



In situ hybridizace (ISH) je metoda molekulárně cytogenetická, která je hojně využívána mimo jiné také v laboratořích molekulární patologie. Základním principem této metody, jak již z názvu vyplývá, je hybridizace, tedy párování denaturovaného vlákna vyšetřované DNA s „umělým“ krátkým značeným úsekem nukleové kyseliny, který se nazývá sonda. Celý tento proces pak probíhá přímo v jádře vyšetřovaných buněk v dané tkáni – in situ (na místě).

Využití in situ hybridizace s detekcí stříbrem (SISH) v rutinní histopatologické diagnostice v laboratořích molekulární patologie

MUDr. TOMÁŠ ROZKOŠ, Ph.D.

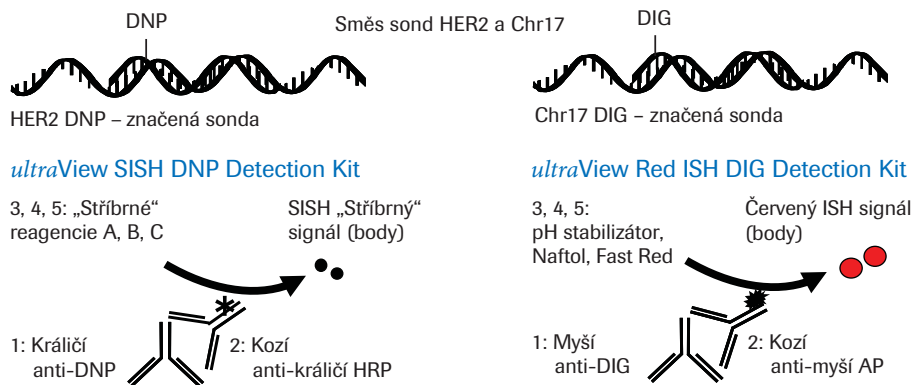
Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Úvod

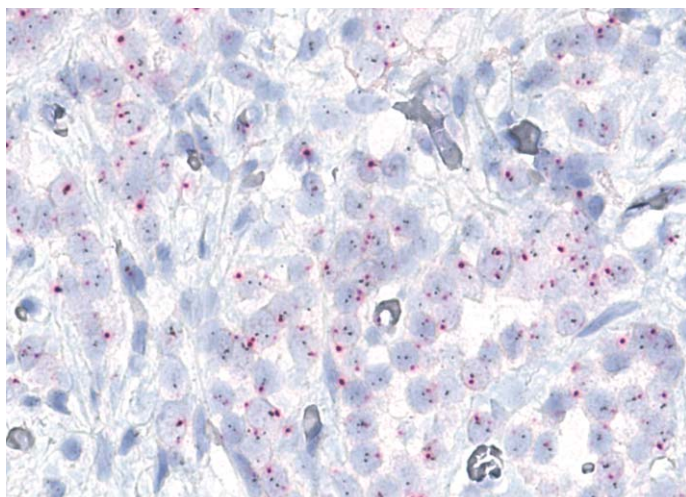
Metoda ISH se vyskytuje v řadě modifikací, které jsou dány jednak různými typem sond a jednak různými možnostmi značení, respektive detekce hybridizované sondy. Mezi nejčastější typy sond, se kterými se na poli molekulární patologie setkáváme, patří sondy kvantifikační, jež obvykle značí konkrétní část genu, popřípadě centromerickou oblast příslušného chromozomu, a které slouží ke stanovení numerických aberací (delece nebo amplifikace, případně aneusomie). Druhou hlavní skupinu sond pak představují sondy sloužící k zachycení přestavby/přesunu genu nebo jeho části z původního místa v určitém chromozomu. V tomto případě se používají současně

minimálně 2 sondy, přičemž každá je značená jiným chromogenem. Sem spadají dvě podskupiny, a to sondy fúzní (negativní nálezy = barevné signály jsou oddělené, pozitivní nálezy = barevné signály se překrývají/splývají) a sondy tzv. break-apartové, které mají přesně opačný princip (negativní nálezy = barevné signály se překrývají/splývají, pozitivní nálezy = barevné signály jsou oddělené).¹⁾ ISH lze také členit podle metody detekce příslušné sondy. Nejstarším a stále nejrozšířenějším způsobem detekce je fluorescenční in situ hybridizace (FISH), která využívá ke značení sond fluorochromy, a preparáty je nutné prohlížet ve speciálním fluorescenčním mikroskopu. Vedle toho však existují také metody používající ke značení sond chromogeny (CISH), které jsou viditelné ve světelném poli, a tudíž nepotřebují k hodnocení fluorescenční mikroskop. Podvariantou CISH je pak metoda, která k detekci jedné ze sond využívá vizualizaci pomocí stříbra (SISH). Těto metodě budou věnovány následující odstavce.

