



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE
FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Imunohistochemická detekce MSH2 proteinu

The immunohistochemical detection of MSH2 protein

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Ing. Marcela Staňková

Alena Černá

Kladno, květen 2016

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Alena Černá**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Imunohistochemická detekce MSH2 proteinu**
Téma anglicky: The immunohistochemical detection of MSH2 protein

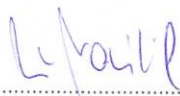
Zásady pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude zavedení nového imunohistochemického vyšetření karcinomu tlustého střeva do rutinní laboratorní praxe v laboratoři BioLab Praha. V teoretické části se student bude zabývat karcinomem tlustého střeva, jeho incidencí a mortalitou v České republice a významem vyšetření skupiny DNA mismatch repair proteinů pro diagnostiku a prognózu tohoto onemocnění. V praktické části student zavede metodu pro imunohistochemickou detekci jednoho z proteinů - MSH2 (MutS protein homolog 2) do laboratorní praxe.

Seznam odborné literatury:

- [1] Shia J, Ellis NA, Klimstra DS. , The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins, *Virchows Arch Nov*, číslo 445(5), 2004, 431-41 s., ISSN: 1432-2307
- [2] Ellis NA. , Value of Immunohistochemical Detection of DNA Mismatch Repair Proteins in Predicting Germline Mutation in Hereditary Colorectal Neoplasms, *American Journal of Surgical Pathology*, číslo 29(1), 2005, 96-104 s., ISSN: 1532-0979.
- [3] S. R. Hamilton. L. A. Aaltonen., *The International Agency for Research on Cancer. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System Paperback - November 2000, IARC Press, 2000 November, 103-155 s., ISBN-10: 9283224108*

zadání platné do: 30.09.2017
Vedoucí: Ing. Marcela Staňková


.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 18.12.2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem **Imunohistochemická detekce MSH2 proteinu** vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 20. května 2016

.....Alena Černá!.....

Alena Černá

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Marcele Staňkové, vedoucí laboratoře imunohistochemie, za odborné vedení bakalářské práce, za cenné rady a čas strávený nad konzultacemi a korekcemi mé práce, MUDr. Markétě Trnkové, ředitelce laboratoře AeskuLab Patologie k. s., za poskytnutí prostor, laboratorních přístrojů a protilátky pro uskutečnění praktické části bakalářské práce, a Bc. Tereze Boškové za odborný překlad abstraktu do anglického jazyka.

Abstrakt

Předmětem bakalářské práce je zavedení nového imunohistochemického vyšetření karcinomu tlustého střeva do rutinní laboratorní praxe v laboratoři AeskuLab Patologie k. s. (dříve BioLab) v Praze. Současný stav popisuje problematiku kolorektálního karcinomu, jeho incidenci a mortalitu v ČR i ve světě, příčiny jeho vzniku a nejčastější lokalizace nádoru. Rovněž se zaměřuje na dědičnou formu CRC, tedy Lynchův syndrom, jeho příčiny a diagnostiku. Metodika práce se zabývá imunohistochemickým stanovením proteinu MSH2, optimalizací reakčních podmínek a výběru vhodných kontrol jak pro verifikaci metody tak pro rutinní laboratorní vyšetření. K ověření metody využijeme také komerční sklo poskytnuté společností NordiQC, které obsahuje vzorky se známou expresí proteinu MSH2.

Klíčová slova

Kolorektální karcinom, hereditární nepolypózní kolorektální karcinom, mismatch repair protein, Lynchův syndrom, imunohistochemické stanovení

Abstract

The subject of the bachelor thesis is to introduce a new immunohistochemical colon cancer examination into routine laboratory practice in the AeskuLab Patologie k. s. (Formerly BioLab) laboratory in Prague. Current status describes the problems of colorectal cancer, its incidence and mortality in the Czech Republic and in the World, its causes and the most common tumor localization. It also focuses on the hereditary form of CRC, the Lynch Syndrome, its causes and diagnostics. Methodology of the thesis deals with immunohistochemical detection of MSH2 protein, optimizing reaction conditions and the selection of appropriate controls for verification of the methods, as well as for routine laboratory examinations. For validation of the method, we will also use commercial glass provided by NordiQC that contains samples with known expression of MSH2 protein.

Key words

Colorectal cancer, hereditary nonpolyposis colorectal cancer, mismatch repair protein, Lynch syndrom, immunohistochemical assesement

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav.....	10
2.1	Tlusté střevo.....	10
2.1.1	Stavba stěny tlustého střeva.....	11
2.1.2	Funkce tlustého střeva.....	11
2.2	Karcinom tlustého střeva.....	12
2.2.1	Příčiny vzniku CRC.....	14
2.2.2	Incidence a mortalita kolorektálního karcinomu.....	16
2.3	Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom.....	19
2.3.1	Klinická kritéria HNPCC.....	20
2.3.2	MMR geny.....	20
2.3.3	Funkce MMR genů.....	22
2.3.4	Nestabilita mikrosatelitu.....	23
2.4	IHC stanovení MMR proteinů.....	24
3	Cíl práce.....	27
4	Metodika práce.....	28
4.1	Materiál.....	28
4.2	Přístroje.....	29
4.2.1	Chladicí deska.....	29
4.2.2	Mikrotomový nůž.....	30
4.2.3	Napínací stolek (vyhřívána deska).....	30
4.2.4	Termostat.....	31
4.2.5	Imunostainer.....	32
4.2.6	Montovací automat.....	32
4.2.7	Mikroskop.....	33
4.3	Pomůcky a nástroje.....	33

4.3.1	Podložní skla.....	33
4.3.2	Vodní lázeň.....	34
4.4	Reagencie.....	34
4.4.1	Protilátka.....	34
4.4.2	Gillův hematoxylin.....	34
4.4.3	Dehydratační řada.....	35
4.4.4	Pufry do imunostaineru.....	35
4.5	Laboratorní postupy.....	35
4.5.1	Optimalizace.....	36
4.5.2	Testovací sklo NordiQC.....	37
4.5.3	Testování pacientů s CRC.....	37
4.5.4	Mutace genu MSH2.....	37
5	Výsledky.....	38
5.1	Výsledky optimalizace.....	38
5.1.1	Tonsila.....	38
5.1.2	Apendix.....	40
5.2	Testovací sklo NordiQC.....	42
5.3	Testování CRC.....	46
5.4	Testování pacientů s mutací MSH2 genu.....	49
6	Diskuse.....	51
7	Závěr.....	56
	Seznam použité literatury.....	59
	Seznam obrázků.....	63
	Seznam tabulek.....	65
	Seznam grafů.....	66

1 Úvod

Kolorektální karcinom (CRC) je po kardiovaskulárních onemocněních druhé nejčastější onemocnění ve světě. Tumory obvykle vznikají ve stěně sliznice vzestupného tračníku, může se ovšem nacházet i v jiných částech kolorekta. CRC je nechvalně známý svou vysokou incidencí a mortalitou po celém světě. Dědičnou formou CRC je hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC), který je také znám pod názvem Lynchův syndrom (LS). Jedná se o autozomálně dominantní dědičné onemocnění.

LS může být stanoven molekulárně genetickým vyšetřením, avšak tato metody je velmi drahá. Častěji je tedy přistupováno k levnějším, ale stejně spolehlivým metodám detekce tohoto onemocnění, mezi které patří histologické metody - testy mikrosatelitní nestability (MSI) a imunohistochemická (IHC) vyšetření. Praktická část práce se zabývá zavedením IHC metody, konkrétněji detekcí mutS homolog 2 (MSH2) proteinu, jehož chybná funkce či její úplná ztráta způsobuje HNPCC. Po zavedení detekce MSH2 proteinu spolu s proteiny MSH6, MLH1 a PMS2 bude možné v laboratoři detekovat pacienty s dědičnou formou CRC.

2 Současný stav

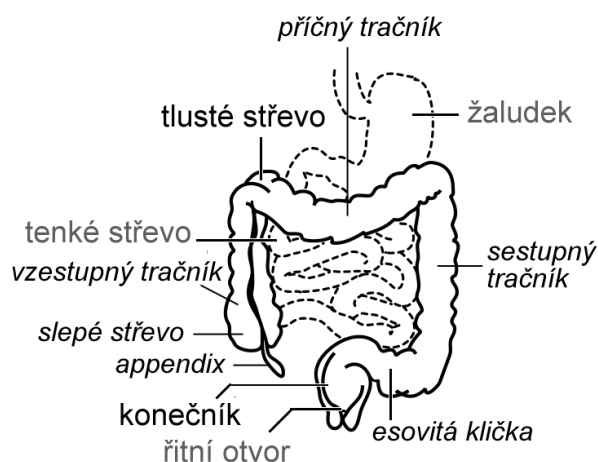
Kolorektální karcinom je maligní nádor, vznikající v oblasti tlustého střeva a konečníku. Tento zhoubný novotvar patří mezi onemocnění s vysokou incidencí i mortalitou v populaci. (Abrahámová, 2000, s. 7, 19)

2.1 Tlusté střevo

Tlusté střevo (lat. *Intestinum crassum*) je poslední část trávicí trubice dlouhá 1,2-1,4 m a široká 5-8 cm. Sestává se ze slepého střeva, čtyř tračníků (vzestupného, příčného, sestupného a esovité kličky) a konečníku. (Dylevský, 2009, s. 327)

Prvním oddílem tlustého střeva je slepé střevo (*caecum*). Tlusté střevo (*colon*) dále pokračuje vzestupným tračníkem (*colon ascendens*), který se nachází v pravé části dutiny břišní, naopak na levé straně se nachází sestupný tračník (*colon descendens*). Vzestupný a sestupný tračník jsou spojeny tračníkem příčným (*colon transversum*). Přejít mezi *colon ascendens* a *transversum* tvoří jaterní ohbí (*flexura hepatica*), slézinné ohbí (*flexura lienalis*) se tvoří mezi *colon transversum* a *descendens*. Esovitá klička (*colon sigmoideum*) je posledním tračníkem tlustého střeva, který dále ústí do řitního otvoru. (Dylevský, 2007, s. 122-123) (Švíglerová, 2013, s. 83)

Červovitý přívěsek (*appendix vermoris*) je výběžek slepého střeva, široký asi 1 cm a dlouhý asi 10 cm. Sliznice appendixu obsahuje velké množství mízních žlázek. Časté záněty v tomto místě jsou řešeny chirurgickým odstraněním červovitého přívěsku. (Dylevský, 2007, s. 122-123)



Obrázek 1 Schematický náčrt tlustého střeva a jeho okolí (Dušek, 2016)

2.1.1 Stavba stěny tlustého střeva

Stěna tlustého střeva je tenčí, než ostatní části trávicí trubice, protože je zde cirkulární a podélná svalová vrstva užší. Toto zúžení způsobuje výdutě stěny (haustrace). (Dylevský, 2007, s. 122-123)

Skládá se ze čtyř vrstev:

Sliznice (mukosa) je výstelka vnitřního povrchu tlustého střeva, která bývá často složena v řasy. Tyto řasy zvětšují plochu slizničního povrchu. Mukosa tlustého střeva neobsahuje klky, pouze dlouhé Lieberkühnovy kryty. Epitel je tvořen pohárkovými buňkami. Ve sliznici jsou umístěné hlenové žlázy. Tyto žlázy produkují hlen, který chrání střevní stěnu. (Dylevský, 2007, s. 109-110) (Lata, 2010, s. 91) (Martínek, 2009, s. 41) (Švíglerová, 2013, s. 9-10)

Podslizniční vazivo (submukosa) je vrstva řídkého vaziva připevňující sliznici ke svalovině trávicí trubice. Submukosa obsahuje mízní uzlíky (lymfatické folikuly), které brání průniku škodlivin do krevního oběhu. Obsahuje nervovou pletěň, síť lymfatických a krevních cév. (Dylevský, 2007, s. 109-110) (Martínek, 2009, s. 41)

Svalovina (muscularis) je nejsilnější vrstva. Je tvořena hladkou svalovinou, která svými stahy umožňuje mísení a posun potravy tubicí. Tyto stahy jsou vyvolány autonomní nervovou pletenou uloženou v hladké svalovině střeva. (Dylevský, 2007, s. 109-110)

Peritoneum je hladká a lesklá blána tvořící vnější vrstvu tlustého střeva. (Dylevský, 2007, s. 109-110)

2.1.2 Funkce tlustého střeva

K funkcím tlustého střeva patří resorpce iontů a vody, dále se zde skladuje feces a obsahuje bakterie, které zde mají fyziologické uplatnění. (Silbernagl, 2012, s. 146)

Slepé střevo a colons ascendens zahušťují obsah střeva, colon descendens zadržuje obsah před defekací. Rektum a colon sigmoideum defekaci realizují. (Lata, 2010, s. 91)

Resorpce vody probíhá ve vzestupném tračníku, hlen pak slepuje nestrávené zbytky potravy. Trávenina se v těle skladuje 8-12 hodin a posouvá se tlustým střevem pomocí stahů dále ke konečníku. (Dylevský, 2007, s. 122-124)

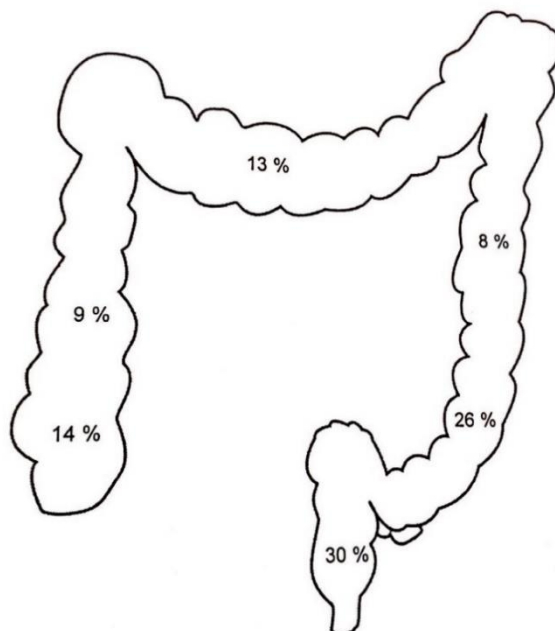
Bakterie způsobují v organismu kvašení (cukry, tuky) a hnití (bílkoviny). Těmito procesy mohou vznikat různé jedovaté produkty, před jejichž průnikem do krevního řečiště je sliznice střeva chráněna hlenem. (Dylevský, 2007, s. 122-124)

2.2 Karcinom tlustého střeva

Nejčastěji vyskytujícím se nádorovým onemocněním trávicího systému je kolorektální karcinom, který rovněž obsazuje druhé místo žebříčku rakovinných onemocnění člověka na světě. Výskyt této choroby znepokojivě narůstá. (Holubec, 2004, s. 13)

Převážná většina (až 98%) CRC jsou adenokarcinomy, tumory vycházející z hlenových žláz střevní sliznice. Nejčastěji je lokalizován ve vzestupném tračníku. V sestupném tračníku pak nacházíme karcinomy rostoucí cirkulárně ve střevě. Tyto karcinomy nejsou mikroskopicky odlišné. (Jablonská, 2000, s. 30) (Vorlíček, 2012, s. 88)

CRC bývá anatomicky umístěn v různých částech tlustého střeva. Nejčastější místo vzniku karcinomu je v rektální oblasti a v esovité kličce, tzv. rektosigmoideální oblasti, kde pravděpodobnost vzniku CRC činí 56 %. (Jablonská, 2000, s. 148)



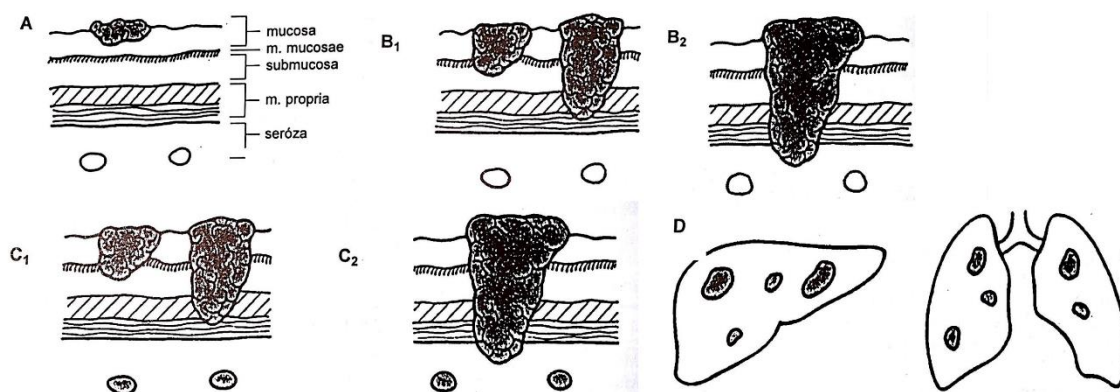
Obrázek 2 Anatomická distribuce kolorektálních karcinomů (Jablonská, 2000, s. 149)

