

ŽIVOT PATOLOGA MEZI MOLEKULAMI – VÝSTROJ A VÝZBROJ PRO PŘEŽITÍ

HOW TO SURVIVE IN THE VASTNESS OF MOLECULES: A VIEW FROM A PATHOLOGIST

KODET R., MRHALOVÁ M., KRŠKOVÁ L., MANDÁKOVÁ P., KALINOVÁ M.

ÚSTAV PATOLOGIE A MOLEKULÁRNÍ MEDICÍNY, UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE,
2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA A FAKULTNÍ NEMOCNICE V MOTOLE, PRAHA

Souhrn: Biopické vyšetření má v diagnostice nádorových onemocnění významné postavení. Tradiční histopatologické a cytologické vyšetřovací metody s využitím histologických postupů a barvení, doplněné o imunohistochemickou detekci proteinů ve tkáni představují základ. Ten v současné době rozšiřujeme o nové vyšetřovací metody identifikující změny v nádorových buňkách na úrovni proteinů, mRNA a DNA (vertikální pohled) a v budoucnu budeme rozšiřovat o detekci souborů genů nebo jejich produktů současně – mikročipové metody (horizontální pohled). Příklady z praktického využití moderních diagnostických postupů slouží k ilustraci soudobého trendu rozšiřovat spektrum vyšetření prováděných pracovišti patologie jako základního laboratorního oboru. Kromě diagnostického aspektu molekulárních vyšetření je třeba zdůraznit rozšiřování spektra vyšetření s aspektem terapeuticko – indikačním (např. vyšetření proteinu ERBB-2 a genu ERBB2 u nemocných s invazivními ductálními karcinomy mléčné žlázy). Kontinuální vzdělávání v oboru patologie a molekulární biologie je předpokladem dosažení pracovní dlouhověkosti současného patologa.

Klíčová slova: onkologie, histopatologie, molekulární diagnostika

Summary: Surgical histopathology investigations plays a key role in diagnostics of neoplastic diseases. Traditional histopathological and cytological approach using histological techniques and staining methods, complemented by immunohistochemical detection of proteins in tissues represent the basic principles in diagnostics. The spectrum of investigations is broadened by methods identifying changes in tumor cells at the level of mRNA and DNA (a vertical aspect), and in near future will be expanded by detection of groups of genes or their products at one time – microchip technologies (a horizontal aspect). Examples based on a practical use of modern diagnostic approaches serve to illustrate a trend to introduce a spectrum of investigations performed by departments of pathology, which should maintain a role of a basic laboratory discipline. It is to be stressed that beside a diagnostic importance of molecular investigations there is an increasing importance of investigations aimed at molecular therapy (eg. detection of ERBB-2 protein and ERBB2 gene in patients with invasive duct carcinomas of the breast). A continuous training in the field of pathology and molecular biology is a prerequisite for longevity of any pathologist.

Key words: oncology, histopathology, molecular diagnostics

Obor patologie (dříve také nazývaný patologická anatomie) byl v minulých stoletích v mnohých směrech předvojem vývoje medicíny. Osvojil si pokrokové metody opřené o mikroskopické a v sedmdesátých letech dvacátého století o ultrastrukturální pozorování. Na jeho základech počaly vyrůstat nové disciplíny (histochemie, imunohistochemie) i nové obory (např. imunologie).

Rozvoj biologických poznatků od doby objasnění podstaty genetické informace a jejího přepisu do proteinů podstatně změnil uvažování o patobiologii nemoci a změnil pohled na mnohé nosologické jednotky. Mikroskopické techniky, stále používané jako základ pro vyšetření v oboru patologie, přestávají stačit k vysvětlení příčinných vztahů nemoci a v mnohých případech nejsou dost citlivé například k identifikaci jednotlivých nádorových buněk diseminovaných do kostní dřeni. Aby patolog mohl vyšetřovat nemocné v souladu se současnými nároky na diagnostiku onemocnění a zohlednil nové poznatky o chorobných dějích, musí doplňovat své znalosti a výzbroj o nástroje využívané dosud pouze v biologii či genetice.

S narůstajícími možnostmi detekce proteinů (regulačních, či strukturálních) během posledních dvaceti let byl rozvoj patologie *imunohistochemickým směrem* předvojem hlubšího

pohledu do dění v buňkách. Předznamenával období molekulární patologie na úrovni proteinové diagnostiky a komplexní pohled na vzájemné vztahy mezi proteiny v buňce - *proteomiku*. Proteinová diagnostika bude mít stále větší význam, protože kromě identifikace buněčně příznačných antigenních epitopů (tedy diagnostické výtěžnosti) ukazuje i aktuální funkční situaci v buňce (např. buněčnou kinetiku, obr. 1a). Proteinovou diagnostiku můžeme aplikovat nejen *in situ* na histologickém skle (imunohistochemické metody), ale také v periferní krvi, v kostní dřeni a v homogenátu tkáně - pomocí průtokové cytometrie (1). Průtokový cytometr je přístroj, který kombinuje princip fluorescenčního mikroskopu a hematologického analyzátoru a tudíž umožňuje simultánní analýzu velkého počtu částic a současně omezuje faktor subjektivního hodnocení. Standardním výstupem cytometrického vyšetření je zastoupení buněk nesoucích daný antigen vyjádřen v procentech. Výhodou této metody je možnost stanovení koexprese buněčných antigenů, což předpokládá použití monoklonálních, většinou přímo fluorescenčně značených protilátek. Běžné cytometry vybavené argonovým laserem umožňují souběžnou aplikaci tří fluorochromů a tedy trojbarevnou analýzu, která má vyšší citlivost než analýza jednobarevná a její použití je vhodné zejména při detekci minimální residuální nemoci. Kro-

