

## **Pokročilé metody v patologii**

Pokročilé metody v patologii mají obecně (ve srovnání se základními metodami) vyšší citlivost a specifitu při detekci hledaného antigenu nebo molekulární změny. S tím se však pojí specifické nároky na zpracování materiálu a cena („náklady na test“), která je obecně vždy vyšší než u základního barvení, ale může být až extrémně vysoká.

Specifické nároky na zpracování materiálu pro pokročilé metody v patologii jsou především nároky na způsob fixace a uchování tkáně. V dnešní době je snaha o to, aby se co nejvíc metod dalo aplikovat na materiál zpracovaný standardní FFPE technikou. Jsou však stále metody, které pro validní výsledek vyžadují, aby tkáň byla fixována velmi rychle, tzn. rychlým zamražením, kryokonzervací. Při tomto způsobu fixace je tkáň uchovávána v zásobnících s tekutým dusíkem. Tento způsob fixace však vyžaduje rychlý transport odebrané nativní tkáně na pracoviště patologie, speciální vybavení laboratoře (zacházení s tekutým dusíkem) a je vázán i legislativně (uchovávané tkáně jsou viabilní).

Všechny metody, ať již základní nebo pokročilé, jsou náročné na odbornost a edukaci posuzovatele a na prostor. Pořizování digitální obrazové dokumentace (skeny, mikrofotografie) je proto výhodné v mnoha ohledech:

- možnost sdílet mikroskopické nálezy s dalšími posuzovateli, a to v aktuálním čase a na velké vzdálenosti
- uchování nálezů a výsledků testů – obecnou vlastností všech zhotovených tkáňových řezů je blednutí a ztráta „signálu“ v čase. V digitální podobě je však zachována původní kvalita preparátu a v případě potřeby může být provedeno opakované nebo i doplňující morfologické hodnocení preparátu
- výuka: databáze typických nebo naopak vzácných nálezů jsou vhodným doplňkem výuky histopatologických změn. Skeny a mikrofotografie mohou být prezentovány a sdíleny, bez nutnosti vytvářet stále nové a nové tkáňové řezy (především u malých vzorků může dojít k nežádoucímu spotřebování veškerého dostupného materiálu).

Pokročilé metody v patologii jsou spojeny nejen s diagnostikou, ale hlavně s predikcí, tedy s odpovědí na léčbu. Ve výsledku to znamená, že podání určité léčebné látky je vázáno na výsledek konkrétního testu. Vzhledem k tomu, že se velmi často jedná o extrémně drahou léčbu, jsou kladeny velké nároky na spolehlivost (validitu) testu. Požadovanou součástí testů jsou tedy i kontrolní vzorky s pozitivní a negativní kontrolou, trénink hodnotících pracovníků (a to nejen v hodnocení samotného výsledku testu, ale i v posouzení a správném výběru oblasti zájmu v základním HE barvení) a účast v některém ze systémů externího hodnocení kvality (EHK, EQA = external quality assessment).

## **Speciální barvení**

Metody speciálního barvení patří mezi "klasické" histo(pato)logické techniky. Využívají chemických reakcí k průkazu určitých látek ve tkáni (např. Perlsova reakce, průkaz železa při rozkladu krevního barviva na hemosiderin, barvení na hlen...) nebo např. k průkazu infekčního agens (barvení dle Grama - průkaz bakterií, Grocotta - průkaz mykotických elementů, Ziehl-Neelsena - průkaz mykobakterií, Warthin-Starryho - průkaz spirochet...) apod.

Tato barvení se obvykle provádějí v samostatné laboratoři, manuálně (široké spektrum metod).

## **Imunohistochemie a imunocytochemie**

Imunohistochemie a imunocytochemie využívají přirozenou imunologickou vazbu antigenu a protilátky, která je vizualizována enzymatickou reakcí za vzniku barevného produktu

Obecný postup:

oživení antigenu

vysycení endogenní peroxidázy

aplikace primární protilátky

detekce

aplikace enzymu a chromogenu

### Antigeny

Antigeny jsou vazebnou oblastí pro protilátku. Antigen může mít jedno nebo více vazebných míst (epitopů). Antigeny jsou různě lokalizovány, tomu odpovídá i typ exprese a pozitivita výsledku imuno reakce: jaderná (nukleární), cytoplazmatická, membránová. U každého antigenu je nutné znát typ exprese, popř. změny v expresi typické pro určité histopatologické změny.

