsker D, Malthieu F, McGilliway B, Maugard C, Méjean A, Mortemousque I, Plessis G, Poppe B, Pruvost-Balland C, Rooker S, Roume J, Soufir N, Steinraths M, Tan MH, Théodore C, Thomas L, Vabres P, Van Glabeke E, Meric JB, Verkarre V, Lenoir G, Joulin V, Deveaux S, Cusin V, Feunteun J, Teh BT, Bressac-de Paillerets B, Richard S; French National Cancer Institute "Inherited predisposition to kidney cancer" network. Novel FH mutations in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) and patients with isolated type 2 papillary renal cell carcinoma. *J Med Genet.* 2011 Apr;48(4):226-34. doi: 10.1136/jmg.2010.085068. Epub 2011 Mar 12. Erratum in: *J Med Genet.* 2011 Aug;48(8):576. PMID: 21398687.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983 Jan 15;31(1):13-20. doi: 10.1002/ijc.2910310104. PMID: 6339421.

Giuntoli RL 2nd, Metzinger DS, DiMarco CS, Cha SS, Sloan JA, Keeney GL, Gostout BS. Retrospective review of 208 patients with leiomyosarcoma of the uterus: prognostic indicators, surgical management, and adjuvant therapy. *Gynecol Oncol.* 2003 Jun;89(3):460-9. doi: 10.1016/s0090-8258(03)00137-9. PMID: 12798712.

Gosden JR, Middleton PG, Rout D. Localization of the human oestrogen receptor gene to chromosome 6q24----q27 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet.* 1986;43(3-4):218-20. doi: 10.1159/000132325. PMID: 3802924.

Hall KL, Teneriello MG, Taylor RR, Lemon S, Ebina M, Linnoila RI, Norris JH, Park RC, Birrer MJ. Analysis of Ki-ras, p53, and MDM2 genes in uterine leiomyomas and leiomyosarcomas. *Gynecol Oncol.* 1997 May;65(2):330-5. doi: 10.1006/gyno.1997.4653. PMID: 9159347.

Harrison WJ, Andrici J, Maclean F, Madadi-Ghahan R, Farzin M, Sioson L, Toon CW, Clarkson A, Watson N, Pickett J, Field M, Crook A, Tucker K, Goodwin A, Anderson L, Srinivasan B, Grossmann P, Martinek P, Ondič O, Hes O, Trpkov K, Clifton-Bligh RJ, Dwight T, Gill AJ. Fumarate Hydratase-deficient Uterine Leiomyomas Occur in Both the Syndromic and Sporadic Settings. *Am J Surg Pathol.* 2016 May;40(5):599-607. doi: 10.1097/PAS.0000000000000573. PMID: 26574848; PMCID: PMC4830748.

Hodge JC, Pearce KE, Clayton AC, Taran FA, Stewart EA. Uterine cellular leiomyomata with chromosome 1p deletions represent a distinct entity. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Jun;210(6):572.e1-7. doi: 10.1016/j.ajog.2014.01.011. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24412114; PMCID: PMC4040311.

Huo L, Wang D, Wang W, Cao D, Yang J, Wu M, Yang J, Xiang Y. Oncologic and Reproductive Outcomes of Uterine Smooth Muscle Tumor of Uncertain Malignant Potential: A Single Center Retrospective Study of 67 Cases. *Front Oncol.* 2020 May 14;10:647. doi: 10.3389/fonc.2020.00647. PMID: 32477938; PMCID: PMC7240040.

Chayed Z, Kristensen LK, Ousager LB, Rønlund K, Bygum A. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma: a case series and literature review. *Orphanet J Rare Dis.* 2021 Jan 18;16(1):34. doi: 10.1186/s13023-020-01653-9. PMID: 33461594; PMCID: PMC7814596.

Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004 May;4(5):336-47. doi: 10.1038/nri1349. PMID: 15122199.



Chiang S, Cotzia P, Hyman DM, Drilon A, Tap WD, Zhang L, Hechtman JF, Frosina D, Jungbluth AA, Murali R, Park KJ, Soslow RA, Oliva E, Iafrate AJ, Benayed R, Ladanyi M, Antonescu CR. NTRK Fusions Define a Novel Uterine Sarcoma Subtype With Features of Fibrosarcoma. *Am J Surg Pathol.* 2018 Jun;42(6):791-798. doi: 10.1097/PAS.0000000000001055. PMID: 29553955; PMCID: PMC6764747.

Christacos NC, Quade BJ, Dal Cin P, Morton CC. Uterine leiomyomata with deletions of Ip represent a distinct cytogenetic subgroup associated with unusual histologic features. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006 Mar;45(3):304-12. doi: 10.1002/gcc.20291. PMID: 16320247.

Chu PG, Arber DA, Weiss LM, Chang KL. Utility of CD10 in distinguishing between endometrial stromal sarcoma and uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical comparison of 34 cases. *Mod Pathol.* 2001 May;14(5):465-71. doi: 10.1038/modpathol.3880335. PMID: 11353058.

Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM. Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature.* 1986 Mar 6-12;320(6057):84-5. doi: 10.1038/320084a0. PMID: 3456488.

Jensen E. A conversation with Elwood Jensen. Interview by David D. Moore. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:1-11. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153327. Epub 2011 Sep 1. PMID: 21888507.

Joseph NM, Solomon DA, Frizzell N, Rabban JT, Zaloudek C, Garg K. Morphology and Immunohistochemistry for 2SC and FH Aid in Detection of Fumarate Hydratase Gene Aberrations in Uterine Leiomyomas From Young Patients. *Am J Surg Pathol.* 2015 Nov;39(11):1529-39. doi: 10.1097/PAS.0000000000000520. PMID: 26457356.

Kalogiannidis I, Stavrakis T, Dagklis T, et al. A clinicopathological study of atypical leiomyomas: Benign variant leiomyoma or smooth-muscle tumor of uncertain malignant potential. *Oncol Lett.* 2016;11(2):1425-1428. doi:10.3892/ol.2015.4062

Kämpjärvi K, Mäkinen N, Mehine M, Välipakka S, Uimari O, Pitkänen E, Heinonen HR, Heikkinen T, Tolvanen J, Ahtikoski A, Frizzell N, Sarvilinna N, Sjöberg J, Bützow R,

Aaltonen LA, Vahteristo P. MED12 mutations and FH inactivation are mutually exclusive in uterine leiomyomas. *Br J Cancer*. 2016 Jun 14;114(12):1405-11. doi: 10.1038/bjc.2016.130. Epub 2016 May 17. PMID: 27187686; PMCID: PMC4984459.

Katayama R, Lovly CM, Shaw AT. Therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase in lung cancer: a paradigm for precision cancer medicine. *Clin Cancer Res*. 2015 May 15;21(10):2227-35. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2791. PMID: 25979929; PMCID: PMC4435823.

Kefeli M, Caliskan S, Kurtoglu E, Yildiz L, Kokcu A. Leiomyoma With Bizarre Nuclei: Clinical and Pathologic Features of 30 Patients. *Int J Gynecol Pathol*. 2018 Jul;37(4):379-387. doi: 10.1097/PGP.0000000000000425. PMID: 28700441

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331. PMID: 18173375.

Kubinova K, Tesarova M, Hansikova H, Vesela K, Kuzel D, Mara M. Fumarate hydratase gene mutation in two young patients with sporadic uterine fibroids. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013 Jan;39(1):410-4. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01939.x. Epub 2012 Jul 6. PMID: 22764886.

Kurman RJ, Ellenson LH, Ronnett BM., Herrington RH.: *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract*, 7th ed., 2019

Lameirinhas A, Miranda-Gonçalves V, Henrique R, Jerónimo C. The Complex Interplay between Metabolic Reprogramming and Epigenetic Alterations in Renal Cell Carcinoma. *Genes (Basel)*. 2019 Apr 2;10(4):264. doi: 10.3390/genes10040264. PMID: 30986931;

Launonen V, Vierimaa O, Kiuru M, Isola J, Roth S, Pukkala E, Sistonen P, Herva R, Aaltonen LA. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Mar 13;98(6):3387-92. doi: 10.1073/pnas.051633798. Epub 2001 Feb 27. PMID: 11248088; PMCID: PMC30663.

Law ML, Kao FT, Wei Q, Hartz JA, Greene GL, Zarucki-Schulz T, Conneely OM, Jones C, Puck TT, O'Malley BW, et al. The progesterone receptor gene maps to human chromosome band 11q13, the site of the mammary oncogene int-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):2877-81. doi: 10.1073/pnas.84.9.2877. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Dec;85(24):9688. PMID: 3472240; PMCID: PMC304763.

Lee HR, Kim TH, Choi KC. Functions and physiological roles of two types of estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , identified by estrogen receptor knockout mouse. *Lab Anim Res*. 2012 Jun;28(2):71-6. doi: 10.5625/lar.2012.28.2.71. Epub 2012 Jun 26. PMID: 22787479; PMCID: PMC3389841.

Lehtonen HJ, Kiuru M, Ylisaukko-Oja SK, Salovaara R, Herva R, Koivisto PA, Vierimaa O, Aittomäki K, Pukkala E, Launonen V, Aaltonen LA. Increased risk of cancer in patients with fumarate hydratase germline mutation. *J Med Genet*. 2006 Jun;43(6):523-6. doi: 10.1136/jmg.2005.036400. Epub 2005 Sep 9. PMID: 16155190; PMCID: PMC2564537.

Lehtonen R, Kiuru M, Vanharanta S, Sjöberg J, Aaltonen LM, Aittomäki K, Arola J, Butzow R, Eng C, Husgafvel-Pursiainen K, Isola J, Järvinen H, Koivisto P, Mecklin JP, Peltomäki P, Salovaara R, Wasenius VM, Karhu A, Launonen V, Nupponen NN, Aaltonen LA. Biallelic inactivation of fumarate hydratase (FH) occurs in nonsyndromic uterine leiomyomas but is rare in other tumors. *Am J Pathol*. 2004 Jan;164(1):17-22. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63091-X. PMID: 14695314; PMCID: PMC1602244.

Levin ER. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Mol Endocrinol*. 2005 Aug;19(8):1951-9. doi: 10.1210/me.2004-0390. Epub 2005 Feb 10. PMID: 15705661; PMCID: PMC1249516.

Liang Y, Zhang X, Chen X, Lü W. Diagnostic value of progesterone receptor, p16, p53 and pHH3 expression in uterine atypical leiomyoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Jun 1;8(6):7196-202. PMID: 26261614; PMCID: PMC4525948.

Liegl-Atzwanger B, Heitzer E, Flicker K, Müller S, Ulz P, Saglam O, Tavassoli F, Devouassoux-Shisheboran M, Geigl J, Moinfar F. Exploring chromosomal abnormalities and

genetic changes in uterine smooth muscle tumors. *Mod Pathol*. 2016 Oct;29(10):1262-77. doi: 10.1038/modpathol.2016.107. Epub 2016 Jul 1. PMID: 27363490.

Linehan WM, Rouault TA. Molecular pathways: Fumarate hydratase-deficient kidney cancer-targeting the Warburg effect in cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Jul 1;19(13):3345-52. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0304. Epub 2013 Apr 30. PMID: 23633457; PMCID: PMC4447120.

Llamas-Velasco M, Requena L, Kutzner H, Schärer L, Rütten A, Hantschke M, Paredes BE, Mentzel T. Fumarate hydratase immunohistochemical staining may help to identify patients with multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis (MCUL) and hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) syndrome. *J Cutan Pathol*. 2014 Nov;41(11):859-65. doi: 10.1111/cup.12396. Epub 2014 Nov 4. PMID: 25292446.

Llamas-Velasco M, Requena L, Adam J, Frizzell N, Hartmann A, Mentzel T. Loss of Fumarate Hydratase and Aberrant Protein Succination Detected With S-(2-Succino)-Cysteine Staining to Identify Patients With Multiple Cutaneous and Uterine Leiomyomatosis and Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Cancer Syndrome. *Am J Dermatopathol*. 2016 Dec;38(12):887-891. doi: 10.1097/DAD.0000000000000580. PMID: 27097334.

Ly A, Mills AM, McKenney JK, Balzer BL, Kempson RL, Hendrickson MR, Longacre TA. Atypical leiomyomas of the uterus: a clinicopathologic study of 51 cases. *Am J Surg Pathol*. 2013 May;37(5):643-9. doi: 10.1097/PAS.0b013e3182893f36. PMID: 23552381.

Maltese G, Fontanella C, Lepori S, Scaffa C, Fucà G, Bogani G, Provenzano S, Carcangiu ML, Raspagliesi F, Lorusso D. Atypical Uterine Smooth Muscle Tumors: A Retrospective Evaluation of Clinical and Pathologic Features. *Oncology*. 2018;94(1):1-6. doi: 10.1159/000479818. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28869928.

Marsh EE, Bulun SE. Steroid hormones and leiomyomas. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2006 Mar;33(1):59-67. doi: 10.1016/j.ogc.2005.12.001. PMID: 16504806.

Marshburn PB, Matthews ML, Hurst BS. Uterine artery embolization as a treatment option for uterine myomas. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2006 Mar;33(1):125-44. doi: 10.1016/j.ogc.2005.12.009. PMID: 16504811.

Mäkinen N, Aavikko M, Heikkinen T, Taipale M, Taipale J, Koivisto-Korander R, Bützow R, Vahteristo P. Exome Sequencing of Uterine Leiomyosarcomas Identifies Frequent Mutations in TP53, ATRX, and MED12. *PLoS Genet.* 2016 Feb 18;12(2):e1005850. doi: 10.1371/journal.pgen.1005850. PMID: 26891131; PMCID: PMC4758603.

Mäkinen N, Kämpjärvi K, Frizzell N, Bützow R, Vahteristo P. Characterization of MED12, HMGA2, and FH alterations reveals molecular variability in uterine smooth muscle tumors. *Mol Cancer.* 2017 Jun 7;16(1):101. doi: 10.1186/s12943-017-0672-1. PMID: 28592321; PMCID: PMC5463371.

Mäkinen N, Vahteristo P, Kämpjärvi K, Arola J, Bützow R, Aaltonen LA. MED12 exon 2 mutations in histopathological uterine leiomyoma variants. *Eur J Hum Genet.* 2013 Nov;21(11):1300-3. doi: 10.1038/ejhg.2013.33. Epub 2013 Feb 27. PMID: 23443020; PMCID: PMC3798840.

McCluggage WG, Sumathi VP, Maxwell P. CD10 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of normal endometrial stroma and of endometrial stromal neoplasms. *Histopathology.* 2001 Sep;39(3):273-8. doi: 10.1046/j.1365-2559.2001.01215.x. PMID: 11532038.

McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thormann A, Flicek P, Cunningham F. The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol.* 2016 Jun 6;17(1):122. doi: 10.1186/s13059-016-0974-4. PMID: 27268795; PMCID: PMC4893825.

Mehine M, Heinonen HR, Sarvilinna N, Pitkänen E, Mäkinen N, Katainen R, Tuupanen S, Bützow R, Sjöberg J, Aaltonen LA. Clonally related uterine leiomyomas are common and display branched tumor evolution. *Hum Mol Genet.* 2015 Aug 1;24(15):4407-16. doi: 10.1093/hmg/ddv177. Epub 2015 May 10. PMID: 25964426.

Mehine M, Kaasinen E, Heinonen HR, Mäkinen N, Kämpjärvi K, Sarvilinna N, Aavikko M, Vähärautio A, Pasanen A, Bützow R, Heikinheimo O, Sjöberg J, Pitkänen E, Vahteristo P, Aaltonen LA. Integrated data analysis reveals uterine leiomyoma subtypes with distinct driver pathways and biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Feb 2;113(5):1315-20. doi: 10.1073/pnas.1518752113. Epub 2016 Jan 19. PMID: 26787895; PMCID: PMC4747776.

Merino MJ, Torres-Cabala C, Pinto P, Linehan WM. The morphologic spectrum of kidney tumors in hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC) syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2007 Oct;31(10):1578-85. doi: 10.1097/PAS.0b013e31804375b8. PMID: 17895761.

Miettinen M, Felisiak-Golabek A, Wasag B, Chmara M, Wang Z, Butzow R, Lasota J. Fumarase-deficient Uterine Leiomyomas: An Immunohistochemical, Molecular Genetic, and Clinicopathologic Study of 86 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2016 Dec;40(12):1661-1669. doi: 10.1097/PAS.0000000000000703. PMID: 27454940; PMCID: PMC5106328.

Mills AM, Ly A, Balzer BL, Hendrickson MR, Kempson RL, McKenney JK, Longacre TA. Cell cycle regulatory markers in uterine atypical leiomyoma and leiomyosarcoma: immunohistochemical study of 68 cases with clinical follow-up. *Am J Surg Pathol*. 2013 May;37(5):634-42. doi: 10.1097/PAS.0b013e318287779c. PMID: 23552380.

Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1994 Mar 4;263(5151):1281-4. doi: 10.1126/science.8122112. Erratum in: *Science*. 1995 Jan 20;267(5196):316-7. PMID: 8122112.

Nibert M, Heim S. Uterine leiomyoma cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer*. 1990 May;2(1):3-13. doi: 10.1002/gcc.2870020103. PMID: 2278965.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994 Apr 21;368(6473):753-6. doi: 10.1038/368753a0. PMID: 8152487.

Oliva E, Young RH, Clement PB, Bhan AK, Scully RE. Cellular benign mesenchymal tumors of the uterus. A comparative morphologic and immunohistochemical analysis of 33 highly cellular leiomyomas and six endometrial stromal nodules, two frequently confused tumors. *Am J Surg Pathol*. 1995 Jul;19(7):757-68. doi: 10.1097/00000478-199507000-00003. PMID: 7793473.

