

Beatrice Mohelníková-Duchoňová
ONK FN Olomouc

LABORATORNÍ METODY V ONKOLOGII

ÚVOD

- ◉ V širším pojetí:
 - > metody k vyšetření onkol. pacienta:
(Biochemie, KO, koagulace, moč, punktáty, etc.)
- ◉ V užším pojetí:
 - > METODY VYUŽÍVÁNY K VYŠETŘENÍ N. BUNĚK a MARKERŮ

VYŠETŘOVACÍ METODY- PACIET

- ◉ Sedimentace, KO – cave: leukocytóza, trombocytóza,
- ◉ Biopsie kostní dřeně
- ◉ Moč
- ◉ Cave CRP
- ◉ Základní biochemie: nutrice, z meta postižení- jater, kostí, z útlaku –ŽC, KPS, z rozpadu
- ◉ Nádorové markery – není univerzální

NÁDOROVÉ MARKERY

- hCG (30 léta minulého století)
- Onkofetální antigeny
(hCG, AFP, CEA, PLAP)
- Tkáňově a orgánově specifické antigeny
(PSA, NSE, protein S-100, rozpustné fragmenty cytokeratinů (TPA, TPS, CYFRA 21-1), většina CA antigenů, SCC, thyreoglobulin, hormony a jejich prekursory (C-peptid u insulinomu)
- Nespecifické antigeny (LDH, TK, paraneo)

NÁDOROVÉ MARKERY

- ◉ Solubilní markery - klasické nádorové markery, různá chemická povaha
- ◉ Cirkulující buněčné elementy – cirkulující nádorové buňky, cirkulující endotelové buňky a jejich prekurzory
- ◉ Genetické abnormality – detekce mutací v onkogenech a tumor supresorových genech, proteinové produkty onkogenů, další změny

NÁDOROVÉ MARKERY

- ◉ Solubilní markery - klasické nádorové markery, různá chemická povaha
- ◉ Cirkulující buněčné elementy – cirkulující nádorové buňky, cirkulující endotelové buňky a jejich prekurzory
- ◉ Genetické abnormality – detekce mutací v onkogenech a tumor supresorových genech, proteinové produkty onkogenů, další změny

Metody stanovení nádorových markerů

- Většinou imunochemická analýza
- Principem je vazba antigenu a specifické protilátky
- Detekce komplexu- značení
- ELISA,RIA,FIA,CLIA,IRMA,EMIT.....
 - radioimunoanalýza – RIA, IRMA - enzymoimunoanalýza - ELISA, EIA, MEIA - fluorescenční analýza - FPIA, TRACE - chemiluminiscence - CLIA
 - Používat stále stejnou metodu a diagnostickou soupravu od jedné firmy! (event. rebaselining)
- Koncentrace markerů v séru se pohybují ve velice nízkých hodnotách ug/l, ng/l

VYŠETŘOVACÍ METODY- NÁDOROVÉ BUŇKY

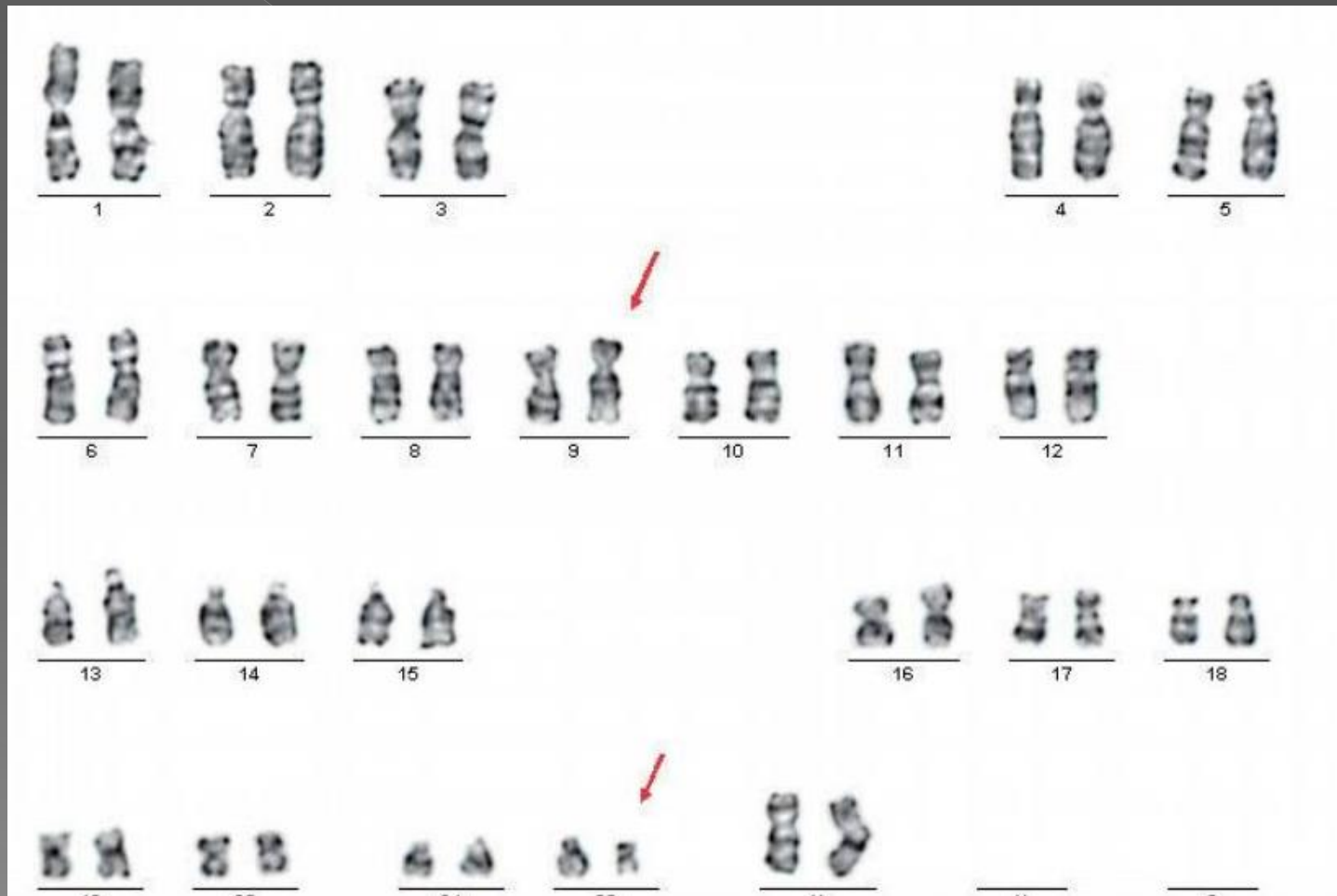
- ◉ KARYOTYP
- ◉ FISH (SKY)
- ◉ CGH
- ◉ PCR
- ◉ Real-time PCR
- ◉ SEKVENOVÁNÍ
- ◉ RFLP
- ◉ HYBRIDIZACE na membráně, IHC
- ◉ MICROARRAY

