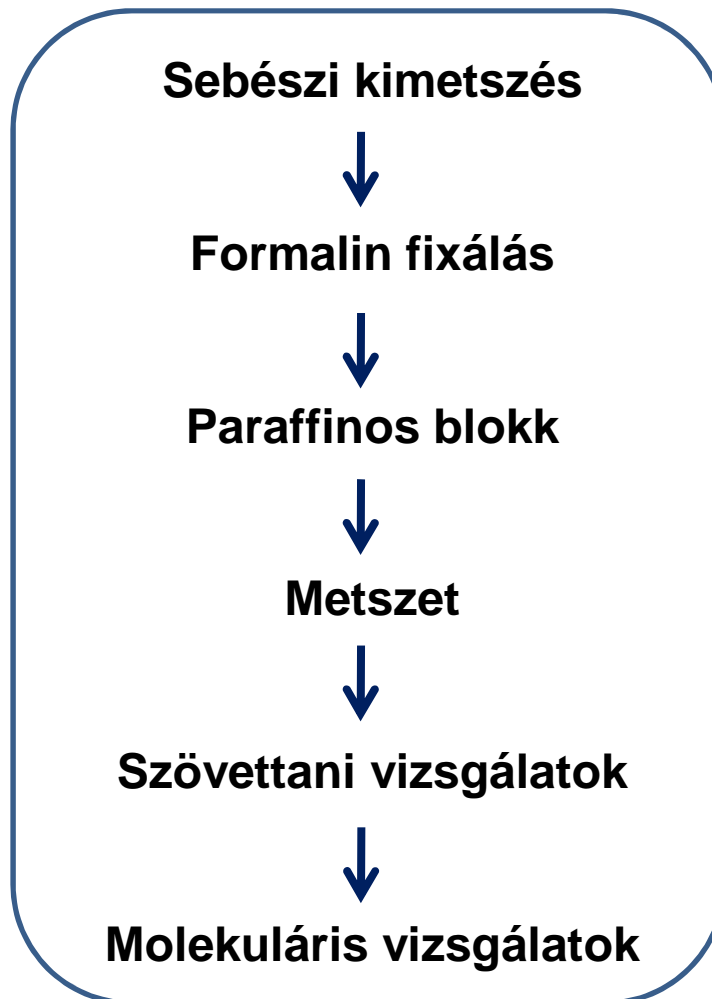


**A minta feldolgozásának alternatívái
malignus lymphomák
molekuláris diagnosztikájában**

Méhes Gábor
DEOEC Pathologiai Intézet
Debrecen

MPT 69. Kongresszusa, Siófok, 2010

A sebészi minta (pl. nyirokcsomó) feldolgozásának KLASSZIKUS lépései



*Standardizált módszer
(SOP)*

Molekuláris vizsgálatok malignus lymphomák diagnosztikájában

- Klonalitás
- Specifikus génátrendeződések, klonális kapcsolat
- Specifikus transzlokációk
- Onkogén/protein expresszió
- Terápiás válasz/reziduális betegség

A sebészi minta (pl. nyirokcsomó) feldolgozásának ALTERNATÍV lépései

Natív minta feldolgozása

- fagyasztva archiválás
- lenyomat
- RNase mentesítés
- vákuumos konzerválás

Fixálás

- formalin
- alternatív fixálószer

Beágyazás (paraffinos blokk)

- alternatív víztelenítés

Metszet

Hisztokémiai kit-ek, detektáló rendszerek

Izoláló kit-ek

- FISH - CISH

A formaldehid (CHO₂) fixálás problémái I.

A. Toxikus hatás

- Lokális irritatív (szem, orr/garat a n. trigeminus ingerlésével, bőr)
- Genotoxikus (International Agency for Research on Cancer: FA is a group 1 carcinogen)
- Felső léguti rák, leukémiák

B. Analitikai/ technikai tényezők

- Kovalens keresztkötések (cross-linking), CH₂OH csoportok addíciója
- Fehérje denaturáció, fehérje/DNS ill. fehérje/RNS komplexek
- Emésztőenzimek hozzáférése korlátozott
- Ideje: 16-24h
 - túl rövid = szövet degradáció
 - túl hosszú = irreverzibilis denaturáció

A formaldehid (CHO₂) fixálás problémái II.