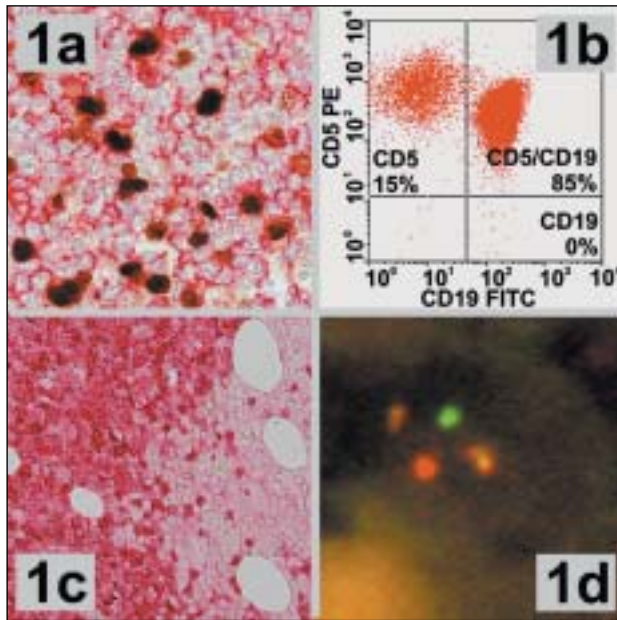
Obr. 1. Příklad komplexní diagnostiky, v tomto případě lymfomu z buněk pláště („Mantle cell lymphoma“, MCL). PCR reakce k průkazu translokace t(11;14) je součástí každého vyšetření při podezření na tento lymfom, na obrázku není uvedena

1a – imunohistochemický průkaz exprese proteinu Ki-67 (hnědá jaderná pozitivita, peroxidáza / diaminobenzidin), zároveň s průkazem molekuly CD20 (červená membránová pozitivita, alkalická fosfatáza / stálá červeně) v lymfatické uzlině; imunohistochemické vyšetření se dvojnásobným značením umožňuje detegovat proliferativní frakci v CD20 pozitivních nádorových buňkách – vyšetření má význam v prognostickém odhadu chování nádoru;

1b – průtoková cytometrie provedená z lymfatické uzliny; identifikace koexpresie molekuly CD5 a CD19 u nádorové populace, která je zastoupená ve vyšetřovaném vzorku jako většina;

1c – imunohistochemický průkaz overexpresie proteinu cyclín D1 v kostní dřeni (červená jaderná pozitivita, alkalická fosfatáza / stálá červeně); overexprese vzniká na základě patologické stimulace genu CCND1 kódujícího cyclín D1 při translokaci t(11;14)(q13;q32);

1d – průkaz translokace t(11;14)(q13;q32) metodou I-FISH v histologickém řezu lymfatické uzliny (dva fúzní červeno-žluto-zelené signály z translokovaných oblastí, jeden signál zelený – intaktní oblast alelického lokusu 14q32 a jeden signál červený – intaktní oblast alelického lokusu 11q13).



mě analýzy může průtokový cytometr sloužit rovněž ke třídění (sortování) částic, což je zatím využíváno spíše k experimentálním účelům: vše vypracované především v hematologii u leukémií a lymfomů (obr. 1b). Další možnosti proteinové diagnostiky je izolace proteinů a jejich studium pomocí blotovacích technik (western blotting, umožňující identifikaci proteinu na základě jeho fyzikálních vlastností a molekulové hmotnosti a také částečnou kvantifikaci). S postupem vývoje poznání si však uvědomujeme, že je potřebné dívat se na procesy v buňkách komplexně a že využítí jen jednoho přístupu (proteinové diagnostiky) není dostatečné. Proteiny vznikají translací genetické informace z informačních ribonukleových kyselin (mRNA), do kterých byla tato informace přenesena transkripcí z příslušných genů (DNA), a to za fyziologických i patologických podmínek. V mnoha případech rutinního vyšetřování tkání je třeba mít tento přenos genetické informace na zřeteli a ve vybraných případech by měl patolog přistoupit k vyšetření dílčích složek buněčných regulací nejen na horizontální úrovni – tedy při vyšetření exprese proteinů, ale také na úrovni vertikální – tedy při snaze vysvětlit příčinné souvislosti tvorby proteinu na úrovni DNA a RNA (obr. 1c,d). Pomocí imunohistochemických technik můžeme totiž prokázat například akumulaci proteinu v buňce nebo ve tkáni, protein však nemusí být funkční; imunohistochemický průkaz může tedy být, bez znalosti aktivity transkripce a translace zjištěné pomocí molekulárních metod, mylně interpretován jako zvýšená tvorba proteinu.

Ke komplexnímu vyšetření (protein, RNA, DNA) má patolog dobré předpoklady. Ovládá zpracování tkání a dokáže na základě mikroskopického vyšetření vybrat tkáň potřebnou ke specializovaným vyšetřením. Po zmrazení (které uchová strukturu i cytologii buněk a také nukleové kyseliny v dostatečné kvalitě pro jejich izolaci) může patolog identifikovat tu část tkáně, která je chorobně změněna a která by měla být v dalších krocích analyzována. Patolog má tak v rukou první kroky rozhodovacího procesu o tom, jaký proces se vyšetřuje a o tom, které tkáňové struktury, případně které buňky jsou k tomuto vyšetření vhodné (platí zejména u tzv. solidních nádorů). Na základě morfologického vyšetření může patolog navrhnout, jaké spektrum dalších metod je vhodné aplikovat.

Není však možné, aby specializované molekulární vyšetření vykonával patolog sám. Tak jako je chirurgie již po mnoho desetiletí týmovou prací, a je to tým nejen chirurgů, ale také anesteziologů a dalších specialistů, musí také patolog rozvíjet týmovou činnost. Určitý princip týmovosti se spontánně uplatňuje již mnoho let. Například makroskopická diagnostika některých onemocnění je v rukou gastroenterologů vyšetřujících endoskopickými technikami, dermatologů nebo gynekologů. Mezioborová spolupráce je zde potřebná, je třeba ji dále vědomě pěstovat, protože ne na všech pracovištích je ideálně funkční (např. informovanost vyšetřujícího patologa o klinickém stavu pacienta bývá často nedostatečná). Do vlastního týmu patologa je vhodné a dokonce nutné přizvat odborníky z oblasti molekulární diagnostiky, kteří ovládají technologie studia jak proteinů, tak nukleových kyselin, dosud pathology málo využívané. Potenciál znalostí a dovedností se tak sdílí mezi odbornostmi a obohacuje patologa, stejně tak, jako molekulární biologa. Takový tým by měl pracovat nejen na výzkumu určité problematiky (blízké tomu či onomu zařízení patologie), ale i v oblasti diagnostiky. Již v současnosti je jasné, že diagnostika mnohých onemocnění se bez komplexního přístupu neobejde. V rutinní práci patologa zasluhují stále větší záber již zmíněné metody identifikující děje v nádorových buňkách na úrovni genu (DNA), transkriptu (mRNA) a proteinu, především v diagnostice nádorových onemocnění. Identifikace těchto vertikálních regulací jsou podstatné. Můžeme uvést praktický případ s dopadem na terapii:

Imunohistochemické vyšetření exprese proteinu ERBB-2 u nemocných s invazivními ductálními karcinomy mléčné žlázy za účelem indikace terapie humanizovanou monoklonální protilátkou Herceptin (trastuzumab, Genentech, Inc.). Toto vyšetření není v některých případech jednoznačně interpretovatelné. Protože overexprese proteinu je u většiny případů způsobena amplifikací genu ERBB2 (17q21), je obecným trendem podporovat proteinovou diagnostiku diagnostikou genovou - vyšetřením amplifikace genu ERBB2 metodou fluorescenční *in situ* hybridizace - FISH (2), (obr. 2a,b). Jak se nám podařilo prokázat, ne vždy je overexprese proteinu ERBB-2 způsobena amplifikací genu. Při vyšetření mRNA jsme zjistili, že u většiny případů je sice dobrá korelace mezi zvýšeným počtem kopií genu a zvýšenou hladinou transkriptu, ale u některých nemocných může být zvýšená mRNA a overexprese proteinu (3+) způsobena jinými faktory než amplifikací genu (3). V patogenезi tohoto nálezu se tedy uplatňují regulační změny na úrovni transkripce. Kdybychom však přistoupili „jen“ na současný trend diagnostiky, bylo by sporné, zda by nemocné při zjištění overexpresie ERBB-2 proteinu bez amplifikace ERBB2 genu měl být aplikován preparát Herceptin. Z tohoto příkladu tedy vyplývá nutnost komplexního přístupu k diagnostice na základě uceleného laboratorního výstupu s fundovaným epikritickým zhodnocením.

Aplikace Herceptinu u nemocných s karcinomy mléčné žlázy je pouze jedním příkladem. Onkologická terapie se začíná orientovat na léky, které jsou cíleně vyvinuty na některý specifický znak nádorových buněk. Tyto postupy však vyžadují a budou i v budoucnu vyžadovat specializovaná vyšetření. Detekce exprese proteinů pro nasazení terapie humanizova-

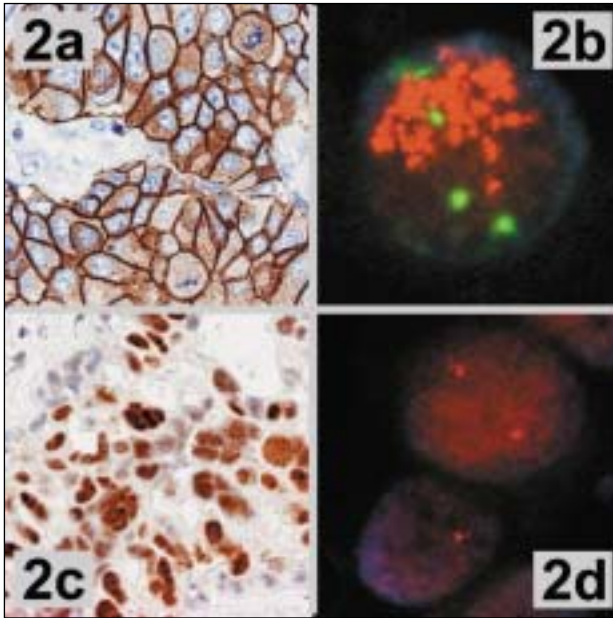
Obr. 2. Kombinace diagnostických metod u invazivních duktálních karcinomů mléčné žlázy, příklady morfologického vyšetření s navazujícím imunohistochemickým průkazem proteinů a vyšetření metodou I-FISH s lokus specifickými sondami

2a – imunohistochemický průkaz overexpresce proteinu ERBB-2 v histologickém řezu; intenzita reakce je hodnocená 3+ (hnědá membránová pozitivita, HercepTest, DakoCytomation);

2b – silná amplifikace genu ERBB2 (červené signály) a zvýšený počet chromosomu 17 (zelené signály) v jádře nádorové buňky v otiskovém preparátu, I-FISH; výsledek overexpresce proteinu (2a) a amplifikace genu (2b) dobře koreluje a pacientka je z tohoto pohledu indikována k terapii Herceptinem;

2c – imunohistochemický průkaz proteinu TP53 v histologickém řezu (hnědá jaderná pozitivita, peroxidáza / diaminobenzidin); akumulace proteinu s možností jeho imunohistochemické detekce je projevem patologickým, příčiny jsou však různorodé;

2d – průkaz počtu kopií genu TP53 v otiskovém preparátu (červené signály, I-FISH), příklad ztráty heterozygosity s jedním signálem v oblasti genu TP53 v jedné buňce, ve druhé buňce I-FISH ukazuje obě alely genu TP53; tato metoda je pouze orientační, pro detailní analýzu je nutná sekvenace genu TP53.



nými monoklonálními protilátkami je toho příkladem již dnes (výše zmíněný karcinom mléčné žlázy), gastrointestinální stromální nádory - imatinib mesylate (Glivec, Novartis, European, Ltd.), lymfomy B řady – rituximab (Rituxan, Genentech, Inc.). V klinických testech se objevují další preparáty. Z patologie se v tomto ohledu stává obor nejen *diagnostický*, ale také *terapeuticko-indikační*. A to je podstatná změna odehrávající se v posledním desetiletí. Nebude-li patolog schopen indikační podmínky pro leckdy velmi nákladnou terapii stanovit, převezme problematiku ten obor, či ta skupina specialistů, který/ktará si tyto podmínky připraví. Pokud taková odborníci pracují izolovaně, nemají řádnou podporu morfologické diagnostiky a neznají neobyčejnou pestrost patologického spektra nálezů ve vyšetřované tkáni. Při takovém postupu mohou při specializovaných vyšetřeních unikat nejen morfologické podrobnosti, ale i základní informace o jakou tkáň či o jaký typ chorobného děje jde. Zde si dovoluji jen krátce poznamenat do vlastních řad, že cesta extenzivního vyšetřování v rámci oboru patologie za daného počtu erudovaných patologů vedla ke stagnaci vývoje směrem do hloubky a kvality a patologie ztrácí krok i tam, kde má tradičně v diagnostice nezastupitelnou úlohu (zřetelné se to projevuje právě v diagnostice onkologických onemocnění).