KARYOTYP

- Cytogenetické vyšetření umožňuje průkaz numerických a hrubých strukturálních aberací chromosomů
- Výhody: široká škála chrom. změn
- Nedostatky: menší citlivost, častá neúspěšnost
 - > Negativní výsledek hodnotit opatrně
- Podmínky: sterilní vzorek v kultivačním mediu
 - > Dostatek dělicích buněk- hodnotitelné mitózy
 - > Bb. v metafázi fixovány a obarveny

KARYOTYP II

Obr. 1: karyotyp 46,XX, t(9,22)

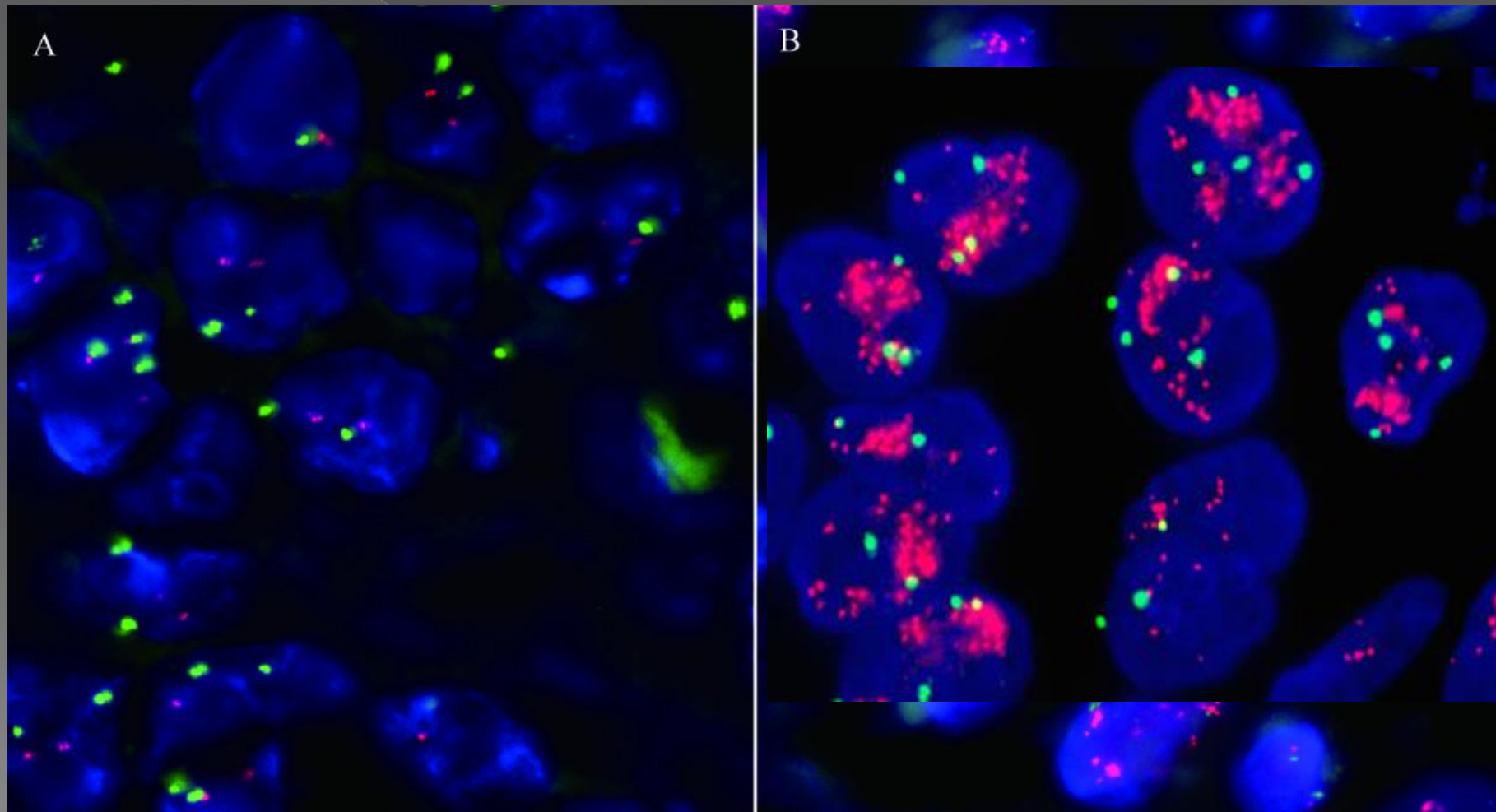


FISH

- Fluorescenční in situ hybridizace
- Cytogenetická metoda založená na vazbě fluorescenčně značené sondy k NA přítomné ve vzorku buněk fixovaných na podložním sklíčku a jejich detekci fluorescenčním mikroskopem