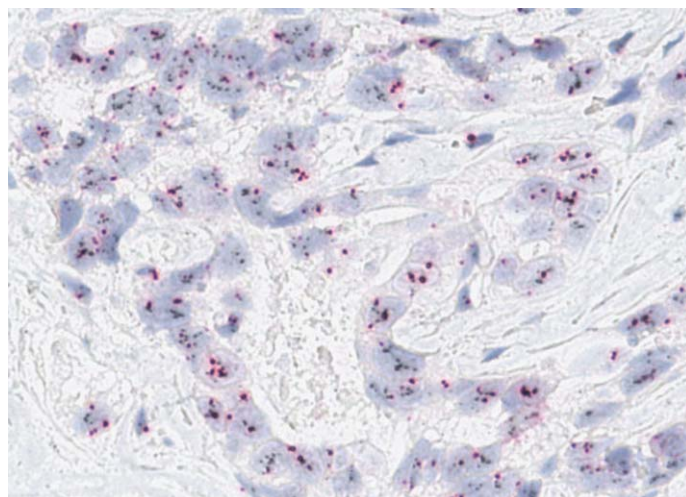
Na našem pracovišti dlouhodobě využíváme metodu Dual ISH k detekci případné amplifikace genu *ERBB2* (kodujícího protein HER2) u karcinomů



▲ Obr. č. 1 : Schéma hybridizace značenou sondou a následné detekce (vizualizace) chromogenem a stříbrem



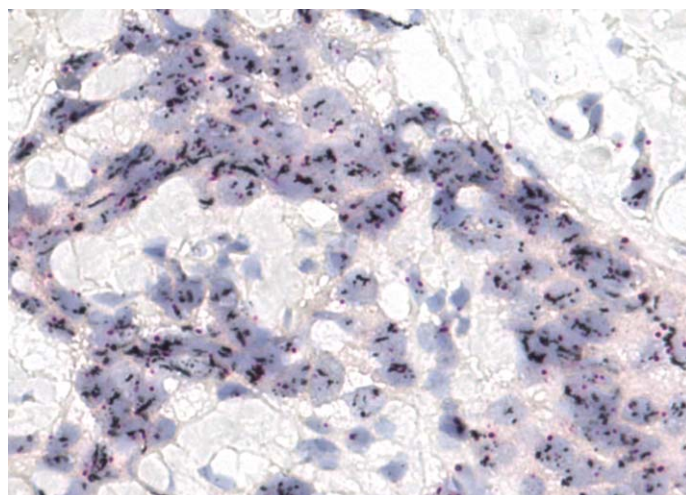
▲ Obr. č. 2: Normální (fyziologický) nále. V buňkách jsou povětšinou patrné 2 kopie genu *ERBB2* (černý signál) a zároveň 2 kopie centromerické oblasti chromozomu 17 (červený signál). Zvětšení 400x



▲ Obr. č. 3: Mírná amplifikace genu *ERBB2*. V jádrech nádorových buněk je patrný zvýšený počet černých signálů (většinou 4 až 6) genu *ERBB2*. Zvětšení 400x

prsu a žaludku, přičemž detekce probíhá v přístroji Ventana BenchMark ULTRA od firmy Roche. Při tomto vyšetření je detekována centromerická oblast chromozomu 17 pomocí sondy značené digoxigeninem (DIG), která je následně vizualizována pomocí červeného chromogenu a je tedy v jádrech patrná jako červená tečka. Dále je pak detekován gen *ERBB2* pomocí sondy značené dinitrofenolem (DNP), která je následně vizualizována pomocí stříbra a je v jádrech patrná jako černý signál (obr. č. 1).²⁾ Za účelem lepší orientace ve tkáni je pak celý preparát dobarven jaderným značením (nejčastěji hematoxylinem). V normálních jádrech nenádorových buněk, které zároveň slouží jako vnitřní kontrola ve vzorku, bychom tedy měli najít 2 červené a 2 černé signály (obr. č. 2). V malé míře mohou být přítomna i jádra pouze s 1 kopií některého ze signálů, což je dáno rovinou řezu, kdy může dojít k „rozkrojení“ příslušného jádra, takže v preparátu je přítomna pouze jeho část. V případě amplifikace nacházíme v jádrech zvýšený počet černých signálů genu *ERBB2* (obr. č. 3), nebo dokonce shluky (clustery) černých signálů (obr. č. 4). V rutinní praxi je stanovován poměr průměrného počtu signálů genu *ERBB2* (černý signál) a centromerické oblasti chromozomu 17 (červený signál), který je vyhodnocen