Metodou, která spojuje výhody histopatologického vyšetření s pohledem do buněk na úrovni DNA i RNA je *in situ hybridizace*, chromogenní (CISH) nebo fluorescenční (FISH), využívající různě značené sondy (obr. 2b, d). Výhodou *in situ* hybridizace proti PCR je možnost detekce velkých úseků

nukleových kyselin (sondy pokrývají stovky kilobází) a možnost vizualizace přímo ve tkáni bez homogenizace (nutné při izolacích DNA a RNA). V oboru patologie je metoda FISH vhodná pro DNA diagnostiku na jádrech v interfázi (tzv. I-FISH). Tento přístup, na rozdíl od cytogenetického vyšetření, umožní vyšetřovat nejen jednotlivé buňky, ale také histologické řezy. Odpadá nutnost kultivace buněk a především je možné buňky studovat v kontextu se strukturálním uspořádáním tkáně – tak lze přesně identifikovat jednotlivé typy buněk. Navíc lze použít řezy ze tkání fixovaných formolem a zalitých do parafinových bločků, což umožňuje studium retrospektivní nebo takové, kde není možnost získat čerstvé buňky / čerstvou tkáň. Výhodou *in situ* hybridizace je to, že i v případě normálního nálezu, tedy absence hledané změny (např. translokace) lze případ spolehlivě diagnosticky zhodnotit, protože signály jsou přítomny, ale v normálním uspořádání. Při PCR vyšetření absence očekávaného produktu může znamenat nepřítomnost specifické genové změny nebo také variantní změnu nezachycenou použitými primery a v neposlední řadě také neproběhlou reakci (při použití pozitivních a negativních kontrol v každé PCR a při amplifikaci kontrolního genu lze však i při

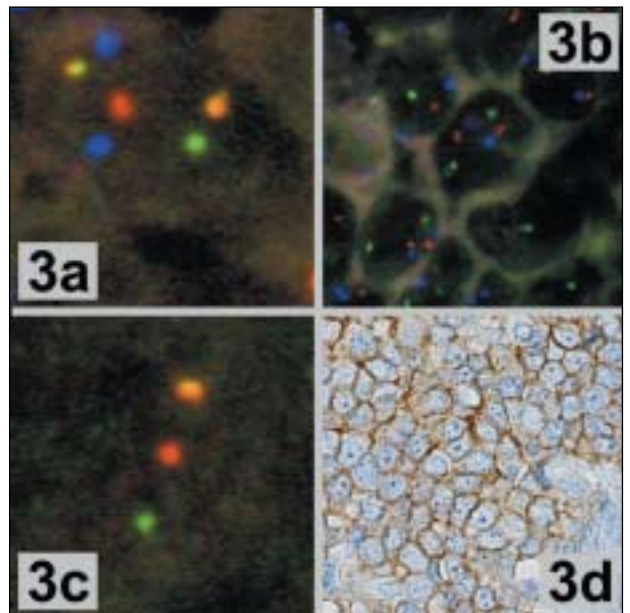
Obr. 3. Příklady detekce chromosomální translokace t(8;14) metodou I-FISH (Burkittův lymfom; absence translokace u velkobuněčného difusního B lymfomu) a chromosomálního zlomu (u Ewingova sarkomu / periferního neuroepiteliomu, ES/PNET a diagnostický význam imunohistochemického vyšetření)

3a – Burkittův lymfom: průkaz t(8;14)(q24;q32) a počtu kopií chromosomu 8 v jádře nádorové buňky (histologický řez) metodou I-FISH (dva fúzní červeno-zluto-zelené signály z translokovaných oblastí, jeden signál zelený – intaktní oblast alelického lokusu 14q32 a jeden signál červený – intaktní oblast alelického lokusu 8q24, dva signály modré – centromery chromosomu 8);

3b – jádra nádorových buněk bez přítomnosti t(8;14)(q24;q32) - dvě intaktní oblasti 8q24 a 14q32, dva signály pro centromery chromosomu 8 u difusního velkobuněčného B lymfomu, nádor se morfologicky podobal Burkittově lymfomu (u případu jsme neprokázali ani variantní translokace t(2;8) a t(8;22)); vyšetření má význam pro další postup v terapii;

3c – ES/PNET: průkaz chromosomálního zlomu v oblasti genu EWS na 22q12 metodou I-FISH v jádře nádorové buňky (histologický řez, oddálení zeleného a červeného signálu svědčí pro chromosomální zlom v lokusu EWS genu); vyšetření využívá princip stálého zlomu genu EWS - jde tedy o screening zlomu, pro přesné vymezení jednoho z možných translokačních partnerů je třeba postupovat pomocí PCR; vyšetření napomáhá v diferenciální diagnostice nediferencovaných kulatobuněčných nádorů;

3d – imunohistochemický průkaz exprese molekuly CD99 charakteristické pro skupinu nádorů typu ES/PNET (hnědá membránová pozitivita, peroxidáza / diaminobenzidin); vyšetření je relativně specifické a při dobré korelaci s morfologickým obrazem lze diagnosu stanovit spolehlivě; výhodná je ovšem kombinace s metodou I-FISH a následně PCR.



nepřítomnosti produktů PCR vyloučit laboratorní chybu a zvýšit procento jistoty, že hledaná změna není ve vyšetřeném materiálu skutečně přítomna). Pomocí *in situ* hybridizace na jádrech v interazi je možné zjišťovat počty chromosomů (centromerické sondy), specifických genových úseků (např. lokusy s onkogeny – stanovit jejich počet, zjišťovat amplifikace, případně i některé delece, obr. 2b,d). I-FISH je vhodná také k detekci chromosomálních translokací (např. u lymfomu z buněk pláště – obr. 1d, nebo u Burkittova lymfomu – obr. 3a). S výhodou využíváme posouzení chromosomálních zlomů. Je vhodné pro screening translokací základního lokusu s příslušným genem, u kterého existuje více partnerských genů – např. gen EWS na 22q12 má nejméně 8 známých translokací u řady nádorů měkkých tkání a kostí – obr. 3c, tabulka 1. Na úrovni mRNA lze pomocí FISH prokazovat např. klonalitu lymfoidních populací průkazem mRNA pro lehké řetězce imunoglobulinů; *in situ* hybridizace se běžně využívá v diagnostice virových infekcí (EBV, HPV a dalších). Je však nutné zdůraznit, že vyšetření metodou I-FISH je výhodné a žádoucí kombinovat s vyšetřením cytogenetickým, a to vždy, kdy je to možné. Cytogenetické vyšetření považujeme za základní, informující o chromosomálních změnách v mnoha aspektech, zatímco I-FISH je zaměřena na konkrétní předpokládané změny, které indikuje fundovaná histopatologická diagnostika.