- Sondy: centromerické (numerické aberace), specifické pro danou sekvenci (amplifikace, delece), malovací (painting)
- Výhody: lze vyšetřit i interfazické bb., bb. s nedostatečně protaženými chromozomy
- Podmínky: vzorek ve fyziol. roztoku

FISH II

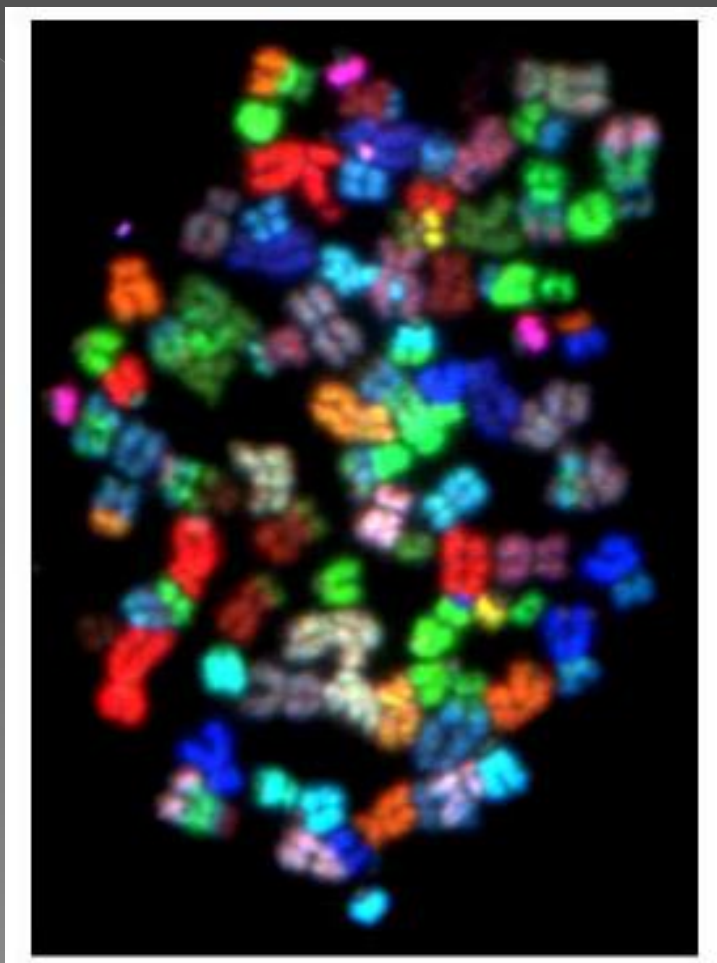
Obr. 2: FISH HER2- růžová sonda, centromera 17 chromosomu- zelená sonda



FISH III

- Metoda umožňuje označit část chromosomu o velikosti 500 000- 10mil nukleotidů
- Fibre FISH – 1000
- Multiplex FISH- několik v jednom jádře
- RNA FISH- sledování transkripce
- SKY FISH (spectral karyotyping)- barevná identifikace všech lidských chromosomů
 - 24 malovacích sond, interferometr