Závažnost karcinomu tlustého střeva se stanovuje podle Dukesy klasifikace. Určuje se stádium karcinomu v době diagnózy, který postupně prorůstá stěnou tlustého střeva. Jednotlivá stádía CRC jsou zaznamenány v Tabulce 1. (Jablonská, 2000, s. 32)

Tabulka 1 Modifikovaná Dukesova klasifikace stádía CRC (Jablonská, 2000, s. 32)

Stádium karcinomu	Hloubka invaze
A	Sliznice
B1	invaze do muscularis propria bez penetrace v celé tloušťce uzliny bez nádorové infiltrace
B2	penetrace m. propria v celé tloušťce uzliny bez nádorové infiltrace
C1	invaze do m. propria bez penetrace v celé tloušťce uzliny s nádorovou infiltrací
C2	penetrace m. propria v celé tloušťce uzliny s nádorovou infiltrací
D	vzdálené metastázy, nejčastěji v plicích a játrech

Po léčbě či operativním zákroku existují rizika návratu CRC. Tato recidiva onemocnění závisí na stádiu karcinomu, u nádoru typu A je pravděpodobnost recidivy do 5 %, u tumoru typu B kolo 30% a pro typ C je pravděpodobnost 60%. (Jablonská, 2000, s. 207)



Obrázek 3 Staging CRC podle Dukesy klasifikace (Jablonská, 2000, s. 34)

Kvůli nedostatkům v Dukesově klasifikaci se častěji používá TNM (tumor, node, metastasis) systém. Tento stagingový systém má častější využití pro svou univerzálnost a dovoluje sledování prognózy onemocnění a vliv léčby. (Jablonská, 2000, s. 32) (Foretová, 2014, s. 24)

TNM je klasifikace doporučována společností UICC (Union Internationale Contre la Cancer). Ukazateli tohoto systému jsou tumor, který ukazuje rozsah primárního ložiska, noduli popisující stav regionálních lymfatických uzlin a metastases, který prokazuje přítomnost vzdálených metastáz. (Klener, 2011, s. 31)

Tabulka 2 Korelace mezi klasifikací Dukesovou a TNM (Lata, 2010, s. 109)

Dukes A	T1,2	N0	M0
Dukes B	T3	N0	M0
Dukes C1	T1-4	N1,2	M0
Dukes C2	T1-4	N1,3	M0
Dukes D	T jakékoli	N jakékoli	M1

Prognóza CRC závisí na stádiu onemocnění. V prvním klinickém stádiu přežití 5 let dosahuje 90 % pacientů, ve druhém stádiu 60 – 80 %, ve třetím stádiu 30 – 60 % a v případě čtvrtého klinického stádia už pouze 5 %. (Adam, 2010, s. 80)

2.2.1 Příčiny vzniku CRC

CRC patří k velmi častým onemocněním tlustého střeva a bývá způsoben například stravovacími návyky v populaci nebo zárodečnými mutacemi v MMR genech. Výskyt CRC se s přibývajícím věkem zvyšuje. (Kubáčková, 2015, s. 312) (Vorlíček, 2012, s. 88)

Faktory působící na vznik CRC se dají rozdělit na faktory vnějšího prostředí, životního stylu a dědičnosti. (Otová, 2012, s. 163)

Vlivy vnějšího prostředí:

- Chemické
- Fyzikální

Chemické látky působí v organismu rakovinotvorně až po své přeměně na kancerogeny. Tato přeměna je pak u různých lidí odlišná, záleží na predispozici detoxikovat tyto látky. Příkladem je kouření, lidé s vysokou aktivitou enzymu AHH mají vyšší pravděpodobnost vzniku nádorů. (Otová, 2012, s. 163,164)

Mezi fyzikální vlivy patří ionizující a UV záření. Záření způsobuje zlomy chromosomů v DNA a tím zvyšuje riziko vzniku mutace a následně vzniku nádorů. Jako u chemických látek zde záleží na predispozici. Člověk s vrozeným defektem reparace DNA má vyšší riziko vzniku nádorového bujení. (Otová, 2012, s. 163,164)

Vlivy životního stylu a potravy:

- Nadměrná konzumace živočišných tuků a červeného masa
- Nedostatek vlákniny
- Nadváha
- Nedostatek vápníku
- Nedostatek vitamínů (A, C, E)
- Alkohol
- Kouření
- Špatná tepelná úprava potravin (Holubec, 2004, s. 19)

Mnoho studií poukazuje na vztah mezi přijímanými potravinami a CRC. Nadměrná konzumace živočišných tuků zvyšuje pravděpodobnost vzniku rakoviny kolorekta až o polovinu. Riziko vzniku CRC roste i se zvýšenou konzumací hovězího, vepřového nebo jehněčího masa. Rybí maso toto riziko naopak snižuje. Červené maso obsahuje heterocyklické aminy, které mohou v organismu působit jako kancerogeny. (Jablonská, 2000, s. 46-47) (Vyzula, 2007, s. 33)

Zvýšený přísun vlákniny ve stravě snižuje riziko vzniku CRC. Vláknina (celulóza, hemicelulóza, pektiny) se váže na kancerogeny, snižuje fekální pH vazbou na žlučové kyseliny a zvětšuje sliznici tlustého střeva. Rozšířením povrchu sliznice se snižuje koncentrace působících kancerogenů. (Jablonská, 2000, s. 47)

Nadváha, tedy vysoká hodnota BMI, a současně vysoký energetický příjem mají negativní vliv na vznik CRC. Pohybová aktivita snižuje nadváhu, urychluje metabolismus organismu, a tím redukuje riziko vzniku CRC. (Vyzula, 2007, s. 34)

O pozitivním či negativním působení vápníku na CRC se dosud spekuluje. Nicméně, jsou jeho vlastnosti neutralizace působení žlučových kyselin, podobně jako u vlákniny, jsou prokazatelné. (Jablonská, 2000, s. 48)

Působení vitaminů A, C a E je také dosud diskutováno a zkoumáno, ale během klinických pozorování byl zjištěn pozitivní efekt proti vzniku CRC. (Jablonská, 2000, s. 48)

Při konzumaci alkoholu se zvyšuje riziko u mužů konzumujících 70 gramů alkoholu denně. Konzumace piva, nejméně 15 litrů měsíčně, zvyšuje pravděpodobnost vzniku rakoviny karcinomu rekta. (Jablonská, 2000, s. 49)

Kouření má vliv na vznik CRC. Patří sem kouření cigaret, doutníků, dýmek, a dokonce i žvýkání tabáku. Při hoření tabáku vznikají různé kancerogeny, např. arylaminy, jejichž polykání způsobuje CRC. Některé studie ukazují, že riziko vzniku CRC vlivem kouření je vyšší u mužů než u žen, patrně antiestrogenním vlivem. Jiné studie toto vyvracují, riziko je riziko stejné pro obě pohlaví. (Jablonská, 2000, s. 50) (Vyzula, 2007, s. 33)

Uzené potraviny a maso upravované smažením nebo grilováním zvyšují riziko CRC. (Vyzula, 2007, s. 35)

Genetické faktory:

- *Syndromy mnohotné adenomatózní polypózy (familiární adenomatózní polypóza, Gardnerův syndrom)* (Holubec, 2004, s. 19)
- *Syndromy familiárního výskytu nepolypózních karcinomů tlustého střeva (Lynchův syndrom I, II)* (Holubec, 2004, s. 19)

Syndromy patří mezi autozomálně dominantní onemocnění vznikající mutací v některém z genů (např. APC, MSH2, MLH1 apod.). Tato geneticky podmíněná nádorová onemocnění tvoří pouze 5 % všech CRC. (Holubec, 2004, s. 19) (Adam, 2010, s. 71)

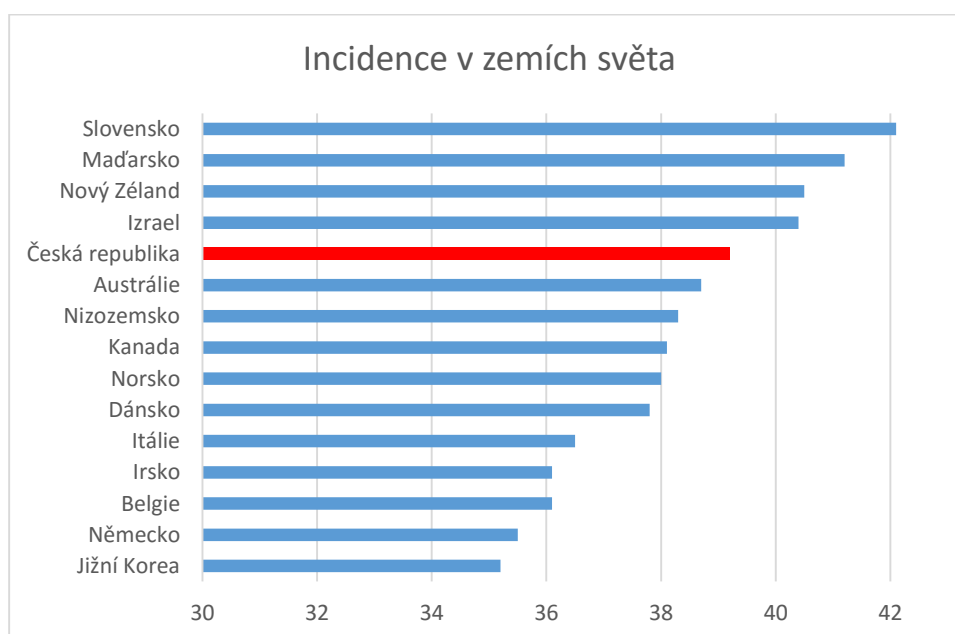
2.2.2 Incidence a mortalita kolorektálního karcinomu

Epidemiologie nádorových onemocnění se zabývá výskytem nových onemocnění (incidencí) a úmrtností (mortalitou). Průměrně v ČR trpí zhoubným

nádorem každý čtvrtý člověk a každý pátý z důvodu těchto onemocnění umírá. (Klener, 2011, s. 9)

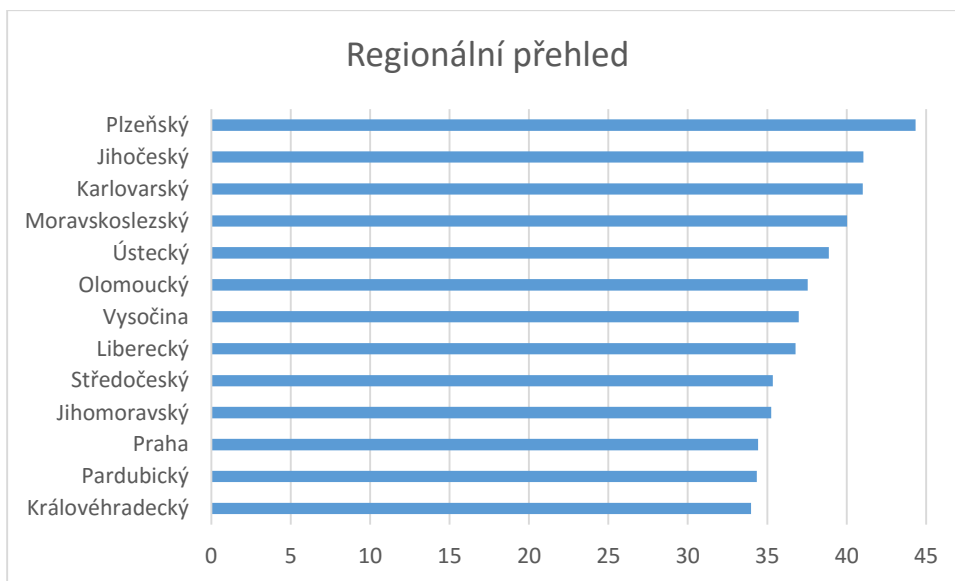
V současné době se v Evropě nachází 3 000 000 pacientů s CRC. Incidence je vyšší než 400 000 nových případů za rok. Mortalita za rok činí 200 000 úmrtí na CRC. (Seifert, 2015, s. 21)

Celosvětově patří CRC mezi nejčastěji se vyskytující maligní onemocnění. V incidenci nových nádorových onemocnění je Česká republika na 5. místě v celosvětových tabulkách (Graf 1). Rozděleno dle pohlaví pak zaujímá Česká republika 3. místo v incidenci u mužů a 15. místo u žen. (Vorlíček, 2012, s. 88) (Dušek, 2007)



Graf 1 Srovnání incidence s ostatními zeměmi světa, přepočten na 100 000 osob (Dušek, 2007)

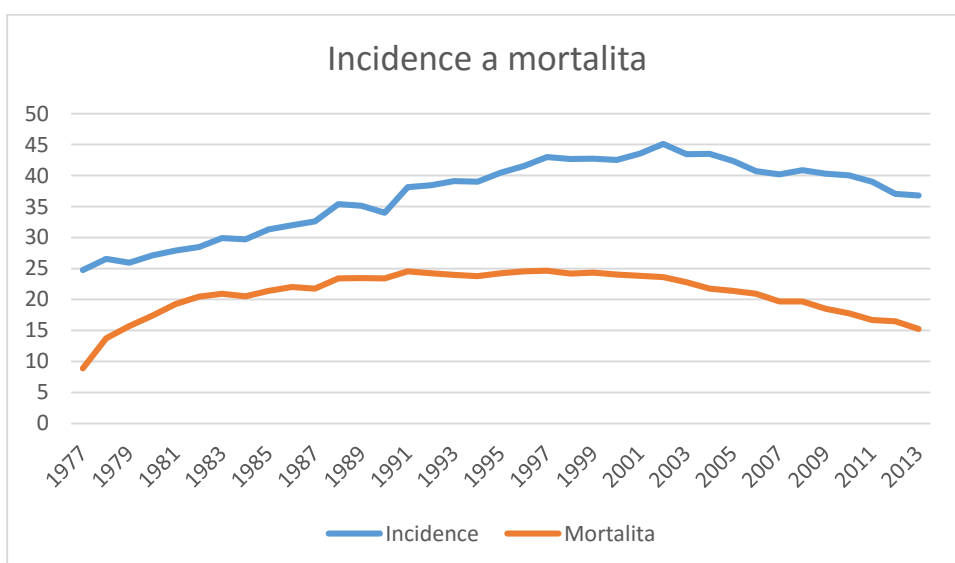
V Evropských zemích zaujímá Česká republika 3. místo po Slovensku a Maďarsku v incidenci CRC u mužů. Ženy jsou na 9. místo po zemích jako je Norsko, Dánsko nebo Nizozemsko. (Dušek, 2007)



Graf 2 Incidence CRC v ČR podle regionů, přepočet na 100 000 osob (Dušek, 2007)

Incidence zhoubných CRC je vyšší u mužů než u žen a stále narůstá. Rozdíly v incidenci jsou i mezi kraji v České republice. Nejvyšší výskyt CRC byl v letech 1977-2013 zaznamenán v Plzeňském kraji, dále také v Jihočeském, Karlovarském a Moravskoslezském kraji, (Graf2). Nejnižší incidence byla zaznamenána v Pardubickém a Královéhradeckém kraji. (Dušek, 2007)

Nárůst incidence CRC (Graf 3) byl pozorován do roku 2002, od té doby dochází ke stagnaci výskytu nových onemocnění. Z důvodu poklesu mortality a stagnace incidence dochází k vyšší prevalenci onemocnění v ČR. (Seifert, 2015, s. 30-36)



Graf 3 Incidence a mortalita CRC v ČR, přepočet na 100 000 osob (Dušek, 2007)

Incidence závisí na věku pacienta jako důsledek narůstající entropie v genomu. Nejčastější jsou delece supresorových genů např. APC, DCC a p53. Sporadické formy CRC se vyskytují ve věku 65-75 let. Vrozené familiární polypózy a nádory Lynchova syndromu se vyskytují ve věku do 50 let u 10% populace. (Vyzula, 2007, s. 13)