Pod pojmem **molekulární diagnostika** se běžně rozumí diagnostika na úrovni nukleových kyselin (i když diagnostika proteinová je bezesporu také součástí molekulární diagnostiky). Na našem pracovišti byla založena Laboratoř molekulární patologie (LaMPa) v roce 1994 (o její praktické uvedení do života se zasloužili spolupracovníci, dr. J. Soukup a Mgr. R. Dahbiová). V té době jsme rozvinuli tzv. diferenciální PCR pro detekci amplifikace genu MYCN (2q24.1) u dětí s neuroblastomy (4). To mělo zásadní význam pro prognosu i terapii onemocnění a výsledky přispěly k indikaci léčby transplantací kmenových hemopoetických buněk. Rozvoj diagnostiky si postupně vyžádal rozšíření laboratoře, změny v týmu i ve vybavenosti pracoviště.

K praktickému provozování molekulární diagnostiky na úrovni **DNA (PCR) a RNA (RT-PCR, reverzně transkriptázová PCR)** je třeba vybavení laboratoře základními přístroji (cyklery, elektroforézy, centrifugy, laminární boxy, hlubokomrazicí boxy, detekční zařízení pro snímání gelů). S tímto vybavením lze začít diagnostiku např. specifických translokací u různých skupin nádorů, zejména lymfomů a nádorů měkkých tkání. Nadstavbou je pak sekvenátor nezbytný pro přesnou analýzu sekvencí bází nukleotidů, viz dále.

V současné době využíváme molekulárních metod k doplnění histopatologické diagnostiky u nádorů měkkých tkání – u **synoviálních sarkomů** – detekce t(X;18) s fúzí genů SYT (SSXT) a SSX1 nebo SSX2 (případně dalších vzácnějších variant) (obr. 4a,b) a u **alveolárních rhabdomyosarkomů** – t(2;13) s geny PAX3/FKHR a t(1;13) s geny PAX7/FKHR (obr. 4c,d). Vymezení typu translokace u alveolárních rhabdomyosarkomů má také prognostický význam (5). U skupiny **Ewingova sarkomu / periferní neuroepiteliom (ES/PNET)** postačuje pro rutinní bioptickou diagnostiku histologický obraz a imunohistochemický průkaz molekuly CD99, případně doplněný o metodu I-FISH s průkazem zlomu genu EWS na 22q12 (obr. 3c,d); partnera genu EWS lze přesně identifikovat jen molekulární analýzou, tedy průkazem specifické fúze genů, tedy genu EWS nejčastěji s genem FLI1 při translokaci t(11;22) (6). Mnohé další jednotky jsou v našem bioptickém materiálu vzácnější, avšak z praktického hlediska není obtížné do algoritmu diagnostiky začlenit PCR/RT-PCR detekci specifických genových přestaveb, pokud je známa sekvence příslušných fúzujících genů. Takovým příkladem je u dětí **kongenitální (infantilní) fibrosarkom** s translokací t(12;15) se vznikem fúzního genu ETV6 a NTRK3 a u dospělých například tzv. **sarkom měkkých tkání ze světlých buněk** (maligní melanom měkkých tkání) s translokací t(12;22) a vznikem fúzního genu ATF1

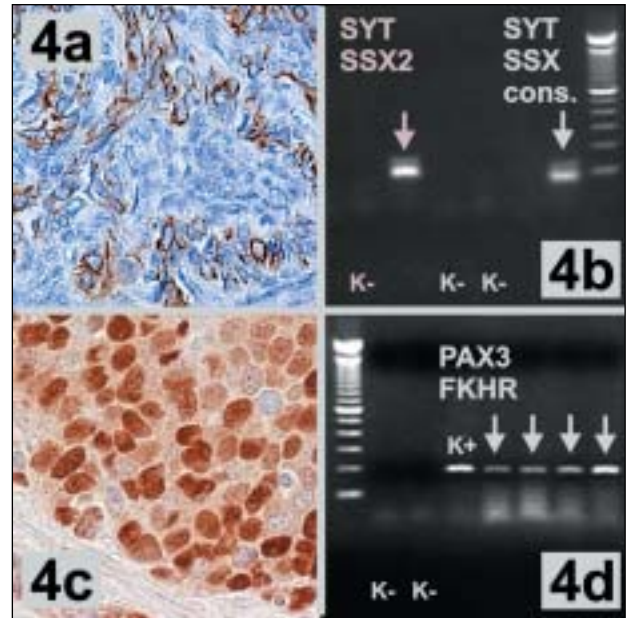
Obr. 4. Kombinace imunohistochemického vyšetření a vyšetření molekulárního u synoviálního sarkomu (a,b) a alveolárního rhabdomyosarkomu (c,d)

4a – imunohistochemický průkaz exprese cytokeratinů (hnědá cytoplasmická pozitivita, peroxidáza / diaminobenzidin), náleze zpravidla přítomný u tzv. bifázických forem sarkomu, méně častý u monofázických forem, jehož příklad je na vyobrazení; ne vždy je však vyšetření cytokeratinů pozitivní, pak záleží na zkušenosti patologa, ale s výhodou, zejména u monofázických forem, můžeme použít PCR;

4b – RT-PCR průkaz fúze SYT/SSX2 pomocí konsensus a specifických primerů u synoviálního sarkomu;

4c – imunohistochemický průkaz exprese myogeninu – regulačního jaderného faktoru charakteristického pro rhabdomyoblasty u různých sarkomů, nejčastěji u rhabdomyosarkomů (RMS), v tomto případě jde o alveolární RMS (hnědá jaderná pozitivita, peroxidáza / diaminobenzidin); diagnosa RMS pomocí imunohistochemie je spolehlivá, je však vhodné nález u alveolárních RMS (nebo při podezření na tento typ RMS) doplňovat pomocí PCR;