Obr. 3: spectral karyotyping- SKY FISH



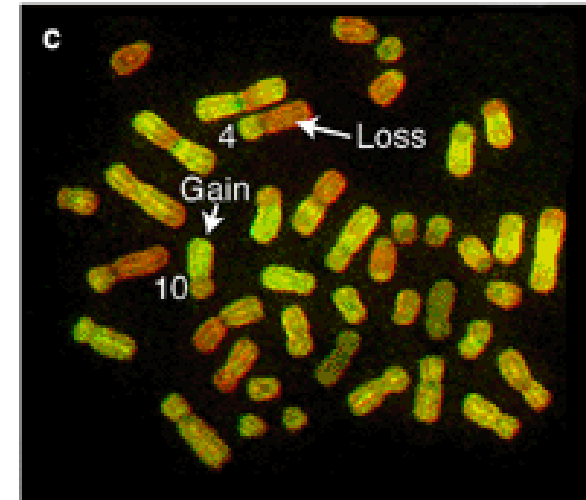
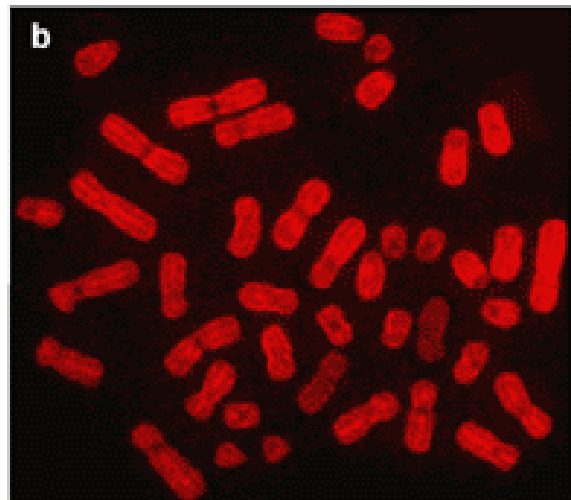
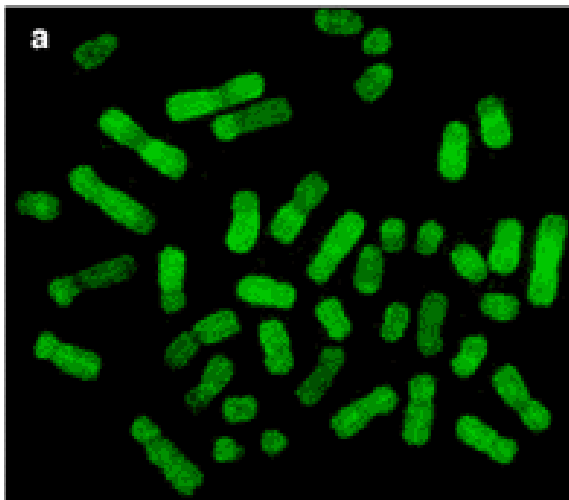
CGH I

- Komparativní genomová hybridizace
- Modifikace FISH
- Normální a studovaná DNA jsou označeny fluorochromy a jsou hybridizovány na normální chromosomy v metafázi
- Fluorescence se snímá kamerou a vyhodnocuje počítačem
- Ideální metoda k zjišťování chybění či zmnožení DNA, nelze použít k balancovaným translokacím

CHG II

- Výhoda: používá se izolovaná DNA, není nutno získat dělící se buňky, lze použít archivní materiál, parafínové řezy

Obr. 4: CGH metastáza renálního karcinomu u von Hippel Lindau syndromu
A) Nádorová DNA- mutace genu **VHL** (3p25), B) kontrolní DNA