► Obr. č. 4: Výrazná amplifikace genu *ERBB2*. V jádrech nádorových buněk jsou patrné shluky (clustery) černých signálů genu *ERBB2*, jejichž počet nelze přesně kvantifikovat, lze jej pouze odhadnout na základě porovnání velikosti clusteru s jednotlivým signálem. Zvětšení 400x

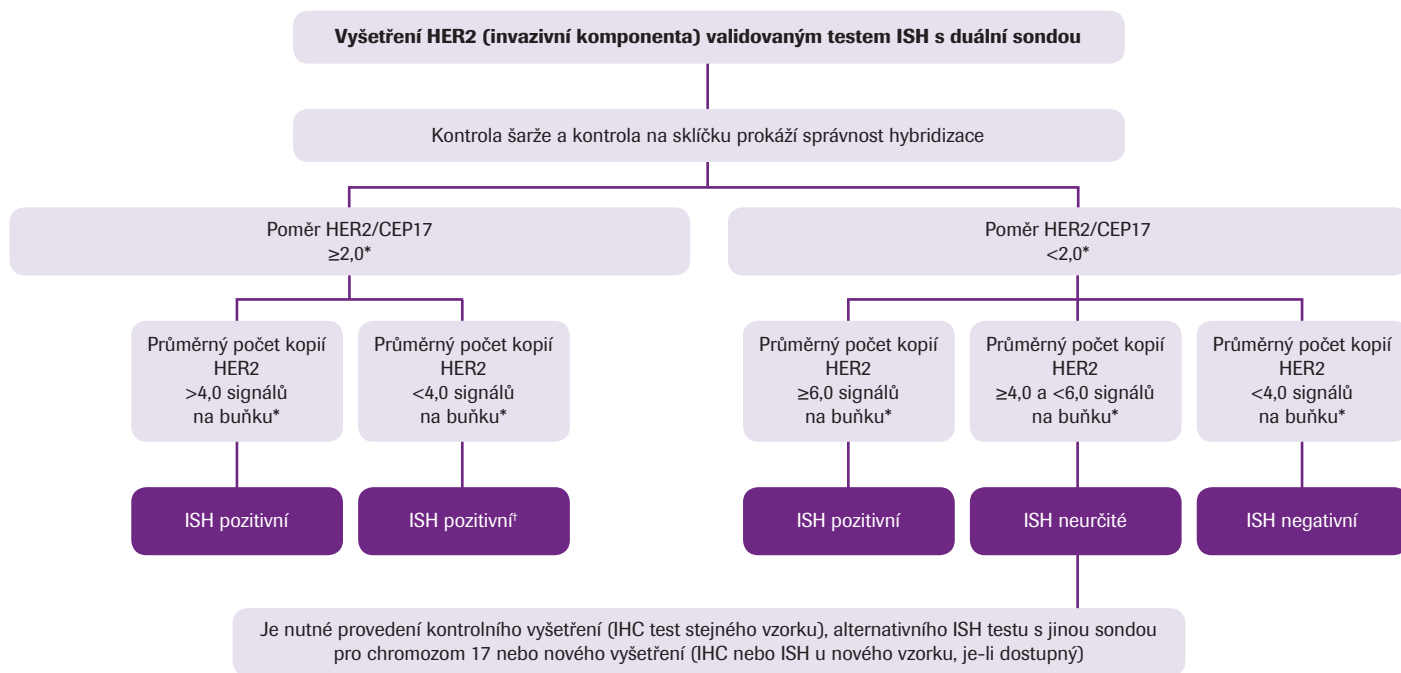


z minimálně 20 jader nádorových buněk (na našem pracovišti rutinně hodnotíme 50 jader). Rozhodnutí, zda je nádor amplifikovaný či neamplifikovaný, se pak řídí dle Doporučeného postupu pro zpracování a vyšetření bioptických vzorků prsu Společnosti českých patologů (obr. č. 5 – viz citace 3, schéma 3, str. 7).³⁾

Výhody, nevýhody a limitace metody SISH

Hlavní výhodou metody SISH v porovnání s klasickou metodou FISH je jednoznačně možnost hodnotit výsledek detekce ve světelném poli, tudíž není zapotřebí nákladný a speciální fluorescenční

mikroskop, jehož provoz je taktéž finančně náročný (zejména výměna rtuťové výbojky). K hodnocení SISH skel stačí „běžný“ světelný mikroskop. Další výhodou oproti FISH je poměrně dobrá stálost výsledných barevných signálů, což umožňuje vyhodnocení skla archivovat a eventuálně se k nim v budoucnu vrátit, například v případě revize staršího případu v souvislosti s aktuálně řešeným vzorkem, pro edukační či publikační účely nebo pro účely posuzování kvality detekce a hodnocení na daném pracovišti. Mezi výhody také jednoznačně patří lepší orientace ve tkáni v porovnání s FISH, neboť u SISH je díky dobarvování patrná lokalizace buněk, které mají být hodnoceny, zatímco u FISH vyšetření je pozadí