2.3 Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom

Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom je dědičná dispozice ke vzniku kolorektálního karcinomu, nejčastěji v tračniku. HNPCC, tedy Lynchův syndrom je onemocnění mnohočetných zhoubných nádorů tlustého střeva. Projevuje se růstem polypů nebo adenomů ve střevní stěně. Tyto stopkaté či ploché útvary se často mění ve zhoubné nádory. (Jablonská, 2000, s. 252,253) (Foretová, 2006, s. 11) (Hadravský, 2015)

Nádory mohou postihnout i dělohu a mazové žlázy v kůži. V případě mazových žláz se jedná o Muir-Torreův syndrom (MTS). Onemocnění LS často vzniká v mladém nebo středním věku. Současně se mohou objevit karcinomy i v jiných orgánech, např. tenkého střeva, žaludku a vaječníků. (Jablonská, 2000, s. 252,253) (Foretová, 2014, s. 10) (Hadravský, 2015)

HNPCC je autozomálně dominantní dědičné onemocnění. Tento typ CRC bývá způsoben chybnou nebo nedostatečnou funkcí mismatch repair (MMR) proteinů. Tyto DNA MMR proteiny tvoří systém pro opravování chybných párování bazí. Pokud nejsou tyto chyby opravovány kvůli špatné funkci tohoto systému, dochází ke kumulaci buněk s vadnou DNA, a to může vést ke vzniku rakoviny. (Vyzula, 2007, s. 51) (Hadravský, 2015)

Populační riziko vzniku CRC je 2 %, zatímco riziko vzniku CRC u pacientů s LS je 28-75 % u mužů a 24-52 % u žen. Nejčastější lokalizací tumorů je vzestupný tračník. Ženy s LS mají riziko 27-71 % vzniku karcinomu endometria a riziko 3-13 % onemocnění rakovinou vaječníků. Nádory močových cest, ledvin a kůže mají riziko vzniku u obou pohlaví stejně. V ČR žije kolem 10 500 jedinců postižených LS. (Foretová, 2014, s. 10, 11) (Hadravský, 2015) (Kubáčková, 2015, s. 314)

2.3.1 Klinická kritéria HNPCC

Pro určení diagnózy HNPCC byla vydána amsterodamská kritéria, publikována již roku 1990. Jejich revize a rozšíření proběhly až o 8 let později. (Foretová, 2009, s. 10-11)

Amsterodamská kritéria (1998)

- tři příbuzní s nádory asociované s HNPCC (CRC, uterus, vaječníky, ...), jeden z nich příbuzný prvního stupně ostatních dvou
- postiženy osoby dvou generací jdoucích po sobě
- vznik nádoru do 50 let života
- vyloučena FAP (Foretová, 2009, s. 10-11)

Při splnění amsterodamských kritérií se v diagnostice HNPCC uplatňují ještě kritéria bethesdská, která určují, u kterých pacientů se provede vyšetření na MSI a při pozitivním výsledku i testování genů MLH1 a MSH2. (Foretová, 2009, s. 10-11)

Bethesda kritéria

- pacienti se dvěma nádory ze spektra HNPCC (CRC nebo asociované s HNPCC)
- pacienti s CRC a příbuzným prvního stupně s CRC, kolorektálním adenomem nebo nádorem asociovaným s HNPCC, diagnostika do 45 let
- pacienti se sporadickým CRC nebo nádorem endometria, do 45 let
- pacienti s pravostranným CRC, do 45 let
- pacienti s nádorem buněčné formy pečetního prstenu (signet ring), do 45 let
- pacienti s adenomem, do 40 let (Foretová, 2009, s. 10-11)

Jeden nebo více těchto mutací se objevuje u 80% případů splňujících amsterodamská kritéria a u 35% kritéria bethesdská. (Vyzula, 2007, s. 52)

2.3.2 MMR geny

U člověka je známo 6 genů s MMR funkcí, které mohou způsobovat HNPCC. Za většinu případů jsou zodpovědné geny MLH1 a MSH2. (Foretová, 2014, s. 10)

Nové vlákno DNA je tvořeno DNA polymerázou, která pracuje rychle, a může docházet k chybě kopie. K chybám patří adice, eliminace nebo záměna nukleotidů. Z těchto důvodů tvoří MMR proteiny systémy, které kontrolují a případně opravují chyby. (Hadravský, 2015)

Proteiny pracují ve dvojicích, např. MLH1/PMS2, MSH2/MSH6 – protein hlavní/vedlejší. V případě, že chybí hlavní protein, protein vedlejší je nepotřebný a je degradován buňkou ubiquitinovou cestou. Naopak pokud chybí protein vedlejší, hlavní protein zůstává. Těchto poznatků je využito při IHC vyšetřeních. (Hadravský, 2015)

Tabulka 3 Geny zodpovědné za HNPCC (Foretová, 2009, s. 10; Vyzula, 2007, s. 52)

MMR gen	Lokalizace na chromosomu
MLH1	Lokus 3p21
MSH2	Lokus 2p21
MSH6	Lokus 2p16
PMS1	Lokus 2q31
PMS2	Lokus 7p22
MLH3	Lokus 14q24

Prvních pět z těchto MMR genů z Tabulky 3 má klinický význam. Jejich zmutovanou formu můžeme nalézt u HNPCC - MLH1 (49%), PMS1 (0,3%), PMS2 (2%), MSH2 (38%) a MSH6 (9%). (Lauridsen, 2015)

Tabulka 4 Mutace genů způsobující různá onemocnění (zdroj: Vyzula, 2007, s. 52)

MMR gen	Onemocnění
MLH1	Typický syndrom HNPCC
MSH2	Typický syndrom HNPCC, Muir-Torrerův syndrom
MSH6	Typický a atypický syndrom HNPCC (pozdější nástup, distální lokalizace, nízký stupeň MSI)
PMS2	Typický a atypický HNPCC, Turcotův syndrom

Z tabulky 4 je patrné, že geny MLH1 a MSH2 způsobují klasický LS, zatímco geny MSH6 a PMS2 vedou k lehčí formě LS s pozdním nástupem. (Kubáčková, 2015, s. 313)

Přítomnost či nepřítomnost MMR proteinů lze stanovit imunohistochemicky, nejčastěji u genů MLH1, MSH2 a MSH6. (Vyzula, 2007, s. 52)

2.3.3 Funkce MMR genů

Během replikace DNA dochází k chybnému párování bazí z důvodu záměny nukleotidů nebo „prokluzování“ DNA-polymerázy. Funkcí MMR genů je oprava chyb, které nastanou:

- při replikaci DNA
- vnějšími noxami (fyzikální, chemické)
- nehomologními rekombinacemi DNA vláken

Díky MMR proteinům se rizika vzniklá během replikace snižují až tisíckrát. Podobné geny byly nalezené u všech organismů, např. *Escherichia coli*. (Jablonská, 2000, s. 254,255)

Jednotlivé proteiny mají různé funkce. Protein MSH2 je potřeba k rozlišení chybně zařazených bazí během replikace DNA. Váže se s proteinem MSH6 a vzniká heterodimer, tzv. mismatch rozeznávací komplex. V případě úbytku MSH2 pozorujeme i ztrátu MSH6, pravděpodobně kvůli nestabilitě proteinu. (Lauridsen, 2015)

Proteiny MSH6 a PMS2 opravují záměny nukleotidů. Přesná funkce PMS1 není známá, MLH3 se účastní oprav drobných inzercí nebo delecí. (Vyzula, 2007, s. 51)

MLH1 a PMS2 formují komplex, který je nezbytný pro mismatch rozeznávací komplex a jeho interakci s ostatními proteiny, např. DNA-polymeráza nebo PCNA. MLH1 může tvořit heterodimer i s PMS1 nebo MLH3. (Vyzula, 2007, s. 51) (Lauridsen, 2015)

Pokud nejsou chyby v DNA správně opraveny, vzniká zde mutace, která se dále přenáší na dceřiné buňky jako součást genetické informace. (Jablonská, 2000, s. 255)

Téměř 20 % pacientů s CRC má poruchu nebo úplnou ztrátu funkce v systému pro opravu chybných párování nukleotidů v DNA (MMRd, mismatch repair deficiency). (Foretová, 2014, s. 29)

Ztráta funkce MMR genů nastává:

- postupná ztráta obou genů

- mutace některého z MMR genů
- u HNPCC – nefunkčnost jednoho genu zárodečnou mutací, druhého somatickou mutací
- u sporadických CRC s MSI – inaktivace MLH1 metylací promotoru, tento proces lze zvrátit činidlem 5-azacytidinem
- nerovnovážná produkce kooperujících proteinů
- nestabilita mikrosatelitu (Jablonská, 2000, s. 255) (Foretová, 2014, s. 29)

Přítomnost MMR lze prokázat na úrovni genů (mutační analýza), proteinů (IHC vyšetření) nebo MSI (nepřímá analýza). (Foretová, 2014, s. 29)

2.3.4 Nestabilita mikrosatelitu

Mikrosatelity jsou krátké úseky DNA, složené ze stejných nukleotidů. Opakující se sekvence jednoho až čtyř nukleotidů jsou u jedince stejné, ale mezi jedinci se mohou lišit. Pokud dochází k různě dlouhým úsekům sekvencí u daného jedince, tento jev nazýváme nestabilita mikrosatelitu. (Daum, 2014, s. 19)

Mikrosatelitní sekvence jsou náchylné k chybám při replikaci DNA, protože v těchto místech DNA-polymeráza často prokluzuje. (Daum, 2014, s. 19)

Nehledě na odlišné základní mechanismy sporadických a hereditárních karcinomů, oba tumory mají společný molekulární fenotyp – nestabilitu mikrosatelitu. Tento fenotyp vychází ze skutečnosti, že mikrosatelity, tedy mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidy opakujících se sekvencí DNA, jsou příliš citlivé na nefunkčnost MMR proteinů. Tyto malé, opakující se sekvence hromadí vkládání nebo delece DNA během replikace. Neschopnost oprav chybně zařazených nukleotidů ihned po replikaci z důvodu nefunkčnosti MMR proteinů způsobuje stažení či roztažení opakujících se jednotek a tím i genetickou nestabilitu. (Shia, 2004)

Tumory vzniklé MSI mohou být detekovány pomocí PCR. The National Cancer Institut doporučuje použití sady pěti mikrosatelitních markerů, kdy se DNA zdravé tkáně porovnává s DNA tkáně nádorové. (Shia, 2004) (Hadravský, 2015)

Podle počtu pozměněných sekvencí rozdělujeme MSI do třech skupin:

- mikrosatelitní stabilita (MSS) - pokud není pozměněna ani jedna sekvence oproti zdravé DNA

- nízká nestabilita mikrosatelitů (MSI-L) – změna 1 úseku z 5
- vysoká nestabilita mikrosatelitů (MSI-H) – pozměněno 2 až 5 úseků (Hadravský, 2015)

Molekulárně genetické studie ukázaly, že 10 – 15 % CRC je spojena s MSI-H. MSI se často objevuje jako důsledek sporadické methylace MLH1, také v zárodečné mutaci v MMR genech predisponují MSI-H CRC u pacientů s HNPCC, tedy Lynchovým syndromem. Adenokarcinomy s MSI-H mají lepší celkovou prognózu než onemocnění MSS. Existuje také důkaz, že CRC s MSI-H je méně citlivý k chemoterapii než MSS tumory. (Greeson, 2009, s. 126)

2.4 IHC stanovení MMR proteinů

Během posledního desetiletí se značně rozšířili znalosti o MMR proteinech jakožto jedné z příčin CRC. Je známo, že změna funkce MMR proteinů vede k 15 % všech CRC, asi třetina těchto onemocnění se objevuje u pacientů s HNPCC syndromem, ostatní jsou sporadického typu. (Shia, 2004, s. 431-441)

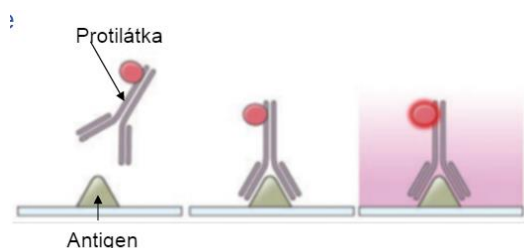
IHC vyšetření patří mezi histologické techniky. Jedná se o vyšetření kvalitativní, tzn. je vyšetřováno, zda je antigen přítomen, nebo ne. Ve tkáních je prokazována přítomnost proteinů nebo jiných molekul. Často se jedná o molekuly s tkáňovou či nádorovou specifitou. K tomuto průkazu je využívána imunologická reakce antigenu a protilátky. (Foretová, 2014, s. 42-44) (Slabý, 2015, s. 39)

Imunohistochemie se během posledních 20 let stala důležitou metodou v oboru histopatologie. IHC stanovení probíhá podle následujících kroků:

1. Demaskování antigenu (antigen retrieval) – Po fixaci formalínem tvoří makromolekuly spojené methinovými můstky hustou síť, která brání molekulám Ig v průniku do cílové struktury. Tuto síť je potřeba otevřít, nejlépe proteolytickým štěpením za vysoké teploty. Příliš vysoká teplota nebo nadměrná proteolýza může působit kontraproduktivně.
2. Blokace enzymatických aktivit – Vizualizace reakce nejčastěji probíhá pomocí peroxidázy, která se váže na sekundární protilátku. Některé buňky testované tkáně mohou vykazovat pseudoperoxidázovou aktivitu, která by mohla způsobit falešně pozitivní výsledek. Pomocí peroxidu vodíku je tato aktivita blokována.

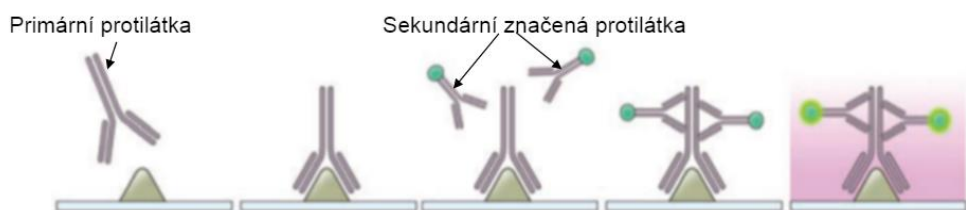
3. Blokace nespecifických vazebných míst – Inkubací neimunních sér s místy s tendencí k vazbě proteinu se předchází vzniku nespecifických vazeb primárních a sekundárních protilátek.
4. Primární protilátka – Výběr optimální koncentrace protilátky je klíčovým krokem IHC vyšetření. Příliš vysoká nebo nízká diluce protilátky často vede ke vzniku nespecifických vazeb a tím je snížena intenzita výsledného signálu.
5. Vizualizace – Detekční systém je tvořen sekundární protilátkou navázanou na polymerový nosič. Součástí tohoto nosiče jsou molekuly peroxidázy. Po přidání peroxidu vodíku s diaminobenzidinem (DAB) vzniká permanentní hnědé zbarvení. Jiný typ detekčního systému je např. s použitím alkalické fosfatázy.
6. Hodnocení - Při IHC vyšetřeních je potřeba znát umístění antigenu v tkáňovém řezu. Reakce může být jaderná, membránová, plasmatická nebo extracelulární. Pro ověření funkce protilátky je použita pozitivní kontrola.
7. Archivace – Histologické preparáty je možno dlouhodobě archivovat. (Slabý, 2015, s. 39-40)

IHC metody jsou přímé a nepřímé. Přímé metody spočívají v reakci značených protilátek přímo s antigeny v tkáňových řezech (Obrázek 4). Primární protilátka bývá označena enzymem, kovem nebo fluoresceinem. Metody to jsou rychlé, mají však ve většině případů nedostatečnou citlivost. Přímé metody lze využít v případě, že se sledovaný antigen nachází ve tkáni v dostatečné koncentraci. (Beranová, 2012) (Foretová, 2014, s. 42-44)



Obrázek 4 Přímá imunohistochemická metoda (Ross, 2006, s. 10)

Nepřímé metody jsou komplikovanější ve srovnání s metodami přímými, mají však mnohem vyšší citlivost. Používají vazbu neoznačené primární protilátky (imunoglobulin) na detekovaný protein. Na primární protilátku se váže označená sekundární protilátka proti Fc-fragmentu Ig, která slouží k zesílení signálu a zvýšení senzitivity. Sekundární protilátka může být označena fluorochromem nebo enzymem. V tomto stanovení se používají zvířecí Ig. Tuto metodu nazýváme dvoustupňovou. (Foretová, 2014, s. 42-44) (Beranová, 2012)



Obrázek 5 Nepřímá imunohistochemická metoda (Ross, 2006, s. 10)

Existuje také nepřímá metoda třístupňová. Obsahuje amplifikaci k zesílení signálu. Amplifikační metody je využito v případě nízké koncentrace Ag. Nejprve dochází k reakci specifického antiséra s prokazovaným Ag, poté je aplikována neznačená protilátka proti Ig. Tato protilátka je označována jako spojovací, tvoří můstek, který se přidává v nadbytečném množství. Při vysycení IgG molekul by docházelo k falešně negativnímu výsledku. V poslední fázi reakce přidáváme značený komplex PAP (peroxidáza-anti-peroxidázový komplex). Tento způsob je mnohem citlivější než předchozí metody, je však časově náročnější. (Beranová, 2012)

Nepřímá imunofluorescenční metoda obsahuje sekundární protilátku značenou fluorescenčním barvivem (rhodamin, FITC). Nepřímé imunoenzymové metody mají sekundární protilátku značenou enzymaticky (glukózooxidáza, alkalická fosfatáza, peroxidáza). (Foretová, 2014, s. 42-44)

3 Cíl práce

Cílem této práce je rozšířit spektrum imunohistochemických vyšetření v laboratoři AeskuLab Patologie k. s. v Praze o stanovení proteinu MSH2, který spolu s dalšími MMR geny umožňují detekci MSI u pacientů s CRC a zlepši diagnostiku tohoto onemocnění.