Pang SJ, Li CC, Shen Y, Liu YZ, Shi YQ, Liu YX. Value of counting positive PHH3 cells in the diagnosis of uterine smooth muscle tumors. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 May 1;8(5):4418-26. PMID: 26191133; PMCID: PMC4503005.

Parra-Herran CE, Yuan L, Nucci MR, Quade BJ. Targeted development of specific biomarkers of endometrial stromal cell differentiation using bioinformatics: the IFITM1 model. *Mod Pathol*. 2014 Apr;27(4):569-79. doi: 10.1038/modpathol.2013.123. Epub 2013 Sep 27. PMID: 24072182.

Pelms M, Penault-Llorca F, Guillou L, Collin F, Bertrand G, Trassard M, Leroux A, Floquet A, Stoeckle E, Thomas L, MacGrogan G. Prognostic factors in early-stage leiomyosarcoma of the uterus. *Int J Gynecol Cancer*. 2009 Apr;19(3):385-90. doi: 10.1111/IGC.0b013e3181a1bfbc. PMID: 19407564.

Peters WA 3rd, Howard DR, Andersen WA, Figge DC. Uterine smooth-muscle tumors of uncertain malignant potential. *Obstet Gynecol*. 1994 Jun;83(6):1015-20. doi: 10.1097/00006250-199406000-00023. PMID: 8190416.

Picaud S, Kavanagh KL, Yue WW, Lee WH, Muller-Knapp S, Gileadi O, Sacchettini J, Oppermann U. Structural basis of fumarate hydratase deficiency. *J Inher Metab Dis*. 2011 Jun;34(3):671-6. doi: 10.1007/s10545-011-9294-8. Epub 2011 Mar 29. PMID: 21445611; PMCID: PMC3109261.

Pulford K, Lamant L, Morris SW, Butler LH, Wood KM, Stroud D, Delsol G, Mason DY. Detection of anaplastic lymphoma kinase (ALK) and nucleolar protein nucleophosmin (NPM)-ALK proteins in normal and neoplastic cells with the monoclonal antibody ALK1. *Blood*. 1997 Feb 15;89(4):1394-404. PMID: 9028963.

Robin YM, Penel N, Pérot G, Neuville A, Vélasco V, Ranchère-Vince D, Terrier P, Coindre JM. Transgelin is a novel marker of smooth muscle differentiation that improves diagnostic accuracy of leiomyosarcomas: a comparative immunohistochemical reappraisal of myogenic markers in 900 soft tissue tumors. *Mod Pathol.* 2013 Apr;26(4):502-10. doi: 10.1038/modpathol.2012.192. Epub 2012 Nov 23. PMID: 23174934.

Sanz-Ortega J, Vocke C, Stratton P, Linehan WM, Merino MJ. Morphologic and molecular characteristics of uterine leiomyomas in hereditary leiomyomatosis and renal cancer (HLRCC) syndrome. *Am J Surg Pathol.* 2013 Jan;37(1):74-80. doi: 10.1097/PAS.0b013e31825ec16f. PMID: 23211287; PMCID: PMC3524342.

Scagliola A, Mainini F, Cardaci S. The Tricarboxylic Acid Cycle at the Crossroad Between Cancer and Immunity. *Antioxid Redox Signal.* 2020 Apr 20;32(12):834-852. doi: 10.1089/ars.2019.7974. Epub 2020 Feb 11. PMID: 31847530.

Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993 Dec 16;366(6456):704-7. doi: 10.1038/366704a0. PMID: 8259215.

Shanes ED, Friedman LA, Mills AM. PD-L1 Expression and Tumor-infiltrating Lymphocytes in Uterine Smooth Muscle Tumors: Implications for Immunotherapy. *Am J Surg Pathol.* 2019 Jun;43(6):792-801. doi: 10.1097/PAS.0000000000001254. PMID: 31009388.

Schmidt LS, Linehan WM. Hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2014 Jun 20;7:253-60. doi: 10.2147/IJNRD.S42097. PMID: 25018647; PMCID: PMC4074185.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9. PMID: 10653597.

Soussi T. The history of p53. A perfect example of the drawbacks of scientific paradigms. *EMBO Rep.* 2010 Nov;11(11):822-6. doi: 10.1038/embor.2010.159. Epub 2010 Oct 8. PMID: 20930848; PMCID: PMC2966958.



Stein Y, Rotter V, Aloni-Grinstein R. Gain-of-Function Mutant p53: All the Roads Lead to Tumorigenesis. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 8;20(24):6197. doi: 10.3390/ijms20246197. PMID: 31817996; PMCID: PMC6940767.

Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res.* 1995 Jul 15;55(14):2988-94. PMID: 7606716.

Sung CO, Ahn G, Song SY, Choi YL, Bae DS. Atypical leiomyomas of the uterus with long-term follow-up after myomectomy with immunohistochemical analysis for p16INK4A, p53, Ki-67, estrogen receptors, and progesterone receptors. *Int J Gynecol Pathol.* 2009 Nov;28(6):529-34. doi: 10.1097/PGP.0b013e3181a2b8d3. PMID: 19851199.

Tawfik O, Rao D, Nothnick WB, Graham A, Mau B, Fan F. Transgelin, a Novel Marker of Smooth Muscle Differentiation, Effectively Distinguishes Endometrial Stromal Tumors from Uterine Smooth Muscle Tumors. *Int J Gynecol Obstet Reprod Med Res.* 2014 Sep;1(1):26-31. PMID: 26023684; PMCID: PMC4443873.

Teodoro JG, Evans SK, Green MR. Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome. *J Mol Med (Berl).* 2007 Nov;85(11):1175-86. doi: 10.1007/s00109-007-0221-2. Epub 2007 Jun 23. PMID: 17589818.

Testa S, Million L, Longacre T, Bui N. Uterine Leiomyosarcoma with FN1-Anaplastic Lymphoma Kinase Fusion Responsive to Alectinib and Lorlatinib. *Case Rep Oncol.* 2021 Jun 11;14(2):812-819. doi: 10.1159/000516758. PMID: 34248545; PMCID: PMC8255722.

Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, Leigh I, Gorman P, Lamlum H, Rahman S, Roylance RR, Olpin S, Bevan S, Barker K, Hearle N, Houlston RS, Kiuru M, Lehtonen R, Karhu A, Vilkki S, Laiho P, Eklund C, Vierimaa O, Aittomäki K, Hietala M, Sistonen P, Paetau A, Salovaara R, Herva R, Launonen V, Aaltonen LA; Multiple Leiomyoma Consortium. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 2002 Apr;30(4):406-10. doi: 10.1038/ng849. Epub 2002 Feb 25. PMID: 11865300.

Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443-54. doi: 10.1056/NEJMoa1200690. Epub 2012 Jun 2. PMID: 22658127; PMCID: PMC3544539.

Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, Brahmer JR, Lawrence DP, Atkins MB, Powderly JD, Leming PD, Lipson EJ, Puzanov I, Smith DC, Taube JM, Wigginton JM, Kollia GD, Gupta A, Pardoll DM, Sosman JA, Hodi FS. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol*. 2014 Apr 1;32(10):1020-30. doi: 10.1200/JCO.2013.53.0105. Epub 2014 Mar 3. PMID: 24590637; PMCID: PMC4811023.

Toro JR, Nickerson ML, Wei MH, Warren MB, Glenn GM, Turner ML, Stewart L, Duray P, Tourre O, Sharma N, Choyke P, Stratton P, Merino M, Walther MM, Linehan WM, Schmidt LS, Zbar B. Mutations in the fumarate hydratase gene cause hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer in families in North America. *Am J Hum Genet*. 2003 Jul;73(1):95-106. doi: 10.1086/376435. Epub 2003 May 22. PMID: 12772087; PMCID: PMC1180594.

Trpkov K, Hes O, Agaimy A, Bonert M, Martinek P, Magi-Galluzzi C, Kristiansen G, Lüders C, Nesi G, Compérat E, Sibony M, Berney DM, Mehra R, Brimo F, Hartmann A, Husain A, Frizzell N, Hills K, Maclean F, Srinivasan B, Gill AJ. Fumarate Hydratase-deficient Renal Cell Carcinoma Is Strongly Correlated With Fumarate Hydratase Mutation and Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2016 Jul;40(7):865-75. doi: 10.1097/PAS.0000000000000617. PMID: 26900816.

Ubago JM, Zhang Q, Kim JJ, Kong B, Wei JJ. Two Subtypes of Atypical Leiomyoma: Clinical, Histologic, and Molecular Analysis. *Am J Surg Pathol*. 2016 Jul;40(7):923-33. doi: 10.1097/PAS.0000000000000646. PMID: 27015034; PMCID: PMC5777155.

Vargas AC, Maclean FM, Sioson L, Tran D, Bonar F, Mahar A, Cheah AL, Russell P, Grimison P, Richardson L, Gill AJ. Prevalence of PD-L1 expression in matched recurrent and/or metastatic sarcoma samples and in a range of selected sarcomas subtypes. *PLoS One*. 2020 Apr 15;15(4):e0222551. doi: 10.1371/journal.pone.0222551. PMID: 32294103; PMCID: PMC7159201.

Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, et al. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Dec;82(23):7889-93. doi: 10.1073/pnas.82.23.7889. PMID: 3865204; PMCID: PMC390875.

Wei JJ. Atypical Leiomyoma With Features Suggesting of Fumarate Hydratase Mutation. *Int J Gynecol Pathol*. 2016 Nov;35(6):531-536. doi: 10.1097/PGP.0000000000000276. PMID: 26919578.

Wei MH, Toure O, Glenn GM, Pithukpakorn M, Neckers L, Stolle C, Choyke P, Grubb R, Middleton L, Turner ML, Walther MM, Merino MJ, Zbar B, Linehan WM, Toro JR. Novel mutations in FH and expansion of the spectrum of phenotypes expressed in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Med Genet*. 2006 Jan;43(1):18-27. doi: 10.1136/jmg.2005.033506. Epub 2005 Jun 3. PMID: 15937070; PMCID: PMC2564499.

Yang CY, Liao JY, Huang WJ, Chang YT, Chang MC, Lee JC, Tsai JH, Su YN, Hung CC, Jeng YM. Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. *Am J Transl Res*. 2015 Oct 15;7(10):2072-81. PMID: 26692951; PMCID: PMC4656784.

Ylisaukko-oja SK, Kiuru M, Lehtonen HJ, Lehtonen R, Pukkala E, Arola J, Launonen V, Aaltonen LA. Analysis of fumarate hydratase mutations in a population-based series of early onset uterine leiomyosarcoma patients. *Int J Cancer*. 2006 Jul 15;119(2):283-7. doi: 10.1002/ijc.21798. PMID: 16477632.

Zatloukalová P, Pječová M, Babčanová S, Hupp TR, Vojtěšek B. Úloha PD-1/PD-L1 signalizace v protinádorové imunitní odpovědi [The Role of PD-1/PD-L1 Signaling Pathway

in Antitumor Immune Response]. *Klin Onkol.* 2016 Fall;29 Suppl 4(Suppl 4):72-77. Czech. PMID: 27846724.

Zhang Q, Kanis MJ, Ubago J, Liu D, Scholtens DM, Strohl AE, Lurain JR, Shahabi S, Kong B, Wei JJ. The selected biomarker analysis in 5 types of uterine smooth muscle tumors. *Hum Pathol.* 2018 Jun;76:17-27. doi: 10.1016/j.humpath.2017.12.005. Epub 2017 Dec 16. PMID: 29258902; PMCID: PMC6065267.

Zhang Q, Poropatich K, Ubago J, Xie J, Xu X, Frizzell N, Kim J, Kong B, Wei JJ. Fumarate Hydratase Mutations and Alterations in Leiomyoma With Bizarre Nuclei. *Int J Gynecol Pathol.* 2018 Sep;37(5):421-430. doi: 10.1097/PGP.0000000000000447. PMID: 28863073; PMCID: PMC5832508.

Zhai YL, Kobayashi Y, Mori A, Orii A, Nikaido T, Konishi I, Fujii S. Expression of steroid receptors, Ki-67, and p53 in uterine leiomyosarcomas. *Int J Gynecol Pathol.* 1999 Jan;18(1):20-8. doi: 10.1097/00004347-199901000-00004. PMID: 9891238.

Zhao W, Cui M, Zhang R, Shen X, Xiong X, Ji X, Tao L, Jia W, Pang L, Sun Z, Wang C, Zou H. IFITM1, CD10, SMA, and h-caldesmon as a helpful combination in differential diagnosis between endometrial stromal tumor and cellular leiomyoma. *BMC Cancer.* 2021 Sep 23;21(1):1047. doi: 10.1186/s12885-021-08781-w. PMID: 34556086; PMCID: PMC8461929.

Zou W, Chen L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jun;8(6):467-77. doi: 10.1038/nri2326. PMID: 18500231.

## 10. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

---

### 10.1. Publikace, které jsou podkladem disertační práce

**Gregová M**, Hojný J, Němejcová K, Bártů M, Mára M, Boudová B, Laco J, Krbal L, Tichá I, Dundr P. Leiomyoma with Bizarre Nuclei: a Study of 108 Cases Focusing on Clinicopathological Features, Morphology, and Fumarate Hydratase Alterations. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(3):1527-1537. doi: 10.1007/s12253-019-00739-5. (IF2020=3,201)

Dundr P, **Gregová M**, Hojný J, Krkavcová E, Michálková R, Němejcová K, Bártů M, Hájková N, Laco J, Mára M, Richtárová A, Zima T, Stružinská I. Uterine cellular leiomyomas are characterized by common HMGA2 aberrations, followed by chromosome 1p deletion and MED12 mutation: morphological, molecular, and immunohistochemical study of 52 cases. *Virchows Arch.* 2021 Oct 9. doi: 10.1007/s00428-021-03217-z. (IF2020=4,064)

### 10.2. Publikace, které souvisí s disertační prací

Dundr P, **Gregová M**, Němejcová K, Bártů M, Bennett RJ, Stružinská I. Význam imunohistochemických metod v diagnostice mezenchymálních nádorů dělohy. *Cesk Patol.* 2021;57(2):86-95. (bez IF).

Boudová B, Mára M, Dundr P, **Gregová M**, Lisá Z, Kužel D. Uterine leiomyomas with bizarre nuclei: analysis of 37 cases after laparoscopic or open myomectomy. *Ceska Gynekol.* 2019 Summer;84(5):324-330. (bez IF)

### 10.3. Publikace bez vztahu k tématu disertační práce

**Gregová M**, Dundr P. Meningoteliální hamartom měkkých tkání hlavy [Meningothelial hamartoma of the scalp. A case report]. *Cesk Patol.* 2016;52(2):113-6. (bez IF)

Cibula D, Zikan M, Slama J, Fischerova D, Kocian R, Germanova A, Burgetova A, Dusek L, Dundr P, **Gregova M**, Nemejcova K. Risk of micrometastases in non-sentinel pelvic lymph nodes in cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2016 Oct;143(1):83-86. doi: 10.1016/j.ygyno.2016.07.101. (IF2016=4,694)

Dundr P, **Gregová M**, Němejcová K, Bártů M, Hájková N, Hojný J, Stružinská I, Fischerová D. Ovarian mesonephric-like adenocarcinoma arising in serous borderline tumor: a case report with complex morphological and molecular analysis. *Diagn Pathol.* 2020 Jul 21;15(1):91. doi: 10.1186/s13000-020-01012-z. (IF2020=2,344)

Anasuya Guha, **Maria Gregova**, Josef Sebek, Jitka Levorova, Rene Foltan. Fifteen years of recurrent ameloblastoma: outcome of disease after reconstruction with fibula free flap. *International Medicine* 2020; 2(4): 244-247. (IF2020=0,196)

Hrudka J, Drozenová J, Sýba J, **Gregová M**, Dundr P. Secretory carcinoma of salivary type in a lymph node presenting as a neck cyst diagnosed by cytology: A case report. *Diagn Cytopathol.* 2021 Jan;49(1):E1-E6. doi: 10.1002/dc.24550. (IF2021= 1,582)

Dundr P, **Gregová M**, Bártů M, et al. Přehled problematiky hodnocení tumor infiltrujících lymfocytů u karcinomu prsu v rutinní diagnostické praxi. *Cesk Patol.* 2021;57(3):161-166. (bez IF)

Fischerova, D.; Indrielle-Kelly, T.; Burgetova, A.; Bennett, R.J.; **Gregova, M.**; Dundr, P.; Nanka, O.; Gambino, G.; Frühauf, F.; Kocian, R.; Borcinova, M.; Cibula, D. Yolk Sac Tumor of the Omentum: A Case Report and Literature Review. *Diagnostics* 2022, 12, 304. (IF 2021=3,24)



## Leiomyoma with Bizarre Nuclei: a Study of 108 Cases Focusing on Clinicopathological Features, Morphology, and Fumarate Hydratase Alterations

Mária Gregová<sup>1</sup> · Jan Hojný<sup>1</sup> · Kristýna Němejcová<sup>1</sup> · Michaela Bártů<sup>1</sup> · Michal Mára<sup>2</sup> · Barbora Boudová<sup>2</sup> · Jan Laco<sup>3</sup> · Lukáš Krbal<sup>3</sup> · Ivana Tichá<sup>1</sup> · Pavel Dundr<sup>1</sup>

Received: 20 March 2019 / Accepted: 27 August 2019  
© Arányi Lajos Foundation 2019

### Abstract

Leiomyoma with bizarre nuclei (LBN) is an uncommon variant of uterine smooth muscle neoplasm. Involvement of fumarate hydratase (*FH*) has been suggested in the pathogenesis of a subset of LBN. The goal of our study is to assess the clinicopathological, morphological, immunohistochemical and molecular findings focusing on *FH* in LBNs ( $n = 108$ ) and compare it with the findings in usual leiomyomas (UL;  $n = 50$ ) and leiomyosarcomas (LMS;  $n = 42$ ). Immunohistochemically, loss of *FH* expression was found in 67/108 of LBN, 1/50 of UL and in no LMS. Class 4/5 *FH* mutations were detected in 15/53 LBN with sufficient DNA quality for molecular analysis. Pathogenic variants of the *FH* gene were detected in neither UL nor LMS. Local recurrence after surgery was present in 18/92 of LBN patients, 7 of which were histologically verified and 2 of which were found to be LBN. Our results confirmed that LBN behave in a benign fashion, although they may relapse. *FH* gene mutations were a common finding only in LBN, but not in UL and LMS. Immunohistochemistry with an antibody against *FH* seems to have a good sensitivity (87%) and moderate specificity (58%) with regard to predicting *FH* gene mutations and could be used as a screening method in tumors with features suggestive of *FH* alterations to identify patients who are at risk for the *FH* aberrations.