- Minél nagyobb a minta, annál problémásabb a fixálás (colon, emlő, stb.)
 - nagy nyirokcsomók – nagy kísértés
- Neutrális pufferezett: kíméli a szövetet, lassítja a formalin degradációt
- Romlott formalin: a nukleinsavak vizsgálatának legfőbb korlátozó tényezője
- Savanyú kémhatás: reverz transzkripció, Taq polymerase blokkolása
- Kelátképződés (decalcinálás): nucleotid nick, fragment hosszúság csökken
- RNAlater nem keverhető formalinoldattal

Alternatív (formaldehid-mentes) fixálószer

Főbb összetevők: metanol, PEG, sók, ecetsav

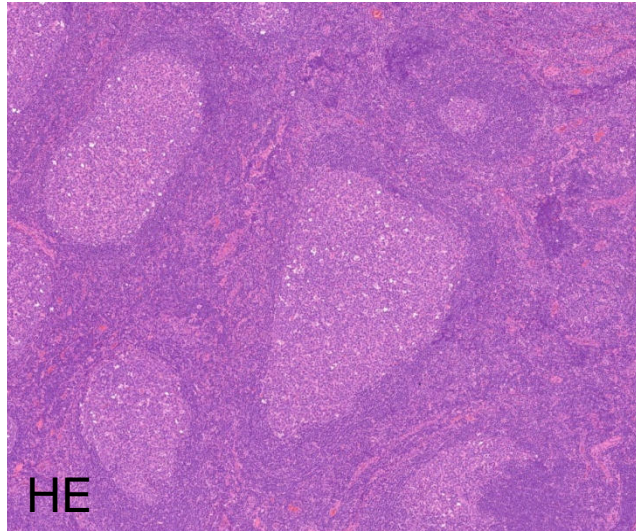
- FineFix (Milestone)
- RCL2 (Alphelys)
- Xpress Molecular Fixative (Sakura)
- Z7 (Lydikis D., Stamp G. et al.)
- HOPE (Goldmann T. et al.)

Referencia

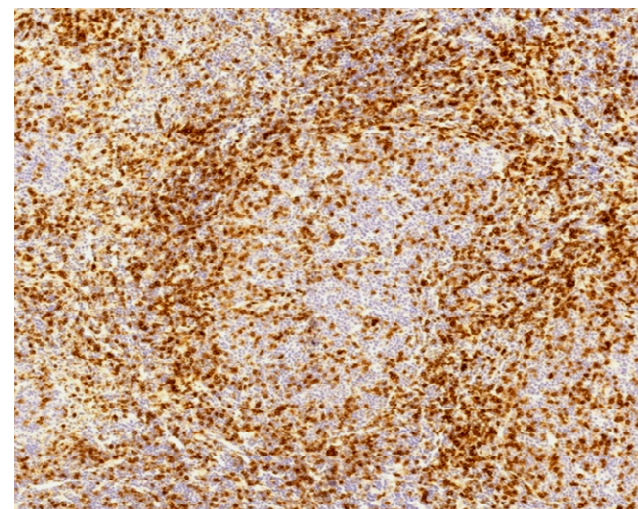
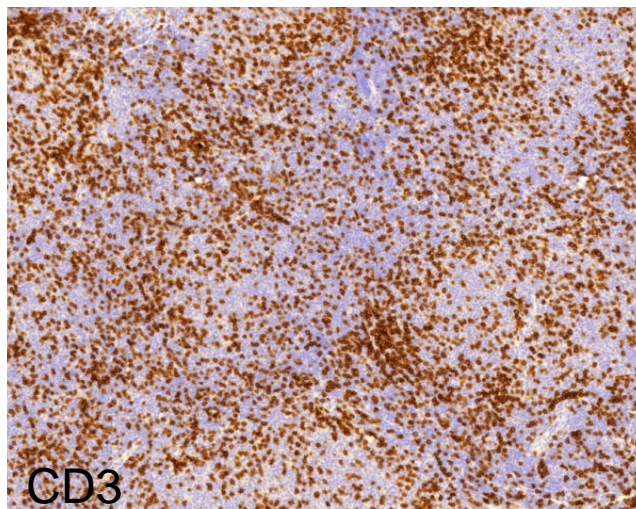
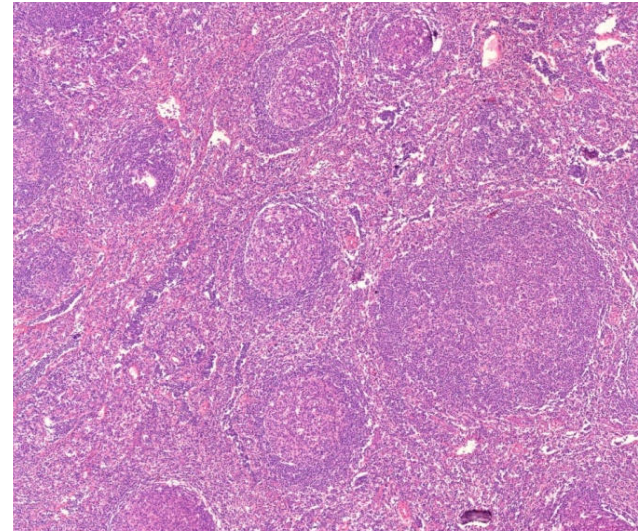
- Szövettanhoz: morfológiai megtartottság,
- Molekuláris vizsgálatokhoz: natív fagyasztott minta