K úspěšnému zavedení metody do rutinní praxe laboratoře je zapotřebí zvolit optimální reakční podmínky. Dílčím cílem je tedy provést testování kontrolních vzorků tonsily a appendixu se třemi různými protokoly, výsledné preparáty porovnat a vybrat nejvhodnější protokol pro další testování.

Pro ověření funkce protilátky bude použito testovací sklo od společnosti NordiQC. Preparáty budou pozorovány v mikroskopu a následně porovnány s výsledky poskytnutými společností NordiQC.

Na závěr se budou testovat vzorky tkání pacientů s CRC a pacientů s prokázanou mutací v genu MSH2 a porovnávat s očekávanými výsledky.

4 Metodika práce

Praktická část bakalářské práce se zabývá IHC detekcí MSH2 proteinu. Metodika popisuje materiál používaný k tomuto stanovení, použité přístroje, pomůcky a chemikálie. Jsou zde také popsány laboratorní postupy testování MSH2 proteinu.

Pro stanovení optimálních reakčních podmínek jsme využili informací společnosti NordiQC. NordiQC je dánská společnost, která se zabývá kontrolou laboratoří po celém světě, zvýšením kvality imunohistochemie a rozšíření spekter vyšetření v IHC laboratořích. NordiQC poskytuje výsledky testů jednotlivých proteinů, včetně informací o výrobci protilátky, klonu a úspěšnosti v testování.

V roce 2014 se účastnilo testování MSH2 proteinu 143 laboratoří. 35 % zúčastněných laboratoří použilo klon G219-1129 od firmy Cell Marque v RTU formátu od firmy Roche. Výsledky těchto laboratoří byly v 90 % uspokojivé. Na základě těchto informací jsme vybrali tento klon společnosti od Cell Marque.

4.1 Materiál

Pro optimalizaci a ověření funkčnosti reakce pro detekci MSH2 proteinu je vhodné použít:

- apendix
- tonsila
- adenokarcinom tlustého střeva s normální expresí MSH2
- adenokarcinom tlustého střeva se ztrátou exprese MSH2

Kritéria pro optimální reakci MSH2 proteinu jsou:

- slabá až střední jaderná reakce všech buněk apendixu
- slabá až střední jaderná reakce B-buněk plášťové zóny a střední až silná jaderná reakce B-buněk zárodečného centra v tonsile
- střední až silná jaderná reakce ve všech rakovinných buňkách adenokarcinomu tlustého střeva s normální expresí MSH2 proteinu
- žádná reakce rakovinných buněk adenokarcinomu tlustého střeva se ztrátou exprese MSH2 proteinu

Společnost NordiQC poskytuje také informace, který materiál je vhodný jako kontrola pro běžné použití v laboratoři a optimální reakce na těchto kontrolách. Jako pozitivní kontrola je doporučována tonsila, kde B-buňky v pláštěvé zóně musí vykazovat slabou až střední jadernou reakci, v zárodečných centrech pak střední až silnou reakci. Kromě tonsily lze pro kontrolu použít také appendix, kde musí reagovat slabě až středně jádra všech buněk.

Negativní kontrolou může být adenokarcinom tlustého střeva se ztrátou exprese MSH2, kde nedochází k žádné reakci. V laboratoři AeskuLab se pro IHC vyšetření používá pouze kontrola pozitivní.

4.2 Přístroje

K testování MSH2 proteinu jsme využili laboratorní přístroje používané během rutinních IHC vyšetření. Hlavním přístrojem byl imunostainer, neméně důležité byly však také chladicí deska, mikrotomový nůž, montovací automat apod.

4.2.1 Chladicí deska

Parafínové histologické bloky obsahující vzorky tkání bylo nezbytné před krájením řezů zmrazit. Použili vestavnou chladicí desku MKF 2000 od firmy Medite GmbH. Teplota desky byla $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$. Bloky jsme položili na chladicí desku minimálně na dobu 15 minut, parafín nízkou teplotou ztuhnul a krájení řezů pak bylo snazší. Řezy krájené za studena měli vyšší kvalitu, než řezy ukrojené z nezchlazených bloků.



Obrázek 6 Chladicí deska

4.2.2 Mikrotomový nůž

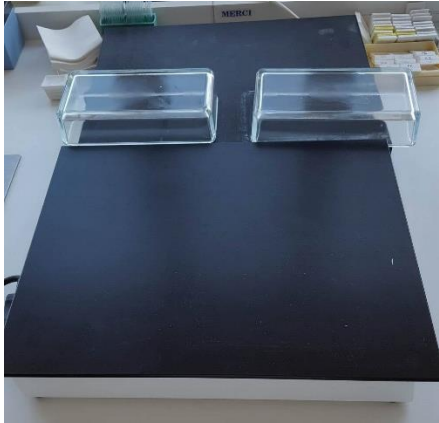
Ke krájení řezů jsme použili sáňkový mikrotom HM400 od firmy Microm. Mikrotom se skládá z podstavce, na jehož straně se nachází šroub, který je spojen se svorkou, do které se upevňuje parafínový blok. Po každém řezu se šroub mechanicky posune o 3 μm , tím se zajišťuje konstantní tloušťka řezu. Svorka pro histologický blok obsahuje šrouby pro nastavení ideální hladiny řezu. Další část mikrotomu je nůž upevněný na saních, které se po kluzných plochách pohybují směrem k bloku.



Obrázek 7 Mikrotomový nůž

4.2.3 Napínací stolek (vyhříváná deska)

V histologických a imunohistochemických laboratořích se pro napínání a sušení řezů na sklíčkách používá napínací stolek Medite OTS 40. Hliníková deska silná 6 mm se zahřála na 50°C, skla se položila na desku a byla zde sušena minimálně po dobu 15 minut, aby řezy správně přilnuly na jeho povrch.



Obrázek 8 Napínací stolek

4.2.4 Termostat

Po napnutí a usušení řezu se sklíčko vložilo do termostatu. V laboratoři jsme využili termostat Incucell Comfort 22 od výrobce BMT Medical Technology s.r.o., který fixuje řezy na skla pomocí vzduchu o teplotě 58 °C. Skla s preparáty se při takové teplotě ponechala v termostatu minimálně po dobu 60 minut. Pokud bylo potřeba nechat skla v termostatu přes noc, fixace probíhala při teplotě 37 °C. Obecně platí, že pokud se ponechá sklo v termostatu přes noc, snižujeme tím pravděpodobnost, že řezy během zpracování tzv. uplavou – tedy neudrží se na sklíčku.



Obrázek 9 Termostat

4.2.5 Imunostainer

Přístroj Ventana BenchMark ULTRA od firmy Roche se často používá k IHC vyšetřením. Obsahuje 30 pozic pro sklíčka a 35 pozic pro dispenzery s protilátkami. Hlavní výhodou tohoto přístroje je, že jednotlivá skla zpracovává na sobě nezávisle a po ukončení jedné reakce lze do přístroje kontinuálně doplňovat další preparáty. Přístroj může tedy zpracovat až 90 skel během 8 hodin a až 120 skel s nočním během. Současně může probíhat stanovení IHC, ISH, SISH nebo FITC. Imunostainer obsahuje plastové nádoby na promývací pufr, destilovanou vodu a olej. Tyto nádoby je potřeba po každém běhu kontrolovat a doplňovat



Obrázek 10 Imunostainer

4.2.6 Montovací automat

Obarvená skla, která prošla dehydratační řadou, byla zamontována. Místo klasických krycích skel jsme použili montovací fólii. Stojan se skly se vložil do přístroje Tissue-Tek Film® Film Coverslipper od firmy Sakura, který preparáty zamontoval. Do montovacího automatu lze současně vložit 3 stojany se skly, kde je na sklo fólie automaticky natažena. Jako montovací médium je zde použit xylen.



Obrázek 11 Montovací stroj

4.2.7 Mikroskop

Preparáty jsme sledovali pomocí světelného mikroskopu Nikon Eclipse 50i. Mikroskop byl připojen k počítači, měli jsme tedy možnost sledovat preparáty na velké obrazovce a pořizovat snímky. K pozorování preparátů jsme zvolili objektiv se zvětšením 150x.

4.3 Pomůcky a nástroje

Mezi nástroje a pomůcky použité při IHC stanovení patří podložní skla a vodní lázeň.

4.3.1 Podložní skla

Skla TOMO přímo pro IHC stanovení vyrábí firma Matsunami. Skla jsme si popsali obyčejnou tužkou, aby nedošlo k jejich záměně, a po natažení řezu jsme je opatřili čárovým kódem, který byl rozeznatelný imunostainerem a obsahoval informace o zvoleném protokolu.



Obrázek 12 Podložní skla

4.3.2 Vodní lázeň

Vodní lázeň byla skleněná nádoba s destilovanou vodou. Ukrojené řezy se pomocí histologického háčku přenesly na vodní hladinu, aby se napnuly.

4.4 Reagencie

Vedle přístrojů a laboratorního náčiní jsme využili i některé reagenty, např. protilátku proti MSH2 proteinu, pufr, barvivo a alkoholy.

4.4.1 Protilátka

Nejdůležitější chemikálií použitou ke stanovení MSH2 proteinu byla protilátka. Zvolili jsme monoklonální protilátku MSH2 mAb clone G219-1129 od firmy Roche. Přednaplněný dispenzer je typu RTU (ready to use) s koncentrací 2,84 $\mu\text{g/ml}$. To znamená, že protilátku nebylo potřeba před použitím naředit. Dávkořadec měl objem protilátky na 50 IHC stanovení. Protilátka je označena číslem produktu (760-4265) a číslem šarže (1529502C). Datum expirace je září 2018.



Obrázek 13 Protilátka

4.4.2 Gillův hematoxylin

Gillův hematoxylin je barvivo, které se používá k dobarvení imunohistologických řezů. Barvením preparátů se dosahuje požadovaného kontrastu mezi jednotlivými složkami tkáně. Barvivo je aplikováno na preparát po dobu 2 minut a následně opláchnuto tekoucí vlažnou vodou. Při stanovení MSH2 proteinu používáme Gillův hematoxylin formátu RTU – barvivo není potřeba před použitím ředit.

4.4.3 Dehydratační řada

Dehydratační řada se skládá z 6 kyvet, přičemž čtyři kyvety obsahují alkohol a zbylé dvě xylen. Obarvené preparáty jsou vloženy do jednotlivých kyvet alkoholu na 3 minuty, do xylenu pak na 1 minutu. Dehydratační řada slouží k odvodnění a projasnění preparátů.

4.4.4 Pufry do imunostaineru

K IHC stanovením jsou potřeba pufry, které se musí po každém běhu kontrolovat a případně doplňovat. Využívá se několik druhů pufrů.

- **ULTRA LCS** - ULTRA Liquid Coverslip je předem naředěný krycí roztok vyrobený pro použití na přístroji Ventana. Odstraňuje neváznutelný materiál a minimalizuje odpařování vodních činidel ze sklíčka.
- **Reaction Buffer Concentrate (10X) solution** - Reakční pufr na bázi roztoku TRIS pufru (pH 7,6) se používá k promývání sklíček mezi jednotlivými kroky reakce a současně, stejně jako ULTRA LCS, zajišťuje stabilní vodní prostředí pro IHC a ISH stanovení.
- **EZ Prep Concentrate (10X) solution** - Tento roztok je používán pro odstranění parafínu z tkáňových řezů během IHC a ISH reakcí.
- **Cell Conditioning Solution 1** - CC1 je předem naředěný roztok používaný ke kondicionování tkáňových preparátů před přidáním primární protilátky.

4.5 Laboratorní postupy

S použitím výše zmíněných přístrojů, pomůcek a chemikálií jsme provedli testování MSH2 proteinu. Nejdříve byly optimalizovány reakční podmínky, kdy jsme stanovovali MSH2 protein na kontrolách (tonsile a apendixu). Dále jsme ověřili funkci protilátky na testovacím skle od firmy NordiQC. K poslední fázi stanovení jsme využili vzorky pacientů s CRC a pacienta s prokázanou mutací genu MSH2.

4.5.1 Optimalizace

Optimalizace reakčních podmínek proběhla otestováním reakce protilátky a antigenu na kontrolních vzorcích tonsily a apendixu.

Pro IHC stanovení MSH2 proteinu jsme museli nastavit protokol na imunostaineru. Testovali jsme tři různé protokoly:

- protokol doporučený firmou Roche
- protokol využívající amplifikačního kitu pro zvýšení signálu
- protokol doporučený firmou NordiQC

Jednotlivé protokoly se liší detekčním systémem metody (Tabulka 5). Protokol doporučený firmou Roche obsahuje detekční systém UltraView, pro lepší zobrazení byl k tomuto protokolu při druhém testování využito amplifikačního kitu a protokol od společnosti NordiQC používá zobrazovací systém OptiView.

Tabulka 5 Protokoly pro IHC stanovení MSH2 proteinu

Protokol	Roche	Roche + amp	NordiQC
Sušení	4 min, 60 °C	4 min, 60 °C	4 min, 60 °C
Odparafinování	72 °C	72 °C	72 °C
Kondicionování	CC1, 40 min, 100 °C	CC1, 40 min, 100 °C	CC1, 40 min, 100 °C
Protilátka	20 min, 37 °C	20 min, 37 °C	20 min, 37 °C
Detekční systém	UltraView, 8 min + 8 min, 36 °C	Amplifikace, 8 min + 8 min, 36 °C	OptiView, 8 min + 8 min, 36 °C

Postup přípravy preparátů tonsily a apendixu byl následující:

1. Histologický bloček s apendixem nebo tonsilou jsme upevnili v držáku mikrotomového nože. Pomocí otočných šroubů jsme nastavili ideální rovinu pro krájení a zhotovili jsme několik řezů tenkých 3 µm.
2. Ukrojené řezy jsme pomocí háčku přenesli do vaničky s vodou. Voda byla zahřátá na cca 55°C, aby se řezy dostatečně roztáhly.
3. Na připravená skla jsme nalepili štítky s čárovými kódy, díky kterým imunostainer rozezná požadovanou protilátku. Každé sklo obsahovalo čárový kód zvoleného protokolu.

4. Skla jsme ponořili do vody a pomocí háčku natáhli řezy na skla. Následně jsme skla opatrně osušili buničinou a položili na nahřívací plotnu, kde ležela alespoň 15 min.
5. Pro lepší fixaci vzorku jsme sklíčka vložili do termostatu, minimálně na 1 hodinu.
6. Skla jsme po vyjmutí z termostatu vložili do šuplíků v přístroji Ventana společně s dispenzerem obsahujícím protilátku, detekčním systémem a přístroj spustili.
7. Po doběhnutí protokolu jsme skla vyjmuli ze šuplíků a promyli je v roztoku detergentu.
8. Obarvili jsme preparáty Gillovým hematoxylinem. Stojan se skly jsme ponořili do kyvety s barvivem na 2 minuty a poté opláchli vlažnou vodou.
9. Odvodnili a projasnili jsme preparáty v řadě alkoholů a xylenu.
10. Preparáty jsme zamontovali v montovacím automatu a následně pozorovali v mikroskopu.