* Hodnocení uvnitř homogenní a souvislé populace

† Podrobnosti o hodnocení této málo časté situace viz http://www.asco.org/sites/www.asco.org/files/final_her2_testing_ds_10-3-13.pdf

▲ Obr. č. 5: Schéma vyšetření HER2 pomocí *in situ* hybridizace se dvěma sondami (upraveno dle Wolff AC et al, JCO 2013), převzato z: Nenutil R, Ryška A: Doporučený postup pro zpracování a vyšetření biptických vzorků prsu. Společnost českých patologů, 2013; 7

tmavé a jsou patrná pouze jádra buněk. Tento rozdíl má největší význam u malých tkáňových vzorků s limitovaným počtem hodnocených jader a také u vzorků, kde jsou hodnocené buňky přítomny difuzně ve směsi s jinou (nenádorovou) buněčnou populací (stromální a zánětlivé elementy), jako je tomu typicky v případě hodnocení amplifikace genu *ERBB2* u lobulárního karcinomu prsu nebo u difuzního karcinomu žaludku. Zásadní pro hodnocení ISH metod obecně je totiž posuzovat hybridizaci v jádrech příslušných nádorových buněk bez příměsi „nenádorových“ jader, která mohou vést k falešně negativnímu výsledku interpretace, aniž by byla na vině preanalytická či analytická fáze. Mezi výhody SISH lze také počítat možnost nepoměrně snazšího zhotovení virtuálních preparátů či jakékoli jiné obrazové dokumentace, a tím i snadnější možnost využití této metody pro publikační a vzdělávací účely.⁴⁾

Absolutní nevýhody v porovnání s jinými ISH metodami nejsou autorovi známy. Volba metody (SISH nebo FISH) je

do značné míry dána subjektivní preferencí a zkušeností (zvykem) hodnotícího lékaře či biologa, přičemž obě metody vykazují velmi dobrou míru shody a jsou zaměnitelné.⁵⁾ Určitou limitací je fakt, že jednotlivé barevné signály mohou mít lehce nepravidelnou velikost a neostré okraje, což stěžuje hodnocení zejména při posuzování vzdálenosti a postavení signálů (tedy u sond fúzních a break-apartových). Někdy je metodě SISH vyčítáno také to, že v případech použití kvantifikačních sond, kdy je ve tkáni (nádoru) nalezena výrazná amplifikace detekovaného genu, která se manifestuje tvorbou objemných shluků (clusterů), nelze s přesností stanovit počet signálů v jednotlivém clusteru. Tato výtká se nám však zdá být neopodstatněná, neboť stejný problém je také u ostatních ISH metod, a navíc tento limit nemá praktický dopad, neboť je-li nalezena amplifikace, tak její míra nijak neovlivňuje případnou diagnózu nebo léčbu. Za hlavní limit tak dnes lze považovat skutečnost, že SISH a CISH sondy jsou dostupné pro vyšetření menšího počtu genů v porovnání

s počtem FISH sond, ale tato situace se může během krátké doby změnit.

Úskalí preanalytické a analytické fáze SISH vyšetření

Výhodou řešení problémů s detekcí signálů u všech ISH je, že není potřeba žádná zvláštní pozitivní či negativní kontrola. Ve tkáni by měly být vždy přítomny alespoň „nějaké“ signály. Tento fakt slouží jako pozitivní kontrola a chrání tak před falešně negativními výsledky. V patologii navíc většinou hodnotíme histologické preparáty, ve kterých je kromě vyšetřovaných buněk (nejčastěji nádor) přítomna i jiná (nenádorová) tkáň, u níž by měl mít počet kopií daného barevného signálu (genu) v normální somatické diploidní buňce vždy hodnotu dva. Pokud je v „normální“ (zdravé/nenádorové) tkáni přítomen větší nebo menší počet signálů než dva, nesmí se ISH vyšetření hodnotit z důvodu možné falešné pozitivity či negativy výsledku.



