



metodika diagnostické patologie

IMUNOHISTOCHEMIE

a

FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE

Marcela Mrhalová

Ústav patologie a molekulární medicíny

Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Motole

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 - Motol

IMUNOHISTOCHEMICKÉ VYŠETŘENÍ

průkaz exprese proteinu / makromolekuly v histologickém řezu na základě **reakce antigen (epitop) – protilátka**

a následně chromogenní detekce vazby protilátky na epitop antigenu pomocí enzymatické reakce

vyšetření se provádí na histologických řezech z tkání fixovaných ve formolu a zalitých do parafinu

ANTIGENY

při imunohistochemickém vyšetření

jsou většinou přirozenou součástí buněk / tkání

např. exprese keratinů – epiteliální buňky, karcinomy

např. exprese CD20 – B lymfocyty, B lymfomy

PROTILÁTKY

při imunohistochemickém vyšetření

jsou aplikovány na histologický řez

váží se specificky na epitop antigenu

monoklonální vs. polyklonální

CO PŘEDCHÁZÍ IMUNOHISTOCHEMICKÉMU VYŠETŘENÍ

odběr materiálu

fixace tkáně ve formolu

přikrojení materiálu

zpracování tkáně do podoby parafinového bloku

krájení histologického řezu

barvení hematoxylinem a eosinem

mikroskopické zhodnocení

výběr vhodného bloku

...vlastní imunohistochemické vyšetření

POSTUP

ukrojení histologického řezu

deparafinace, zavodnění

zpřístupnění epitopu antigenu

inkubace s primární protilátkou

inkubace se sekundární protilátkou a enzymem

aplikace substrátu a kosubstrátu

dobarvení jader buněk hematoxylinem

odvodnění, projasnění, zamontování

hodnocení výsledku ve světelném mikroskopu

HODNOCENÍ LOKALIZACE

jaderná

např. Ki-67, receptory pro estrogen

membránová

např. CD20, ERBB-2 protein

cytoplasmatická

např. desmin, cytokeratiny

„mimo“ buňky

např. kolagen IV

HODNOCENÍ INTENZITY

v imunohistochemii semikvantitativní

hodnocení pomocí skóre: 0, 1+, 2+, 3+

např. exprese ERBB-2 / HER2 proteinu

HODNOCENÍ POČTU

% pozitivních buněk – nádorových / nenádorových
např. proliferace (exprese molekuly Ki-67)

VYUŽITÍ

diagnostika

nádorových i nenádorových onemocnění
primární nádor x metastatický proces

stanovení prognózy

proliferační x apoptotická aktivita
metastatický potenciál

indikace k cílené terapii

„biologická léčba“
nízkomolekulární inhibitory
monoklonální protilátky

VYUŽITÍ

diagnostika

např. exprese keratinů – epiteliální nádory

např. exprese CD20 – B lymfomy

VYUŽITÍ

stanovení prognózy

např. exprese Ki-67 molekuly – proliferační aktivita

např. exprese BCL-2 proteinu – apoptotická aktivita

INDIKACE K CÍLENÉ TERAPII - příklady

karcinomy mléčné žlázy	<i>expresse receptorů pro estrogen</i> <i>expresse receptorů pro progesteron</i> <i>expresse ERBB-2 / Her2 proteinu</i>
nemalobuněčné karcinomy plic	<i>expresse ALK proteinu</i> <i>expresse ROS1 proteinu</i>
B lymfomy	<i>expresse molekuly CD20</i>
melanom, Ca plic...	<i>expresse molekuly PD-L1</i>

FLUORESCENČNÍ IN SITU HYBRIDIZACE

průkaz určité oblasti genomické DNA či její přestavby
na základě komplementarity sekvence basí pomocí vazby
fluorescenčně značené sondy / sond

*vyšetření se provádí na histologických řezech z tkání
fixovaných ve formolu a zalitých do parafinu,
na jádrech v interfázi (I-FISH)*

sondy jsou většinou přímo značené fluorochromy

vyšetřují se somatické změny DNA v nádorové populaci

RŮZNÉ TYPY SOND

sondy pro jádra v interfázi

sondy centromerické

sondy lokus specifické

směsi lokus specifických sond

směsi centromerických a lokus specifických sond

FLUORESCENČNÍ MIKROSKOP

zdroj UV záření

filtry: excitační
dichroické zrcadlo
emisní

jednopásmové
vícepásmové

CO PŘEDCHÁZÍ FISH VYŠETŘENÍ

odběr materiálu

fixace tkáně ve formolu

příkrojení materiálu

zpracování tkáně do podoby parafinového bloku

krájení histologického řezu

barvení hematoxylinem a eosinem

mikroskopické zhodnocení

výběr vhodného bloku

imunohistochemické vyšetření

...vlastní FISH

POSTUP

výběr vhodné části tkáně

ukrojení histologického řezu

deparafinace, zavodnění

zpřístupnění DNA

denaturace DNA (genomické a sondy)

hybridizace se sondou značenou fluorochromem

odmytí nadbytku sondy

zamontování, zhotovení preparátu

hodnocení výsledku ve fluorescenčním mikroskopu

HODNOCENÍ

počtu signálů

uspořádání signálů

HODNOCENÍ POČTU SIGNÁLŮ

norma

zisky – amplifikace

např. amplifikace genu ERBB2 – karcinomy mléčné žlázy

ztráty – delece

např. delece oblastí 1p36 / 19q13 – některé mozkové nádory

HODNOCENÍ USPOŘÁDÁNÍ SIGNÁLŮ

norma

chromosomální zlomy – separace signálů

např. zlom genu MYC – Burkittův lymfom

chromosomální translokace – fúze signálů

např. $t(14;18)(q32;q21)$ IGH / BCL2 – folikulární lymfom

VÝHODY

vyšetření bez potřeby kultivace buněk

sondy „dlouhé“

vyšetření velkého množství buněk

možnost vyšetření archivního materiálu

vyšetření tam, kde je problematická izolace DNA

hodnocení v kontextu s morfologií tkáně

porovnání s expresí proteinu

VYUŽITÍ

diagnostika

např. $t(11;14)(q13;q32)$ CCND1 / IGH – lymfom z buněk pláště

např. $t(11;22)(q24;q12)$ FLI1 / EWSR1 – Ewingův sarkom

stanovení prognózy

např. zlom genu ALK – velkobuněčný anaplastický lymfom

např. amplifikace genu MYCN – neuroblastom

indikace k cílené terapii

např. amplifikace genu ERBB2 – karcinomy mléčné žlázy

např. zlom genu ROS1 – nemalobuněčné karcinomy plic