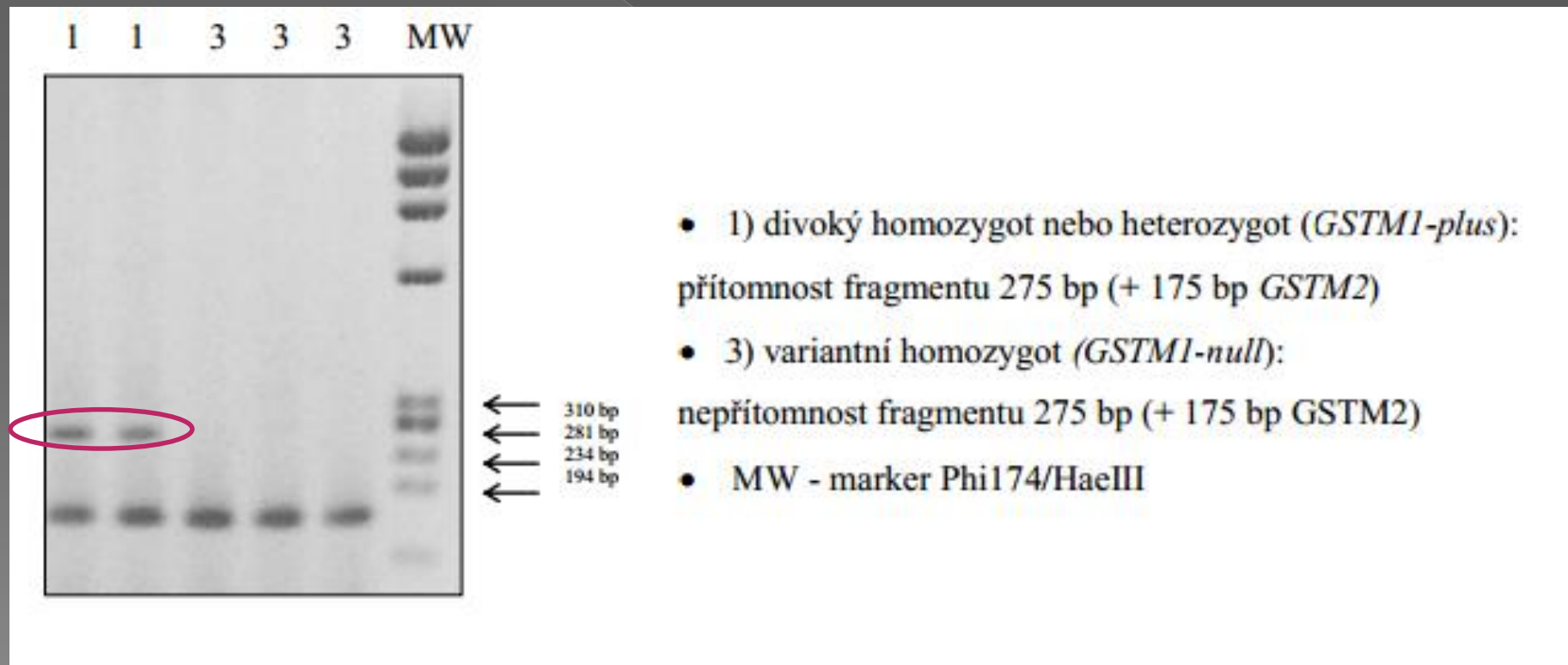


PCR I

- Polymerázová řetězová reakce
- Umožňuje několikanásobné pomnožení specifických úseků DNA 2^n , kdy n je počet cyklů
- Stovky až tisíce bází
- Produkt lze prokázat elektroforézou po obarvení
- Podstata je opakovaná cyklická enzymatická syntéza DNA o 3 fázích: denaturace DNA- hybridizace s primery- syntéza
- Střídáním teplot v cyklu 92°C - X - 72°C
- Polymeráza, deoxynukleotid trifosfáty, primery, pufr s ionty

PCR II

Obr. 5: Určení genotypu *GSTM1* dle velikosti fragmentů z 3% agarózového gelu

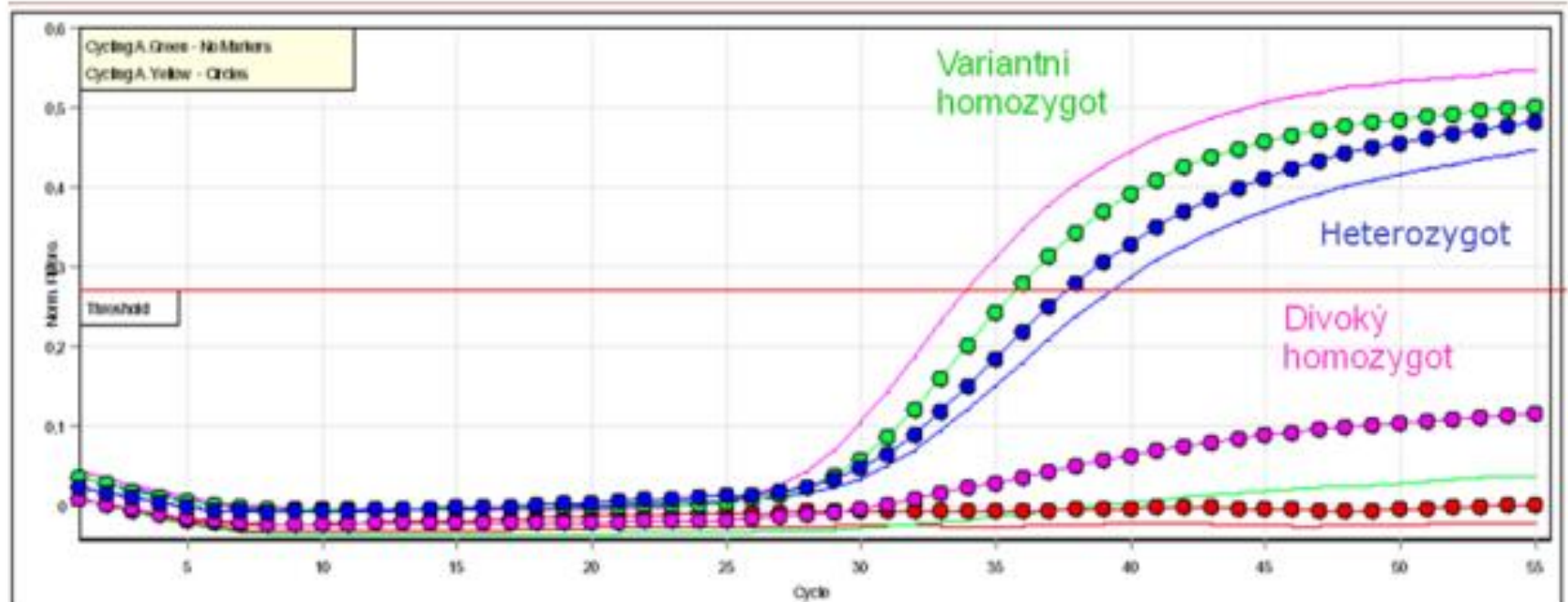


Real-time PCR I

- PCR v reálném čase, která umožňuje kvantitativní měření
- PCR probíhá ve speciálních cyklerech, které jsou připojeny k počítači se speciálním hodnotícím softwarem (ligh cyclers, rotor gene, ...)
- Umožňují měřit fluorescenci po každém cyklu, přičemž primery jsou značeny fluorochromy, které emitují světlo pouze pokud jsou navázány do produktu reakce