**Keywords** Leiomyoma with bizarre nuclei · Usual leiomyoma · Leiomyosarcoma · Fumarate hydratase

### Introduction

Leiomyoma with bizarre nuclei (LBN) is an uncommon variant of uterine smooth muscle neoplasm. This entity was defined in 1994 and, according to Bell's criteria, is characterized by moderate-to-severe nuclear atypia, < 10 mitoses per 10

high power fields (HPF), and no tumor type (coagulative) necrosis [1]. Initially, this lesion was termed "atypical leiomyoma with low risk of recurrence", but later the terminology was changed to "atypical leiomyoma" (ALM), pleomorphic leiomyoma and symplastic leiomyoma. LBN were originally regarded as tumors with a low risk of malignant behavior, but the current opinion is that despite the possibility of recurrence, these tumors probably behave in benign fashion. However, the experience with this entity is still limited, especially in conservatively treated tumors.

According to the latest WHO classification (2014), this tumor should be termed "leiomyoma with bizarre nuclei" and the use of the term "atypical leiomyoma" is no longer recommended (the term "atypical smooth muscle tumor" is used as a synonym for smooth muscle tumors of uncertain malignant potential) [2]. However, as the bizarre nuclei do not necessarily need to be present in certain variants of this tumor, the terminology is not yet perfect. WHO classification defines this entity as a tumor containing bizarre cells (focal, multifocal or diffuse) on a background of otherwise typical leiomyoma. Prominent eosinophilic nucleoli are a common

✉ Ivana Tichá  
ivana.tich@vfn.cz

✉ Pavel Dundr  
pavel.dundr@vfn.cz

<sup>1</sup> Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Štefánickova 2, 12800 Prague 2, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>3</sup> The Fingerland Department of Pathology, Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital in Hradec Králové, Charles University, Prague, Czech Republic

finding in a certain subset of these tumors. The mitotic activity is typically low, but karyorrhectic nuclei may be present, in which case they may mimic atypical mitotic figures. The cytoplasm is usually eosinophilic and can contain globular bodies, giving the cells a rhabdoid appearance. Infarct type (hyaline) necrosis can be seen, but no tumor type (coagulative) necrosis should be present.

Molecular genetic changes occurring in LBN are largely unknown. However, recent studies have shown that some of these tumors share some genetic changes with usual leiomyoma (UL) and leiomyosarcoma (LMS), including *fumarate hydratase* (*FH*) alterations or *MED12* mutations, but the frequency of these changes is different in different entities [3, 4]. Notably, *FH* alterations including germline and somatic *FH* mutations and an aberrant protein expression were described in a subset of LBN, but are rarely found in UL and LMS [4–10]. On the other hand, genomic deletions of the *FH* gene were described as a common finding in all leiomyocellular tumors, according to one study [3].

The *FH* gene is located on the long arm of chromosome 1 at position 43 (1q42.3-q43). The *FH* locus encodes two isoforms of fumarate hydratase: cytosolic and mitochondrial. Moreover, the Ensemble (release 94, January 2019) and the NCBI database both contain a record of fumarate hydratase pseudogene 1 (FHP1; HGNC: 39442; Entrez Gene ID: 100873790) which includes a reverse transcribed mRNA sequence of *FH* exon 7–10 (NCBI RefSeq: NG\_032302.2) and is localized on chromosome 13q14.11 (95% of homology).

*FH* catalyzes the reversible hydration of fumarate to L-malate. The mitochondrial isoform performs this reaction as a part of the Krebs' cycle and as such is central to aerobic respiration. The cytosolic isoform is thought to be involved in the metabolism of fumarate, which is produced in the cytosol by several reactions [11]. Patients which carry the germline homozygous *FH* mutation (*FH* deficiency) present with neonatal encephalopathy and rarely survive beyond early childhood. Patients with a heterozygous *FH* mutation present with variable symptoms, including HLRCC (hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma).

Although the mechanism of tumorigenesis in *FH*-mutated cells remains incompletely understood, it is believed that *FH* is a tumor suppressor gene. Therefore, the inactivation of both *FH* alleles results in the reduction or complete loss of the *FH*'s enzymatic activity, which leads to fumarate accumulation [12]. There are several proposed mechanisms by which the resulting elevated levels of fumarate may function as an oncoprotein. Elevated fumarate may be transported out of the mitochondria into the cytoplasm, where it can competitively inhibit the function of hypoxia-inducible factor (HIF) prolyl hydroxylase, resulting in HIF accumulation. With increased HIF-1 $\alpha$  levels, HIF target genes, such as *VEGF* and *GLUT1*, are transcriptionally activated, leading to

proliferation and resistance to apoptosis, providing increased vasculature and glucose transport for these glucose-dependent *FH*-deficient tumors. This phenomenon is called "pseudohypoxia" [12–15]. A different hypothesis to explain the role of *FH* as a tumor suppressor includes the presence of hypermutability, as a result of oxidative damage [16]. The increased level of fumarate modifies the cysteine residues in many proteins, resulting in increased protein succination and the production of S-(2-succino)-cysteine (2SC). The loss of *FH*'s enzymatic activity is mostly demonstrated by negative IHC staining of *FH* and positive IHC staining of 2SC, due to its accumulation [17]. The IHC staining of *FH* and 2SC has been described as highly specific for the identification of loss of *FH* activity [17, 18].

Patients with hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC) are at an increased risk of developing smooth muscle tumors of the uterus and skin, as well as renal tumors. HLRCC associated renal cell carcinomas are aggressive, usually papillary carcinomas, with metastatic disease in 50% of patients at the time of presentation. Efforts to reduce the morbidity and mortality of this disease through screening for disease carriers would be beneficial [16, 19]. These patients and family members would benefit from early identification and appropriate surveillance. Germline mutations of the *FH* gene are associated not only with the risk of renal cell tumors, but less frequently also with Leydig cell tumors, ovarian mucinous cystadenomas, and cerebral cavernous hemangiomas [12].

In our study we undertook a comprehensive analysis of 108 cases of LBN focusing on their clinicopathological features, morphology, and fumarate hydratase (*FH*) alterations on genomic DNA and protein level. The results were compared with a control cohort of 50 usual leiomyomas (UL) and 42 leiomyosarcomas (LMS).

## Material and Methods

### Case Selection

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue blocks and patient characterization from 1998 to 2017 were obtained from the archive files and databases of the participating institutions.

The total amount of 108 cases of LBN (Table 1) was selected for analyses. The hematoxylin-eosin slides from each case were re-evaluated to confirm the original diagnosis. A cohort of 42 cases of LMS and 50 cases of UL was used as a control group. The LMS cases included 17 uterine and 25 extragenital tumors (including skin, urinary bladder, lung, oral cavity, stomach, epididymal, and orbital tumors).

In compliance with the Helsinki Declaration, the study has been approved by The Ethics Committee of General



within the LBN was assessed as: focal - if BN were only present in scattered areas in an amount arbitrarily defined as up to 5 (per  $\times 20$  objective field), multifocal - if BN were still patchy and  $> 5$  (per  $\times 20$  objective field), and diffuse - if BN were seen essentially throughout the entire tumor. The density of BN within the LBN was semi-quantitatively assessed as follows: low:  $< 30\%$  of tumor cells, intermediate:  $\geq 30$  and  $< 70\%$ , and high:  $\geq 70\%$ .

The cytologic features included: the character of chromatin, the presence of prominent eosinophilic nucleoli, karyorrhectic nuclei, nuclear pseudoinclusions, rhabdoid-like cells, and mitotic count (per 10 high power fields (HPFs)).

The LBN cases were divided into 2 subtypes, type I and II, according to their distinct nuclear features, as described by others [5]. Type I LBN were characterized by their large round or oval nuclei, distinct and smooth nuclear membranes, prominent nucleoli and open, coarse chromatin. Type II LBN were characterized by their elongated or spindle nuclei, irregular nuclear membranes, pinpoint or no nucleoli, and dark smudgy chromatin. Cases were defined as either type I or II when over 70% of the tumor cells appeared to show nuclear features which favored either one or the other.

For the tissue microarray (TMA) construction, the eligible areas of tumor were identified and marked. The tissue cores (each 2.0 mm in diameter) were drilled from different areas in a single donor block (formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue) from each case using the tissue microarray instrument TMA Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary). In cases of LBN samples, 2 cores were taken from areas with bizarre nuclei (arbitrary termed "R"), and 2 cores from the areas where the typical leiomyoma is on the background (arbitrary termed "G"), in order to independently evaluate the R and G areas. In 9 cases, however, only the areas with atypical nuclei were taken, as there were no areas with a typical leiomyoma appearance. In cases of UL and LMS samples, 2 cores from each biopsy were taken.

### Immunohistochemical Analysis

Immunohistochemical analysis was performed manually on 4  $\mu\text{m}$  sections with an antibody against FH (polyclonal, 1:500, Abcam, Cambridge, United Kingdom). The epitope retrieval solution of pH 9.0 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) was used for pretreatment. The expression of FH was double-blindly evaluated by two observers. We graded the staining as negative (0) and positive (1+, 2+, 3+), on the basis of its intensity. Grade 0 signifies a complete absence of staining of the tumor cells, grade 1+ weak staining, grade 2+ moderate staining, and grade 3+ describes strong labeling. Only the cytoplasmic positivity was evaluated. In each LBN the R and G areas were analyzed separately. Overall, cases with a negative staining pattern in at least the R areas were

considered as IHC negative (Table 2). Endothelial cells showing a positive staining were used as an internal control.

### Molecular Analysis

Genomic DNA was isolated using the Cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's protocol, and then spectrophotometrically quantified using the NanoDrop 2000 instrument (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The quality was ascertained using a 2% agarose gel electrophoresis, and control qPCR amplification using 5 $\times$  HOT FirePol EvaGreen HRM Mix NO ROX (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). Samples with poor DNA quality ( $C_p > 40$ ) in the control amplicons of sizes 237 and 308 bp were excluded from further analysis (80/200 samples). DNA sequence analysis of the *FH* gene was successfully performed in 53 LBN, 20 LMS, and 47 UL (120/200 samples).

PCR and direct Sanger sequencing of the whole coding region (10 exons) and the adjacent intronic sequences was performed. Fragments of interest were amplified using 5 $\times$  HOT FirePol EvaGreen HRM Mix NO ROX (Solis Biodyne). BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was used for the sequencing reaction. Separation was performed on an ABI 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems). Due to the limitations of the direct Sanger sequencing method, we were only able to detect variants with frequency over 15 or 20%, and due to the semi-quantitative manner of the method, only a rough estimation of the frequency of the mutant allele in comparison to the wild-type sequence was possible.

All samples with class 4/5 mutations or multiple low frequency variants detected by dideoxy sequencing which passed DNA quality criteria (32 cases, including 18 LBN, 6 UL, and 8 LMS) were selected and re-sequenced using next generation sequencing (NGS) in order to exclude false positive detections

**Table 2** The IHC expression of FH in 108 LBN cases in separated areas with (R) or without (G) cells with bizarre nuclei

IHC staining in R and G areas	IHC evaluation	108 LBN cases
R-, G-	negative	59 (54.6%)
R-, G0	negative	5 (4.6%)
R-, G+	negative	2 (1.9%)
R+, G+	positive	38 (35.2%)
R+, G0	positive	3 (2.8%)
R-, R+, G0	negative	1 (0.9%)

Abbreviations: LBN leiomyoma with bizarre nuclei, FH fumarate hydratase, R areas with bizarre nuclei, G areas without bizarre nuclei, G0 cases without G areas, +/- negative/positive FH expression

within the LBN was assessed as: focal - if BN were only present in scattered areas in an amount arbitrarily defined as up to 5 (per  $\times 20$  objective field), multifocal - if BN were still patchy and  $> 5$  (per  $\times 20$  objective field), and diffuse - if BN were seen essentially throughout the entire tumor. The density of BN within the LBN was semi-quantitatively assessed as follows: low:  $< 30\%$  of tumor cells, intermediate:  $\geq 30$  and  $< 70\%$ , and high:  $\geq 70\%$ .

The cytologic features included: the character of chromatin, the presence of prominent eosinophilic nucleoli, karyorrhectic nuclei, nuclear pseudoinclusions, rhabdoid-like cells, and mitotic count (per 10 high power fields (HPFs)).

The LBN cases were divided into 2 subtypes, type I and II, according to their distinct nuclear features, as described by others [5]. Type I LBN were characterized by their large round or oval nuclei, distinct and smooth nuclear membranes, prominent nucleoli and open, coarse chromatin. Type II LBN were characterized by their elongated or spindle nuclei, irregular nuclear membranes, pinpoint or no nucleoli, and dark smudgy chromatin. Cases were defined as either type I or II when over 70% of the tumor cells appeared to show nuclear features which favored either one or the other.

For the tissue microarray (TMA) construction, the eligible areas of tumor were identified and marked. The tissue cores (each 2.0 mm in diameter) were drilled from different areas in a single donor block (formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue) from each case using the tissue microarray instrument TMA Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary). In cases of LBN samples, 2 cores were taken from areas with bizarre nuclei (arbitrary termed "R"), and 2 cores from the areas where the typical leiomyoma is on the background (arbitrary termed "G"), in order to independently evaluate the R and G areas. In 9 cases, however, only the areas with atypical nuclei were taken, as there were no areas with a typical leiomyoma appearance. In cases of UL and LMS samples, 2 cores from each biopsy were taken.

### Immunohistochemical Analysis

Immunohistochemical analysis was performed manually on 4  $\mu\text{m}$  sections with an antibody against FH (polyclonal, 1:500, Abcam, Cambridge, United Kingdom). The epitope retrieval solution of pH 9.0 (Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) was used for pretreatment. The expression of FH was double-blindly evaluated by two observers. We graded the staining as negative (0) and positive (1+, 2+, 3+), on the basis of its intensity. Grade 0 signifies a complete absence of staining of the tumor cells, grade 1+ weak staining, grade 2+ moderate staining, and grade 3+ describes strong labeling. Only the cytoplasmic positivity was evaluated. In each LBN the R and G areas were analyzed separately. Overall, cases with a negative staining pattern in at least the R areas were

considered as IHC negative (Table 2). Endothelial cells showing a positive staining were used as an internal control.

### Molecular Analysis

Genomic DNA was isolated using the Cobas® DNA Sample Preparation Kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's protocol, and then spectrophotometrically quantified using the NanoDrop 2000 instrument (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The quality was ascertained using a 2% agarose gel electrophoresis, and control qPCR amplification using 5 $\times$  HOT FirePol EvaGreen HRM Mix NO ROX (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). Samples with poor DNA quality ( $C_p > 40$ ) in the control amplicons of sizes 237 and 308 bp were excluded from further analysis (80/200 samples). DNA sequence analysis of the *FH* gene was successfully performed in 53 LBN, 20 LMS, and 47 UL (120/200 samples).

PCR and direct Sanger sequencing of the whole coding region (10 exons) and the adjacent intronic sequences was performed. Fragments of interest were amplified using 5 $\times$  HOT FirePol EvaGreen HRM Mix NO ROX (Solis Biodyne). BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) was used for the sequencing reaction. Separation was performed on an ABI 3500 genetic analyzer (Applied Biosystems). Due to the limitations of the direct Sanger sequencing method, we were only able to detect variants with frequency over 15 or 20%, and due to the semi-quantitative manner of the method, only a rough estimation of the frequency of the mutant allele in comparison to the wild-type sequence was possible.

All samples with class 4/5 mutations or multiple low frequency variants detected by dideoxy sequencing which passed DNA quality criteria (32 cases, including 18 LBN, 6 UL, and 8 LMS) were selected and re-sequenced using next generation sequencing (NGS) in order to exclude false positive detections

**Table 2** The IHC expression of FH in 108 LBN cases in separated areas with (R) or without (G) cells with bizarre nuclei

IHC staining in R and G areas	IHC evaluation	108 LBN cases
R-, G-	negative	59 (54.6%)
R-, G0	negative	5 (4.6%)
R-, G+	negative	2 (1.9%)
R+, G+	positive	38 (35.2%)
R+, G0	positive	3 (2.8%)
R-, R+, G0	negative	1 (0.9%)

Abbreviations: LBN leiomyoma with bizarre nuclei, FH fumarate hydratase, R areas with bizarre nuclei, G areas without bizarre nuclei, G0 cases without G areas, +/- negative/positive FH expression

of a mutation due to either fixation artifacts or existing pseudogenes. A Nimblegen custom panel sequence capture (257 kbp, 89 genes or gene parts including whole coding sequence of *FH*) of samples prepared using the Hyper Plus Library preparation kit (KAPA) was performed according to the Roche SeqCap EZ Library protocol. The samples were paired-end sequenced by MiSeq instrument (Illumina) using the 2 × 75 bp Reagent Kit v3 (Illumina). Demultiplexed FastQ files were processed using the in-house bioinformatic pipeline (including PCR duplicate and low-quality reads removal), performed by the NextGENE v2.1.2 software (Softgenetics). The average coverage of samples in the *FH* gene was in the range of 250–500x, which shows sufficient sensitivity for the NGS detection of mutations with a frequency > 5% (at least 10 reads with mutation).