Szöveti és IHC festések formalin és FineFix fixálást követően

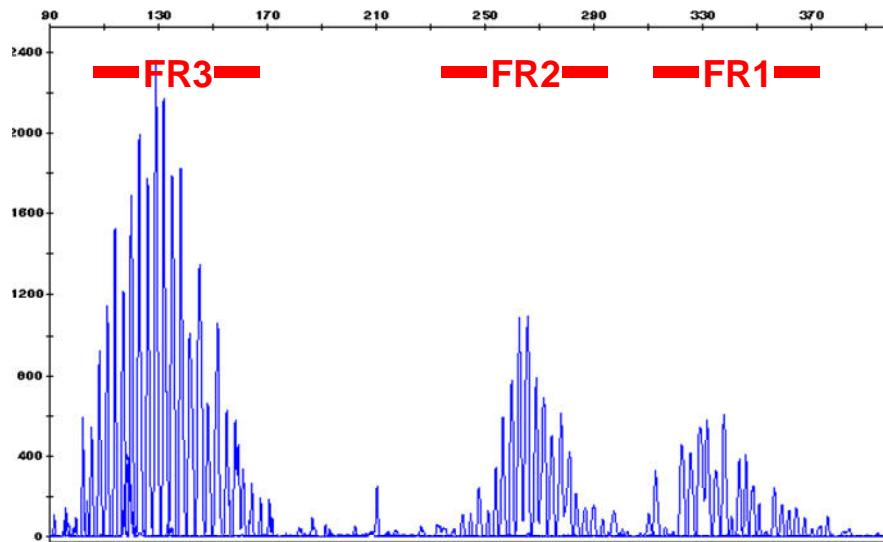
A. Formalin



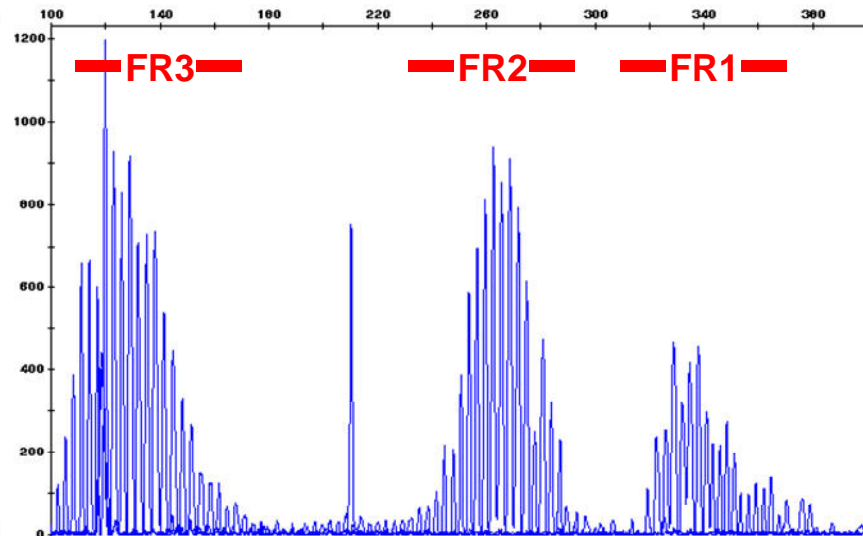
B. FineFix (formaldehyde-free)



IgHV FR 3, FR2 és FR1 fragmentvizsgálat formalinban és FineFix formalin mentes fixálószerben történt fixálás során