Real-time PCR II

Obr. 6: Určení genotypu *ADH1C*- výstup

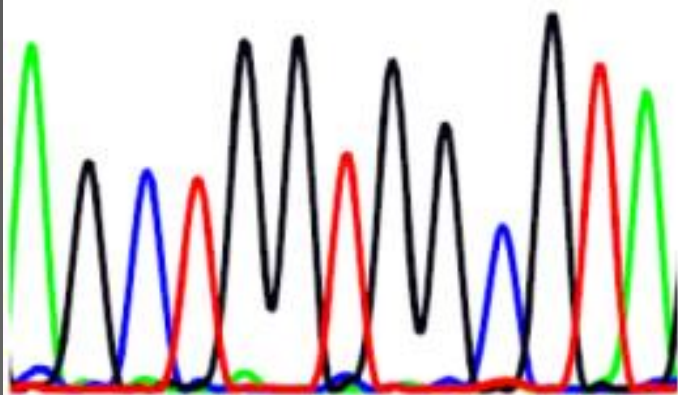


SEKVENOVÁNÍ

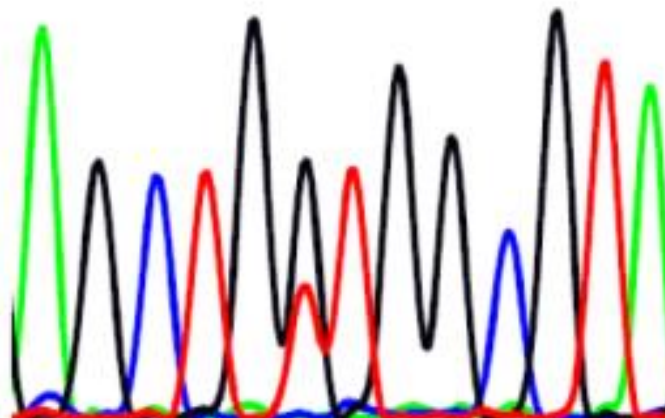
- Určování pořadí bází DNA, které se provádí Sangerovou metodou
- Založena na PCR s jedním primerem ve čtyřech zkumavkách, kdy v každé je jeden z nukleotidů nahrazen dideoxynukleotidem- ukončí syntézu
- Automatické analyzátory využívají kapilární elektroforézu a dideoxynukleotidy jsou fluorescenčně značené každý jiným fluorochromem
- Klinický význam dříve malý, nyní NGS v důsledku cílené terapie