### Annotation of Variants

The nomenclature of variants follows the recommendations of the Human Genome Variation Society (HGVS), and is based on the NM\_000143.3 reference sequence. Mutations which were not found in the literature or databases until January 2019 were considered as novel (dpSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>; 1000 Genomes, <http://www.1000genomes.org/>; ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>; ESP, <http://varianttools.sourceforge.net/Annotation/EVS/>; COSMIC, <http://www.sanger.ac.uk/cosmic/>; or HGMD, <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/human-gene-mutation-database/>).

The in silico tool Variant Effect Predictor (Ensembl; <http://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>) was used to evaluate the predicted effects of all of the variants [20]. A variant was considered as a “true” pathogenic when identified as pathogenic in the mutation databases (ClinVar) or when the nature of the mutation suggests a truncated protein product (nonsense, frameshift, start loss or indels mutations). A variant was considered as a “predicted” pathogenic when at least six of the nine in silico predictive softwares suggested a damaging nature of the variant (including CADD, GERP++, Mutation Assessor, Mutation Taster, Provean, SiPhy, VEST3, PolyPhen and SIFT).

### Statistical Analysis

The software STATISTICA 10 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) was used. The Fisher exact test or the chi-square test were used to compare different tumor groups based upon the immunohistochemical and clinicopathological variables. All tests were two sided, and a *p* value less than 0.05 was considered significant.

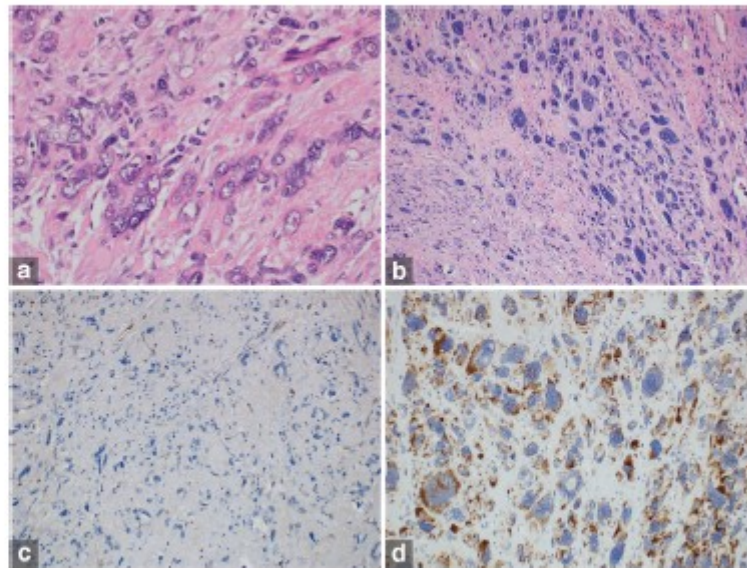
### Results

The patients' characteristics, clinicopathological, gross and microscopic features of LBN cohort are summarized in Table 1. In a nutshell, the mean age was 43 years (range 25–84), and the tumor sizes ranged from 5 to 150 mm. Most patients included in this study were admitted to hospital for abnormal uterine bleeding (*n* = 36; 33.3%), or pelvic pain/discomfort (*n* = 9; 8.3%). Other patients were either asymptomatic (*n* = 13; 12%) or had clinical symptoms of another nature (hydronephrosis, myomatous uterus, leiomyoma protrusion, vaginal discharge, *n* = 5; 4.6%). No data was available for 45 patients (41.7%). Of the 108 LBN, 104 (96%) were localized in the uterus, 2/108 (2%) in the parametrium and in 2 cases (2%) the location was unknown. Local recurrence after surgery was present in 19.6% (18/92) of patients – of which 11 patients presented clinically with a myomatous uterus without a bioptic confirmation of the lesions, 2 had LBN, 4 UL and the last one had mitotically active leiomyoma. Additionally, two of the patients who were treated for LBN later on developed LMS – one arising in the vaginal stump 8 months after a hysterectomy, while the second one was a case of uterine LMS occurring 7 years after a myomectomy. In both these cases the tumors arose without a relation to LBN, and as such LBN cannot be regarded as their precursor. Metastases were not observed in any of the cases. None of our patients had a personal history of renal neoplasia; although it had been reported that one patient's father died of generalization of renal clear cell carcinoma (RCC) at the age of 61.

Microscopic evaluation revealed that all LBN cases had sharp, well-circumscribed margins (68/68; 100%). However, the margins could not be ascertained in 40/108 of the LBN cases as their interface with the myometrium was not observed. A majority of cases showed both intermediate and high cellularity (106/108; 98%), and only 2/108 (2%) cases were hypocellular. Fibrinoid necrosis of the vessel wall was found in 6/108 (6%) cases, luminal vascular obliteration in 5/108 (5%), and a perivascular inflammatory infiltrate composed of mononuclear cells in 30/108 (28%). Tumor regressive changes like edema were present in 31.5% (34/108) of the cases, hyalinization in 33.3% (36/108), and hydropic changes in 3.7% (4/108). The ischemic type of necrosis or a suspicion of this type of necrosis was observed in only 4.6% (5/108) cases.

The LBN were further divided into two subgroups: type I (72 cases) and type II (36 cases) (Fig. 1a, b). The LBN of type I and II were significantly different, based upon the histopathological characteristics presented in Table 1. LBN type I more frequently had prominent nucleoli ( $\chi^2 = 20.23$ , *df* = 1, *p* < 0.001) and rhabdoid-like cells ( $\chi^2 = 21.77$ , *df* = 1, *p* < 0.001) when compared with type II. There was no difference between the presence of staghorn vessels in type I and type II lesions.

**Fig. 1** Leiomyoma with bizarre nuclei. Note the prominent eosinophilic nucleoli in the type I tumor (1A, HE, 400 x) and coarse, dark smudged chromatin in the type II tumor (1B, HE, 100 x). Immunohistochemical expression of FH showing granular positivity in all tumor cells (1C, 200 x). Loss of FH expression in tumor cells (1D, 200 x). Note the granular positivity in endothelial cells



### Immunohistochemical Findings

Immunohistochemical findings are summarized in Table 3. Briefly, the immunohistochemical analysis showed at least a partial loss of FH expression in 67/108 (62%) of LBN cases. In 97/108 (90%) cases the expression was concordant in both of the evaluated regions, R and G (Fig. 1c, d). In 8/108 (7%) cases the G area could not be evaluated due to the presence of diffuse atypias without background areas of typical leiomyoma. In 3/108 (3%) of LBN cases the noted expression was different in different areas: R versus G ( $n=2$ ) or in 2 different cores from the R area ( $n=1$ ; R-, R+, G not present) (Table 2). More cases with loss of FH expression were observed in LBN type I group in comparison to the type II group ( $\chi^2=18.89$ ,  $df=1$ ,  $p<0.001$ ). In the group of type I LBN 76% (55/72) showed loss of FH expression, compared to 33% (12/36) in type II LBN group. In UL, loss of FH expression was present in 1/50 (2%) case. No cases of LMS showed loss of FH expression.

### Molecular Findings

Sequencing analysis was performed primarily using direct Sanger sequencing, but this approach showed a high number (243) of detected FH variants with a relatively high percentage of C>T or G>A substitutions (97/243; 40% and 93/243; 38%), respectively, suggesting the presence of sequenced fixation artefacts (likely deamination which arose from fixation). The majority of these substitutions (82% of C>T and 62% of G>A) showed low frequency pattern with an estimated variant allele frequency of less than 25% on Sanger electropherograms. Moreover, multiple low frequency mutations were detected in numerous other samples. Therefore, the NGS capture approach was implemented to set up cut-offs to filter out the high mutation background. The NGS results were compared to Sanger sequencing data. Low-frequency variants detected using Sanger sequencing (variants the signal of which was less than one third of the wild-type signal on the electropherogram) were not confirmed using the NGS approach.

**Table 3** The IHC expression of FH in different diagnoses

FH expression	LBN type I	LBN type II	LBN	UL	LMS
No. of evaluated cases	72	36	108	50	42
negative	55 (76%)	12 (33%)	67 (62%)	1 (2%)	0
positive	17 (24%)	24 (66%)	41 (38%)	49 (98%)	42 (100%)

Abbreviations: LBN leiomyoma with bizarre nuclei, UL usual leiomyoma, LMS leiomyosarcoma

Therefore, those variants were considered as fixation artifacts that were, together with the so-called pseudogene variants, filtered out. Two *FH* pseudogenes were identified due to the localization of some NGS reads in all of the sequenced cases outside of the coding sequence of *FH*. Firstly, an already described pseudogene *FHP1*, and secondly another copy of this pseudogene, which has not yet been described in databases. This novel pseudogene was found by comparing the sequence fragment (with the mutation identified using Sanger sequencing) to the human genome using BLAST/BLAT on chromosome 5p13.2. This copy shows 89% homology.

Altogether, DNA sequence analysis of the *FH* gene was successfully performed in 53 LBN, 20 LMS, and 47 UL cases, and revealed 57 alterations in 39/120 lesions, including 56 single nucleotide variants and one complex pathogenic variant (c. [278T>C;282delA;284C>G], p. [I1e93Thr; Ala95ValfsTer5]). Out of these variations, 6 were protein truncating [6/57 (10.5%)], 25 missense [25/57 (43.9%)], 8 silent [8/57 (14%)] and 17 were non-coding [17/57 (29.8%)]. None of these were found in the general splice site DNA consensus motifs.

Out of all the 57 identified variants, 51 variants were unique (48 were detected once, 2 were detected in two samples, and one intronic variant was detected in 5 samples). Of the unique variants, 24 have already been previously described in databases and 27 variants were novel. Moreover, 18 nonsynonymous variants were in the catalytic domain of *FH* spanning codons 58–389. Pathogenic variants, according to the ClinVar database or truncating nature of the variant (excluding in silico analyses of missense variants), were detected in 7/53 (13.2%) LBN. Furthermore, 9 missense variants with an unknown significance which were determined using in silico tools as pathogenic or damaging were detected in 8/53 LBN (15.1%; 1 case carried 2 mutations).

Pathogenic or likely pathogenic mutations (class 4/5) were detected in 35% (12 out of 34) of the analyzed type I LBN and 16% (3/19) of type II LBN (summarized in Table 1). In total, 13/29 (45%) LBN with loss of *FH* expression, and 2/24 (8%) LBN with positive *FH* expression carried a class 4/5 mutation of the *FH* gene. No pathogenic *FH* gene variants were detected in UL and LMS.

In total, pathogenic, likely pathogenic, and predicted pathogenic mutations (according to databases, the truncating nature of the mutation or in silico analysis; i.e. class 4/5 mutations) were detected in 15/53 (28.3%) LBN, but in no UL or LMS cases.

The detected variants were mainly of a somatic origin. However, there was a confirmed germline pathogenic variant in exon 5 (c.698G>T, p.R233L; mutant allele frequency 50%; Fig. 2) found in one of the patients, diagnosed with LBN at the age of 36. This variant is located in the conserved sequence of the active catalytic domain (Lyase\_1) of *FH*, and has been described in several publications and databases as a mutation associated with HLRCC and multiple cutaneous and uterine leiomyomas. The set of in silico prediction tools which we used in our study also suggested the damaging nature of this mutation.

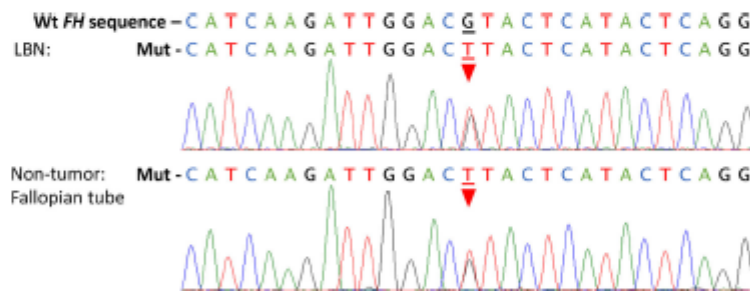
Three cases of LBN showed a difference in the immunohistochemical staining of *FH* in an area with bizarre nuclei vs. an area with typical nuclei. In the first case (R-, G+) two likely pathogenic missense variants in exon 8 (p.G389R - mutant allele frequency 35% and p.P410L - mutant allele frequency 30%) were found. In the second case (R-, G+) and the third case (R-, R+) no mutation was found.

## Discussion

Leiomyoma with bizarre nuclei (LBN) is an uncommon variant of uterine smooth muscle neoplasm. Only a few studies with at least 10 cases (either termed LBN or atypical leiomyomas (ALM)) have to date been reported, and as such less than 400 cases in total have been analyzed [3, 5, 21–28]. Additional sporadic single case reports or small series have also been reported [29].

LBN/ALM was originally regarded as a tumor with a low risk of malignant behavior, but subsequent studies have shown that this lesion probably behaves in a benign fashion. Despite this fact, LBN shares some molecular features with LMS and it has been suggested that LBN bears some potential to subsequent malignant transformation [3]. However, there are no well documented deaths related to this tumor.

**Fig. 2** Sequencing analysis revealed germline pathogenic missense mutation in exon 5 of fumarate hydratase NM\_000143.3:c.698G>T; p.(Arg233Leu); rs121913123. Heterozygous variant was detected in tissue dissected from LBN, and corresponding non-tumor tissue



The optimal treatment of this tumor is still a subject with some uncertainties. Most patients are treated by hysterectomy and large studies following patients treated by myomectomy are lacking [22, 27]. In our study 19/45 (42%) patients treated by myomectomy showed clinical local recurrence. However, only 7 of these recurrences were histologically verified, of which 2 were LBN, 4 UL and 1 mitotically active leiomyoma. Based on the findings of several studies, relapse after treatment (predominantly in the form of myomectomy) was found only in the range of 0–8%, but in our study the recurrence after myomectomy was 42% according to clinical data [26, 30]. However, the LBN relapse was proven in only 2/7 histologically verified cases.

From the pathologist's point of view, LBN commonly presents a diagnostic dilemma and is probably the leiomyocellular tumor most commonly misdiagnosed as leiomyosarcoma [22]. However, when the lesion is carefully scrutinized, and the typical diagnostic criteria are ascertained, the diagnosis is usually straightforward. The biggest problem seems to be the assessment of mitotic activity, as a typical feature of these tumors is the presence of multiple karyorrhectic nuclei, which are easily misinterpreted as mitoses. In this setting, the antibody against PHH3 seems to be helpful [25, 31].

One of the other typical features of LBN/ALM is the presence of eosinophilic cytoplasmic globules. However, these are not specific for LBN/ALM and can also be found in UL, although in UL these bodies are very rare. In our previous study we were able to find them only in 10/428 usual leiomyomas (2.3%) [32]. Moreover, a staghorn pattern of vessels, nuclear pseudoinclusions, rhabdoid-like cells, and fibrillary appearance of the cytoplasm can also be found as a part of the LBN morphology.

Mutation analysis of our cohort revealed pathogenic or likely pathogenic variants of *FH* in LBN cases, but not in UL and LMS cases. Recent studies have shown that there are at least 3 putative driver mutations or cytogenetic rearrangements which occur in leiomyomas. These include the translocation t(12;14)(q15;q24), leading to an overexpression of the high mobility group AT-hook 2 (HMGA2), occurring in approximately 20% of UL. The other two mutations are the *mediator complex subunit 12 (MED12)* mutation, occurring in 60–70% of UL, and the *FH* mutation, which can be found in approximately 20% of LBN, but is very rare in UL [5–7, 33]. In LMS, *FH* mutation and HMGA2 overexpression is rarely found [34]. However, in one study the authors found deletions of *FH* gene in 27% of patients with UL, 30.8% of patients with LBN, and 25% of patients with LMS [3].

Several studies have focused on the detailed morphological aspects of LBN/ALM and some recent studies have also focused on the molecular genetic changes which occur in these tumors [21–23]. Based on their results discussions have emerged, debating whether LBN/ALM represents a single

entity or two (or more) distinct entities. In a recent study of 60 cases, the authors defined 2 subtypes of LBN/ALM based on their nuclear features [5]. Type I LBN/ALM were characterized by round or oval nuclei with smooth nuclear membranes, prominent nucleoli with perinuclear halos, and open, coarse chromatin. Type II LBN/ALM had elongated or spindle nuclei with irregular nuclear membrane, pinpoint or no nucleoli, and dark smudgy chromatin. The authors were able to classify 95% of cases, the remaining 5% showed mixed nuclear features of both types and were classified based on the predominant component. In a subsequent study (expanded to 77 cases) the authors focused on *FH* alterations by assessing the mutation status of the *FH* gene and immunohistochemistry with antibodies against *FH* and S-(2-succino)-cystein (2SC) [28]. The results of their study showed that 51% of LBN had alteration detected by immunohistochemistry and 21% of LBN harbored the *FH* gene mutation. In our study the corresponding results were 62% (67/108) and 14% (15/108), respectively. Out of the 15 cases with *FH* alterations, 80% were of type I and 20% were of type II LBN. We observed loss of *FH* expression in 76% LBN I and 33% LBN II (Table 3). Class 4/5 mutations of *FH* were more frequent in LBN I (35%, 12/34) than LBN II (16%, 3/19). The description of type I tumors in this study is quite similar to uterine smooth muscle tumors with fumarate hydratase alteration (SMT-FHs), as described recently [35–37].

In a large study of 1583 uterine smooth muscle tumors, *FH* deficiency was detected in 86 cases (5.43%). The frequency of *FH* deficiency was the highest in LBN/ALM (37.3%), while it was low in usual leiomyomas (1–2%). None of the included leiomyosarcomas showed *FH* deficiency. The authors detected 17 non-atypical leiomyomas with aberrant *FH* expression in a group of 1058 leiomyomas [38]. Morphologically, 13/17 cases contained at least some cells with mildly enlarged eosinophilic nucleoli, 13/17 with eosinophilic cytoplasmic inclusions, and 17/17 with staghorn vessels. The molecular genetic findings in 16 of these tumors showed abnormalities in the *FH* gene in 50% ( $n = 8$ ). In this study, the authors also analyzed 182 cases of LBN/ALM. They observed loss of *FH* expression in 37.3% (68/182).