a. Absence signálů

Největším problémem při kompletní absenci signálů ve tkáni (obr. č. 6) je určit, zda se jedná o problém ve vyšetřované tkáni (preanalytickou chybu) nebo o chybu vlastního detekčního postupu (analytickou chybu). Určitým vodítkem může být výsledek detekce v dalších vzorcích, které byly vyšetřovány současně s problémovým případem. Pokud se stejná chyba vyskytuje u více vzorků ve stejném kole, velmi pravděpodobně se jedná o analytickou chybu. V izolovaném případě je pravděpodobnější preanalytická chyba, kterou nejčastěji bývá nevhodná nebo nepřiměřená fixace vyšetřované tkáně formalinem. Podle našich zkušeností je nejčastější preanalytickou chybou negativně ovlivňující výsledek příliš dlouhá fixace tkáně, která přesahuje 3 až 4 dny v závislosti na velikosti vzorku. Takové vzorky jsou nevyšetřitelné, jelikož je DNA již degradována. Tento fakt podporuje také nemožnost provedení vyšetření DNA metodou PCR u „přefixovaných“ vzorků. Naopak nedostatečný čas fixace nebo snížená kvalita formalinu (nepřesná koncentrace nebo pH) kupodivu, alespoň z naší zkušenosti, takový vliv na vyšetření DNA metodami FISH či PCR nemá. V každém

případě je doporučeno při negativním výsledku detekci zopakovat.²⁾ Na našem pracovišti se nám osvědčilo na dané sklo se vzorkem přidat ještě řez ze tkáně, u které máme jistotu, že netrpí preanalytickou chybou, a která v tomto případě slouží jako kontrolní vzorek (např. tkáň již dříve ISH vyšetřená, bez technického limitu). V takovémto případě je možné typ chyby odhalit ihned (pokud je kontrola pozitivní = preanalytická chyba, obě tkáně negativní = analytická chyba).

b. Slabá intenzita signálů

Dalším problémem, se kterým se v rutinní diagnostice můžeme setkat, je slabá intenzita jednoho nebo více (obou) barevných signálů nebo velmi malá velikost signálů (obr. č. 7). V těchto případech se většinou jedná o preanalytickou chybu (zejména nevhodná fixace). V některých případech je možné tento nedostatek ve vzorku kompenzovat úpravou detekčního postupu, např. prodloužením doby trávení proteázou nebo prodloužením inkubačního času příslušného chromogenu.²⁾

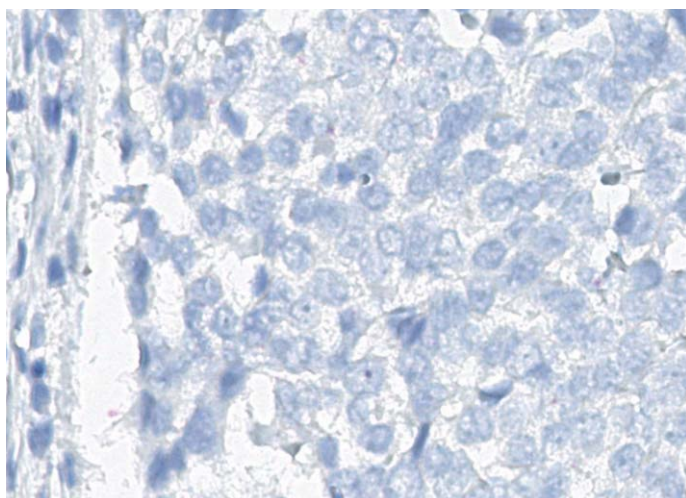
c. Chybění signálů jedné barvy

V těchto situacích se naopak vždy jedná o chybu analytickou. Pokud

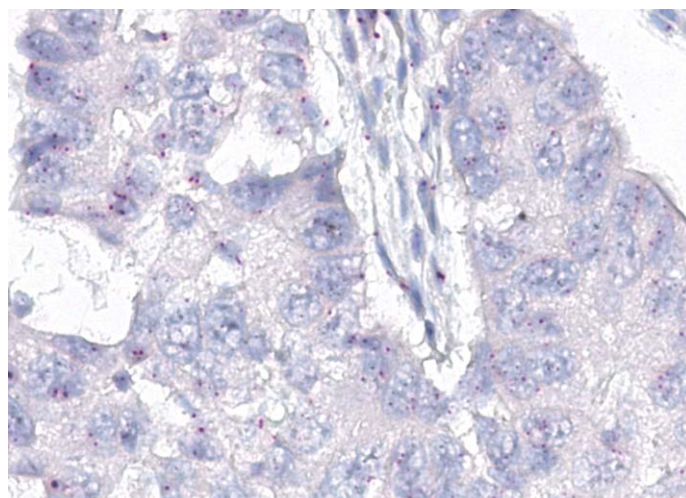
je přítomen pouze signál jedné barvy (obr. č. 8), je chyba buď v aplikaci sondy (chybí aplikace příslušné sondy), nebo v aplikaci příslušného detekčního systému. V naší laboratoři pro SISH vyšetření využíváme směs (koktejl) sond, takže chyba musí nastat až v průběhu aplikace detekčních reagensií. Je nutné zkontrolovat, zda nejsou prázdné zásobníky (tzv. dispensory) nebo zda není v zásobníku při jeho výstupu přítomna vzduchová bublina, a případnou závadu odstranit. V některých případech se příčina nepodaří objevit. I za těchto okolností je opět výrobcem doporučeno provést opakované vyšetření, které je prakticky vždy bez chyby, jedná se tedy o jednorázovou náhodnou chybu.²⁾