4.5.2 Testovací sklo NordiQC

Dále jsme použili testovací sklo NordiQC z Run 41 z roku 2014, které bylo uchováno v mrazáku při teplotě -23 °C. Sklo obsahovalo tkáň tonsily, apendixu, adenokarcinom s normální expresí MSH2 a adenokarcinom se ztrátou exprese MSH2.

4.5.3 Testování pacientů s CRC

Dalším krokem stanovení bylo ověřit funkci protilátky na vzorcích adenokarcinomu tlustého střeva. Byly vybrány 4 vzorky pacientů s CRC. Postup přípravy preparátů byl stejný jako kontrolních vzorků. Protokol byl po předchozím testování zvolen jen jeden a to doporučený společností NordiQC využívající detekční systém OptiView.

4.5.4 Mutace genu MSH2

Posledním krokem testování bylo použít protilátku na tkáň pacienta s prokázanou mutací v genu MSH2 a na tkáň pacienta s pravděpodobnou mutací. Tyto vzorky tkání nám poskytla Fakultní nemocnice Hradec Králové.

5 Výsledky

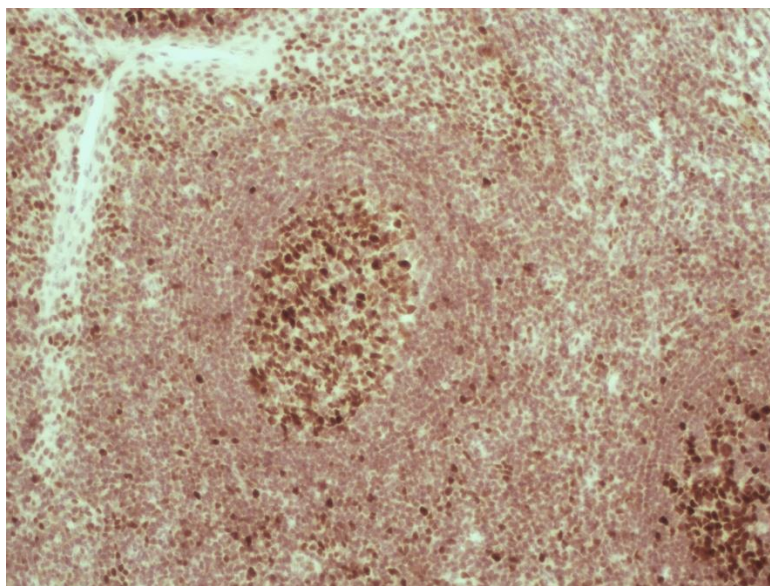
Na vybraných preparátech jsme provedli IHC stanovení MSH2 proteinu. Klon protilátky byl mAb G219-1129. Vyšetřené tkáně jsme sledovali pod mikroskopem a zhotovili fotografie pro následné hodnocení výsledků.

5.1 Výsledky optimalizace

Podmínkou správného stanovení MSH2 byl výběr optimální protokolu pro dané vyšetření. Použili jsme shodné tři vzorky tonsily a tři vzorky appendixu, každý pro jiné stanovení.

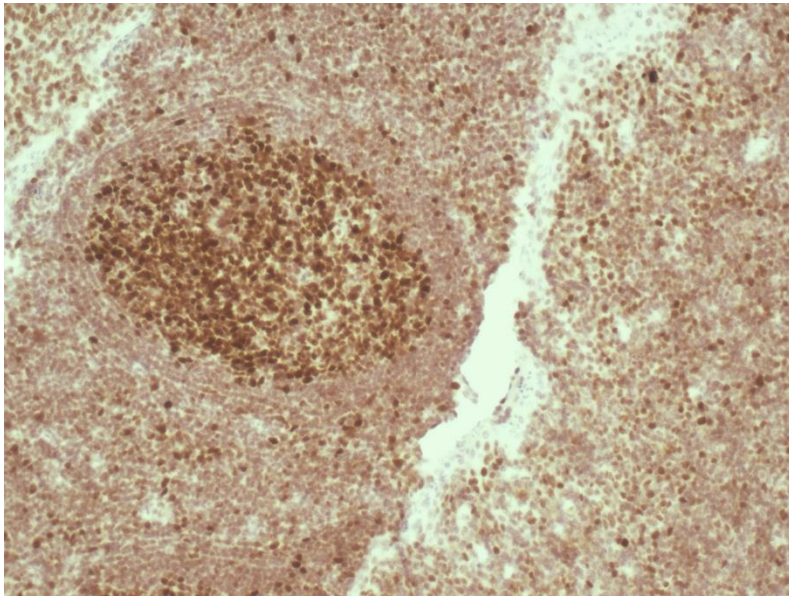
5.1.1 Tonsila

Testování preparátů tonsily třemi různými protokoly poskytlo následující výsledky:



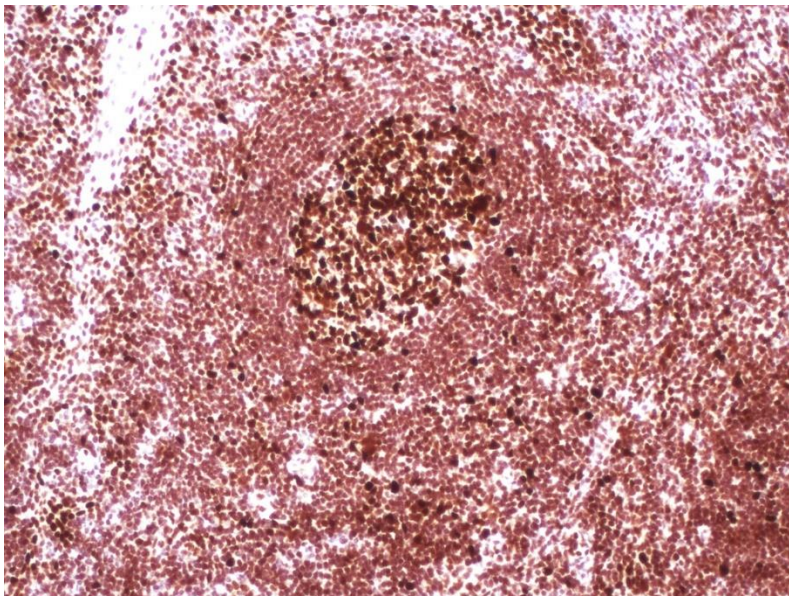
Obrázek 14 Tonsila Roche UltraView, zvětšení 150x

Na tonsilu z obrázku 1 byl použit protokol firmy Roche s detekčním systémem UltraView. Tonsila vykazuje slabou reakci B-buněk plášťové zóny a slabou až střední reakci B-buněk germinálních center. Výsledek tohoto vyšetření není dostačující.



Obrázek 15 Tonsila, amplifikace, zvětšení 150x

Amplifikační kit v protokolu pro stanovení MSH2 měl zvýšit signál reakce. Na obrázku 15 můžeme vidět reakci tkáně tonsily s použitím právě amplifikačního kitu. Reakce se však výrazně neliší od protokolu s detekčním systémem UltraView.

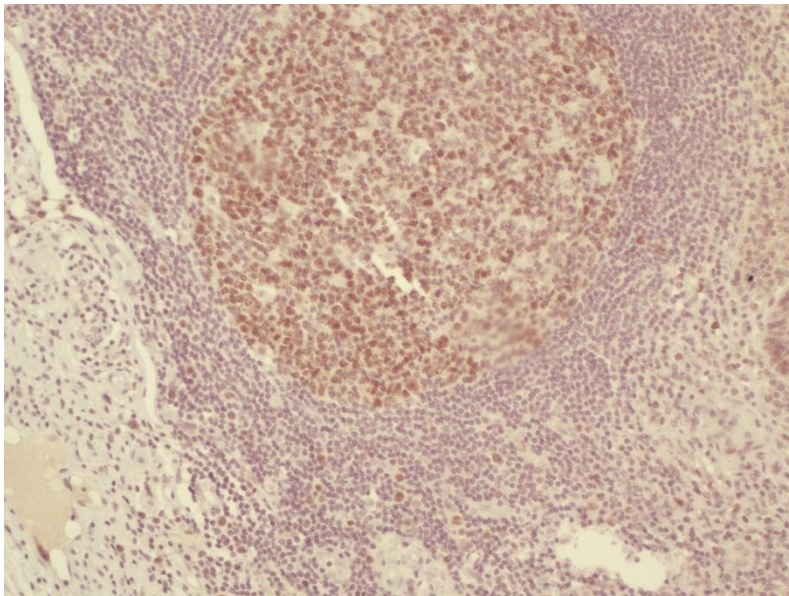


Obrázek 16 Tonsila, NordiQC, zvětšení 150x

Preparát tonsily z obrázku 16 ukazuje výsledek stanovení MSH2 s použitím protokolu doporučeným společností NordiQC. Tento protokol obsahoval detekční systém OptiView. B-buňky pláštěvé zóny vykazují typickou střední jadernou reakci a germinální centra lymfatických folikulů vykazují silnou jadernou reakci. Tato reakce je optimální.

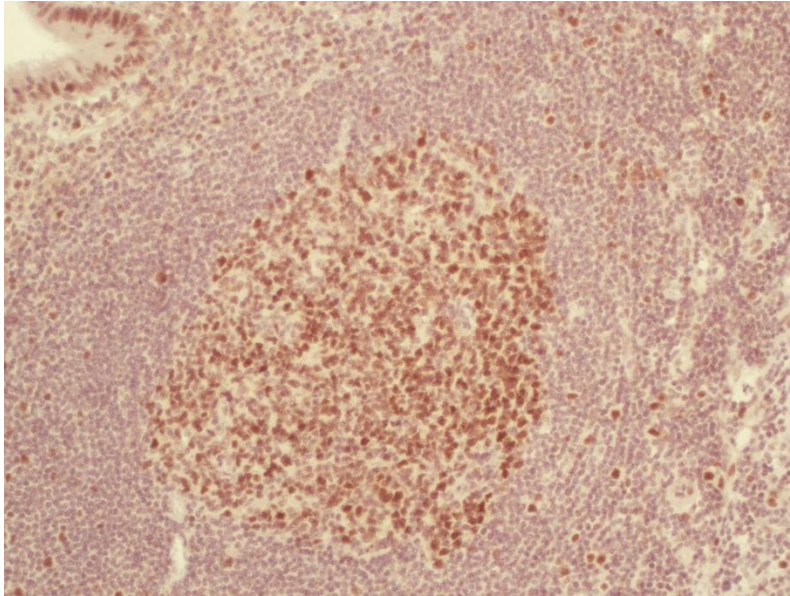
5.1.2 Apendix

U stanovení protilátky na preparátu apendixu očekávám střední až silnou jadernou reakci u všech buněk.



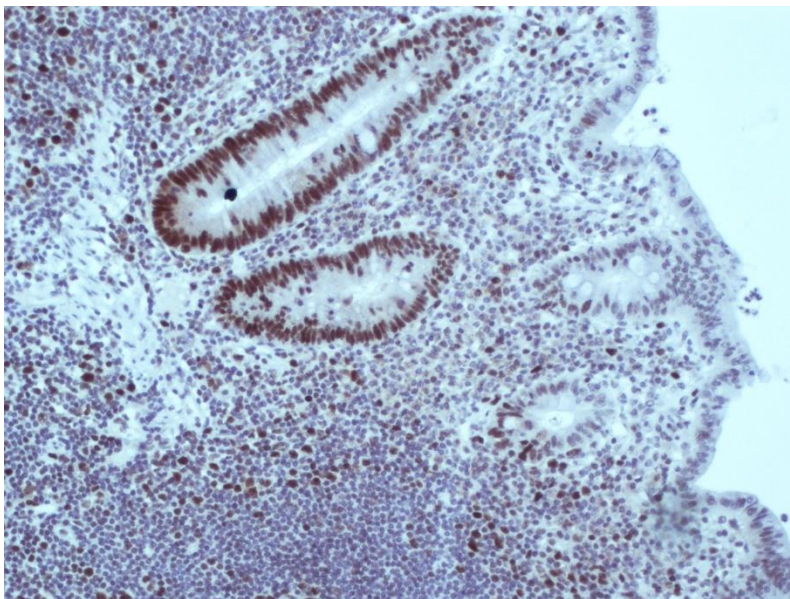
Obrázek 17 Apendix, Roche, zvětšení 150x

Protokol Roche s UltraView detekčním systémem neposkytl uspokojivý výsledek (Obrázek 17). Buňky apendixu vykazují slabou jadernou reakci. Některé buňky tkáně nevykazují žádnou reakci.



Obrázek 18 Apendix, amplifikace, zvětšení 150x

Výsledek použití protokolu s amplifikačním kitem ukazuje slabou reakci v buňkách apendixu.



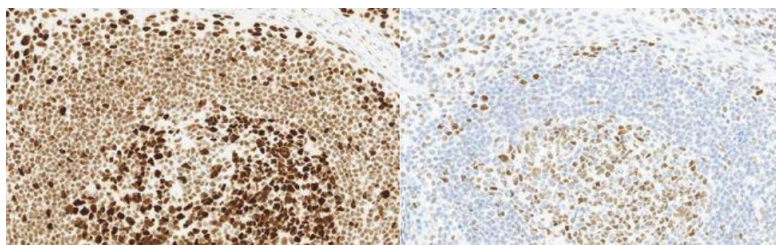
Obrázek 19 Apendix, NordiQC, zvětšení 150x

Apendix z obrázku 19 reaguje na protilátku střední až jadernou reakcí všech buněk. Tento jev jsme pozorovali u protokolu od společnosti NordiQC.

Na rozdíl od předchozích dvou protokolů firmy Roche, protokol NordiQC obsahoval detekční kit formátu OptiView. Použitím tohoto protokolu sledujeme optimální reakce buněk tonsily i apendixu, proto k dalším vyšetřením zvolíme protokol s detekčním systémem OptiView.

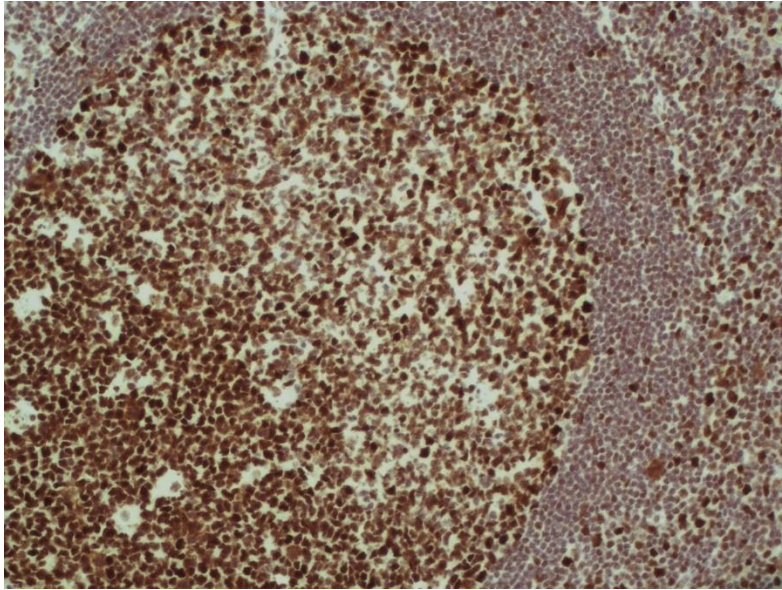
5.2 Testovací sklo NordiQC

Komerční sklo slouží ke kalibraci metody. Sklo společnosti NordiQC obsahovalo tkáňové řezy tonsily, apendixu a dvou adenokarcinomů tlustého střeva.



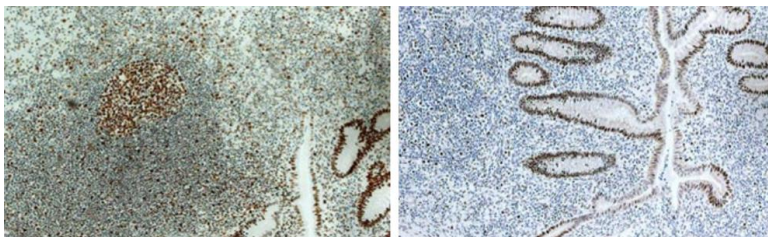
Obrázek 20 Tonsila, optimální (vlevo) a nedostačující stanovení (Nielsen, 2014)

Levá polovina obrázku 20 znázorňuje optimální reakci tonsily při použití detekčního systému OptiView v protokolu. Klon použitý pro stanovení MSH2 proteinu je mAb klon G219-1129. Plášťová zóna vykazuje výraznou střední jadernou reakci, B-buňky v germinálních centrech prezentují silnou jadernou reakci. V pravé části obrázku vidíme nedostatečnou reakci buněk preparátu tonsily. Germinální centra vykazují slabou reakci, plášťová zóna je téměř bez reakce. K tomuto výsledku může dojít slabou koncentrací protilátky nebo použitím protokolu s detekčním systémem UltraView.