Obr.7: Stanovení KRAS mutací sekvenací DNA

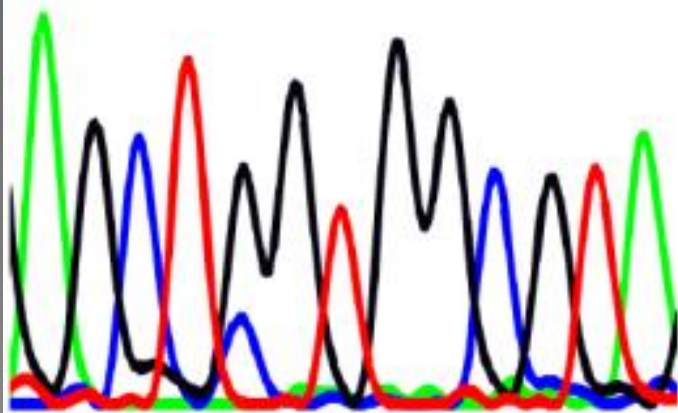
wild
A G C T G G T G G C G T A



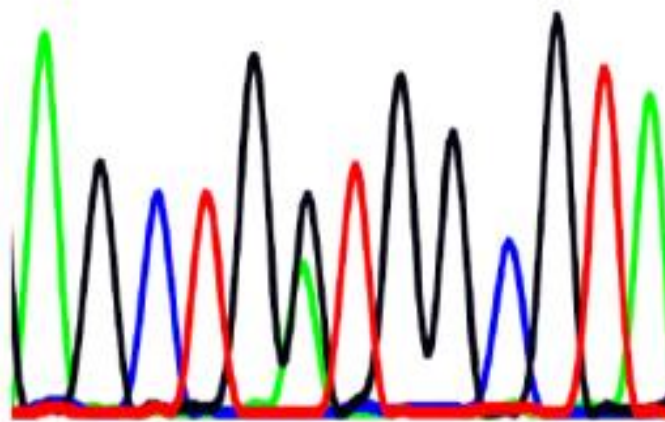
12V
A G C T G G/T T G G C G T A



12R
A G C T G/C G T G G C G T A



12D
A G C T G G/A T G G C G T A



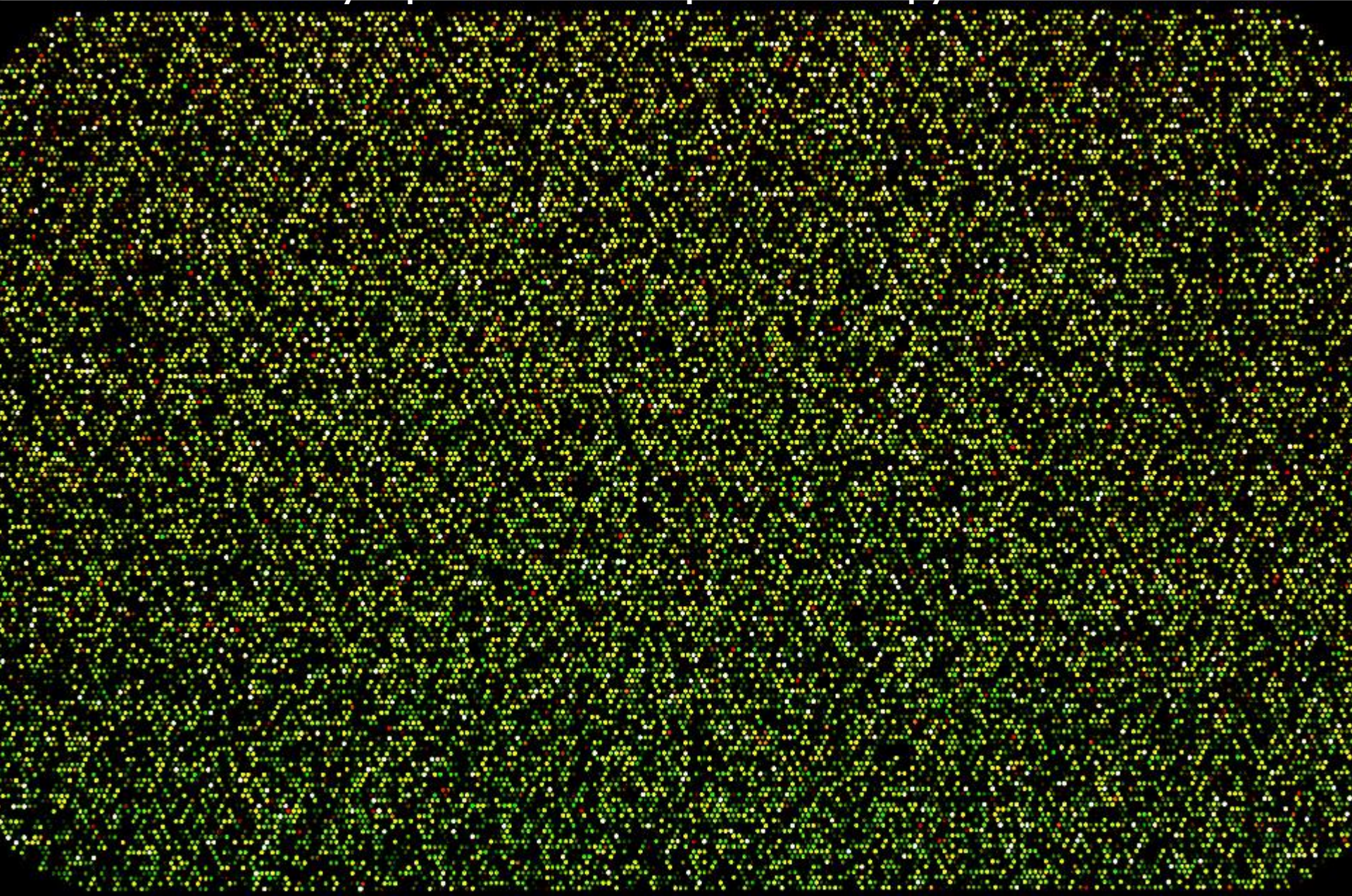
NGS

- Sekvenování nové generace- řada metod, ale obecně zjednodušení a zlevnění sekvenování pomocí kratších klíčových fragmentů, které po namnožení jsou sekvenovány paralelně
- Využívá se nepř. k celogenomovému sekvenování
- V klinické onkologii pro cílenou terapii

WESTERN BLOTTING I

- ◉ Umožňuje přenést protein na membránu
- ◉ Proteiny jsou izolovány, elektroforeticky rozděleny, přeneseny na membránu a na ní detekovány specifickou protilátkou
- ◉ Nevýhody: není příliš citlivá
- ◉ Výhody: levná a specifická
- ◉ Další hybridizace na membráně: Southern blotting- DNA, Northern blotting RNA
- ◉ Hybridizace na biočipu- microarray- hybridizace probíhá na skleněné destičce, na které je ukotveno velké množství sond

