

Fluorescenční *in situ* hybridizace na histologických řezech

Marcela Mrhalová, Roman Kodet

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole, Praha

SOUHRN

Metoda I-FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace na jádrech v interfázi) propojuje morfologické vyšetření histologických řezů z formolem fixovaných a do parafínu zalitých tkání s molekulárními technikami, které využívají sekvenční specifity bází nukleových kyselin pro určitý lokus (oblast na chromozomu). I-FISH je poměrně nenáročná na laboratorní provedení a přitom poskytuje celou řadu důležitých informací o vyšetřovaných buňkách. V rámci pracovišť patologie je využívána především v diagnostice nádorů. I-FISH umožňuje detekovat počty kopií genů (amplifikace či delece), počty jednotlivých chromozomů (polyzomie či monozomie), chromozomální zlomy a translokace a další změny. V současné době se I-FISH používá nejen pro stanovení diagnózy onemocnění nebo k odhadu prognózy nemocných, ale i k indikaci cílené terapie nádorů. Protože se zvyšují nároky na vyšetřování solidních nádorů, stává se metoda I-FISH prakticky rutinním vyšetřením. Článek shrnuje princip a využití I-FISH a snaží se usnadnit základní orientaci v této problematice.

Klíčová slova: fluorescenční *in situ* hybridizace – histologický řez – fluorescenční mikroskop – sonda – interfázická jádra – fixace formaldehydem

Fluorescence *in situ* hybridization on histologic sections

SUMMARY

I-FISH (fluorescence *in situ* hybridization on interphasic nuclei) represents a laboratory method linking morphological investigations (histological sections of formaldehyde fixed and paraffin embedded tissues) with molecular techniques (sequence specificity of nucleic acids bases for a certain locus). I-FISH is relatively undemanding for a laboratory workout, but offering a lot of important information about the investigated cells. Within a scope of pathology departments I-FISH is utilized mostly in diagnostics of neoplasms. I-FISH is helpful in detecting gene copy numbers (amplifications or deletions), and, importantly, in establishing copy numbers of individual chromosomes (polysomies or monosomies), chromosomal breaks and translocations. At present, I-FISH is used not only for diagnosis and estimation of prognosis, but also as a method to qualify a patient for a targeted biological therapy. Because demands on investigation of solid tumors keep raising I-FISH becomes a part of routine investigations. The aim of this paper is to summarize principles and the utility of I-FISH and to help the interested readers in finding a basic orientation in this laboratory method.

Keywords: fluorescence *in situ* hybridization – histological section – fluorescence microscope – probe – interphasic nuclei – formaldehyde fixation

Cesk Patol 2013; 49(4): 114–122

V posledních letech se rozvíjí řada molekulárních metod umožňujících vyšetřování patologických procesů na úrovni nukleových kyselin. Jejich aplikace vede k odhalování molekulárních změn, které mohou být charakteristické pro určitá nádorová onemocnění. Tento přístup přispívá nejen k upřesnění diagnostiky, ale molekulární změny v nádorech se dají využít i při odhadu prognózy onemocnění. V neposlední řadě se molekulární vyšetřování stává nezbytnou součástí indikací ke specifické cílené terapii pacientů s nádorovými onemocněními. Přestože morfologické vyšetření je a nadále stále bude trvalým základem diagnostiky patologických procesů, je nezbytné, aby patolog postupně zaváděl nová vyšetření, která mu umožní reagovat na zvýšené nároky současné diagnostické i terapeuticko-indikační onkopatologie.

Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) stojí na pomezí morfologického a molekulárního vyšetření. FISH je zkratkou počátečních písmen anglického názvu „fluorescence *in situ* hybridization“. Umožňuje identifikovat řadu chromozomálních změn, například zjištění počtu kopií genů (amplifikace, delece), zjištění počtu chromozomů (polyzomie, monozomie), stanovení chromozomálních zlomů a translokací a dalších změn na úrovni nukleových kyselin (DNA, méně často RNA) a to přímo *in situ* ve tkáni.

Na našem pracovišti jsme zavedli metodu FISH na histologických řezech v roce 1998, kdy jsme jako jednu z prvních komerčně vyráběných sond začali používat nepřímo značenou sondu pro zjištění počtu kopií genu *ERBB2* u nemocných s karcinomy mléčné žlázy a následně přímo značenou sondu pro zjištění zlomu v oblasti genu *ALK* u dětských pacientů s velkobuněčným anaplastickým lymfomem *ALK* protein pozitivním. Od té doby se spektrum komerčně dostupných sond rozrostlo obrovským způsobem.

Princip FISH je založen na sekvenční specifitě bází nukleových kyselin pro určitý lokus (oblast) a na schopnosti DNA opakovaně tvořit jedno a dvou řetězcové struktury na základě komplementarity bází nukleových kyselin. Sonda (anglicky „probe“), je úsek nasycený DNA, který sekvencí bází odpovídá vyšetřo-

✉ Adresa pro korespondenci:

RNDr. Marcela Mrhalová, Ph.D.

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole, Praha

V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 – Motol

e-mail: marcela.mrhalova@lfmotol.cuni.cz