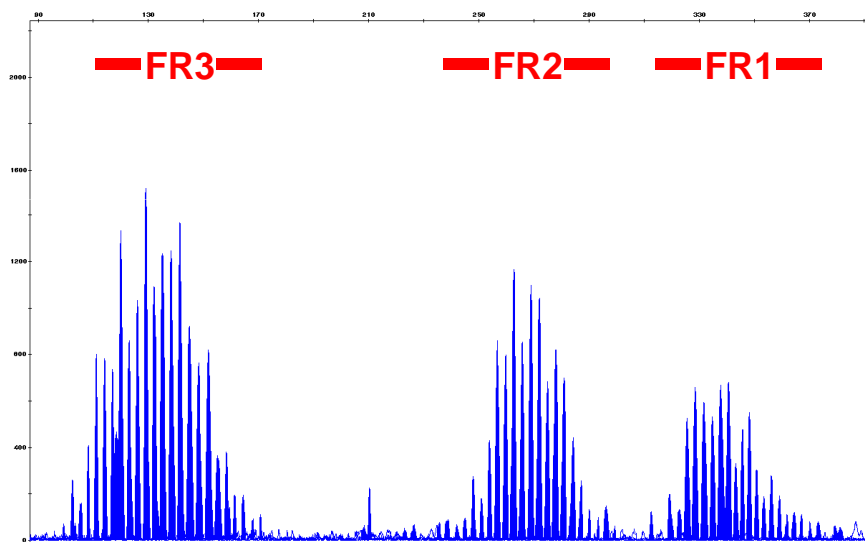


A. Formalin

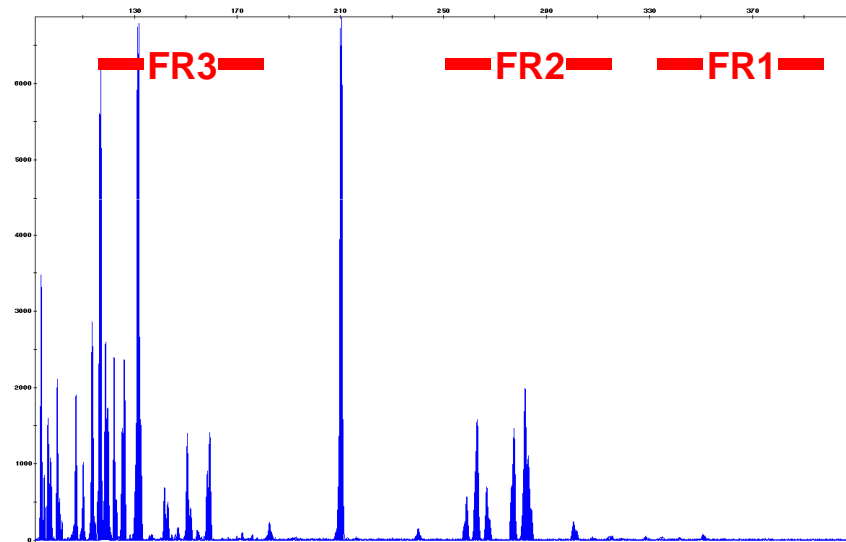


B. FineFix

DNS degradáció következtében keletkezett artefakt IgH klonalitás vizsgálata során