Obr.8: Příklad výstupu hodnocení exprese mikročipy

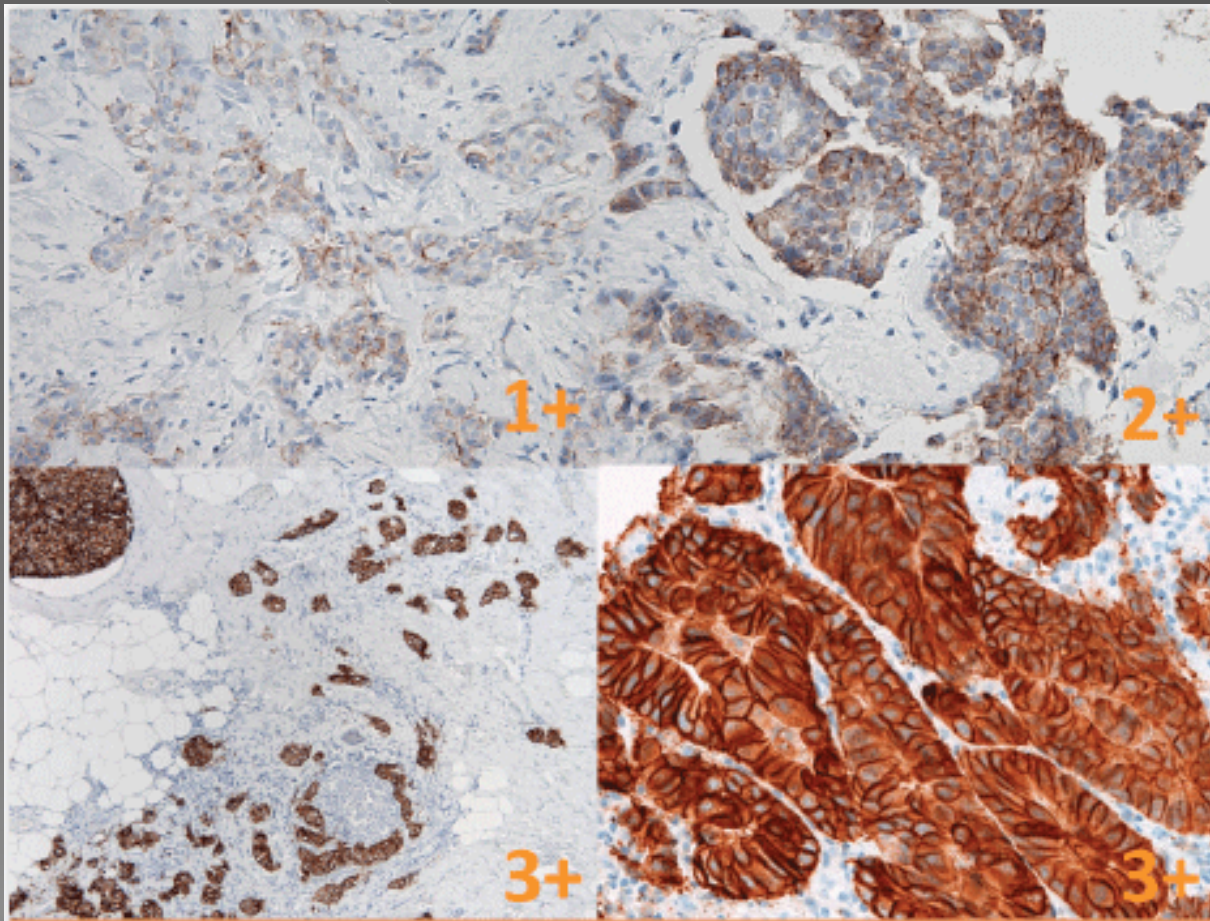


IMUNOHISTOCHEMIE

- Histologická metoda, při níž se ve vyšetřovaném vzorku tkáně prokazuje přítomnost určitých antigenů pomocí specifických protilátek s navázanými chemickými sloučeninami, které umožňují jejich průkaz např. imunoperoxidázová reakce.
- Průkaz různých antigenů protilátkou
- Antigeny: receptory, enzymy, transkripční faktory
- Po navázání protilátky na antigen je vzniklý komplex nutno zviditelnit pomocí dalšího kroku. Pro tento krok je užívána tzv. sekundární protilátka, navázaná s polymerem, dovolující amplifikaci signálu- např. diaminobenzidin- má hnědočernou barvu nebo FastRed- má červenou barvu, ev. fluorescenční barviva (FITC, Cy3 apod.).

IMUNOHISTOCHEMIE II

- Obr.9: Imunohistochemie HER 2



DETEKCE HER-2/neu u ca mammy

- Musí být prováděna u všech nově dg. Invazivních karcinomů patologem automaticky, NIKOLI NA VYŽÁDÁNÍ KLINIKA
- Doporučeno sekvenční testování: IHC-ověření ISH
 - > U pozitivních IHC
 - > U případů se zvýšenou diskordantního fenotypu (IHC-/ISH+)
 - Karcinomy jiné než tubulární, lobulární, mucinózní, které vykazují ztrátu exprese ER či PR (méně než 5%)
- IHC 2+ a 3+ z nereferenčních lab. automaticky preposílány do RL (nikoli na vyžádání onkologa)

Závěr

- ◉ Laboratorní metody se využívají:
 - > Diagnostiku maligního onemocnění, včetně prognostických markerů
 - > Volbu nejefektivnější léčby
 - > Monitoraci pacienta během léčby
 - > Monitoraci efektu léčby
 - > Monitoraci pacienta po léčbě, hodnocení léčebné odpovědi, eventuálního relapsu
 - > Výzkumu a vývoji