*FH* deficient tumors were often associated with *FH* mutations. These mutations vary from single nucleotide substitutions to whole gene deletions. The most commonly reported changes are single nucleotide substitutions. Among the less frequent *FH* alterations were frameshift mutations, splice site mutations, and gene deletions [7, 38]. In our study the reported variants included missense (44%) and frameshift (5%) mutations, but no splice site mutations. There is no clear evidence of a genotype-phenotype correlation. Germline mutations in the *fumarate/fumarate hydratase (FH)*-gene are associated with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer (HLRCC) syndrome, which predisposes carriers to the development of cutaneous and uterine smooth muscle tumors as

well as kidney cancer, frequently in the form of papillary renal cell carcinoma.

A germline missense mutation (NM\_000143.3:c.698G>T; p.R233L) was determined in one patient with LBN diagnosed at the age of 36. The damaging nature of this variant is supported by several publications and database entries (ClinVar, dbSNP, HGMD) which show its association with HLRCC and multiple cutaneous and uterine leiomyomas [39, 40].

Immunohistochemistry can be helpful in the screening of tumors with suspected *FH* deficiency. *FH* is believed to be a tumor suppressor gene and inactivation of both *FH* alleles results in complete loss or reduction of the *FH*'s enzymatic activity and leads to fumarate accumulation. This increased level of fumarate also modifies the cysteine residues in many proteins, resulting in an increased protein succination and production of S-(2-succino)-cysteine (2SC). The loss of *FH* enzymatic activity results in negative *FH* and positive 2SC on immunohistochemistry. An algorithm combining the antibody against *FH* and 2SC has been suggested as having a high specificity for identifying mutations in the *FH* gene, including, HLRCC-associated tumors [17, 18, 21, 37]. Tumors which are *FH* negative/2SC positive and/or *FH* positive/2SC positive are suspected of *FH* genetic alterations, including homozygous deletions and mutations [21]. The probability of *FH* mutation in tumors which are *FH* positive/2SC negative is very low. In one study, of the 41 2SC positive cases, 39 showed loss of *FH* expression. The remaining 2 cases which were positive for both *FH* and 2SC did not reveal any *FH* gene mutations [28]. In another study of 31 cases of LBN the authors found aberrant *FH*/2SC expression in 17 tumors (16 *FH*-negative/2SC-positive; 1 *FH*-positive/2SC-positive). Massively parallel sequencing ( $n=24$ ) found that 13/14 tumors with an aberrant *FH*/2SC immunoprofile had *FH* gene alterations, including homozygous deletions ( $n=9$ ) and mutations ( $n=4$ ). No *FH* gene alterations were found in tumors with normal *FH*/2SC immunophenotype [21]. The problem of using this algorithm in routine practice is that the antibody against 2SC is, to our knowledge, currently not commercially available. Moreover, according to some studies, this antibody, despite being highly sensitive, lacks specificity. Nevertheless, the sensitivity and specificity of the antibody against *FH* is, according to some studies, high even when not used in combination with 2SC [8, 41].

## Conclusion

In conclusion, the results of our study have confirmed that despite their worrisome nuclear features LBN behave in a benign fashion, although relapse is possible. We have found that *FH* gene mutations are a common finding in LBN, but in our study they do not occur in any of the cases of UL or LMS.

In LBN, immunohistochemistry with antibody against *FH* seems to have a moderate sensitivity (87%) and specificity (58%) with regard to predicting the *FH* gene mutations. We believe that immunohistochemistry can be a cheap and effective tool, which could be used as a screening method in tumors with features suggestive of *FH* alterations to identify patients who are at risk for the *FH* aberrations, including hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma (HLRCC). However, to be able to draw definite conclusions concerning the use of anti-*FH* antibody in this setting future studies with larger cohorts are needed.

**Funding Information** This work was supported by Ministry of Health, Czech Republic (Conceptual development of research organization 64165, General University Hospital in Prague), by Charles University (Project Progres Q28/LF1, UNCE 204065 and SVV 260367), by European Regional Development Fund, project EF16\_013/000/1674 and BMMRI\_CZ.LM201/5089, and by OPKK (Research Laboratory of Tumor Diseases, CZ.2.16/3.1.00/245/09).

**Compliance with Ethical Standards** In compliance with the Helsinki Declaration, the project has been approved by Ethics Committee of the General University Hospital, Prague (reference number 6.j. 98/16 Grant RVO-VFN 64165).

**Competing Interests** The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR (1994) Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *Am J Surg Pathol* 18(6):535-558
2. Kurman RJ, Carcangiu ML, Young RH, Herrington CSE (2014) WHO Classification of tumours of female reproductive organs, 4th edn. IARC, Lyon:307
3. Liegl-Atzwanger B, Heitzer E, Flicker K, Muller S, Ulz P, Saglam O, Tavassoli F, Devouassoux-Shisheboran M, Geigl J, Moirafar F (2016) Exploring chromosomal abnormalities and genetic changes in uterine smooth muscle tumors. *Mod Pathol* 29(10):1262-1277. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.107>
4. Mäkinen N, Kampjarvi K, Frizzell N, Butzow R, Vahteristo P (2017) Characterization of MED12, HMGA2, and FH alterations reveals molecular variability in uterine smooth muscle tumors. *Mol Cancer* 16(1):101. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0672-1>
5. Ubago JM, Zhang Q, Kim JJ, Kong B, Wei JJ (2016) Two subtypes of atypical Leiomyoma: clinical, histologic, and molecular analysis. *Am J Surg Pathol* 40(7):923-933. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000646>
6. Nibert M, Heim S (1990) Uterine leiomyoma cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 2(1):3-13
7. Lehtonen R, Kiuru M, Vanhamanta S, Sjöberg J, Aaltonen LM, Aittomäki K, Arola J, Butzow R, Eng C, Husgafvel-Pursiainen K, Isola J, Jarvinen H, Koivisto P, Mecklin JP, Peltomäki P, Salovaara R, Wäsänen VM, Karhu A, Launonen V, Nupponen NN, Aaltonen LA (2004) Biallelic inactivation of fumarate hydratase (*FH*) occurs in nonsyndromic uterine leiomyomas but is rare in other tumors. *Am J Pathol* 164(1):17-22. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63091-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63091-X)

8. Harrison WJ, Andrici J, Maclean F, Madadi-Ghahan R, Farzin M, Sison L, Toon CW, Clarkson A, Watson N, Pickett J, Field M, Crook A, Tucker K, Goodwin A, Anderson L, Srinivasan B, Grossmann P, Martinek P, Ondic O, Hes O, Trpkov K, Clifton-Bligh RJ, Dwight T, Gill AJ (2016) Fumarate hydratase-deficient uterine leiomyomas occur in both the syndromic and sporadic settings. *Am J Surg Pathol* 40(5):599–607. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000573>
9. Ylisaakko-oja SK, Kiuru M, Lehtonen HJ, Lehtonen R, Puukkala E, Arola J, Launonen V, Aaltonen LA (2006) Analysis of fumarate hydratase mutations in a population-based series of early onset uterine leiomyosarcoma patients. *Int J Cancer* 119(2):283–287. <https://doi.org/10.1002/ijc.21798>
10. Barker KT, Spendlove HE, Banu NS, Bridge JA, Fisher C, Shipley J, Garrett M, Manyonda I, Houlston RS (2006) No evidence for epigenetic inactivation of fumarate hydratase in leiomyomas and leiomyosarcomas. *Cancer Lett* 235(1):136–140. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.017>
11. Alam NA, Olpin S, Rowan A, Kelsell D, Leigh IM, Tomlinson IP, Weaver T (2005) Missense mutations in fumarate hydratase in multiple cutaneous and uterine leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Mol Diagn* 7(4):437–443. [https://doi.org/10.1016/S1525-5157\(10\)60574-0](https://doi.org/10.1016/S1525-5157(10)60574-0)
12. Llamas-Velasco M, Requena L, Adam J, Frizzell N, Hartmann A, Menzel T (2016) Loss of fumarate hydratase and aberrant protein succination detected with S-(2-Succinyl)-cysteine staining to identify patients with Multiple cutaneous and uterine Leiomyomatosis and hereditary Leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome. *Am J Dermatopathol* 38(12):887–891. <https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000000580>
13. Wei JJ (2016) Atypical leiomyoma with features suggesting of fumarate hydratase mutation. *Int J Gynecol Pathol* 35(6):531–536. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000276>
14. Linehan WM, Rouault TA (2013) Molecular pathways: fumarate hydratase-deficient kidney cancer—targeting the Warburg effect in cancer. *Clin Cancer Res* 19(13):3345–3352. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0304>
15. Tong WH, Sourbier C, Kovtunovych G, Jeong SY, Vira M, Ghosh M, Romero VV, Sougart R, Vaulont S, Viollet B, Kim YS, Lee S, Trepel J, Srinivasan R, Bratislavsky G, Yang Y, Linehan WM, Rouault TA (2011) The glycolytic shift in fumarate-hydratase-deficient kidney cancer lowers AMPK levels, increases anabolic propensities and lowers cellular iron levels. *Cancer Cell* 20(3):315–327. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.07.018>
16. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, Leigh I, Gorman P, Lamlum H, Rahman S, Roylance RR, Olpin S, Bevan S, Barker K, Heufe N, Houlston RS, Kiuru M, Lehtonen R, Karhu A, Vilkki S, Laïho P, Eklund C, Vierimas O, Aittomäki K, Hietala M, Sistonen P, Paetou A, Salovaara R, Herva R, Launonen V, Aaltonen LA, Multiple Leiomyoma C (2002) Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet* 30(4):406–410. <https://doi.org/10.1038/ng849>
17. Trpkov K, Hes O, Agaimy A, Bonert M, Martinek P, Magi-Galluzzi C, Kristiansen G, Luders C, Nesi G, Comperat E, Sibony M, Berney DM, Mehra R, Brimo F, Hartmann A, Husain A, Frizzell N, Hills K, Maclean F, Srinivasan B, Gill AJ (2016) Fumarate hydratase-deficient renal cell carcinoma is strongly correlated with fumarate hydratase mutation and hereditary leiomyomatosis and renal cell carcinoma syndrome. *Am J Surg Pathol* 40(7):865–875. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000617>
18. Buelow B, Cohen J, Nagymányi Z, Frizzell N, Joseph NM, McCalmont T, Garg K (2016) Immunohistochemistry for 2-Succinylcysteine (2SC) and Fumarate Hydratase (FH) in cutaneous leiomyomas may aid in identification of patients with HLRCC (Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma Syndrome). *Am J Surg Pathol* 40(7):982–988. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000626>
19. Wei MH, Toure O, Glenn GM, Pihlakpakorn M, Neckers L, Stolle C, Choyke P, Grubb R, Middleton L, Turner ML, Walther MM, Merino MJ, Zbar B, Linehan WM, Tom JR (2006) Novel mutations in FH and expansion of the spectrum of phenotypes expressed in families with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *J Med Genet* 43(1):18–27. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.033506>
20. McLaren W, Gill L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GR, Thomann A, Flick P, Cunningham F (2016) The Ensembl variant effect predictor. *Genome Biol* 17(1):122. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
21. Bennett JA, Weigelt B, Chiang S, Selenica P, Chen YB, Bialik A, Bi R, Schultheis AM, Lim RS, Ng CKY, Morales-Oyarvide V, Young RH, Reuter VE, Soslow RA, Oliva E (2017) Leiomyoma with bizarre nuclei: a morphological, immunohistochemical and molecular analysis of 31 cases. *Mod Pathol* 30(10):1476–1488. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.56>
22. Croce S, Young RH, Oliva E (2014) Uterine leiomyomas with bizarre nuclei: a clinicopathologic study of 59 cases. *Am J Surg Pathol* 38(10):1330–1339. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000249>
23. Dastranj Tabrizi A, Ghojzadeh M, Thagizadeh Arvar H, Vahedi A, Naji S, Mostafaei E, Borenjan S (2015) Immunohistochemical profile of uterine leiomyoma with bizarre nuclei: comparison with conventional leiomyoma, smooth muscle tumors of uncertain malignant potential and leiomyosarcoma. *Adv Pharm Bull* 5(Suppl 1):683–687. <https://doi.org/10.15171/aph.2015.093>
24. Kefeli M, Caliskan S, Kurtoglu E, Yildiz I, Kokcu A (2017) Leiomyoma with bizarre nuclei: clinical and pathologic features of 30 patients. *Int J Gynecol Pathol* 37:379–387. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000425>
25. Liang Y, Zhang X, Chen X, Lu W (2015) Diagnostic value of progesterone receptor, p16, p53 and pHH3 expression in uterine atypical leiomyoma. *Int J Clin Exp Pathol* 8(6):7196–7202
26. Ly A, Mills AM, McKenney JK, Balzer BL, Kempson RL, Hendrickson MR, Longacre TA (2013) Atypical leiomyomas of the uterus: a clinicopathologic study of 51 cases. *Am J Surg Pathol* 37(5):643–649. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182893f36>
27. Sung CO, Ahn G, Song SY, Choi YL, Bae DS (2009) Atypical leiomyomas of the uterus with long-term follow-up after myomectomy with immunohistochemical analysis for p16INK4A, p53, Ki-67, estrogen receptors, and progesterone receptors. *Int J Gynecol Pathol* 28(6):529–534. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e3181a2b8d3>
28. Zhang Q, Poropatich K, Ushago J, Xie J, Xu X, Frizzell N, Kim J, Kong B, Wei JJ (2017) Fumarate hydratase mutations and alterations in Leiomyoma with bizarre nuclei. *Int J Gynecol Pathol* 37:421–430. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000447>
29. Kalogianmidis I, Stavrakis T, Dagklis T, Petousis S, Nikolaidou C, Venizelos I, Rouso D (2016) A clinicopathological study of atypical leiomyomas: benign variant leiomyoma or smooth-muscle tumor of uncertain malignant potential. *Oncol Lett* 11(2):1425–1428. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.4062>
30. Mills AM, Ly A, Balzer BL, Hendrickson MR, Kempson RL, McKenney JK, Longacre TA (2013) Cell cycle regulatory markers in uterine atypical leiomyoma and leiomyosarcoma: immunohistochemical study of 68 cases with clinical follow-up. *Am J Surg Pathol* 37(5):634–642. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318287779c>
31. Pang SJ, Li CC, Shen Y, Liu YZ, Shi YQ, Liu YX (2015) Value of counting positive pHH3 cells in the diagnosis of uterine smooth muscle tumors. *Int J Clin Exp Pathol* 8(5):4418–4426
32. Dundr P, Povysil C, Tvrdek D, Man M (2007) Uterine leiomyomas with inclusion bodies: an immunohistochemical and ultrastructural



- analysis of 12 cases. *Pathol Res Pract* 203(3):145–151. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2006.12.008>
33. Mäkinen N, Vähteristö P, Kampjarvi K, Arola J, Butzow R, Aaltonen LA (2013) MED12 exon 2 mutations in histopathological uterine leiomyoma variants. *Eur J Hum Genet* 21(11):1300–1303. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.33>
  34. Mäkinen N, Aavikko M, Heikkinen T, Taipale M, Taipale J, Koivisto-Korander R, Butzow R, Vähteristö P (2016) Exome sequencing of uterine leiomyosarcomas identifies frequent mutations in TP53, ATRX, and MED12. *PLoS Genet* 12(2):e1005850. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005850>
  35. Reyes C, Karamuzin Y, Frizzell N, Garg K, Nonaka D, Chen YB, Soslow RA (2014) Uterine smooth muscle tumors with features suggesting fumarate hydratase aberration: detailed morphologic analysis and correlation with S-(2-succino)-cysteine immunohistochemistry. *Mod Pathol* 27(7):1020–1027. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.215>
  36. Sanz-Ortega J, Vocke C, Stratton P, Linehan WM, Merino MJ (2013) Morphologic and molecular characteristics of uterine leiomyomas in hereditary leiomyomatosis and renal cancer (HLRCC) syndrome. *Am J Surg Pathol* 37(1):74–80. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31825ec16f>
  37. Joseph NM, Solomon DA, Frizzell N, Rabban JT, Zakoudek C, Garg K (2015) Morphology and immunohistochemistry for 2SC and FH1 aid in detection of fumarate hydratase gene aberrations in uterine leiomyomas from young patients. *Am J Surg Pathol* 39(11):1529–1539. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000520>
  38. Miettinen M, Felisjak-Golabek A, Wasag B, Chmura M, Wang Z, Butzow R, Lasota J (2016) Fumarate-deficient uterine leiomyomas: an immunohistochemical, molecular genetic, and clinicopathologic study of 86 cases. *Am J Surg Pathol* 40(12):1661–1669. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000703>
  39. Picard S, Kavanagh KL, Yue WW, Lee WH, Muller-Knapp S, Giladi O, Sacchetti J, Oppermann U (2011) Structural basis of fumarate hydratase deficiency. *J Inher Metab Dis* 34(3):671–676. <https://doi.org/10.1007/s10545011-9294-8>
  40. Chuang GS, Martínez-Mir A, Geyer A, Engler DE, Glaser B, Cserháti-Friedman PB, Gordon D, Hovev L, Lukash B, Herman E, Cid MC, Bremner S, Landau M, Sprecher E, Garcia Muret MP, Christiano AM, Zlotogorski A (2005) Genome-wide fumarate hydratase mutations and evidence for a founder mutation underlying multiple cutaneous and uterine leiomyomas. *J Am Acad Dermatol* 52(3 Pt 1):410–416. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2004.08.051>
  41. Siegler L, Erber R, Burghaus S, Brodkorb T, Wächter D, Wilkinson N, Bolton J, Stringfellow H, Haller F, Beckmann MW, Hartmann A, Agaimy A (2018) Fumarate hydratase (FH) deficiency in uterine leiomyomas: recognition by histological features versus blind immunoscreening. *Virchows Arch* 472(5):789–796. <https://doi.org/10.1007/s00428-018-2292-6>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## Uterine cellular leiomyomas are characterized by common HMGA2 aberrations, followed by chromosome 1p deletion and *MED12* mutation: morphological, molecular, and immunohistochemical study of 52 cases