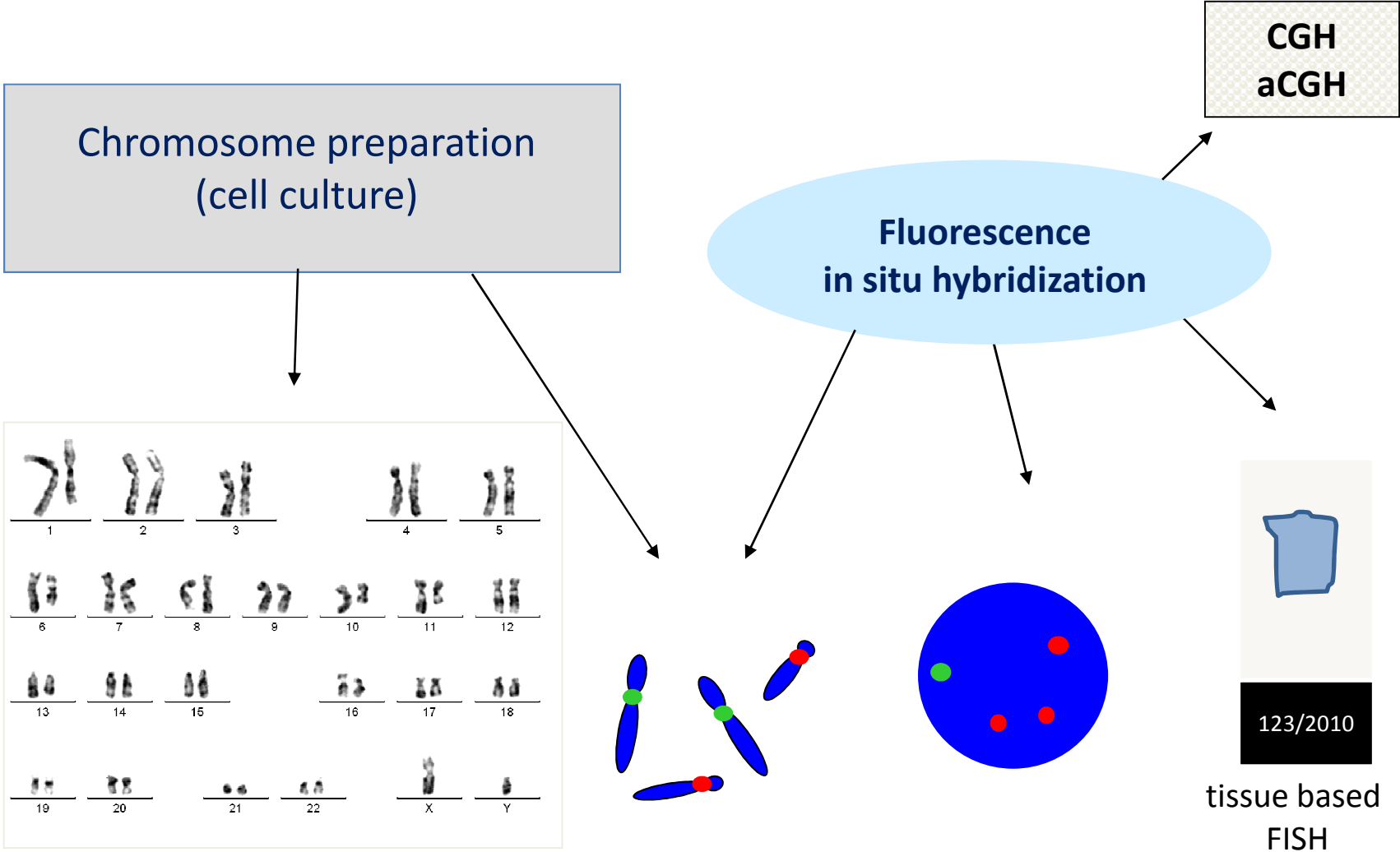


IgHV klonalitás
30 min ischemiás idő elteltével

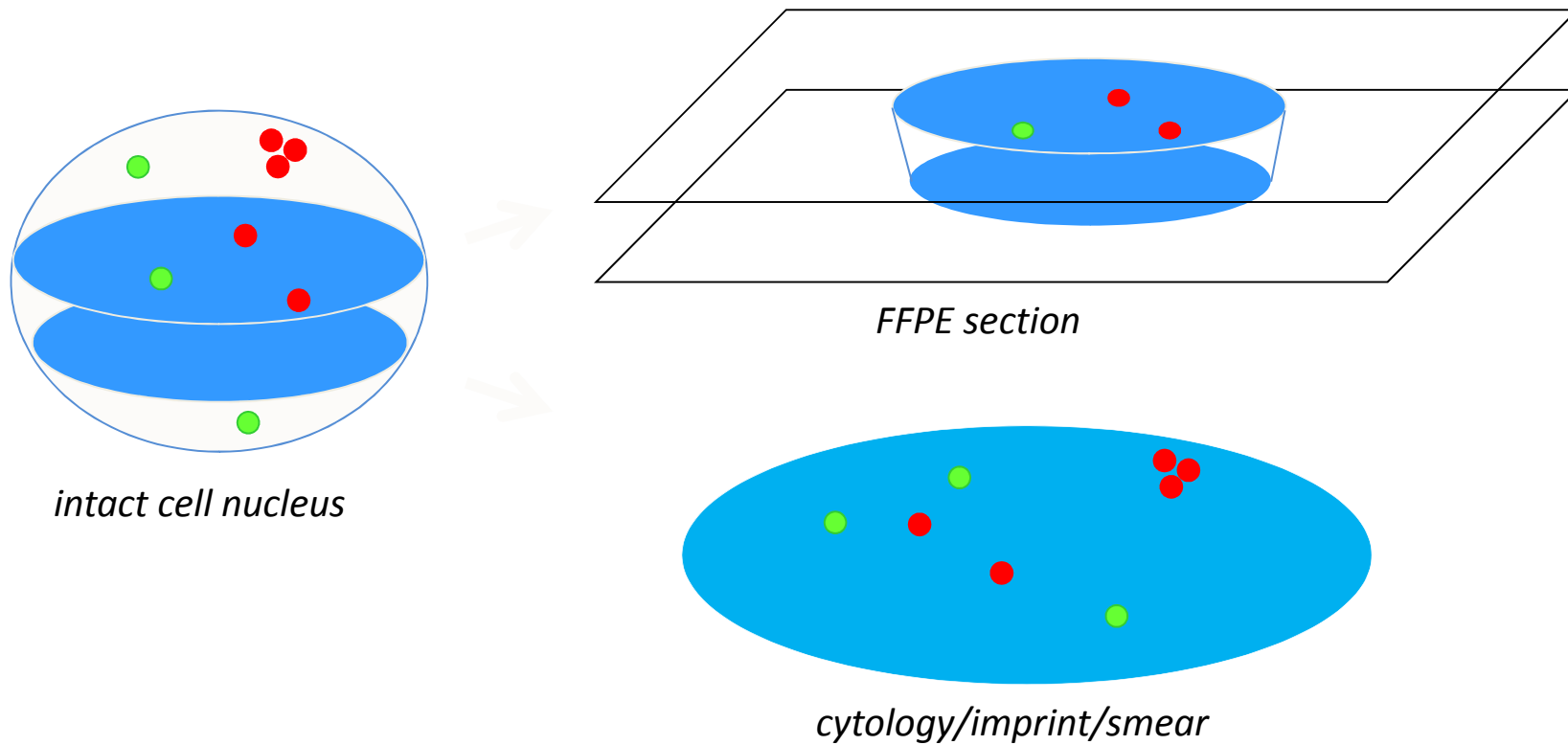


IgHV klonalitás
24h ischemiás idő elteltével