4d – RT-PCR průkaz fúze PAX3/FKHR u čtyřech nemocných s alveolárním rhabdomyosarkomem; vyšetření je vhodné pro základní diagnostiku, pro sledování minimální residuální nemoci, případně pro ověření čistoty autologního transplantátu hemopoetických kmenových buněk.



a EWS. Obdobná situace je u **myxoidního liposarkomu** s t(12;16) s fúzí genů CHOP a FUS, případně fúze CHOP a EWS při t(12;22). Ve všech případech je však třeba usilovat o získání čerstvého, tedy nefixovaného operačního materiálu, což závisí na spolupráci s chirurgickými a ortopedickými pracovišti. Přehled nejčastějších nádorově příznačných chromosomálních translokací u mesenchymálních nádorů měkkých tkání a kostí uvádí tabulka 1.

U maligních lymfomů je v praktické diagnostice naší laboratoře zavedena detekce klonospecifických přestaveb imunoreceptorových genů (IGH, IGK, TCR) a translokací: t(14;18) u **folikulárních a některých velkobuněčných lymfomů** (včetně kvantifikace produktu), t(11;14) u **lymfomu z buněk pláště**, u tzv. **velkobuněčného anaplastického lymfomu** translokace zahrnující gen ALK a jeho variantní partnery (nejčastěji gen NPM) a translokací t(11;18)(q21;q21) u **MALT lymfomů** (7-11). U všech těchto onemocnění je vhodné provádět kromě diagnostiky primárního nádoru také vyšetření infiltrace kostní dřeni a to jak vstupní, tak kontrolní. Každé molekulární vyšetření je bezvýhradně nutné konfrontovat s vyšetřením cytologickým nebo histologickým. Například translokace t(8;14) se typicky vyskytuje u Burkittova lymfomu (obr. 3a), ale může se prokázat u některých velkobuněčných lymfomů B řady, T lymfoblastického lymfomu a u mnohotného myelomu. Samotné molekulární nebo cytogenetické vyšetření by tak mohlo vést ke zcestné diagnóze.

Tabulka 1. Přehled nejvýznamnějších specifických chromosomálních translokací se vznikem fúzních genů u nádorů měkkých tkání a kostí. Detekce translokací je významná jako podpora morfologické diagnostiky a v některých případech je vhodná také ke sledování minimální reziduální nemoci.

Typ nádoru	Translokace	Fúzní geny
alveolární rhabdomyosarkom	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	PAX3-FKHR PAX7-FKHR
alveolární sarkom měkkých tkání	t(X;17)(p11.2;q25)	ASPL-TFE3
světlobuněčný sarkom (maligní melanom měkkých tkání)	t(12;22)(q13;q12)	ATF1-EWS
kongenitální fibrosarkom a mesoblastický nefrom	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3
dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB
desmoplastický kulatobuněčný nádor	t(11;22)(p13;q12)	WT1-EWS
endometriální stromální sarkom	t(7;17)(p15;q21)	JAZF1-JJAZ1
Ewingův sarkom a periferní neuroepiteliom	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q12;q12) t(2;22)(q33;q12)	EWS-FLI1 EWS-ERG EWS-ETV1 EWS-EIAF FEV-EWS
zánětlivý myofibroblastický nádor	t(2;19)(p23;p13.1) t(1;2)(q22-23;p23)	ALK-TPM4 TPM3-ALK
myxoidní chondrosarkom, extraskeletální	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11.) t(9;15)(q22;q21)	EWS-CHN(TEC) RBP56-CHN(TEC) TEC-TCF12
myxoidní liposarkom	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	TLS(FUS)-CHOP EWS-CHOP
synoviální sarkom	t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX1 SYT-SSX2

Příkladem v praktické aplikaci molekulární diagnostiky je mnoho, přesahují rámec informativního přehledu. Složení mozaiky výsledků jednotlivých vyšetření (histologického, imunofenotypizačního, hybridizačního a tzv. molekulárního) je tedy právě tím, kam by mělo vyšetření v oboru patologie směřovat. K získání podrobnější představy o klonospecifických přestavbách je třeba produkty PCR dále analyzovat - **sekvenovat**. Zjištěné specifické sekvenční dané IGH/TCR přestavby pak můžeme využít ke konstrukci primerů vhodných pro detekci minimální reziduální nemoci v kostní dřeni postavené na míru specifické pozice přestavb segmentů imunoreceptorových genů konkrétního pacienta.

Sekvenční analýza je samostatnou disciplínou molekulární diagnostiky, která umožňuje identifikovat změny genomu na úrovni nukleotidů – detekce mutací, běžná např. v oblasti genu TP53 (viz např. *data báze mutací na serveru 2. LF UK, Sedláček Z., Trková M.: www.lf2.cuni.cz/projects/germline_mut_p53.htm.*) (12), v oblasti tzv. mutátorových genů (geny kódující proteiny sloužící k reparaci DNA) a v řadě dalších oblastí diagnostiky. Specializovanou problematiku velmi dobře podchycenou především genetiky představují *dědičné predispozice* ke vzniku nádorových onemocnění a vyšetřování zárodečných mutací genů zodpovědných za rozvoj těchto chorob – např. genů APC (13), BRCA1 a BRCA2 u žen s karcinomy mléčné žlázy a ovarií (14), u nemocných s medulárními karcinomy štítné žlázy (15) nebo u rodin se syndromem Lee-Fraumeni (16, 17), či tzv. hereditární nepolyposní kolorektální karcinom - HNPCC (dr. Křepelová, Ústav biologie a lékařské genetiky UK 2. LF a FN v Motole). Možnosti jsou prakticky nevyčerpatelné. Sekvenovat produkty PCR reakcí je také vhodné při diagnostice translokací k ověření specifity detegovaného produktu.