Pavel Dundr<sup>1</sup> · Mária Gregová<sup>1</sup> · Jan Hojný<sup>1</sup> · Eva Krkavcová<sup>1</sup> · Romana Michálková<sup>1</sup> · Kristýna Němejcová<sup>1</sup> · Michaela Bártů<sup>1</sup> · Nikola Hájková<sup>1</sup> · Jan Laco<sup>2</sup> · Michal Mára<sup>3</sup> · Adéla Richtárová<sup>3</sup> · Tomáš Zlma<sup>4</sup> · Ivana Stružinská<sup>1</sup>

Received: 30 July 2021 / Revised: 14 September 2021 / Accepted: 30 September 2021  
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

### Abstract

Cellular leiomyoma (CL) represents an uncommon variant of uterine leiomyoma with limited data concerning its immunohistochemical and molecular profile. We performed a comprehensive analysis of 52 CL cases all of which were analyzed immunohistochemically. Molecular analysis was possible in 32 cases with sufficient DNA, and 38 cases with sufficient RNA. The immunohistochemical results showed a high expression of smooth muscle markers (calponin (100%), desmin (100%), smooth muscle actin (98.1%), caldesmon (96.1%), transgelin (96.1%), smooth muscle myosin heavy chain (86.5%), and smoothelin (61.5%)). Concerning markers of endometrial stromal differentiation, the expression of CD10 was observed in 65.4% cases (42.2% with *H*-score > 50), and IFITM1 in 36.5% cases (1.9% with *H*-score > 50). 36.5% showed HMGA2 overexpression at the IHC level, associated with increased mRNA expression in 14/14 cases. The rearrangement of the *HMGA2* gene was detected in 13.2%. Chromosome 1p deletion was found in 19.3%, while 9.4% of tumors showed a pathogenic mutation in the *MED12* gene. In conclusion, CL is immunohistochemically characterized by a high expression of “smooth muscle” markers commonly associated with a co-expression of “endometrial stromal” markers, where IFITM1 shows superior performance compared to CD10 regarding its specificity for differentiation from endometrial stromal tumors. The sensitivity of smoothelin in CL seems rather low, but no data is available to assess its specificity. On a molecular level, the most common mutually exclusive aberration in CL affects HMGA2, followed by chromosome 1p deletions and *MED12* mutations.

**Keywords** Cellular leiomyoma · *MED12* · HMGA2 · Chromosome 1p · NGS · ddPCR

### Introduction

Cellular leiomyoma (CL) is uncommon and represents less than 5% of all uterine leiomyomas [1]. A correct diagnosis is crucial, as the differential diagnosis includes not only benign lesions such as endometrial stromal nodule (ESN), but also malignant tumors, especially low grade endometrial stromal sarcoma (LG-ESS) and leiomyosarcoma (LMS) [2–5]. The morphologic diagnostic criteria are well established, but there are cases which cannot be diagnosed with certainty based on the morphology alone and ancillary methods are needed. Currently, the molecular classification of tumors is gaining significance and the knowledge of recurrent molecular aberrations is increasingly used in the differential diagnostics of several tumors. The spectrum of aberrations occurring in usual leiomyomas, which are

✉ Pavel Dundr  
pavel.dundr@vfn.cz

<sup>1</sup> Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Studničkova 2, 12800 Prague 2, Czech Republic

<sup>2</sup> The Fingertand Department of Pathology, Faculty of Medicine in Hradec Králové, University Hospital in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

<sup>4</sup> Institute of Medical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

mostly characterized by the *MED12* mutation and less commonly by *HMGA2* overexpression, is well known [6–9]. The third molecular subtype of leiomyoma is characterized by fumarate hydratase (FH) deficiency, which is typical for FH-deficient leiomyoma and a subset of leiomyoma with bizarre nuclei (LBN), but is absent or very rare in usual leiomyoma (UL) [10–12]. However, the knowledge of molecular findings occurring in CL is limited. In our study, we focused on molecular aberrations occurring in CL with respect to the three molecular leiomyoma subtypes, their mutual exclusivity, the occurrence of cases with chromosome 1p deletion, and the assessment of other molecular changes with a possible recurrent pattern. Moreover, we performed a complex immunohistochemical analysis using a broad panel of antibodies potentially useful for differential diagnosis between CL and endometrial stromal tumors (EST), including some less commonly used antibodies (transgelin, IFITM1) and antibodies whose expression has not yet been analyzed in CL (smoothelin). We also analyzed the expression of other antibodies with possible diagnostic meaning whose expression has not yet been analyzed in CL (BCOR, NTRK, ALK, HMB45) or has been analyzed in only a limited number of cases (CD117, CD44). Finally, our IHC findings were compared with the available literary data.

## Materials and methods

The archive files of our department were searched for cases diagnosed as CL. All cases were reviewed independently by two pathologists (PD and KN) and only the 52 consensual cases meeting the strict diagnostic criteria of CL were included in the study. The main diagnostic criterium for differentiation between usual and cellular leiomyoma represented a substantially increased cellularity compared to the surrounding myometrium (if present). If the myometrium was absent (myomectomy or morcellated specimens), only cases in which the subjective impression of hypercellularity was supported by other features typical of CL, such as thick-walled vessels and the presence of clefts, were included in the study. Microscopic features assessed in each tumor selected for the study included: nuclear atypia, mitotic figures (per 10 HPF equal to  $2.4 \text{ mm}^2$ ), margins (sharp; irregular—undulating uneven margins with possible intersecting fascicles of myometrial smooth muscle; infiltrative—tongue-like infiltrative appearance with a dissection of myometrial smooth muscle), hyalinization (absent; present; rare), hyaline plaques—plaque-like areas usually occurring in endometrial stromal tumors (absent; present; rare), neural-like areas (absent; present; rare), satellite nodules (absent; present), cleft-like spaces (absent; present; rare); and large vessels with a thick muscular wall (absent; present; rare).

 Springer

## Immunohistochemical analysis

The immunohistochemical (IHC) analysis was performed using 4  $\mu\text{m}$  thick sections of formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue using tissue microarrays (TMAs). The eligible areas of tumor were identified and two tissue cores (each 2.0 mm in diameter) were drilled from the donor block using the tissue microarray instrument TMA Master (3DHISTECH Ltd., Budapest, Hungary). The only exception was the expression of smoothelin, which was assessed on whole tissue sections due to its limited and commonly weak expression. The expression of the following antibodies was examined in each tumor: transgelin, smoothelin, smooth muscle actin (SMA), IFITM1, fumarate hydratase (FH), CD10, desmin, caldesmon, BCOR, CD44, calponin, smooth muscle myosin heavy chain (SMMHC), pan-TRK, ALK, CD117, and HMB45. The clones, manufacturers, dilution, and staining instruments for all antibodies are summarized in Table 1. The immunohistochemical results were assessed according to the overall percentage of positive cells (0–100%) and then also semi-quantitatively, using the H-score. This method is based on the assessment of the percentage of positive cells based on the level of staining intensity (1+ for weak intensity, 2+ for moderate, and 3+ for strong intensity). The final H-score for each case is then calculated by adding the multiplication of the different staining intensities according to the following formula:  $1x$  (% of cells 1+) +  $2x$  (% of cells 2+) +  $3x$  (% of cells 3+), resulting in an H-score value of 0–300. For the comparison of our results with literature data, cases were classified based only on the extent (not intensity) of expression as negative (0%), positive (any positivity), and 3+ positive ( $\geq 50\%$ ). The literary data concerning the extent of *HMGA2* expression necessary to be classified as an “overexpression” is not well defined. In our study, we used the same criteria as Bertsch et al., and moderate to strong expression in  $\geq 50\%$  of tumor cells was classified as “overexpression” [13].

## Molecular analysis

Capture NGS analysis of DNA and RNA was performed for all qualitatively sufficient cases: 32/52 (61.5%) DNA and 38/52 (73.1%) RNA.

Genomic DNA and RNA were isolated by the DNA/RNA FFPE isolation kit (ZymoResearch) according to the manufacturer’s protocol. DNA quality control was performed by qPCR assay, as described previously [14]. The isolated total RNA samples were characterized by Fragment Analyser capillary electrophoresis system (AATI) using Standard RNA kit (AATI), resulting in an RNA

**Table 1** List of immunohistochemical antibodies

Antibody	Clone	Dilution	Producer	Platform	Detection
Transgelin	2A10C2	1:300	Cell Marque, Rocklin, CA, USA	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland)	OptiView
Smoothelin	R4A	1:50	Zeta Corporation, Sierra Madre, CA, USA	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland)	OptiView
SMA	1A4	1:800	Dako, Glostrup, Denmark	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	EnVision FLEX (Agilent)
IFTM1	polyclonal	1:300	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland)	OptiView
FH	polyclonal	1:500	Abcam, Cambridge, United Kingdom	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	EnVision FLEX (Agilent)
CD10	56C6	1:50	Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland)	OptiView
Desmin	D33	1:200	Dako, Glostrup, Denmark	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland)	OptiView
Caldesmon	h-CD	1:50	Novocastra, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	EnVision FLEX (Agilent)
BCOR	C-10	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland)	OptiView
CD44	DF1485	1:100	Dako, Glostrup, Denmark	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	EnVision FLEX (Agilent)
Calponin	CALP	1:400	Dako, Glostrup, Denmark	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	EnVision FLEX (Agilent)
SMMHC	SMMS1	1:50	Dako, Glostrup, Denmark	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	EnVision FLEX (Agilent)
Pan-TRK	EPR17341	1:250	Abcam, Cambridge, United Kingdom	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland)	OptiView
ALK	D5F3	1:100	Cell Signalling, Danvers, MA, USA	Ventana BenchMark ULTRA (Roche, Basel, Switzerland)	OptiView
CD117	polyclonal	1:400	Dako, Glostrup, Denmark	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	EnVision FLEX (Agilent)
HMB45	HMB45	1:100	Dako, Glostrup, Denmark	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	EnVision FLEX (Agilent)
HMGA2	D1A7	1:400	Cell Signalling, Danvers, MA, USA	PT-link (Agilent, Santa Clara, CA, USA)	EnVision FLEX (Agilent)

SMA smooth muscle actin, FH fumarate hydratase, SMMHC smooth muscle myosin heavy chain

Quality Number (RQN; median 3.3; range 1.1–10). Amplification capability was assessed by qPCR assay as a part of the FusionPlex protocol (ArcherDX).

Targeted NGS DNA analysis, biostatistical evaluation, and the interpretation of data was performed as described previously with minor changes [14]. The samples were processed using KAPA HyperPlus Kit (Roche) according to the KAPA HyperCapture protocol (Roche) and custom hybridization probes (944 kbp of target sequence, including 765 kbp of coding regions of 300 genes; Supplementary Table 1; KAPA HyperChoice; Roche). The RNA samples were processed by amplicon RNA NGS using Archer FusionPlex Sarcoma Expanded Kit (ArcherDX) according to the manufacturer's protocol. Five samples with undetermined HMGA2 fusion or detected low read count fusion were reanalyzed by targeted capture RNA-Seq approach

using KAPA RNA HyperPrep Kit (Roche) with a panel of hybridization probes (373 kbp of target sequence; 147 genes; Supplementary Table 2, KAPA HyperChoice; Roche). The prepared libraries were sequenced by the NextSeq instrument (Illumina) using the NextSeq500/550 High Output Kit v2.5 (300 Cycles) according to the manufacturer's protocol.

Copy number variation (CNV) was evaluated using an algorithm in the NextGENe CNV Tool (Softgenetics). The variants (including 1q, *MED12*, and *FH* deletions) were evaluated in all cases. Precise CNV data analysis of the entire sequenced region was limited in several low-quality samples (complete CNV analyses were possible in 21 cases).

Fusions were evaluated from amplicon RNA NGS data using Archer Analysis software v5.1.7 (ArcherDX). Low-read fusions or undetermined HMGA2 fusions were further inspected based on the capture RNA-Seq data in the

CLC Genomics Workbench and compared to the Archer FusionPlex results. Low-read fusions were considered only when detected by both the amplicon and capture RNA NGS approach.

Detailed pipelines of all NGS data analysis together with module settings are available upon request.

### Droplet digital PCR (ddPCR) expression analysis of HMGA2 mRNA

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 µg of total RNA as described previously [15]. The expression analysis was performed using the QX200 ddPCR system (Bio-Rad), quantification kits for probes (Bio-Rad), and custom FAM/HEX quencher probes. The amplicon in the *POLR2A* gene (located in the exon 27 and 28) was used as a reference and the amplicon in *HMGA2* (located in the exon 1 and 2) was used as a target (Supplementary Table 3). The reactions were prepared in multiplex PCR reactions using the ddPCR Supermix for Probes (No dUTP; Bio-Rad), 10 µl of cDNA template (approx. 500 ng of total RNA; where available) and 5 pmol of each of the two primers and two probes (250 nM final concentration) in a 20 µl reaction volume. Droplets were generated in the QX200 AutoDG instrument (Bio-Rad) and amplified according to the manufacturer's protocol. The resulting data was acquired by the QX200 Droplet Reader instrument (Bio-Rad) and analyzed by QuantaSoft (Bio-Rad).

Samples with > 10 reference *POLR2A* templates per 1 µl of cDNA were further evaluated (the ddPCR expression analysis of *HMGA2* mRNA was possible in 40/52 cases.). Given that the median of expression of *POLR2A* in a healthy uterus is 144.4 TPM (Transcripts per million) and expression of *HMGA2* is 0.02 TPM (according to GTEx Portal Database), we considered a high *HMGA2* expression to be  $\geq 0.25$  of *POLR2A* [16].

## Results

Fifty-two cases were included in the study; 50 originated from our routine in-house files and 2 cases were sourced from our consultation files. Both consultation cases were sent for a second opinion with a differential diagnosis of CL and EST. From the in-house cases, only 2/50 (4%) were diagnostically challenging and the differential diagnosis of CL and EST was mentioned in the original biopsy report. In 15/50 cases (30%), immunohistochemistry was used during the routine pathological assessment to confirm the leiomyocellular differentiation of the lesion. The basic clinico-pathological data for all patients in the study (age, type of specimen, size, or weight of the tumor) are summarized in Table 2. Microscopic findings together with IHC and

**Table 2** Basic clinico-pathological data

Clinical and gross features (number of cases)		
Age (52); years	Range	22–74
	Mean	43.2
	Median	42.5
Surgical procedure (51)	HE	25
	Myomectomy	3
	Morcellation	23
	Diameter (23); millimeters; HE specimens	Range
	Mean	39.6
	Median	40
Weight (19); grams; myomectomy and morcellation specimens	Range	23–279
	Mean	104.8
	Median	76

HE hysterectomy

molecular findings are descriptively summarized in Fig. 1. The tumors commonly showed irregular margins (19/29), but in most cases, these changes were only focal. Infiltrative margins resembling the type of growth occurring in LG-ESS were found rarely and focally (2/29 cases). Representative microscopic findings are shown in Fig. 2.

### Immunohistochemical findings

Immunohistochemical results are summarized in Fig. 1 and Table 3. Briefly, from the “smooth muscle markers,” positivity of calponin and desmin was seen in 52/52 cases (100%), SMA in 51/52 cases (98.1%), caldesmon and transgelin in 50/52 cases (96.1%), SMMHC in 45/52 cases (86.5%), and smoothelin in 32/52 cases (61.5%) (Fig. 3). BCOR, CD117, and S100 protein were negative in all cases. The assessment of smoothelin was complicated by the commonly weak staining intensity, as a strong intensity of staining was present in only 10/52 cases. The markers of “endometrial stromal differentiation” showed the expression of CD10 in 34/52 cases (65.4%) and IFITM1 in 19/52 cases (36.5%) (Fig. 3). The *H*-score  $\geq 50$  for CD10 was recorded in 23/52 cases (44.2%) and for IFITM1 in 1/52 cases (1.9%). When only the extent of staining is taken into consideration, the expression of CD10 was present in > 50% of tumor cells in 5/52 cases (9.6%) and expression of IFITM1 in 1/52 cases (1.9%).

CD44 expression was detected in 8/52 cases (15.4%) and HMB45 in 2/52 cases (3.8%). From antibodies not listed in Table 3, the expression of *HMGA2* was observed in 23/52 cases (44.2%), but only in 19/52 of cases (36.5%) was the expression classified as overexpression ( $\geq 50\%$  tumor cells) (Fig. 3). All 52/52 cases (100%) showed a retained expression of FH. NTRK expression was seen in 5 cases (3 nuclear,

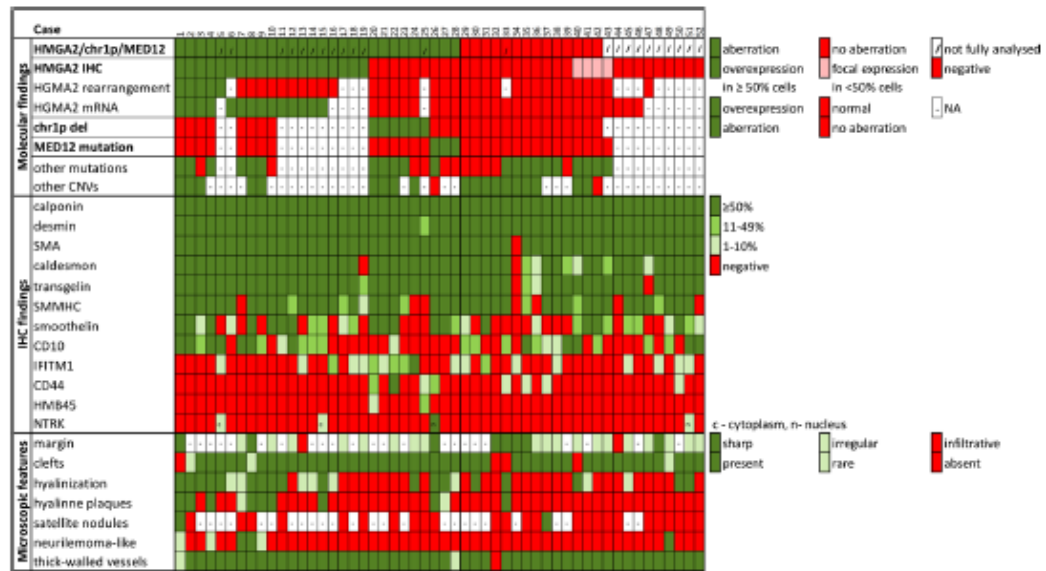


Fig. 1 Summary of the molecular, immunohistochemical, and microscopic features

2 cytoplasmic), but no case with *NTRK* rearrangement was found. *ALK* was negative in all cases.