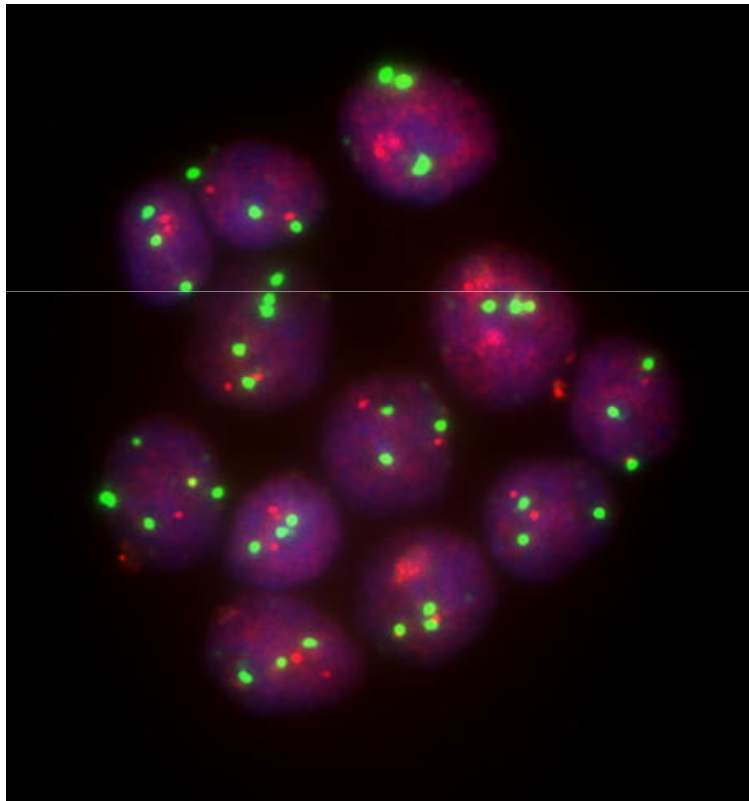
Methods in cancer cytogenetics



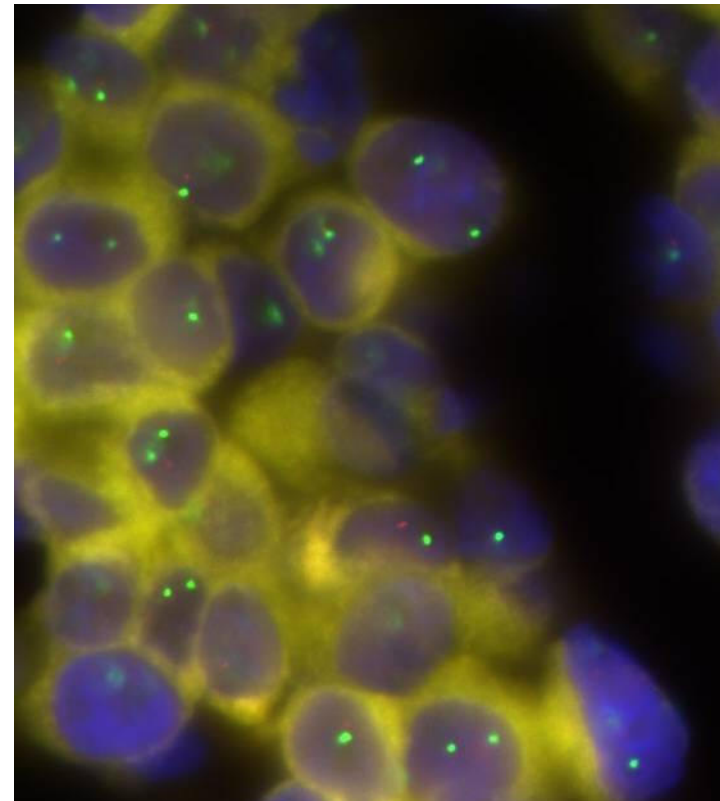
Detection of chromosome loci in tissue sections by in situ hybridization