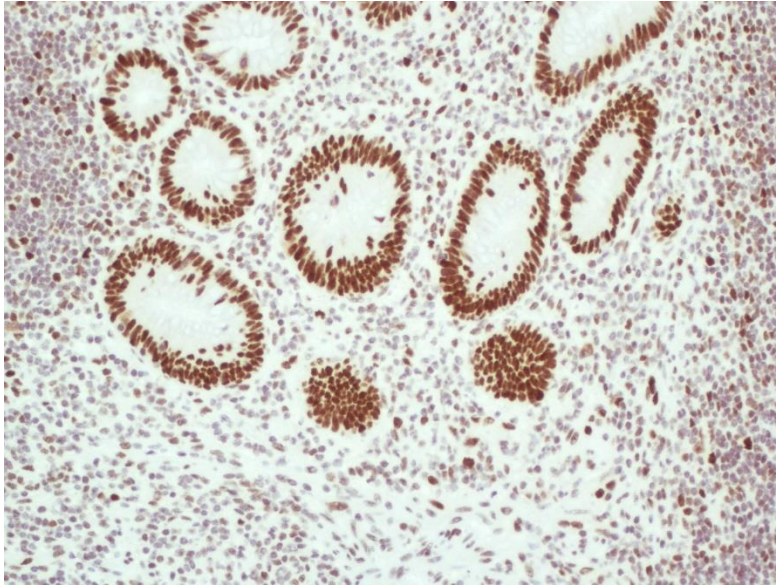
Obrázek 21 Tonsila, testovací sklo NordiQC, zvětšení 150x

Tonsila poskytnutá společností NordiQC (Obrázek 21) vykazuje silnou jadernou reakci v geminálním centru a střední jadernou reakci pláštěvé zóny.



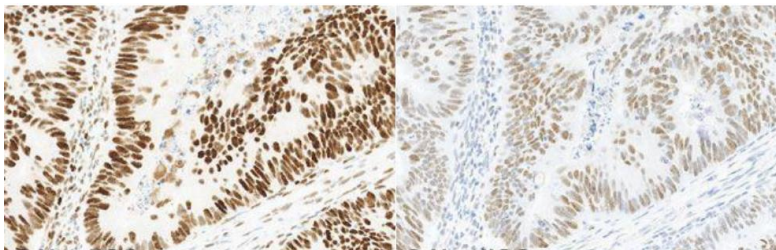
Obrázek 22 Apendix, optimální (vlevo) a nedostačující stanovení (Vyberg, 2005)

Optimální stanovení MSH2 na tkáni apendixu vykazuje střední až silnou reakci téměř všech buněk (Obrázek 22, vlevo). Nedostatečný výsledek stanovení MSH2 zobrazuje výraznou reakci enterocytů, zatímco většina buněk stromatu zůstává negativní.



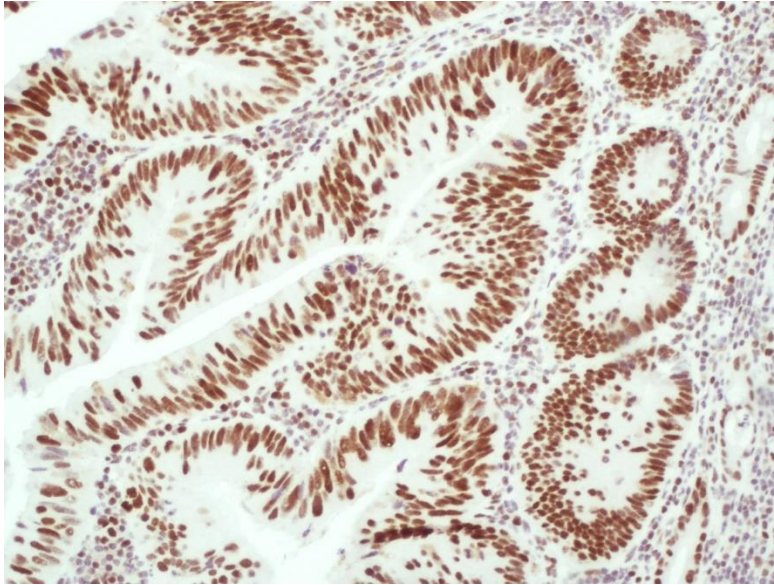
Obrázek 23 Appendix, testovací sklo NordiCQ, zvětšení 150x

Z obrázku 23 je patrná střední až silná reakce jader všech buněk, což odpovídá pozitivní reakci protilátek MSH2 s antigeny buněk appendixu.



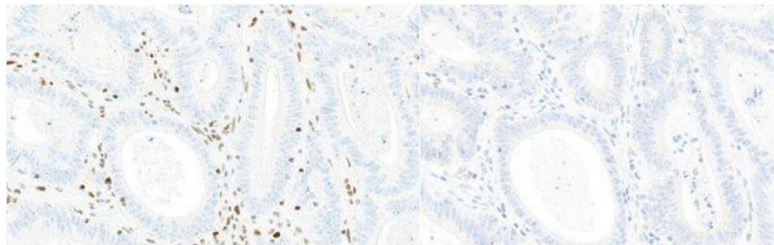
Obrázek 24 Adenokarcinom s normální expresí MSH2, optimální (vlevo) a nedostačující stanovení (Nielsen, 2014)

Optimální stanovení adenokarcinomu s normální expresí MSH2 je ukázáno v levé části obrázku 24. Pro tuto detekci byl použit stejný protokol jako u optimální reakce tonsily. Je zde viditelná střední až silná jaderná reakce rakovinných buněk a výrazná reakce buněk pojivové tkáně. Reakce pozadí není pozorována. Nedostačující reakce této tkáně je vyobrazena v pravé polovině obrázku 24. Je zde použit detekční systém UltraView. Reakce buněk stromatu je negativní. Intenzita reakce neoplastických buněk je značně slabší než u optimálního výsledku.



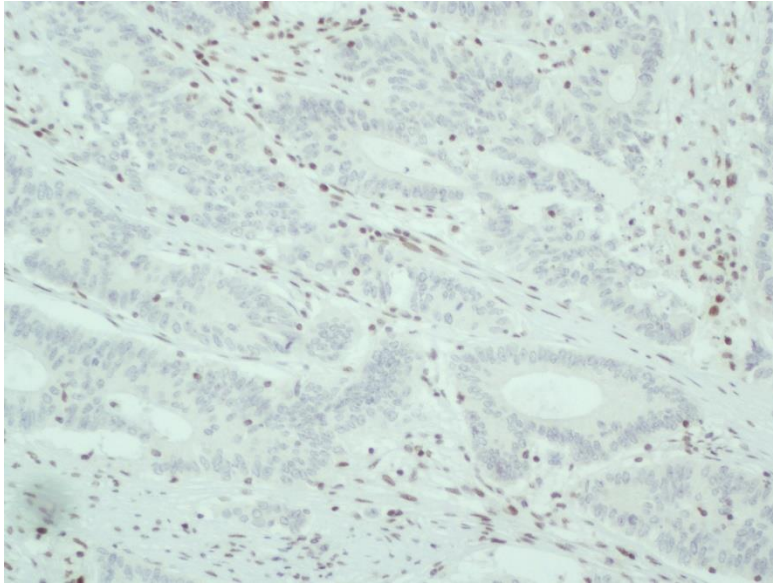
Obrázek 25 Adenokarcinom s normální expresí MSH2, testovací sklo NordiQC, zvětšení 150 x

Všechny rakovinné buňky adenokarcinomu tlustého střeva s normální expresí MSH2 (Obrázek 25) vykazují střední až silnou jadernou reakci.



Obrázek 26 Adenokarcinom se ztrátou exprese MSH2, optimální (vlevo) a nedostačující stanovení (Nielsen, 2014)

Adenokarcinom se ztrátou exprese MSH2 v levé části obrázku 26 vykazuje negativní reakci jader rakovinných buněk. Výraznou jadernou reakci buněk pojivové tkáně lze považovat za pozitivní kontrolu funkce protilátky. Tento výsledek je považován za optimální. Oproti tomu neuspokojivý výsledek reakce této tkáně vykazuje negativní reakci buněk stromatu. Přestože je reakce neoplastických buněk tkáně negativní, na tento výsledek není možné spoléhat.



Obrázek 27 Adenokarcinom se ztrátou exprese MSH2, testovací sklo NordiQC, zvětšení 150x

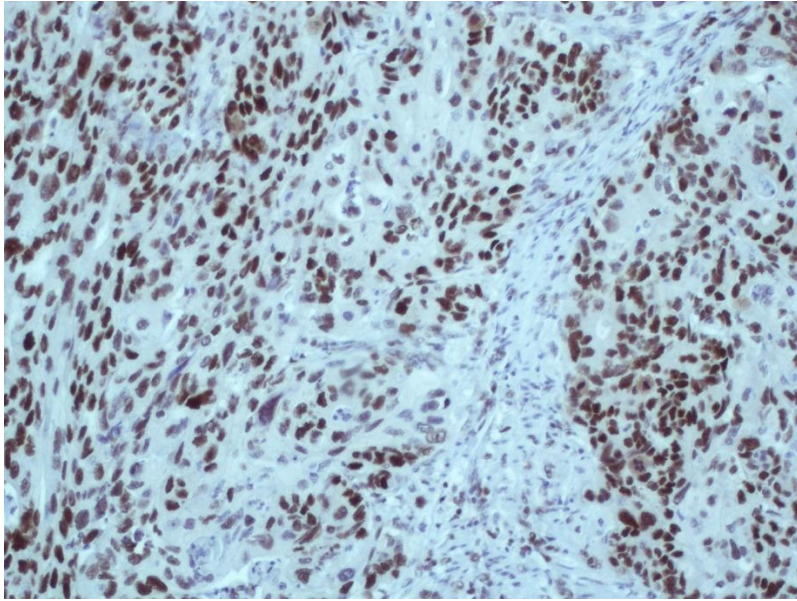
Neoplastické buňky adenokarcinomu tlustého střeva se ztrátou exprese MSH2 (Obrázek 27) nevykazují žádnou reakci. Slabá jaderná reakce buněk pojivové tkáně zde slouží jako kontrola správné funkčnosti protilátky. Tato tkáň může být použita jako negativní kontrola pro IHC vyšetření MSH2 proteinu.

5.3 Testování CRC

Funkci protilátky bylo třeba ověřit na vzorcích pacientů s CRC. K tomuto stanovení jsme použili vzorky čtyř pacientů, vypůjčené ze skladu histologických bločků laboratoře AeskuLab Praha.

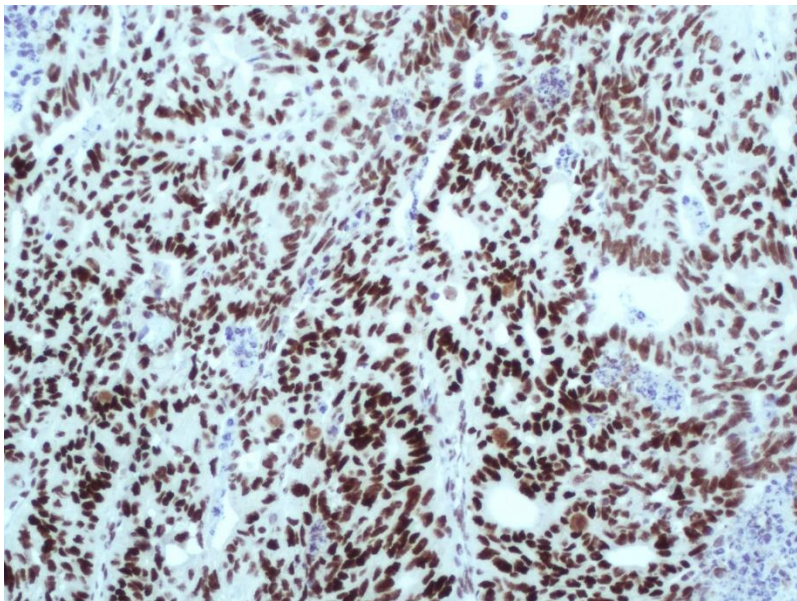
K vzorkům pacientů jsme přidali řez apendixu jako pozitivní kontrolu. Stanovení probíhalo podle NordiQC protokolu s OptiView detekčním systémem.

U adenokarcinomů s normální expresí MSH2 proteinu očekáváme střední až silnou jadernou reakci všech rakovinných buněk.



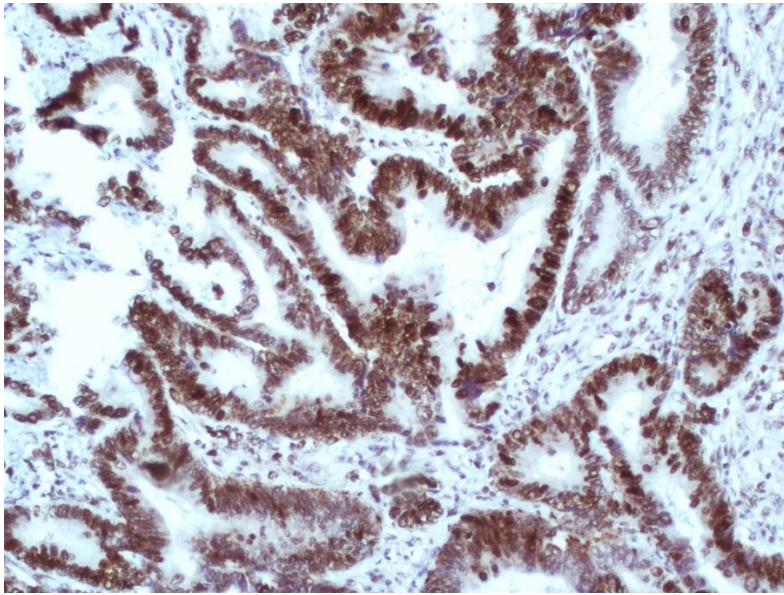
Obrázek 28 Pacient č. 1, NordiQC, zvětšení 150x

U pacienta č. 1 byl diagnostikován adenokarcinom tlustého střeva, nádor prorůstá do subserosy, ale přes serosu se nešíří. Podle TNM klasifikace je tento tumor hodnocen stupněm 3. Na obrázku 28 pozorujeme pozitivní výsledek stanovení. Tkáň adenokarcinomu tlustého střeva pacienta číslo 1 vykazuje silnou jadernou reakci všech rakovinných buněk.



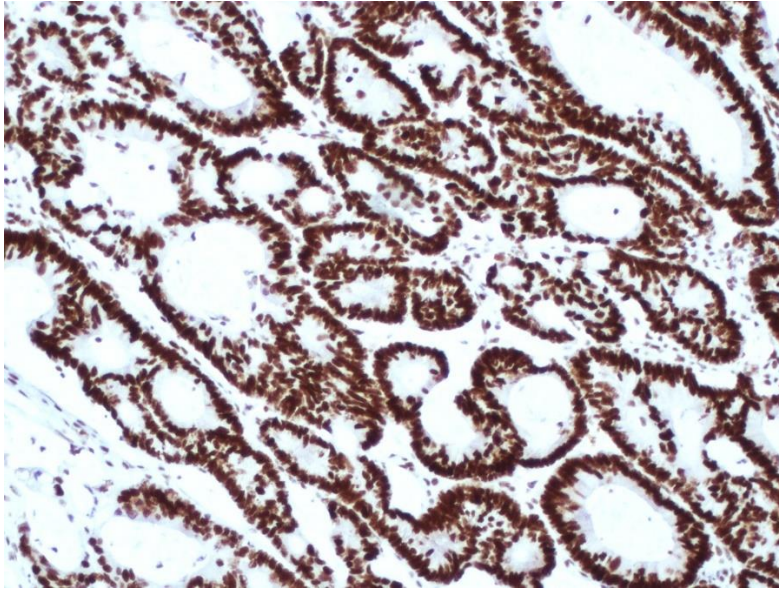
Obrázek 29 Pacient č. 2, NordiQC, zvětšení 150x

U pacienta číslo 2 (Obrázek 29) je viditelná střední až silná reakce jader neoplastických buněk. Diagnostika tohoto pacienta popisuje tumor jako invazivní adenokarcinom tlustého střeva, TNM stupeň 2, s metastázou do jedné lymfatické uzliny a se sedmi metastázami do perikolického tuku. Podle Dukesovy klasifikace je tumor označen stupněm C.