Oživení antigenu je krok, ve kterém je antigen (epitop) po formalínové fixaci znovu „vystavován“ k imunitní reakci. Oživení antigenu se provádí pomocí varu za určitého pH (teplem indukované oživení antigenu, HIER = heat induced epitope retrieval) a nebo za pomoci enzymů (natrávení).

### Vysycení endogenní peroxidázy

Každá tkáň obsahuje určité množství endogenní peroxidázy. Protože imunohistochemické a imunocytochemické reakce využívají enzymatické reakce s chromogenem, je důležité odstranit vnitřní enzymatickou aktivitu tkáně. Pro tento účel se využívá „vysycení“ aktivity vnitřní peroxidázy, a to aplikací (přelití tkáně) přebytkem peroxidu vodíku.

### Protilátky

Protilátky jsou bílkovinné látky ze skupiny imunoglobulinů. Váží se na antigeny, resp. na epitopy. Mohou mít různé klony, které se mohou lišit svými vlastnostmi (vazba na různé epitopy, stupeň afinity a pevnost vazby...).

Protilátky mohou být:

- monoklonální: mají obecně nižší citlivost ale vyšší specifitu ve vazbě na určitý antigen/epitop

- polyklonální: obecně pokrývají širší spektrum antigenů, tedy mají vyšší citlivost, častěji jsou ale prováděny i nespecifickými reakcemi.

Protilátky mohou být různého původu, nejčastěji jsou používány myší a králičí protilátky.

Protilátky jsou dodávány buď jako koncentrované nebo předředěné (ready to use = RTU). U koncentrátů lze při sestavování vhodného protokolu pracovat s titrem ředění, obecně jsou náklady na test ve výsledku nižší. U RTU protilátek je eliminována možnost lidské chyby při ředění, často jsou explicitně vyžadovány u prediktivních testů.

Detekce je v dnešní době prováděna multimerovými a polymerovými detekčními kity. Navázaným enzymem jsou nejčastěji křenuvová peroxidáza (horseradish peroxidase, HRP) a alkalická fosfatáza (alkalic phosphatase, AP).

Chromogen je látka, která po působení enzymu dává vzniknout stálobarevnému produktu. Nejčastěji se používá DAB (diaminobenzidin), kde po aplikaci HRP vznikne produkt hnědé barvy.

Hodnocení imuno reakce může být kvantitativní (hodnotí se pouze, zda je výsledek pozitivní nebo negativní) nebo kvalitativní. Při kvalitativním hodnocení je požadováno, aby posuzovatel udával intenzitu signálu (slabě, středně, silně, velmi silně pozitivní) a počet pozitivních buněk. Toto hodnocení může být doplněno skórovacím systémem.

Výhody imuno vyšetření jsou především: široké spektrum známých antigenů a příznivá cena. Nevýhodou je, že se detekuje bílkovinný produkt, výsledek reakce je závislý na mnoha proměnných a nemusí plně reflektovat genové změny postižených buněk.

### **In situ hybridizace (ISH)**

In situ hybridizace je metoda, při které jsou geny a jejich změny detekovány pomocí komplementárních úseků DNA (= proby), na které je navázána specifická značka. Značka může být fluorescenční (fluorochrom = fluorescenční in situ hybridizace, FISH), chromogenní (chromogenní in situ hybridizace, CISH) a nebo může jít o kombinaci chromogenu a stříbra (= silver/dual in situ hybridizace, SISH/DISH).

Detekovány mohou být kvalitativní změny (delece, translokace) i změny kvantitativní (amplifikace). Tato metoda je aplikovatelná na tkáňové řezy z parafinových bloků (materiál FFPE), řezy ze zmražených tkání i cytologický materiál.