We compared our results with the available literary data concerning the expression of selected markers in CL and low grade endometrial stromal sarcoma, mostly based on our previous review focusing on the immunohistochemical findings in mesenchymal tumors of the uterus [3, 17–28]. The results are summarized in Table 3. Data for some antibodies were not available in the literature.

### Molecular genetic findings

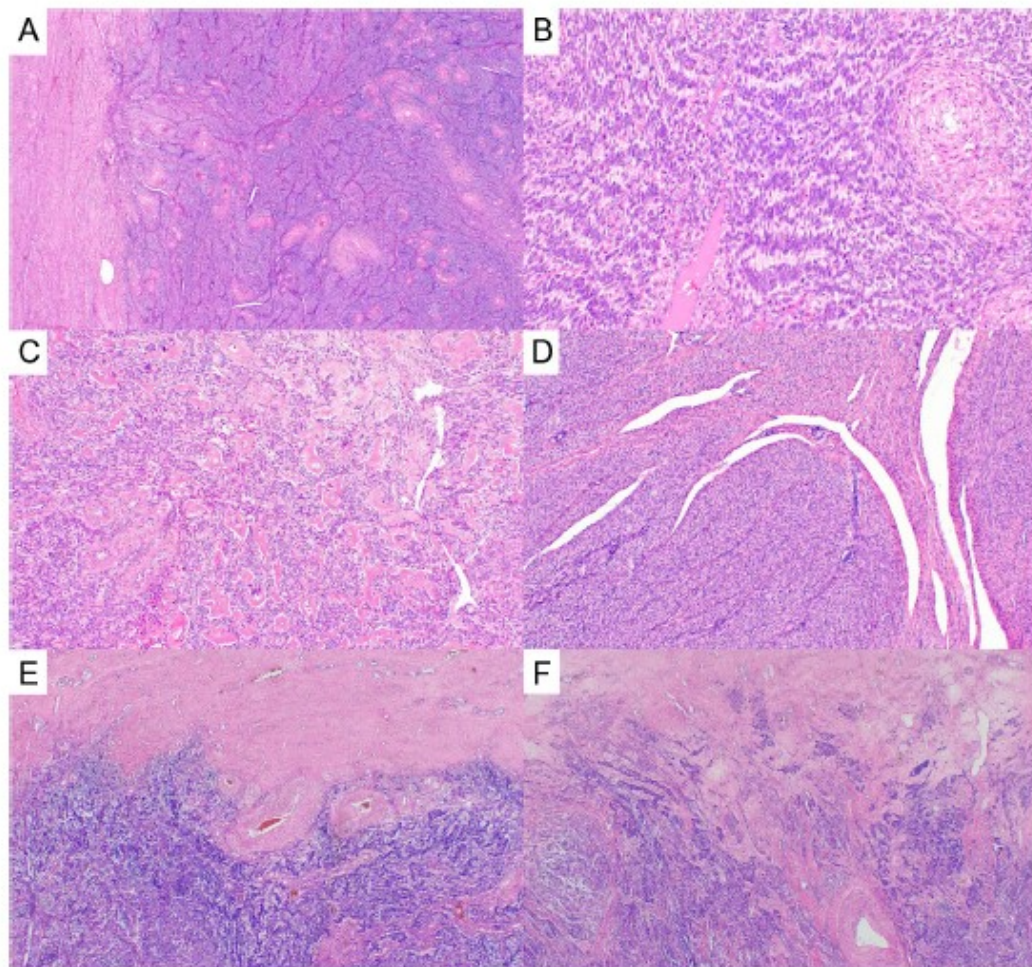
The NGS outputs (32 DNA and 38 RNA) are summarized in Fig. 1. In total, 3/32 cases (9.4%) harbored mutations in the *MED12* gene and 6/31 cases (19.3%) had a heterozygous deletion of chromosome 1p. The RNA-seq revealed rearrangement of the *HMGA2* gene in 5/38 (13.2%) cases (all showing IHC overexpression of *HMGA2*). Fusion partners were identified on mRNA level in three cases: (i) *HMGA2* (exon 3)—*C9orf92* (exon 4); (ii) *HMGA2* (exon 5)—*PBX1* (exon 3); and (iii) *RAD51B* (exon 8)—*HMGA2* (exon 2). In the remaining 2 cases, no fusion partner gene was detected. In these cases, the rearrangements were within the non-coding areas of chromosome 5 (chr5 34,437,681–34,437,906) and 6 (chr6 169,376,151–169,376,269), both connected to *HMGA2* exon 4 on the RNA level. A high expression of *HMGA2* mRNA was detected by ddPCR in 14/40 (35%) cases, in all of which it was associated with *HMGA2*

overexpression on the IHC level. In the 29/52 cases which were suitable for complete immunohistochemical and DNA/RNA NGS analyses of all the markers (*MED12* mutation, *HMGA2* overexpression, *HMGA2* rearrangement, *FH* expression and mutation, and chromosome 1p deletion), all the aberrations were mutually exclusive.

In addition to the “driver” aberrations (mutually exclusive *MED12* mutation, deletion of chr1p, or *HMGA2* overexpression) other mutations and/or copy number alterations were detected in a wide spectrum of genes and were mostly co-occurring (Supplementary Table 4 and 5). However, none of those aberrations had a recurrent pattern. Pathogenic mutations in the *FH* gene were not detected. Only two cases showed a variant of uncertain significance (class 3) and in one case a heterozygous deletion of the *FH* locus (all cases with retained *FH* expression on IHC level).

### Discussion

CL are defined as leiomyocellular tumors having a “significantly” greater cellularity compared to the adjacent myometrium, the microscopic features of which have already been well described in the literature [1, 4, 29–31]. The differential diagnosis of CL includes especially leiomyosarcoma (LMS) and EST. CL compared to LMS lacks significant nuclear atypia, substantial mitotic activity, and tumor-type necrosis. Based on this, the differential diagnosis between



**Fig. 2** Cellular leiomyomas. **A** Lesion with substantially increased cellularity, numerous thick-walled vessels, and sporadic “clefts” (case no. 36, HE,  $\times 40$ ). **B** Neurilemma-like areas with palisading of the nuclei (case no. 7, HE,  $\times 200$ ). **C** Multiple hyaline plaques (case no. 2,

**HE,  $\times 200$ ). **D** Areas with vessels forming the so-called “clefts” (case no. 28, HE,  $\times 100$ ). Some lesions showed irregular (**E**) and/or infiltrative margins (**F**) (HE,  $\times 40$ )**

CL and LMS is usually straightforward. However, the differential diagnosis between CL and EST is more complicated, especially in cases of the so-called highly cellular leiomyomas [1, 4, 5]. EST consists mostly of oval cells, and the fascicles of spindle cells are usually absent. Similarly to CL, the tumor cells have regular nuclei and a high nuclear-cytoplasmic ratio. However, the mitotic activity may be high, even in benign ESN. The characteristic feature of EST is the presence of small arterioles surrounded by whirls of tumor cells. Large thick-walled vessels and clefts are usually

absent. The small arterioles typical for EST may be present also in CL, but tumor cells whorls surrounding these arterioles are absent. Increased perivascular cellularity due to the proliferation of pericytes may be confused with tumor cells whirling. Since ESN represents a benign entity, the most important differential diagnosis is between CL and LG-ESS. In this context, we should be aware that despite the relation to the surrounding myometrium being a defining feature for the discrimination between ESN and LG-ESS, this is not necessarily helpful in the distinction between CL and

**Table 3** Comparison of immunohistochemical findings in our CL cases with literary data (CL, LG-ESS)

	CL (our cases)	1+positive/all (%)	2+positive/all (%)	3+positive/all (%)	CL (literary data)		LG-ESS (literary data)		
	Positive/all (%)	HS < 50	HS 50–149	HS ≥ 150	> 50%; positive/all (%)	Positive/all (%)	> 50%; positive/all (%)	Positive/all (%)	> 50%; positive/all (%)
Calponin	52/52 (100)	0/52 (0)	2/52 (3.8)	50/52 (96.1)	51/52 (98.1)	99 (100)	99 (100)	17/41 (41.5)	1/41 (2.4)
Caldesmon	50/52 (96.1)	4/52 (7.7)	7/52 (13.5)	39/52 (75)	43/52 (82.7)	74/79 (93.7)	17/34 (50)	20/158 (12.7)	4/90 (4.4)
Desmin	52/52 (100)	0/52 (0)	10/52 (19.2)	42/52 (80.8)	50/52 (96.1)	77/78 (98.7)	61/68 (89.7)	100/241 (41.5)	15/180 (8.3)
SMA	51/52 (98.1)	0/52 (0)	0/52 (0)	51/52 (98.1)	51/52 (98.1)	57/58 (98.3)	57/58 (98.3)	108/215 (50.2)	33/143 (23.1)
SMMHC	45/52 (86.5)	7/52 (13.5)	34/52 (65.4)	4/52 (7.7)	34/52 (65.4)	NA	NA	3/10 (30)	0/10 (0)
Smoothelin	32/52 (61.5)	16/52 (30.8)	13/52 (25)	3/52 (5.8)	16/52 (30.8)	NA	NA	NA	NA
Transgelin	50/52 (96.1)	4/52 (7.7)	9/52 (17.3)	37/52 (71.1)	46/52 (88.5)	NA	NA	0/7 (0)	0/7 (0)
CD10	34/52 (65.4)	11/52 (21.1)	11/52 (21.1)	12/52 (23.1)	5/52 (9.6)	25/67 (37.3)	1/58 (1.7)	351/405 (86.7)	157/285 (55.1)
IFITM1	19/52 (36.5)	14/52 (26.9)	1/52 (1.9)	0/52 (0)	1/52 (1.9)	7/16 (43.8)	0/16 (0)	26/28 (92.9)	16/28 (57.1)
BCOR	0/52 (0)	0	0	0	0	NA	NA	4/67 (6)	0/67 (0)
CD44	8/52 (15.4)	7/52 (13.5)	1/52 (1.9)	0/52 (0)	1/52 (1.9)	25/25 (100)	NA	3/29 (10.3)	0/20 (0)
HMB45	2/52 (3.8)	1/52 (1.9)	1/52 (1.9)	0/52 (0)	0/52 (0)	NA	NA	6/102 (5.9)	5/101 (4.9)
CD117	0/52 (0)	0	0	0	0	0/9 (0)	0/9 (0)	14/104 (13.5)	2/75 (2.7)

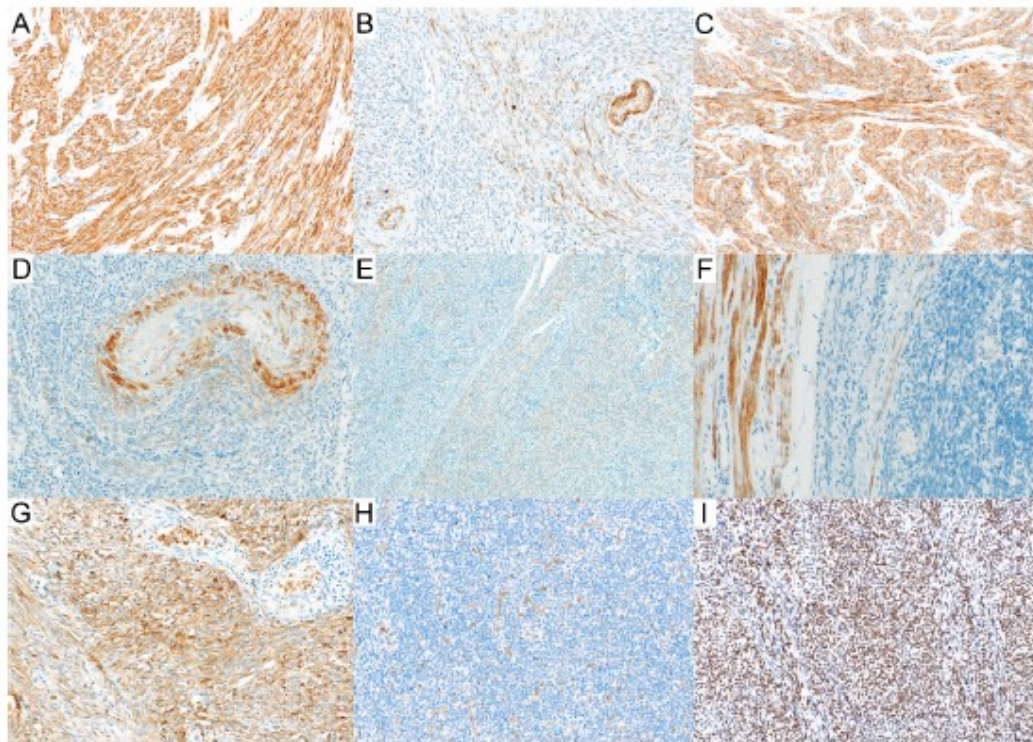
CL cellular leiomyoma, LG-ESS low grade endometrial stromal sarcoma, HS H-score, NA not available, SMA smooth muscle actin; SMMHC smooth muscle myosin heavy chain

LG-ESS [32, 33]. The reason being that CL may commonly manifest irregular tumor borders with undulating margins and can even show infiltrative features. We should also be aware of the possibility of satellite small CL in the vicinity of the main tumor, which can give the impression of infiltrative invasion, mimicking the tongue-like myometrial infiltration of LG-ESS. In summary, because in some CL cases morphology alone is not sufficient to achieve diagnosis, especially in cases of the so-called highly CL, ancillary methods are needed [1]. These methods include immunohistochemical analysis and molecular testing. However, these diagnostically challenging cases are rare (in our study, they represented only 4% of the in-house cases) and in most cases of CL the diagnosis is straightforward, without the need for using ancillary methods.

The most commonly used antibodies in this context are CD10, h-caldesmon, desmin, smooth muscle actin, and recently IFITM1 [3, 22, 23, 34]. Previously, CD10 expression was regarded as a relatively specific marker of endometrial stromal differentiation, but current knowledge is that CD10 expression is relatively common in leiomyocellular tumors. In LG-ESS, CD10 expression is present in about 87% of cases, but can also occur in CL and has been described in 37.3% of CL (according to 6 studies analyzing the total of 67 CL cases) [17, 18]. The extent and intensity of CD10 expression may be an important feature because

in LG-ESS significant positivity (which is quantified differently in individual studies) occurs in c. 55% of cases, while in CL the expression is usually only focal and significant expression has been seen in 1.7% of cases (according to the limited literature data). However, in our study, the expression of CD10 was present in 65.4% of CL and significant in 23.1% of all cases (in 9.6% of cases present in ≥ 50% of tumor cells). With respect to other markers—according to literature data desmin is expressed in about 40% of LG-ESS and 98% of CL, muscle-specific actin in 20% of LG-ESS and 100% of CL, SMA in 50% of LG-ESS and 98% of CL, and caldesmon in 13% of LG-ESS and 94% of CL. Literary data suggests that the IFITM1 antibody has a significantly higher specificity than CD10 while maintaining high sensitivity (93%) for LG-ESS. However, according to the only study focusing on IFITM1 expression in CL, the expression was present in 7/16 cases (43.7%), but never strong. The results of this study were confirmed by our work, in which the expression of IFITM1 was found in 19/52 cases (36.5%), but in only one case was the expression present in more than 50% of tumor cells. In summary, immunohistochemistry is an essential part of the differential diagnosis between CL and EST, but a panel of antibodies should be used, and we should be aware of the limitations due to the overlapping immunohistochemical profile in some cases. Our data suggests that out of the “endometrial stromal markers” IFITM1





**Fig. 3** Immunohistochemical findings in cellular leiomyomas. **A** Tumor cells showing diffuse and strong positivity for transgelin (case no. 26,  $\times 200$ ). **B** Another example with focal and weak positivity for transgelin (case no. 35,  $\times 200$ ). **C** Diffuse and strong expression of smoothelin (case no. 1,  $\times 200$ ). **D** Focal weak positivity of smoothelin (note the strong expression in smooth muscle cells of the vessel wall) (case no. 3,  $\times 200$ ). **E** Weak expression of smoothelin in some

tumor cells (case no. 18,  $\times 100$ ). **F** Negative staining of smoothelin in tumor cells (note the positivity in the adjacent myometrium) (case no. 7,  $\times 200$ ). **G** Diffuse and strong expression of CD10 (case no. 35,  $\times 200$ ). **H** Negativity of IFTTM1 (note the positivity in endothelial cells) (case no. 40,  $\times 200$ ). **I** Diffuse and strong expression of HMGA2 (case no. 14,  $\times 200$ )

clearly outperforms CD10, especially if we consider not only the presence of positivity but also the intensity and extent of the staining.