**Detection of chromosome loci in tissue sections:
Effect of embedding and sectioning on signal morphology**

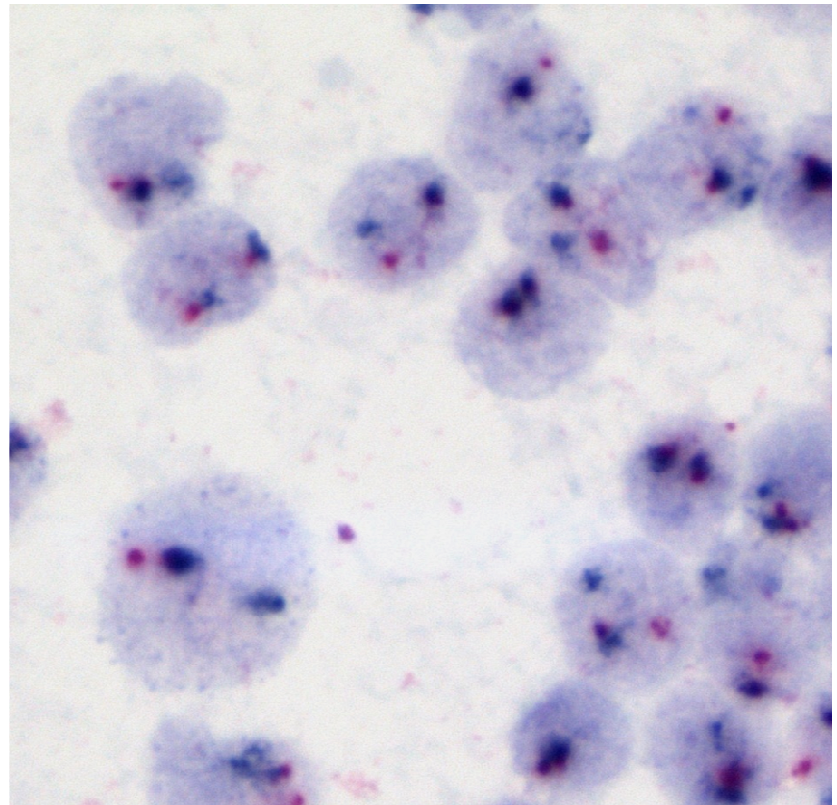
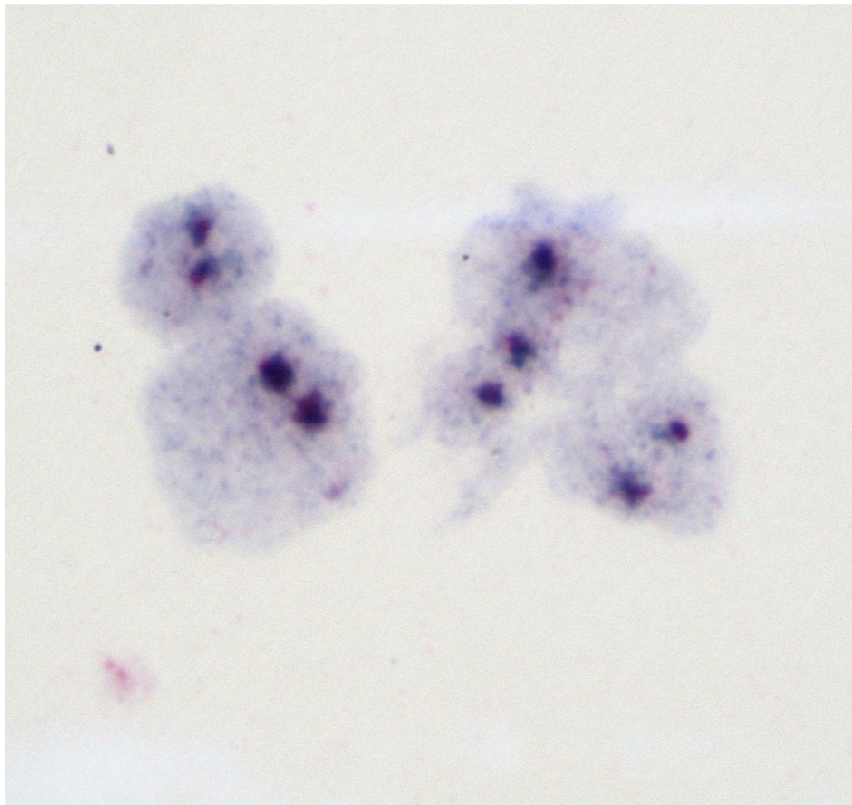


A. Tumour imprint



B. FFPE tissue section

**Chromogén in situ hibridizáció (CISH) nyirokcsomó lenyomaton
IgVH lókuszt transzlokáció kimutatása ML-ban**



Validation of CISH results in progress

Double-staining chromogenic *in situ* hybridization as a useful alternative to split-signal fluorescence *in situ* hybridization in lymphoma diagnostics

Anke van Rijk,¹ Tim Svenstrup-Poulsen,² Margaret Jones,³ José Cabeçadas,⁴ Juan Cruz Cigudosa,⁵ Lorenzo Leoncini,⁶ Anja Mottok,⁷ Christiane Copie Bergman,⁸ Evi Pouliou,⁹ Stephen Hamilton Dutoit,¹⁰ and Han J. van Krieken¹