Obrázek 30 Pacient č. 3, NordiQC, zvětšení 150x

Adenokarcinom tlustého střeva s invazí do perikolického tuku s venosní invazí pacienta č. 3 vykazuje střední jadernou reakci neoplastických buněk (Obrázek 30). Podle TNM je tento novotvar hodnocen stupněm 3, což odpovídá stupni C v klasifikačním systému podle Dukese.



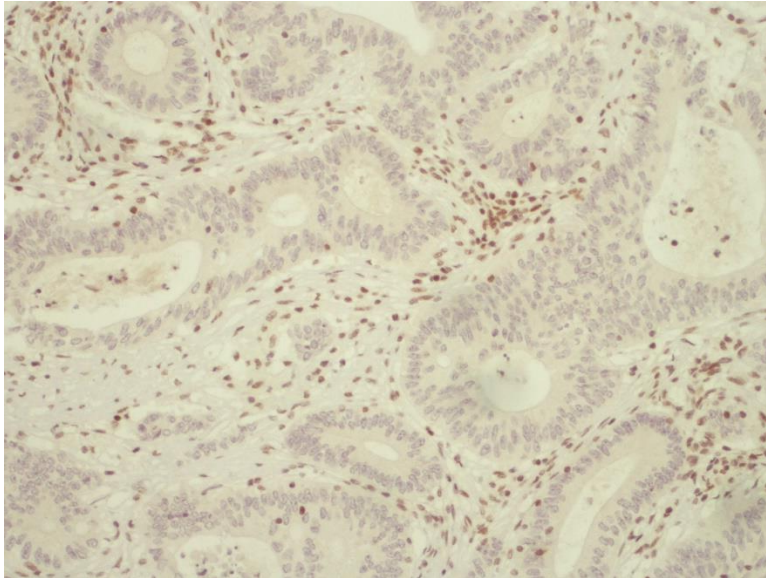
Obrázek 31 Pacient č. 4, NordiQC, zvětšení 150x

Lékařsky je u pacienta číslo 4 diagnostikován mucinózní adenokarcinom tlustého střeva stupně 2 podle TNM, prorůstající do subserózní tukové tkáně stěny střevní. U tohoto pacienta můžeme jako výsledek IHC vyšetření vidět silnou jadernou reakci rakovinných buněk.

5.4 Testování pacientů s mutací MSH2 genu

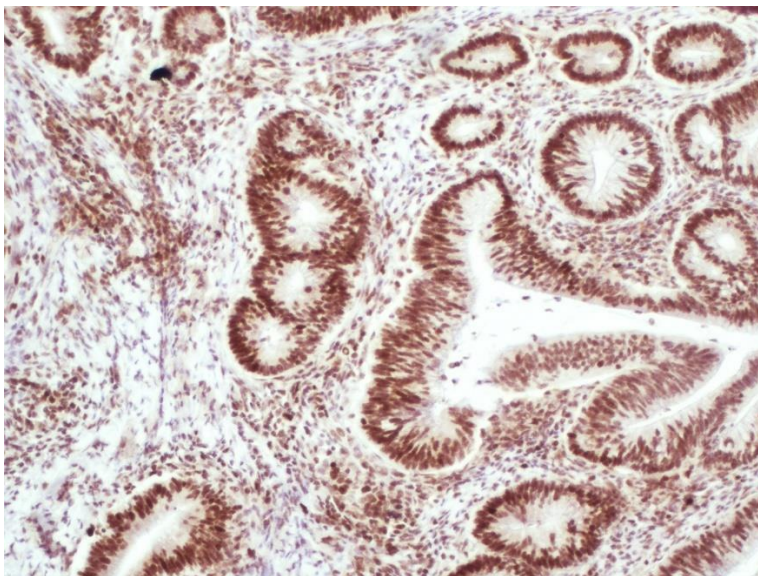
K ověření funkce jsme použili vzorek tkáně pacienta s prokázanou mutací genu MSH2. Použili jsme vzorek adenokarcinomu pacienta poskytnutý histologickým oddělením laboratoře AeskuLab (Obrázek 32).

Jako druhý vzorek jsme použili pacienta s možnou mutací MSH2 genu (Obrázek 33). Kvůli mladému věku pacienta s onemocněním CRC bylo doporučeno genetické vyšetření, které by odhalilo případné onemocnění LS. Tento vzorek jsme tedy použili k vyšetření MSH2 proteinu. V přítomnosti mutace, tedy ztrátě exprese MSH2, by výsledná reakce rakovinných buněk byla negativní, pozitivně by reagovaly buňky pojivové tkáně.



Obrázek 32 Pacient s prokázanou mutací MSH2, zvětšení 150x

Negativní jaderná reakce neoplastických buněk adenokarcinomu pacienta potvrdila výsledek genetického vyšetření – pacient má pozitivní nález HNPCC.



Obrázek 33 Pacient s možnou mutací genu MSH2, zvětšení 150x

Z Obrázku 33 je vidět silná jaderná reakce rakovinných buněk. Pozitivní reakcí vazby Ag s Ab je mutace MSH2 genu vyvrácena.

6 Diskuse

Lékaři laboratoře AeskuLab Patologie diagnostikují benigní i maligní nádory tlustého střeva, ale i prostaty, děložního čípku, prsu, žaludku a mnoho dalších. Nejprve pozorují pod mikroskopem tkáňové řezy obarvené histologickým barvivem hematoxylin-eosin. Pokud není možné jednoznačně určit karcinom, pro další diagnostiku využívají širokého spektra imunohistochemických vyšetření na průkaz antigenů. Při diagnostice CRC u pacientů ve věku do 35 let lze předpokládat na HNPCC. V takových případech se vzorek odesílá do jiných laboratoří specializovaných na molekulárně genetická vyšetření. Cílem této práce tedy bylo rozšířit spektrum diagnostických metod o stanovení dědičné formy kolorektálního karcinomu, tedy Lynchova syndromu pomocí IHC detekce MSH2 proteinu. Diagnostika HNPCC by mohla následně probíhat v IHC laboratoři AeskuLab. Výhodami tohoto stanovení jsou zejména rychlost vyšetření, jednoduchost a jeho finanční dostupnost.

Při zavádění nového imunohistochemického vyšetření byl nejprve proveden průzkum, jaká protilátka by pro toto stanovení byla nejvhodnější, jaké jsou úspěšnosti správně pozitivních výsledků jednotlivých klonů a jestli je vybraná protilátka kompatibilní s imunostainerem, který se používá v IHC laboratoři AeskuLab.

K takovému průzkumu bylo využito informací společností NordiQC a UK NEQAS. Klíčovým aspektem správného stanovení byl výběr protilátky. Monoklonálních protilátek proti MSH2 proteinu existuje několik druhů. Společnost NordiQC během testování kvality v letech 2008 a 2014 (Nielsen, 2008) (Nielsen 2014) využila čtyř protilátek – mAb FE11, mAb G219-1129, mAb 25D12, mAb 27. Účinnosti testovaných protilátek zobrazuje tabulka 6. V průzkumu z roku 2008 bylo použito koncentrovaných protilátek (Nielsen, 2008), které bylo třeba naředit před použitím, v roce 2014 byly použity koncentrované protilátky i protilátky formátu RTU (Nielsen, 2014).

Tabulka 6 Účinnost protilátek, testování NordiQC (Nielsen, 2008, Nielsen, 2014)

	mAb FE11	mAb 27	mAb 25D12	mAb G219-1129
Run 2008	67 %	86 %	88 %	70 %
Run 2014	59 %	Netestováno	0 %	50 %
Run 2014 (RTU)	96 %	Netestováno	0 %	90 %

Protilátku se obvykle vybírá podle úspěšnosti testování a také podle toho, zda je kompatibilní Ventana. Klon mAb FE11 ve formátu RTU z běhu 2014 dosahoval nejvyšší účinnosti (až 96 %), nebylo jej ovšem možné stanovit na analyzátoru od firmy Ventana. S ohledem na tento přístroj jsme vybrali klon mAb G219-1129, jehož účinnost dosahovala 90 %. Podle informací z UK NEQAS (Parry, 2014a) je tento klon nejčastěji používaný laboratořemi ke stanovení MSH2 proteinu.

Dalším krokem bylo nastavit protokol pro detekci MSH2 proteinu. Využili jsme protokol doporučený firmou Roche s detekčním systémem UltraView. UltraView Universal DAB Detection Kit funguje na principu detekce specifických králičích a myších primárních protilátek, které se váží na Ag tkání parafinových řezů. Specifická protilátka je lokalizována směsí sekundárních protilátek označených enzymem. Tento komplex se vizualizuje substrátem z DAB chromogenu a peroxidu vodíku a vzniká hnědá sraženina. Na základě testování společnosti NordiQC z roku 2014 je doporučeno použít tkáň appendixu a tonsily jako kontrolu pro stanovení. Preparát tonsily však vykazoval slabou jadernou reakci B-buněk plášťové zóny a slabou až střední jadernou reakci germinální center lymfatických folikulů. I u appendixu byla v buňkách tkáně pozorována slabá jaderná reakce. Tento výsledek neodpovídal výsledkům testování NordiQC – reakce byla mnohem slabší. Podle společnosti NEQAS (Parry, 2014b) není tkáň tonsily vhodná jako kontrola. Silná jaderná reakce v lymfatických folikulech a epitelu by mohla ztížit odhad citlivosti metody. Z tohoto důvodu je doporučeno použít jako kontrolní vzorek tkáň appendixu a adenokarcinomu tlustého střeva s normální expresí MSH2.

Vzhledem ke slabé intenzitě reakce jsme do dalšího protokolu přidali amplifikaci k zesílení signálu. Amplifikační kit používá specifické králičí IgG těžké a lehké řetězce a myší specifické IgG těžké řetězce, které se váží s primární protilátkou a tím dochází ke zvýšení počtu protilátek vázaných na síť Ag a rovněž se zvyšuje intenzita stanovení. Díky amplifikačnímu kitu bylo sledováno zesílení reakce na obou preparátech, stále však nebylo dosaženo požadovaných výsledků.

NordiQC i NEQAS doporučují k detekci MSH2 využít protokol s detekčním systémem OptiView. OptiView DAB IHC Detection Kit totiž využívá vazby Ag a specifických myších a králičích protilátek ve tkáňových řezech (parafinových nebo zmrazených). Tyto primární protilátky jsou lokalizované směsí sekundárních protilátek, které dále tvoří vazbu s enzymem značenou protilátkou terciární. Terciární

protilátka je, stejně jako u UltraView, vizualizována substrátem peroxidu vodíku s DAB chromogenem za vzniku hnědé sraženiny. Toto třetí testování přineslo uspokojivé výsledky – silnou jadernou reakci B-buněk v germinálních centrech a střední reakci B-buněk plášťové zóny u tonsily a střední jadernou reakci buněk apendixu. Protokol s OptiView detekčním systémem byl zvolen jako optimální a byl použit v dalších fázích testování.

Pomocí DAB chromogenu jsou vizualizovány struktury tkáňových preparátů a je možné sledovat výsledky reakce pod mikroskopem. Pro lepší vizualizaci je však preparát dobarven Gillovým hematoxylinem. Jedná se o histologické barvení jader IHC preparátu, dosahuje se tím pozitivní reakce vůči okolním strukturám preparátu. (Beranová, 2012)

Jak už bylo zmíněno, imuhistochemická detekce probíhá na principu vazby antigen-protilátka. Protilátky se vážou na místa, kde je přítomen antigen, v našem případě MSH2 protein. Pozitivní reakce stanovení tedy signalizuje normální expresi MSH2, tzn., že se nejedná o mutaci tohoto MMR genu. Tohoto faktu bylo využito při testování MSH2 u pacientů s CRC. Z našich výsledků je patrné, že všechny čtyři vzorky vykazují pozitivní, střední až silnou jadernou reakci rakovinných buněk adenokarcinomu. Na základě diagnostických vyšetření bylo zjištěno, že vzorky pacientů 1 – 4 obsahovaly invazivní adenokarcinomy tlustého střeva. Tabulka 7 zobrazuje výsledky detekce MSH2 proteinu a následnou diagnostiku HNPCC. Pozitivními výsledky našeho testování byla vyvrácena hereditární forma CRC u všech 4 pacientů. Shodou mezi našimi výsledky a diagnózami stanovenými lékařem byla potvrzena funkčnost IHC stanovení MSH2 proteinu.

Tabulka 7 Detekce MSH2 proteinu a diagnostika HNPCC u pacientů s CRC

	Detekce MSH2 proteinu	HNPCC/Lynchův syndrom
Pacient č. 1	Pozitivní	Negativní
Pacient č. 2	Pozitivní	Negativní
Pacient č. 3	Pozitivní	Negativní
Pacient č. 4	Pozitivní	Negativní

Zvýšená pozornost je věnována pacientům, u kterých vzniká CRC v mladém věku. Vznik CRC ve věku do 35 let může signalizovat Lynchův syndrom. K vyšetření

LS bývá nejčastěji využito molekulárně genetických vyšetření. Účelem našeho testování detekce MMR proteinu bylo zavést vyšetření LS do IHC praxe. Ke stanovení byly použity dva vzorky pacientů. U prvního z nich byl LS v minulosti prokázán molekulárně genetickým vyšetřením. Po provedení IHC vyšetření tkáň adenokarcinomu vykazovala negativní reakci v rakovinných buňkách, buňky pojivové tkáně reagovali pozitivně. Tento výsledek našeho stanovení potvrzuje diagnózu HNPCC u tohoto pacienta. Díky diagnóze stanovené genetickým vyšetřením mohla být vyloučena falešná negativita detekce MSH2 proteinu a současně byla ověřena funkčnost této metody.

V této fázi IHC testování byl použit vzorek pacienta, u kterého byl zjištěn CRC v poměrně mladém věku. U tohoto pacienta byl předpoklad, že karcinom je genetického původu. Z tohoto důvodu jsme využili detekci MSH2 proteinu jako průkaz HNPCC. Preparát tkáně adenokarcinomu vykazoval silnou pozitivní reakci jader rakovinných buněk. To signalizuje normální expresi MSH2. Z těchto výsledků byla vyloučena hereditární forma CRC způsobená ztrátou funkce MSH2 proteinu. Stále však nelze jednoznačně vyloučit LS.

Jak již bylo zmíněno, HNPCC bývá způsobem MMR proteiny, nejčastěji MLH1, MSH2, MSH6 a PMS2. Z tohoto důvodu nelze vyloučit LS u pacienta, u kterého výsledek IHC detekce MSH2 proteinu byl negativní, tzn., že zde nebyla prokázána ztráta funkce MSH2 genu. Lynchův syndrom totiž může být způsoben mutací genu v některém z ostatních MMR proteinů. MMR proteiny MSH2 a MSH6 tvoří heterodimer. Často tedy dochází k současné ztrátě MSH2 a MSH6 proteinů u pacientů s mutací v genu MSH2. Spekuluje se o tom, že defekt MMR způsobený ztrátou MSH2 může vést k selektivní mutaci genu MSH6. Dalšími MMR proteiny tvořícími heterodimer jsou MLH1 a PMS2. Zvýšení citlivosti IHC metod by mohlo být docíleno přidáním protilátek MSH6 a PMS2 do vyšetřovacího panelu. (Ellis, 2005, s. 101-103)

Imunohistochemické laboratoře v ČR i ve světě, které provádí diagnostiku LS, používají pro tato stanovení 2, 3 nebo 4 protilátky. Kromě detekce MSH2 se v těchto laboratořích testují i protilátky proti MSH6, MLH1 a PMS2. Obecně platí, že čím více Ab proti MMR proteinům je použito při stanovení, tím spolehlivější je diagnostika HNPCC. Například Bioptická laboratoř v Plzni, která se také specializuje na IHC vyšetření, nabízí stanovení všech čtyř MMR proteinů. Toto je nejspolehlivější způsob, jak odhalit mutace MMR genů a následné onemocnění LS. V současné době jsou kromě Bioptické laboratoře v Plzni IHC vyšetření MLH1 a MSH2, případně MSH6 a PMS2

prováděna v Ústavu patologie a molekulární genetiky FN Motol v Praze, MOÚ v Brně, Ústavu patologie FN Ostrava a Onkologickém centru v Novém Jičíně. (Vyzula, 2016)

Vyšetření HNPCC pomocí 4 protilátek si klade za cíl i laboratoř AeskuLab. V průběhu následujících měsíců budou mezi IHC metody zařazeny i detekce MLH1, MSH6 a PMS2 proteinů.