In some CL, the correct diagnosis cannot be achieved with certainty and molecular testing can be helpful. However, knowledge of molecular aberrations occurring in CL is, contrary to UL, limited. UL have been shown to share recurrent molecular aberrations and can be classified into three molecular subtypes including tumors with *MED12* mutation, *HMGA2* overexpression, and *FH* deficiency [6, 8]. The *MED12* mutations occur in approximately 40–75% of UL cases and according to literary data their frequency differs based on ethnicity/nationality [6]. On the contrary, in CL the mutation of *MED12* is present in approximately 5–16% of cases [35–37]. Only one study reported a higher percentage of 33% of CL showing *MED12* mutations, but

as only 6 cases of CL were analyzed in this study, it is not statistically significant [38]. In our study, *MED12* mutations were present in 9.4% of cases. *HMGA2* overexpression occurs in 10–25% of UL cases [13, 36, 37]. Some of these are associated with *HMGA2* intergenic rearrangement, but in most studies, the overexpression and rearrangements of *HMGA2* were not analyzed simultaneously and the percentage of cases with overexpression showing *HMGA2* rearrangement is not entirely clear [9, 38–42]. The knowledge concerning *HMGA2* aberrations in CL is very limited. In one study, overexpression of *HMGA2* was seen in 32% of CL (8/25 cases) [36]. The “highly” CL in this study showed overexpression of *HMGA2* in 10.8% (4/37 cases). In another study of 6 CL cases, no case with *HMGA2* overexpression was found [37]. In another recent study, the authors performed RNA sequencing of 11 CL cases and identified three

cases with fusions, including *HMGA2-TRAF3IP2*, *HMGA2-NAA11*, and *TPCN2-YAP1* [27]. In our work, *HMGA2* overexpression ( $\geq 50\%$  of tumor cells) was present in 18/52 cases (34.6%). The *HMGA2* rearrangement was found in 5/38 cases (13.2%), all of which showed strong IHC expression of *HMGA2* in 100% of tumor cells. Other mechanisms of *HMGA2* overexpression in leiomyomas without *HMGA2* intergenic rearrangement have also been suggested. Rearrangements in flanking areas of the *HMGA2* gene, which are usually not detected by standard methods, could potentially lead to *HMGA2* overexpression, as well as *HMGA2* promoter DNA hypomethylation [40, 43]. Another recurrent aberration detected in uterine leiomyomas is FH deficiency [44]. Inactivation of FH occurs mostly in leiomyoma variants such as LBN and FH-deficient leiomyoma [10, 11, 45]. In UL, FH deficiency is very rare, occurring in 0–2.5% of cases [36, 37, 46]. In CL the data is limited. In one study, FH-deficiency occurred in 1/25 of CL cases (4%) [36]. In our study, no pathogenic mutations or homozygous deletions were found, and all cases showed retained expression of FH. Finally, another recurrent aberration detected in CL is the loss of the short arm (p) of chromosome 1, which can be found in up to 25% of cases (in our work it was 19.3%) [47, 48]. According to some authors, these tumors seem to represent a distinct entity with potentially more aggressive behavior [48].

According to the literature, the aberrations occurring in the leiomyoma molecular subtypes seem to be mutually exclusive [9, 13]. Our results are in concordance with this data on both the molecular and immunohistochemical levels. We have confirmed that the deletion of chromosome 1p is mutually exclusive with the other molecular subtypes as well. However, in one study the overexpression of *HMGA2* on mRNA level has also been described in a leiomyoma with *MED12* mutations [49]. In our work, the mRNA expression was high only in cases with overexpression detected by IHC. The molecular findings in CL may be useful in practice in the differential diagnosis with EST. Knowledge of molecular aberrations occurring in endometrial stromal tumors is rapidly evolving and a substantial part of these tumors is characterized by known aberrations, mostly chromosomal rearrangements of genes involving *JAZF1*, *EPC1*, *CXorf67*, and *BCOR* (such as *JAZF1-JAZ1*, *EPC1-PHF1*, *PHF1-MEAF6*, *MBTD1-CXorf67*, and *ZC3H7B-BCOR* [50–61].

In conclusion, the results of our study showed that on a molecular level CL represents a heterogeneous group of lesions. The most common abnormality occurring in CL seems to be affecting *HMGA2*, as a high percentage of cases showed an overexpression on the IHC level (36.5%). Where molecular analysis was possible, 50% of these cases were associated with *HMGA2* rearrangements. The second most common aberration was chromosome

1p deletion, present in 19.3% of cases. A minority of CL cases may have *MED12* mutations (9.4%), which are far less common in CL than in UL. The FH-deficient subtype of leiomyoma seems to be very rare in CL, and in our study, we have not detected any such case. All molecular aberrations including chromosome 1p deletions were mutually exclusive, which suggests that CL leiomyoma with chromosome 1p deletions represents a distinct molecular subtype. Even though we have detected 8 other gene mutations and deletions and/or duplications of several genes, we have not identified any other molecular aberration with a recurrent pattern and there remains a substantial number of CL cases which do not fit any of the defined molecular subtypes. From a practical point of view, the molecular aberrations occurring in CL may be used as an ancillary marker in the differential diagnosis of equivocal cases with overlapping features with EST, which are characterized by different recurrent molecular aberrations. Regarding immunohistochemical analysis, we should be aware that in a high percentage of cases CL can express markers traditionally regarded as more specific for endometrial stromal differentiation, such as CD10 and IFITM1. In our study, we also analyzed the expression of smoothelin, which is regarded as highly specific for differentiated smooth muscle cells but its expression has not yet been studied in smooth muscle uterine tumors. The results showed the expression of smoothelin in 61.5% of cases, but the intensity of staining was commonly weak, which seems to be a limiting factor for its practical use. Nevertheless, the literary data concerning its expression in EST is missing and further research is needed to assess its practical use in the differential diagnosis of equivocal cases.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03217-z>.

**Acknowledgements** This work was supported by the Ministry of Health, Czech Republic (MH CZ DRO-VFN 64165 and AZV NU22-03-00122), by Charles University (Project Progress Q28/LF1 and UNCE204065), and by the European Regional Development Fund (CZ.02.1.01/0.0/0.0/18\_046/001/5959; BMMR.L.CZ.LM2018125).

The authors wish to thank Zachary Harold Kane Kendall, B.A. (Institute for History of Medicine and Foreign Languages, First Faculty of Medicine, Charles University) for the English proofreading.

**Author contribution** All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Pavel Dundr, Mária Gregová, Jan Hojny, Eva Krkavcová, Romana Micháľková, Kristýna Němejcová, Michaela Bártů, Nikola Hájková, Jan Laco, Michal Mára, Adéla Richtárová, Tomáš Zima and Ivana Stružinská. The first draft of the manuscript was written by Pavel Dundr and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Data availability** All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

## Declarations

**Ethical approval** The study has been approved by the Ethics Committee of General University Hospital in Prague in compliance with the Helsinki Declaration (ethical approval number EK RVO 210/19 S-IV). The Ethics Committee waived the requirement for informed consent, as according to the Czech Law (Act. no. 373/11, and its amendment Act no. 202/17) it is not necessary to obtain informed consent in fully anonymized studies.

**Conflict of interest** The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

## References

- Oliva E et al (1995) Cellular benign mesenchymal tumors of the uterus. A comparative morphologic and immunohistochemical analysis of 33 highly cellular leiomyomas and six endometrial stromal nodules, two frequently confused tumors. *Am J Surg Pathol* 19(7):757–68
- Roy S, Saroha V, Jain D (2010) Highly cellular leiomyoma mimics a malignant small round-cell tumor: a diagnostic dilemma on frozen sections. *Taiwan J Obstet Gynecol* 49(2):203–205
- Agoff SN et al (2001) Immunohistochemical distinction of endometrial stromal sarcoma and cellular leiomyoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 9(2):164–169
- Oliva E (2014) Cellular mesenchymal tumors of the uterus: a review emphasizing recent observations. *Int J Gynecol Pathol* 33(4):374–384
- Pujani M et al (2015) Cellular leiomyoma versus endometrial stromal tumor: a pathologists' dilemma. *J Midlife Health* 6(1):31–34
- Mehine M et al (2014) Genomics of uterine leiomyomas: insights from high-throughput sequencing. *Fertil Steril* 102(3):621–629
- Mehine M et al (2016) Integrated data analysis reveals uterine leiomyoma subtypes with distinct driver pathways and biomarkers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(5):1315–1320
- Mehine, M., et al., 3RNA Sequencing accurately classifies formalin-fixed paraffin-embedded uterine leiomyomas. *Cancers (Basel)*, 2020. 12(12).
- Markowski DN et al (2012) MED12 mutations in uterine fibroids—their relationship to cytogenetic subgroups. *Int J Cancer* 131(7):1528–1536
- Gregova M et al (2020) Leiomyoma with bizarre nuclei: a study of 108 cases focusing on clinicopathological features, morphology, and fumarate hydratase alterations. *Pathol Oncol Res* 26(3):1527–1537
- Reyes C et al (2014) Uterine smooth muscle tumors with features suggesting fumarate hydratase aberration: detailed morphologic analysis and correlation with S-(2-succino)-cysteine immunohistochemistry. *Mod Pathol* 27(7):1020–1027
- Zhang, Q., et al., Fumarate hydratase mutations and alterations in leiomyoma with bizarre nuclei. *Int J Gynecol Pathol*, 2017.
- Bertsch E et al (2014) MED12 and HMGA2 mutations: two independent genetic events in uterine leiomyoma and leiomyosarcoma. *Mod Pathol* 27(8):1144–1153
- Ticha I et al (2019) A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Sci Rep* 9(1):17050
- Hojny J et al (2020) Identification of novel HNF1B mRNA splicing variants and their qualitative and semi-quantitative profile in selected healthy and tumour tissues. *Sci Rep* 10(1):6958
- Carithers LJ et al (2015) A Novel Approach to High-Quality Postmortem Tissue Procurement: The GTEx Project. *Biopreserv Biobank* 13(5):311–319
- Chu PG et al (2001) Utility of CD10 in distinguishing between endometrial stromal sarcoma and uterine smooth muscle tumors: an immunohistochemical comparison of 34 cases. *Mod Pathol* 14(5):465–471
- McCluggage WG, Sumathi VP, Maxwell P (2001) CD10 is a sensitive and diagnostically useful immunohistochemical marker of normal endometrial stroma and of endometrial stromal neoplasms. *Histopathology* 39(3):273–278
- Nucci MR et al (2001) h-Caldesmon expression effectively distinguishes endometrial stromal tumors from uterine smooth muscle tumors. *Am J Surg Pathol* 25(4):455–463
- Oliva E et al (2002) An immunohistochemical analysis of endometrial stromal and smooth muscle tumors of the uterus: a study of 54 cases emphasizing the importance of using a panel because of overlap in immunoreactivity for individual antibodies. *Am J Surg Pathol* 26(4):403–412
- Parra-Herran CE et al (2014) Targeted development of specific biomarkers of endometrial stromal cell differentiation using bioinformatics: the IFTM1 model. *Mod Pathol* 27(4):569–579
- Rush DS et al (2001) h-Caldesmon, a novel smooth muscle-specific antibody, distinguishes between cellular leiomyoma and endometrial stromal sarcoma. *Am J Surg Pathol* 25(2):253–258
- Zhu XQ et al (2004) Immunohistochemical markers in differential diagnosis of endometrial stromal sarcoma and cellular leiomyoma. *Gynecol Oncol* 92(1):71–79
- Allen MM et al (2015) An immunohistochemical analysis of stathmin 1 expression in uterine smooth muscle tumors: differential expression in leiomyosarcomas and leiomyomas. *Int J Clin Exp Pathol* 8(3):2795–2801
- Zhai YL et al (1999) Expression of steroid receptors, Ki-67, and p53 in uterine leiomyosarcomas. *Int J Gynecol Pathol* 18(1):20–28
- Zhang Q et al (2018) The selected biomarker analysis in 5 types of uterine smooth muscle tumors. *Hum Pathol* 76:17–27
- Hodgson, A., et al., Gene fusions characterize a subset of uterine cellular leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer*, 2020.
- Dundr P et al (2021) The value of immunohistochemical methods in diagnosing mesenchymal tumours of the uterus. *Cesk Patol* 57(2):86–95
- Rothmund R et al (2013) Clinical and pathological characteristics, pathological reevaluation and recurrence patterns of cellular leiomyomas: a retrospective study in 76 patients. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 171(2):358–361
- Gisser SD, Young I (1977) Neurilemma-like uterine myomas: an ultrastructural reaffirmation of their non-Schwannian nature. *Am J Obstet Gynecol* 129(4):389–392
- Lee MW et al (2002) Palisaded and verocay body prominent leiomyoma of deep soft tissue. *J Dermatol* 29(3):160–163
- Ali RH, Rouzbahman M (2015) Endometrial stromal tumours revisited: an update based on the 2014 WHO classification. *J Clin Pathol* 68(5):325–332
- Dionigi A et al (2002) Endometrial stromal nodules and endometrial stromal tumors with limited infiltration: a clinicopathologic study of 50 cases. *Am J Surg Pathol* 26(5):567–581
- Busca, A., et al., IFTM1 outperforms CD10 in differentiating low-grade endometrial stromal sarcomas from smooth muscle neoplasms of the uterus. *Int J Gynecol Pathol*, 2017.

35. Makinen N et al (2013) MED12 exon 2 mutations in histopathological uterine leiomyoma variants. *Eur J Hum Genet* 21(11):1300–1303
36. Makinen N et al (2017) Characterization of MED12, HMGA2, and FH alterations reveals molecular variability in uterine smooth muscle tumors. *Mol Cancer* 16(1):101
37. Äyrämäkinen A et al (2020) Systematic molecular and clinical analysis of uterine leiomyomas from fertile-aged women undergoing myomectomy. *Hum Reprod* 35(10):2237–2244
38. Matsubara A et al (2013) Prevalence of MED12 mutations in uterine and extrauterine smooth muscle tumours. *Histopathology* 62(4):657–661
39. Makinen N et al (2011) MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science* 334(6053):252–255
40. George JW et al (2019) Integrated epigenome, exome, and transcriptome analyses reveal molecular subtypes and homeotic transformation in uterine fibroids. *Cell Rep* 29(12):4069–4085.e6
41. Velagaleti GV et al (2010) Fusion of HMGA2 to COG5 in uterine leiomyoma. *Cancer Genet Cytogenet* 202(1):11–16
42. Mehine M et al (2013) Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing. *N Engl J Med* 369(1):43–53
43. Quade BJ et al (2003) Fusion transcripts involving HMGA2 are not a common molecular mechanism in uterine leiomyomata with rearrangements in 12q15. *Cancer Res* 63(6):1351–1358
44. Lehtonen R et al (2004) Biallelic inactivation of fumarate hydratase (FH) occurs in nonsyndromic uterine leiomyomas but is rare in other tumors. *Am J Pathol* 164(1):17–22
45. Joseph NM et al (2015) Morphology and immunohistochemistry for 2SC and FH aid in detection of fumarate hydratase gene aberrations in uterine leiomyomas from young patients. *Am J Surg Pathol* 39(11):1529–1539
46. Barker KT et al (2002) Low frequency of somatic mutations in the FH/multiple cutaneous leiomyomatosis gene in sporadic leiomyosarcomas and uterine leiomyomas. *Br J Cancer* 87(4):446–448
47. Christacos NC et al (2006) Uterine leiomyomata with deletions of 1p represent a distinct cytogenetic subgroup associated with unusual histologic features. *Genes Chromosomes Cancer* 45(3):304–312
48. Hodge JC et al (2014) Uterine cellular leiomyomata with chromosome 1p deletions represent a distinct entity. *Am J Obstet Gynecol* 210(6):572.e1–7
49. Galindo LJ et al (2018) HMGA2 and MED12 alterations frequently co-occur in uterine leiomyomas. *Gynecol Oncol* 150(3):562–568
50. Davidson B, Micci F (2017) Molecular characteristics of uterine sarcomas. *Expert Rev Mol Diagn* 17(5):515–522
51. Sreekantaiah C et al (1991) An endometrial stromal sarcoma with clonal cytogenetic abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet* 55(2):163–166
52. Micci F et al (2016) Cytogenetic and molecular profile of endometrial stromal sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 55(11):834–846
53. Micci F et al (2014) MEAF6/PHF1 is a recurrent gene fusion in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Lett* 347(1):75–78
54. Miettinen M et al (2019) New fusion sarcomas: histopathology and clinical significance of selected entities. *Hum Pathol* 86:57–65
55. Koontz JJ et al (2001) Frequent fusion of the JAZF1 and JAZ1 genes in endometrial stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11):6348–6353
56. Mansor S, et al., ZC3H7B-BCOR-Rearranged endometrial stromal sarcomas: a distinct subset merits its own classification? *Int J Gynecol Pathol*, 2018.
57. Ondic, O., et al., ZC3H7B-BCOR high-grade endometrial stromal sarcoma may present as myoma nascens with cytoplasmic signet ring cell change. *Virchows Arch*, 2020.
58. Micci F et al (2006) Consistent rearrangement of chromosomal band 6p21 with generation of fusion genes JAZF1/PHF1 and EPC1/PHF1 in endometrial stromal sarcoma. *Cancer Res* 66(1):107–112
59. Panagopoulos I et al (2013) Fusion of the ZC3H7B and BCOR genes in endometrial stromal sarcomas carrying an X:22-translocation. *Genes Chromosomes Cancer* 52(7):610–618
60. Dewaele B et al (2014) Identification of a novel, recurrent MBTD1-CXorf67 fusion in low-grade endometrial stromal sarcoma. *Int J Cancer* 134(5):1112–1122
61. Hoang L, Chiang S, Lee CH (2018) Endometrial stromal sarcomas and related neoplasms: new developments and diagnostic considerations. *Pathology* 50(2):162–177

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.