d. Chybění signálů v části tkáně

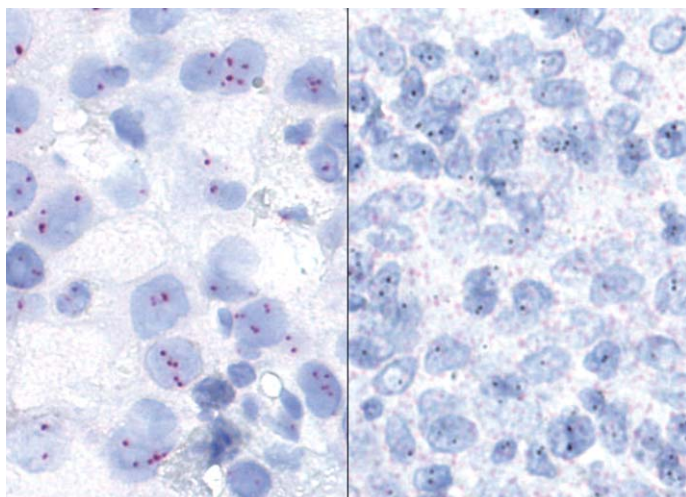
Pokud chybí signály pouze v části vzorku (obr. č. 9), jde prakticky vždy o chybu analytickou. Mechanismy vzniku tohoto problému zahrnují: 1) vznik vzduchové bubliny na povrchu vyšetřovaného skla při aplikaci některé z reagensií, což v daném místě vede k vynechání příslušného kroku protokolu a v případě přetrvání vzduchové bubliny se navíc na dané místo nemohou dostat následně aplikované reagensie; 2) stečení reagensií



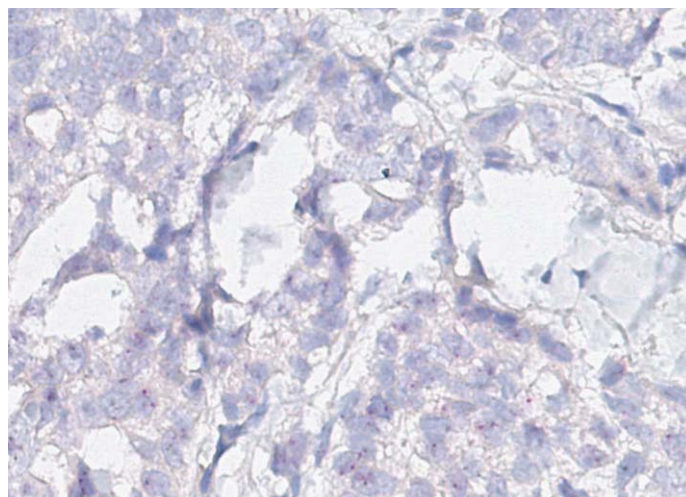
▲ Obr. č. 6: Úplné chybění červených i černých signálů ve vyšetřované tkáni. Viditelná jsou pouze jádra buněk barvená hematoxylinem. Zvětšení 400x



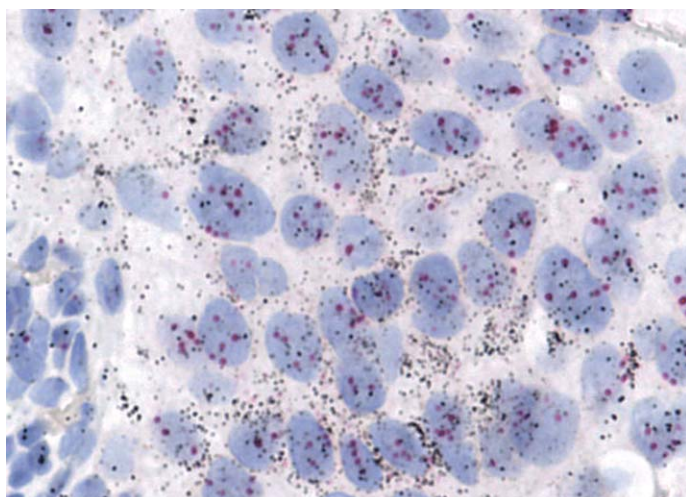
▲ Obr. č. 7: Slabé signály obou sond, jednotlivé signály mají malou velikost a jsou obtížně hodnotitelné. Zvětšení 400x