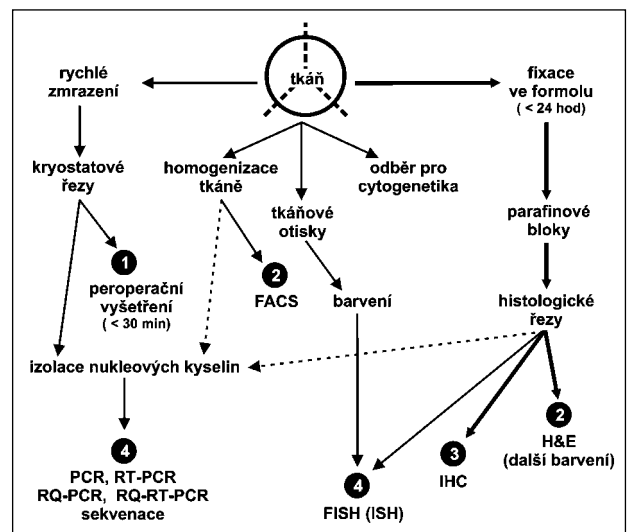
Přednosti PCR a RT-PCR diagnostiky jsou nesporné. Reakce umožní vyšetřit DNA/RNA z obrovského množství buněk. Při výběru nereprezentativního vzorku tkáně však může být v některých případech majoritní příměs buněk, které nejsou předmětem vlastní diagnostiky, a které mohou ovlivnit výsledek reakce - například tzv. smear u převažující polyklonální lymfoidní

populace překrývající specifický pruh minoritně zastoupené nádorové populace monoklonálně přestavěného imunoreceptorového genu, který je diagnostický pro lymfom. Výhodou PCR je vysoká citlivost v identifikaci specifické změny a tím daného typu buňky, která předčí všechny dosud užívané diagnostické přístupy – morfologický a imunofenotypizační (imunohistochemie a průtoková cytometrie). Vysokou citlivost PCR metod běžně využíváme pro diagnostiku nejen primárních patologických procesů (např. lymfomů nebo některých nádorů měkkých tkání), ale také pro diagnostiku procesů diseminovaných do kostní dřeni před, ale zejména také po terapii (detekce tzv. minimální reziduální nemoci) (6, 10).

RT-PCR využívající mRNA identifikuje změny na úrovni transkriptu genu. Aplikuje se nejen tam, kde jsou úseky exonů střídány introny a celá oblast je příliš dlouhá pro DNA PCR diagnostiku, ale také tam, kde je zapotřebí identifikovat produkt transkripce a zjistit, zda je změna v DNA přepisována do RNA. Kvantitativní stanovení transkriptu, např. pomocí LightCycleru (Roche), umožní zjištění účinnosti transkripce a může v mnohých ohledech přispívat k diagnostice (3). **Kvantifikace** specifických úseků nukleových kyselin se stává pro vyšetření mnoha nemocí zásadní. Využívá se metod kvantifikace v reálném čase, tedy kontinuální sledování nárůstu produktu reakce během každého PCR cyklu (**RQ-PCR** a **RQ-RT-PCR**, „real-time quantification“). V některých aplikacích není totiž iden-

tifikace specifické genové změny ve smyslu přítomna / nepřítomna, tak, jak ji stanoví kvalitativní („end-point“) PCR, dostatečná (např. detekce lymfomových buněk v kostní dřeni). Je nutné posoudit, jaké množství specifického produktu je přítomno, tj. sledujeme dynamiku onemocnění a v průběhu času tedy můžeme srovnávat vývoj nemoci a účinnost terapie. Tento přístup je běžný u onemocnění se specifickými geno-

Schéma 1. Ošetření nativního operačního materiálu s odběry pro standardní histopatologická a specializovaná vyšetření. Čísła na černém pozadí určují vyšetření v časových souvislostech a také v logickém sledu podle indikační návaznosti. V odběrech pro extrakci nukleových kyselin jsou vhodnější řezy ze zmrazené tkáně (plná čára) před izolací z homogenátu tkáně nebo z řezů získaných z parafinových bloků po fixaci ve formolu (přerušovaná čára).
FACS – Fluorescence Activated Cell Sorter (průtoková cytometrie); H&E – barvení Hematoxylinem a Eosinem; IHC – Imunohistochemické vyšetření; FISH – Fluorescenční In Situ Hybridizace; ISH – In Situ Hybridizace; RQ-RT-PCR – Real time Quantification-Reverse Transcription PCR



vými přestavbami (např. při translokaci t(14;18) u folikulárních lymfomů) nebo u nemocí se specifickou expresí genů pro dané onemocnění (klonospecifita imunoreceptorových genů u lymfomů, exprese genu kódujícího tyrosin hydroxylázu u neuroblastomů).

Možnosti aplikace molekulární diagnostiky i dalších specializovaných vyšetření komplikují tradiční návyky „chirurgického“ přístupu k ošetření excidovaného nebo resekovaného nádoru – fixace ve formolu. Tento postup se stává opselentní a v dnešní době jej u plánovaných výkonů považujeme za chybu. Je třeba své spolupracovníky z chirurgických oborů vést k širšímu povědomí o možnostech specializované diagnostiky a o výhodách, které přinášejí pro nemocné. Algoritmus vyšetřovacího postupu v našich laboratořích uvádíme ve schématu 1. V případě nouze, kde není možnost hlubokého zmrazení vzorků k následné izolaci nukleových kyselin, doporučujeme tkáň rozdělit a reprezentativní část fixovat v etanolu. Etanol sice není vhodný jako základní fixativum pro histopatologické a imunohistochemické vyšetření, ale na rozdíl od formolu neničí DNA ani mRNA (18).

V blízké budoucnosti lze očekávat rozšiřování spektra uvedených vyšetření. Nevýhody PCR z homogenátů tkání, které mají heterogenní složení, odstraní cílené odběry jednotlivých buněk nebo jejich skupin za pomoci laserové mikrodisekce (19). Přínosem bude nepochybně i využití tzv. sorterů při vyšetření průtokovou cytometrií. Do diagnostiky bude postupně včleňová-

no vyšetření komplexnějšího charakteru a to jak na horizontální úrovni (vyšetření exprese mnoha genů současně pomocí DNA mikročipů, mnoha RNA transkriptů pomocí RNA mikročipů nebo mikročipů zaměřených na zjištění úrovně exprese proteinů), tak na úrovni vertikální – současně stanovení exprese jednoho proteinu, jeho RNA a DNA. Specifické čipové karty s vyšetřením předem definovaného spektra genů deregulovaných u určité nosologické jednotky jsou v současné době zaváděny do diagnostiky u mnohých onemocnění (lymfomy, karcinomy a další) (20). Je jasné, že obor patologie, tak jak je v současnosti provozován, nemůže sám o sobě zabezpečit tato vyšetření. Nicméně by patolog měl stát vedle dalších specialistů (biologů, genetiků) a měl by prosazovat nové diagnostické trendy do praxe. Jen tak bude obor patologie životaschopný. Rudolf Virchow (1821 - 1902) byl průkopníkem patologie ve své době. Takových individualit bylo málo a týmová práce nebyla tak nutná jako dnes. R. Virchow a jeho četní žáci a následovníci používali k diagnostice tehdy moderního přístupu – mikroskopie a histologických technik. I patolog 21. století se musí orientovat na nové laboratorní přístupy a využívat možnosti, které nabízejí. Vidění nemoci jen prizmatem histologického skla se stává věcí minulosti.