V oboru imunohistochemie je stále co vylepšovat. Výsledky testování MMR proteinů publikované v časopise *American Journal Surgical Pathology* (Ellis, 2005) ukazují, že IHC vyšetření nemohou zcela nahradit testy mikrosatelitní nestability, protože ne všechny IHC-pozitivní případy vykazují stejnou formu positivity ve všech tumorech a slabá fokální exprese MMR proteinu může být asociována s MSI nebo genovou mutací. Hlavním nedostatkem je zde nízká senzitivita některých MMR proteinů.

Podle této studie má IHC stanovení mutace MSH2 genu účinnost 91 %. Z tohoto důvodu se doporučuje použití IHC metod jako první screening u pacientů s předpokládanou mutací MMR genů a to hlavně díky jednoduchosti a dostupnosti těchto vyšetření. Při negativní reakci IHC vyšetření, tedy ztrátě exprese MMR proteinu by byly vzorky analyzovány kvůli mutacím v MMR genech. Při pozitivní reakci IHC vyšetření, tedy normální expresi proteinu by vzorky byly otestovány na mikrosatelitní nestabilitu. Až v případě nálezu MSI by docházelo k analýze mutací MMR genů.

7 Závěr

Několikastupňovým testováním detekce MSH2 proteinu jsme dosáhli požadovaných výsledků. Při zadaném protokolu doporučeném společností NordiQC s detekčním systémem OptiView je metoda považována za účinnou. Neoptimálnější pozitivní kontrolou pro toto stanovení je appendix.

Imunohistochemickou detekci MSH2 jsme zařadili mezi již stávající IHC vyšetření laboratoře BioLab Praha. Díky této metodě bude možné diagnostikovat genetické faktory na vznik kolorektálního karcinomu, zvýšit predikci dalších karcinomů rodinných příslušníků nemocného pacienta a snížit mortalitu tohoto onemocnění.

Dalším cílem imunohistochemické laboratoře AeskuLab Patologie k. s. bude rozšířit spektrum metod o další tři mismatch repair proteiny MSH6, MLH1 a PMS2.

Seznam zkratek a symbolů

Ab	Protilátka
Ag	Antigen
AHH	aryl hydrocarbon hydroxylasa
APC	gen adematózní polypózy tlustého střeva
BMI	body mass index
CC1	Cell Condition 1
CRC	kolorektální karcinom
DAB	Diaminobenzidin
DCC	tumor supresorový gen, deleted in colon cancer
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAP	familiární adenomatózní polypóza
FITC	fluorescein 5-isokyanát fluorescence
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
ICC	Immunocytochemistry
Ig	Imunoglobulin
IgG	imunoglobulin G
IHC	imunohistochemie, imunohistochemické
ISH	in situ hybridizace
LCS	liquid coverslip
LS	Lynchův syndrom
mAb	monoclonal antibody, monoklonální protilátka
MLH1	mut L homolog 1
MLH3	mut L homolog 3
MMR	mismatch repair, chybné párování

MMRd	mismatch repair deficiency, porucha v chybném párování
MSH2	mut S homolog 2
MSH6	mut S homolog 6
MSI	nestabilita mikrosatelitu, mikrosatelitová nestabilita
MSI-H	microsatellite instability high, vysoká nestabilita
MSI-L	microsatellite instability low, nízká nestabilita
MSS	microsatellite stable, mikrosatelitní stabilita
MTS	Muir-Torreův syndrom
NordiQC	Nordic immunohistochemical Quality Control
p	krátké raménko chromosomu
p53	tumor supresorový gen p53
PAP	peroxidáza anti peroxidázový komplex
PCNA	proliferating cell nuclear antigen, svírací protein
PCR	polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PMS1	postmeiotic segregation increased 1
PMS2	postmeiotic segregation increased 2
q	dlouhé raménko chromosomu
RTU	ready to use, připraveno k použití
SISH	silver in situ hybridizace
TNM	tumor, node, metastasis; klasifikační systém CRC
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethanu
UICC	Union Internationale Contre le Cancer
UK NEQAS	the United Kingdom National External Quality Assessment Service

Seznam použité literatury

ABRAHÁMOVÁ, Jitka, Ludmila BOUBLÍKOVÁ a Drahomíra KORDÍKOVÁ. *Rakovina tlustého střeva a konečníku*. Praha: Triton, 2000. 20 s. ISBN 80-7254-133-1.

ADAM, Zdeněk, Marta KREJČÍ a Jiří VORLÍČEK. *Speciální onkologie: Příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. Praha: Galén, 2010. 417 s. ISBN 978-80-7262-648-9.

BERANOVÁ Milena a Zbyněk TONAR. *Principy a příklady imunohistochemie: Příručka pro studenty* [online]. Ústav histologie a epidemiologie LF UK v Plzni, 2012, [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: <http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc/>

DAUM, Ondřej, Zdeněk BENEŠ a Ladislav HADRAVSKÝ. Lynchův syndrom v rukách patologa. In: *Česko-slovenská patologie a soudní lékařství* [online]. 2014, **50**(1), 18-24 [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://www.lynch.cz/doc/Daum.pdf>

DUŠEK, Ladislav, Jan MUŽÍK, Miroslav KUBÁSEK, Jana KOPTÍKOVÁ, Jan ŽALOUDÍK a Rostislav VYZULA. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Masarykova univerzita, 2005. [cit. 2016-03-27]. Dostupné z: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.

DUŠEK, Ladislav, Miroslav ZAVORAL, Ondřej MÁJEK, Štěpán SUCHÁNEK, Jan MUŽÍK, Tomáš PAVLÍK, Lenka ŠNAJDROVÁ a Jakub GREGOR. *Rakovina tlustého střeva a konečníku (kolorektální karcinom)* [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2016. [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-verejnost--kolorektalni-karcinom>. ISSN 1804-0888.

DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. Praha: Grada, 2009. 532 s. ISBN 978-80-247-3240-4.

DYLEVSKÝ, Ivan. *Základy funkční anatomie člověka*. Praha: Manus, 2007. 194 s. ISBN 978-80-86571-00-3.

ELLIS, Nathan, Jinru SHIA and David S. KLIMSTRA et al. Value of Immunohistochemical Detection of DNA Mismatch Repair Proteins in Predicting Germline Mutation in Hereditary Colorectal Neoplasms. In: *American Journal of Surgical Pathology*. January 2005, **29**(1), 96-104. ISSN 1532-0979.

FORETOVÁ, Lenka, Eva MACHÁČKOVÁ, Jana ŠMARDOVÁ a Jitka PACHOLÍKOVÁ. *Molekulární biologie a genetika nádorů*. Praha: Grada, 2009. 48 s. ISBN 978-80-247-3324-1.

FORETOVÁ, Lenka, Marek SVOBODA a Ondřej SLABÝ a kol. *Molekulární genetika v onkologii*. Praha: Mladá fronta a. s., 2014. 183 s. ISBN 978-80-204-3236-0.

FORETOVÁ, Lenka. *Dědičnost jako rizikový faktor pro vznik nádorů*. 4. vyd. Brno: Masarykův onkologický ústav, 2006. ISBN 80-238-7619-8.

GREESON, Joel K et al. Pathologic Predictors of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *American Journal of Surgical Pathology*. January 2009, **33**(1), 126-133. ISSN 0147-5185.

HADRAVSKÝ, Ladislav a Ondřej BAUM. Lynchův syndrom [online]. Bioptická laboratoř s.r.o. Plzeň, 2015. [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: <http://www.lynch.cz/>

HOLUBEC, Luboš a kol. *Kolorektální karcinom: Současné možnosti diagnostiky a léčby*. Praha: Grada, 2004. 175 s. ISBN 80-247-0636-9.

JABLONSKÁ, Markéta. *Kolorektální karcinom: časná diagnóza a prevence*. Praha: Grada, 2000. 455 s. ISBN 80-7169-777-X.

KLENER, Pavel. *Základy klinické onkologie*. Praha: Galén, 2011. 96 s. ISBN 978-80-7262-716-5.

KUBÁČKOVÁ, Kateřina a kol. *Vzácné nádory v onkologii*. Praha: Mladá fronta a. s., 2015. 335 s. ISBN 978-80-204-3658-0.

LATA, Jan, Jan BUREŠ a Tomáš VAŇÁSEK et al. *Gastroenterologie*. Praha: Galén, 2010. 256 s. ISBN 978-80-7262-692-2.

LAURIDSEN, Jesper Lund, Mogens VYBERG and Lise EMANUELSEN. Mismatch repair (MMR) proteins [online]. In: *Nordic immunohistochemical Quality Control*. NordiQC, 2015. [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://www.nordiqc.org/Epitopes/MMR-proteins/MMR.htm>

MARTÍNEK, Jindřich a Zdeněk VACEK. *Histologický atlas*. Praha: Grada, 2009. 134 s. ISBN 978-80-247-2393-8.

NIELSEN, Ole, Soren NIELSEN, Mogens VYBERG a Ari RISTIMAKI. Mismatch repair protein MSH2: Assesment Run 22 2008 [online]. In: *Nordic*

immunohistochemical Quality Control. NordiQC, 2008. [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://www.nordiqc.org/Run-22/Assessment/assessment-MSH2.htm>

NIELSEN, Soren, Rasmus ROGE, Mogens VYBERG a Lise EMANUELSEN. Mismatch Repair Protein MSH2 (MSH2): Assessment Run 41 2014 [online]. In: *Nordic immunohistochemical Quality Control*. NordiQC, 2014. [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: http://www.nordiqc.org/Run-41/Assessment/Run41_MSH2.pdf

OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. Praha: Karolinum, 2012, 227 s. ISBN 978-80-2462-109-8.

IBRAHIM, Ashraf and Suzanne PARRY. Lynch Syndrome/HNPCC: Run 105 [online]. In: *Immunocytochemistry*. © UK NEQAS ICC & ISH 2014, **34**(4), 68-76 [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: http://www.ukneqasiccish.org/wp/wp-content/uploads/2014/12/run_105_journal.pdf

PARRY, Suzanne. Lynch Syndrome/HNPCC: Run 107 [online]. In: *Immunocytochemistry*. © UK NEQAS ICC & ISH 2014, **36**(11), 76-84 [cit. 2016-05-11]. Dostupné z: http://www.ukneqasiccish.org/wp/wp-content/uploads/2014/12/run_107_journal.pdf

ROSS, Michael H. and Wojciech PAWLINA. *Histology: A Text and Atlas With correlated cell and molecular biology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. ISBN: 0-7817-6790-3.

SEIFERT, Bohumil, Norbert KRÁL, Ondřej MÁJEK a Štěpán SUCHÁNEK. *Screening kolorektálního karcinomu*. 2. rozšířené vyd. Praha: Maxdorf, 2015. 128 s. ISBN 978-80-7345-444-9.

SHIA, Jinru, Nathan A. ELLIS a David S. KLIMSTRA. The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins. *Virchow Arch*. September 2004, **445**(5), 431-441. ISSN 1432-2307.

SILBERNAGL, Stefan a Florian LANG. *Atlas patofyziologie*. 2. české vyd. Praha: Grada, 2012. 406 s. ISBN 978-80-2473-555-9.

SLABÝ, Ondřej et al. *Molekulární medicína*. Praha: Galén, 2015. 598 s. ISBN 978-80-7492-121-6.

ŠVÍGLEROVÁ, Jitka a Jana SLAVÍKOVÁ. *Fyziologie gastrointestinálního traktu*. 2.

upravené vyd. Praha: Karolinum, 2013. 112 s. ISBN 978-80-246-2189-0.

VORLÍČEK, Jiří (ed.). *Onkologie*. Praha: Triton, 2015. Lékařské repetitorium. 250 s. ISBN 978-80-7387-603-6.

VYBERG, Mogens, Soren NIELSEN a Ari RISTIMAKI. Mismatch repair protein MSH2: Assessment Run 13 2005 [online]. In: *Nordic immunohistochemical Quality Control*. NordiQC, 2005. [cit. 2016-05-10]. Dostupné z: <http://www.nordiqc.org/Run-13/Assessment/assessment-MSH2.htm>

VYZULA, Rostislav a Jan ŽALOUĐÍK a kol. *Rakovina tlustého střeva a konečníku: vybrané kapitoly*. Praha: Maxdorf s. r. o., 2007. 287 s. ISBN 978-80-7345-140-0.

VYZULA, Rostislav. Molekulární genetika a hereditární kolorektální karcinom: Komentář od onkologa [online]. In: *Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně 2016*, [cit. 2016-05-15]. Dostupné z: http://www.linkos.cz/asco/chapter/molekularni-genetika-a-hereditarni-kolorektalni-karcinom-reseni-diagnostickeho-dilematu-hereditarniho-nepolypozyho-kolorektalniho-karcinomu-lynchova-syndromu-familiarniho-kolorektalniho-karcinomu-typu-x-a-syndromu-mnohocetne-polypozy/#komentar_onk_CR/

Seznam obrázků

Obrázek 1 Schematický nákres tlustého střeva a jeho okolí.....	10
Obrázek 2 Anatomická distribuce kolorektálních karcinomů	12
Obrázek 3 Staging CRC podle Dukesovy klasifikace	13
Obrázek 4 Přímá imunohistochemická metoda	25
Obrázek 5 Nepřímá imunohistochemická metoda.....	26
Obrázek 6 Chladicí deska	29
Obrázek 7 Mikrotomový nůž.....	30
Obrázek 8 Napínací stolek.....	31
Obrázek 9 Termostat.....	31
Obrázek 10 Imunostainer.....	32
Obrázek 11 Montovací stroj	33
Obrázek 12 Podložní skla	33
Obrázek 13 Protilátka	34
Obrázek 14 Tonsila Roche UltraView, zvětšení 150x.....	38
Obrázek 15 Tonsila, amplifikace, zvětšení 150x	39
Obrázek 16 Tonsila, NordiQC, zvětšení 150x	39
Obrázek 17 Apendix, Roche, zvětšení 150x.....	40
Obrázek 18 Apendix, amplifikace, zvětšení 150x	41
Obrázek 19 Apendix, NordiQC, zvětšení 150x	41
Obrázek 20 Tonsila, optimální (vlevo) a nedostačující stanovení.....	42
Obrázek 21 Tonsila, testovací sklo NordiQC, zvětšení 150x	43
Obrázek 22 Apendix, optimální (vlevo) a nedostačující stanovení	43
Obrázek 23 Apendix, testovací sklo NordiCQ, zvětšení 150x	44
Obrázek 24 Adenokarcinom s normální expresí MSH2, optimální (vlevo) a nedostačující stanovení	44
Obrázek 25 Adenokarcinom s normální expresí MSH2, testovací sklo NordiQC, zvětšení 150 x	45
Obrázek 26 Adenokarcinom se ztrátou exprese MSH2, optimální (vlevo) a nedostačující stanovení (Nielsen, 2014)	45
Obrázek 27 Adenokarcinom se ztrátou exprese MSH2, testovací sklo NordiQC, zvětšení 150x	46
Obrázek 28 Pacient č. 1, NordiQC, zvětšení 150x	47

Obrázek 29 Pacient č. 2, NordiQC, zvětšení 150x	47
Obrázek 30 Pacient č. 3, NordiQC, zvětšení 150x	48
Obrázek 31 Pacient č. 4, NordiQC, zvětšení 150x	49
Obrázek 32 Pacient s prokázanou mutací MSH2, zvětšení 150x	50
Obrázek 33 Pacient s možnou mutací genu MSH2, zvětšení 150x	50

Seznam tabulek

Tabulka 1 Modifikovaná Dukesova klasifikace stádia CRC	13
Tabulka 2 Korelace mezi klasifikací Dukesovou a TNM.....	14
Tabulka 3 Geny zodpovědné za HNPCC	21
Tabulka 4 Mutace genů způsobující různá onemocnění.....	21
Tabulka 5 Protokoly pro IHC stanovení MSH2 proteinu	36
Tabulka 6 Účinnost protilátek, testování NordiQC	51
Tabulka 7 Detekce MSH2 proteinu a diagnostika HNPCC u pacientů s CRC.....	53

Seznam grafů

Graf 1 Srovnání incidence s ostatními zeměmi světa, přepočet na 100 000 osob	17
Graf 2 Incidence CRC v ČR podle regionů, přepočet na 100 000 osob	18
Graf 3 Incidence a mortalita CRC v ČR, přepočet na 100 000 osob	18