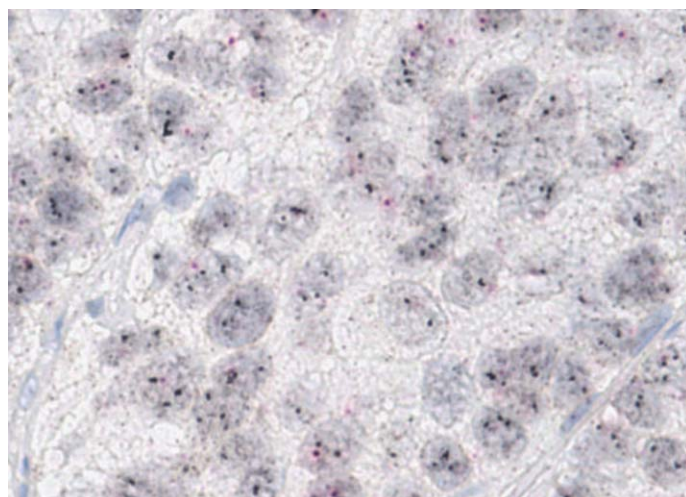
▲ Obr. č. 8: Přítomnost signálů pouze jedné barvy – pouze červené signály centromerické oblasti chromozomu 17 (levá část obrázku) nebo pouze černé signály genu ERBB2 (pravá část obrázku). Zvětšení 400x



▲ Obr. č. 9: Úplné chybění obou signálů v horní polovině obrázku při zachovalých signálech v dolní části snímku. Zvětšení 400x



▲ Obr. č. 10: Tzv. silver dust – jemný poprašek stříbra pokrývající vyšetřovanou tkáň. Zvětšení 400x

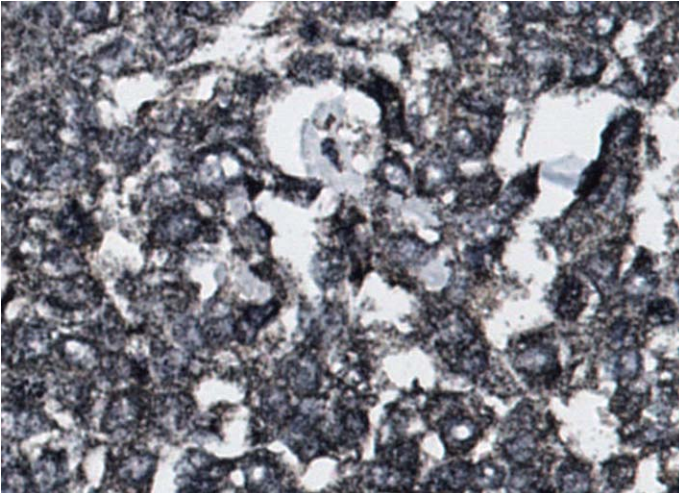


▲ Obr. č. 11: Silver dust o nízké intenzitě, i přes nespecifické pozadí jsou dobře patrné specifické signály sond a případ lze hodnotit. Zvětšení 400x

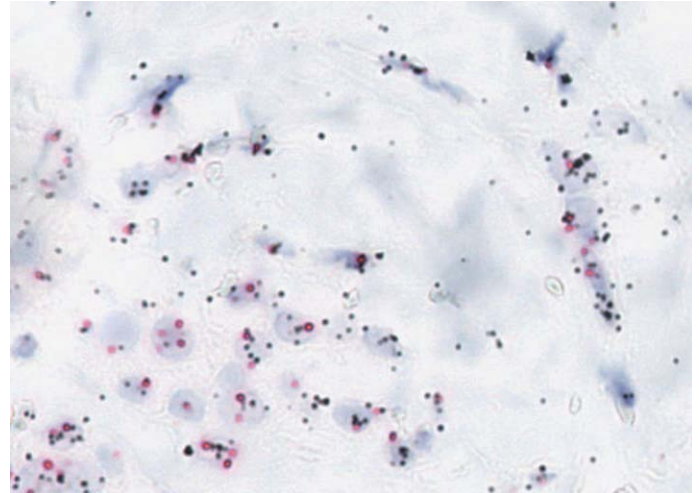
z povrchu skla v důsledku nezajištění vodorovné polohy skla (není zajištěna vodorovná pozice hybridizační ploténky); 3) „odsátí“ reagentů z povrchu skla kapilárním vztlínáním podél hrany skla v případě nevhodně nalepeného identifikačního štítku (křivě nalepený štítek s přesahem přes hranu skla). Pokud se vyskytne tato situace, není vždy nezbytně nutné vyšetření opakovat. Nejprve je nutné v mikroskopu zkontrolovat veškerou vyšetřovanou (nádorovou) tkáň a pouze v případě, že signály chybí v celé této tkáni, je nutné detekci zopakovat.