Práce na dílčích projektech je podpořena Výzkumnými záměry MZ ČR a FN v Motole 000 000 64203/6073 a MŠMT ČR 1112 0000 5

Literatura

1. Mandáková, P., Kodet, R., Campr, V.: Korelace výsledků průtokové cytometrie a morfologických nálezů v diagnostice maligních lymfomů z B buněk. *Čas. Lék. čes.*, 142, 2003, 651-655.
2. Mrhalová, M., Kodet, R., Strnad, P.: Korelace exprese c-erbB-2 proteinu (detekce metodou FISH) s membránovou expresí erbB-2 proteinu (detekce metodou IHC) u pacientek s karcinomy mléčné žlázy. *Čas. Lék. čes.*, 140, 2001, 553-559.
3. Mrhalová, M., Kodet, R., Kalinová, M., Hilska, I.: Relative quantification of ERBB2 mRNA in invasive duct carcinoma of the breast: correlation with ERBB-2 protein expression and ERBB2 gene copy number. *Pathol. Res. Pract.*, 199, 2003, 453-461.
4. Dahbiová, R., Kodet, R., Soukup, J., Kavan, P., Šmelhaus, V., Koutecký, J.: Amplifikace N-myc onkogenu u nádorů sympatického nervového systému: Předběžná studie s metodickým aspektem a klinickopatologickou korelací. *Čs. patol.*, 33, 1997, 83-88.
5. Cordon-Cardo, C.: Applications of molecular diagnostics: solid tumor genetics can determine clinical treatment protocols. *Mod. Pathol.*, 14, 2001, 254-257.
6. Sumerauer, D., Vicha, A., Kucerova, H., Kodet, R., Houskova, J., Bedrnicek, J., Eckschlagler, T.: Detection of minimal bone marrow infiltration in patients with localized and metastatic Ewing sarcoma using RT-PCR. *Folia Biol (Praha)*, 47, 2001, 206-210.
7. Soukup, J., Kodet, R., Dahbiová, R., Trka, J., Zuna, J.: Detekce monoklonality u dětských lymfomů polymerázovou řetězovou reakcí. *Čs. patol.*, 34, 1998, 131-135.
8. Kodet, R., Mrhalová, M., Krsková, L., Soukup, J., Campr, V., Neskudla, T., Szepe, P., Plank, L.: Mantle cell lymphoma: improved diagnostics using a combined approach of immunohistochemistry and identification of t(11;14)(q13;q32) by polymerase chain reaction and fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch.*, 442, 2003, 538-547.
9. Kodet, R., Mrhalová, M., Krsková, L., Stejskalová, E.: Anaplastický velkobuněčný lymfom: přehled problematiky. *Čs. patol.*, 39, 2003, 102-114.
10. Mrhalová, M., Krsková, L., Kalinová, M., Soukup, J., Kodet, R.: Folikulární lymfomy: molekulární diagnostika t(14;18)(q32;q21) - fluorescenční in situ hybridizace, kvalitativní a kvantitativní PCR. *Čs. patol.*, 39, 2003, 130-137.
11. Soukup, J., Krsková, L., Campr, V.: Nové pohledy na problematiku MALT lymfomu žaludku. *Čs. patol.*, 39, 2003, 120-125.
12. Sedlacek, Z., Kodet, R., Poustka, A., Goetz, P.: A database of germline p53 mutations in cancer-prone families. *Nucleic Acids Res.*, 26, 1998, 214-215.
13. Kohoutova, M., Stekrova, J., Jirasek, V., Kapras, J.: APC germline mutations identified in Czech patients with familial adenomatous polyposis. *Hum. Mutat.*, 19, 2002, 460-461.
14. Machackova, E., Damborsky, J., Valik, D., Foretova, L.: Novel germline BRCA1 and BRCA2 mutations in breast and breast/ovarian cancer families from the Czech Republic. *Hum. Mutat.*, 18, 2001, 545.
15. Jindrichova, S., Kodet, R., Krskova, L., Vlcek, P., Bendlova, B.: The newly detected mutations in the RET proto-oncogene in exon 16 as a cause of sporadic medullary thyroid carcinoma. *J. Mol. Med.*, 81, 2003, 819-823.
16. Sedlacek, Z., Kodet, R., Seemanova, E., Vodvarka, P., Wilgenbus, P., Mares, J., Poustka, A., Goetz, P.: Two Li-Fraumeni syndrome families with novel germline p53 mutations: loss of the wild-type p53 allele in only 50% of tumours. *Br. J. Cancer*, 77, 1998, 1034-1039.
17. Trkova, M., Foretova, L., Kodet, R., Hedvicakova, P., Sedlacek, Z.: A Li-Fraumeni syndrome family with retained heterozygosity for a germline TP53 mutation in two tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 145, 2003, 60-64.
18. Soukup, J., Krskova, L., Hilska, I., Kodet, R.: Ethanol fixation of lymphoma samples as an alternative approach for preservation of the nucleic acids. *Neoplasia*, 50, 2003, 300-304.
19. Orba, Y., Tanaka, S., Nishihara, H., Kawamura, N., Itoh, T., Shimizu, M., Sawa, H., Nagashima, K.: Application of laser capture microdissection to cytologic specimens for the detection of immunoglobulin heavy chain gene rearrangement in patients with malignant lymphoma. *Cancer*, 99, 2003, 198-204.
20. Ciro, M., Bracken, A. P., Helin, K.: Profiling cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 2003, 213-220.