Výhodou in situ hybridizace je kombinace molekulárního přístupu (detekce genových změn) a histologie (lokalizace ve tkáních), a to především u CISH a SISH/DISH metody. Hlavní výhodou FISH metody je možnost detekce translokačních signálů – splynutím dvou různých barevných signálů (zelená a červená) dochází k vytvoření směsného signálu jiné barvy (žlutá/oranžová).

Obecnou nevýhodou in situ hybridizačních vyšetření je vyšší citlivost na správnou fixaci tkáně. Specifickou nevýhodou FISH metody je nutnost práce v tmavých prostorech (zamezení „vysvícení“ signálů) a postupné blednutí signálů.

Cena in situ hybridizačního vyšetření je obecně vyšší než u imuno metod.

### **Obecný postup**

natrávení  
denaturace  
aplikace proby  
hybridizace  
detekce

### **Natrávení**

Pomocí enzymů je odtrávena přebytečná tkáň.

### **Denaturace**

Teplem (varem) se od sebe rozdělí dvojšroubovice DNA, na dvě jednotlivá vlákna.

### **Aplikace próby a hybridizace**

Proba (komplementární úsek NK) označená značkou je aplikována a navázána.

### **Detekce**

Detekce se děje odlišně podle použité metody – FISH a SISH přímá detekce (fluorescenční, světelný mikroskop), u CISH metody následuje imuno reakce.

### **CISH**

Chromogenní in situ hybridizace (CISH) je metoda, při které je proba značená chromogenem. Mohou být použity jeden nebo dva chromogeny. Výsledek je hodnocen ve světelném mikroskopu. Hodnotí se přítomnost genu nebo jeho chybění (delece).

Příklady: EBER (detekce nukleové kyseliny viru Epstein-Barrové), kappa/lambda (detekce lehkých řetězců), del 1p19q (specifická delece oligodendroglálních nádorů).

### **FISH**

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) je metoda, při které je proba značená fluorochromem.

Mohou být použity jeden nebo dva chromogeny. Výsledek je hodnocen ve fluorescenčním mikroskopu. Výhodou je možnost detekce směsných (genové translokace) a nebo naopak rozkladných signálů (break-apart sondy, detekce typických genových zlomů). Nevýhodou je blednutí a tím pádem nestálost (nízká životnost) preparátů.

Příklady: ALK (plicní karcinomy), hematologická onemocnění (c-myc, bcl2, bcl6...).

### **SISH/DISH**

Silver in situ hybridizace (SISH), nebo také dual in situ hybridizace (DISH) je metoda, při které se kombinuje chromogenní a stříbrná koncovka.

Používá se pro hodnocení HER2. Toto hodnocení je kvantifikační – kvantifikuje se počet signálů!

### **Molekulární patologie**

= samostatný obor patologie!!! (na pracovištích patologie pracují vysokoškoláci biologického zaměření, ne-lékaři), zabývající se studiem molekulárních mechanismů vzniku a progresse nenádorových a nádorových chorob s využitím metod molekulární biologie

= patologie na molekulární úrovni

Genetické aberace v signálních drahách vedou k transformaci buněk, vývoji nebo progresi nádorového onemocnění. Molekulární patologie umožňuje poznání těchto mechanismů a rozvoj individualizované medicíny, která přizpůsobuje léčebné plány na základě objektivních parametrů charakterizujících biologickou individualitu jednotlivých pacientů a jejich onemocnění.

Molekulární patologie- určování prediktivních a prognostických markerů při indikaci terapie

Prognostický marker- znak nebo vlastnost (např. bodová mutace), který umožní rozdělení populací v rámci sledovaného jevu (onemocnění), = odhad chování onemocnění či jeho závažnosti

Prediktivní marker- znak nebo vlastnost, který umožní rozdělení populací v rámci sledovaného jevu (onemocnění), = odhad odpovědi na konkrétní léčbu

Využití molekulární patologie –

sledování somatických mutací a defektů proteinové exprese u nádorových onemocnění k určení prognózy a optimální individualizace terapie

monitorování odpovědi pacienta na léčbu

detekce molekulárních mechanismů zodpovědných za vznik onemocnění

diagnostika infekčních onemocnění