e. Nespecifické pozadí
Existuje několik variant rušivého pozadí při SISH vyšetření. V praxi se však setkáváme se dvěma nejčastějšími případy a těmi jsou tzv. „silver dust“ a „speckling“. Obě tyto chyby vznikají v analytické fázi. Silver dust (SD) je přítomnost jemného „poprašku“ vysráženého stříbra homogenně v celé tkáni (obr. č. 10). Tento typ chyby vzniká nejčastěji v důsledku vysušení povrchu skla v průběhu jednotlivých detekčních kroků. Jedná se o chybu jednorázovou, která se většinou při opakovaném vyšetření již nevyskytne. Navíc pokud je intenzita SD slabá a lze přes

pozadí spolehlivě rozeznat specifické signály (obr. č. 11), není nutné vyšetření opakovat. V některých případech však intenzita SD na pozadí hodnocení znemožňuje (obr. č. 12). Druhým zmíněným typem pozadí je tzv. speckling (SP), což je přítomnost černých signálů stříbra obdobné velikosti, jako mají specifické signály. Na rozdíl od nich se však SP vyskytuje disperzně i mimo jádra buněk a často také dokonce i mimo vyšetřovanou tkáň na okolním skle (obr. č. 13). Tento typ chyby je velmi zrádný, neboť při letném pohledu imituje často specifické signály a interpretace takového případu by vedla



▲ Obr. č. 12: Silver dust o vysoké intenzitě. Nelze hodnotit specifické signály, vyšetření je nediagnosticské. Zvětšení 400x



▲ Obr. č. 13: Tzv. Speckling – přítomnost „falešných“ signálů stříbra obdobné velikosti jako specifické signály, a to jak v jádrech nádorových buněk, tak i mimo ně (zejména pravá polovina obrázku). Při hodnocení takového případu hrozí riziko falešné positivity případné amplifikace genu ERBB2. Vyšetření je nutné opakovat. Zvětšení 400x

k falešně pozitivnímu výsledku stran případné amplifikace signálu. Naštěstí se jedná o chybu poměrně vzácnou (v porovnání s ostatními výše zmíněnými), jejíž příčina není doposud spolehlivě objasněna. Předpokládá se nějaký druh znečištění či degradace používané sondy, neboť se tento problém typicky vyskytuje na různých pracovištích a je vázán na konkrétní šarži sondy. Při použití jiné šarže sondy se tento problém již nevyskytuje.²⁾

Závěr

Metoda SISH se již řadu let s úspěchem používá na našem pracovišti ke stanovení případné amplifikace genu *ERBB2* u karcinomu prsu a eventuálně žaludku. Tato metoda přináší řadu výhod oproti klasickému vyšetřování metodou FISH a nemá ve srovnání s ní žádnou absolutní

nevýhodu. Obě metody přinášejí srovnatelné výsledky, přičemž hodnocení SISH je díky jednodušší orientaci ve tkáni rychlejší a pohodlnější. Odpadá také potřeba drahého fluorescenčního mikroskopu a hodnocená skla lze dlouhodobě archivovat, což je výhodou pro kontrolní, srovnávací, výzkumné, edukační i publikační účely.



MUDr. Tomáš Rozkoš, Ph.D.

Fingerlandův ústav patologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Sokolská 581, Hradec Králové 500 12

Kontakt: tomas.rozkos@fnhk.cz

Patolog, pracující v oboru od roku 2009, se specializací na onkologickou pneumopatologii a vyšetřování prediktivních markerů pomocí imunohistochemie a in situ hybridizace.

LITERATURA

1. Humphrey, PA, et al.: *The Washington Manual of Surgical Pathology, 2nd edition*. Lippincott Williams & Wilkins 2012; 876–886.
2. Grogan, MT, et al.: *Interpretation Guide Ventana INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail Assay*.
3. Nenutil R, Ryška A: *Doporučený postup pro zpracování a vyšetření bioptických vzorků prsu. Společnost českých patologů*, 2013; 7.
4. Unal B, et al.: *Determination of HER2 gene amplification in breast cancer using dual-color silver enhanced in situ hybridization (dc-SISH) and comparison with fluorescence ISH (FISH)*. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(10): 6131–4.
5. Pehlivanoglu B, et al.: *Comparison of HER2 status determination methods in HER2 (2+) patients: Manual fluorescent in situ hybridization (FISH) vs. dual silver enhanced in situ hybridization (SISH)*. *Ann Diagn Pathol* 2017; 31: 36–40.