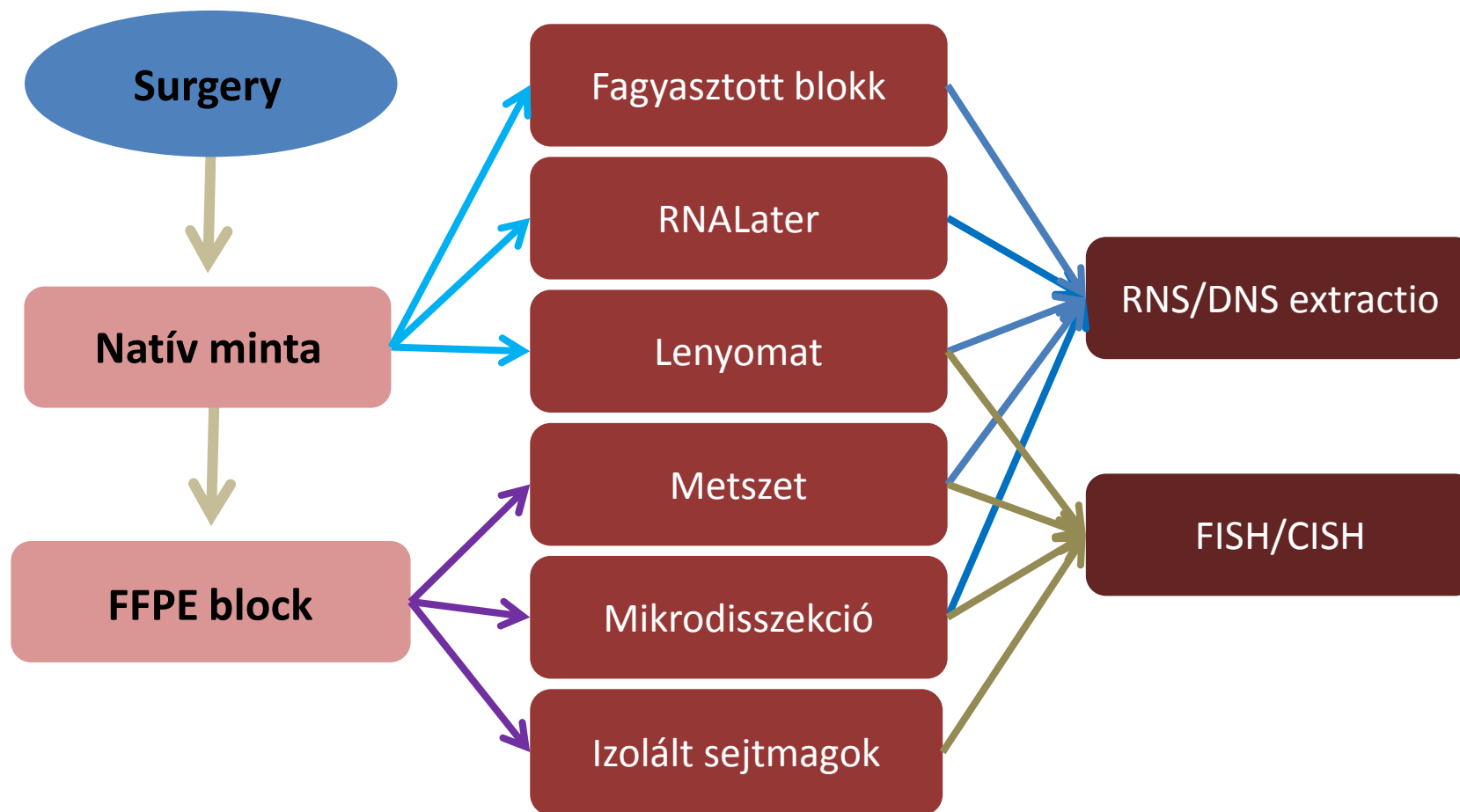
¹Radboud University Nijmegen Medical Centre, Department of Pathology, Nijmegen, The Netherlands; ²Copenhagen University Hospital Herlev, Department of Pathology, Herlev, Denmark; ³LRF Immunodiagnostics Unit, Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, Oxford, United Kingdom; ⁴Serviço de Anatomia Patológica, Instituto Português de Oncologia, Lisboa, Portugal; ⁵Cytogenetics Unit, Spanish National Cancer Centre, (CNIO), Madrid, Spain; ⁶Department of Human Pathology and Oncology, University of Siena, Siena, Italy; ⁷Department of Pathology, University of Wuerzburg, Wuerzburg, Germany; ⁸APHP, Hôpital Henri Mondor, Département de Pathologie, Université Paris, Faculté de Médecine, Créteil, France; ⁹Hematopathology Department, Evaggelismos Hospital, Athens, Greece; ¹⁰Institute of Pathology, Aarhus University Hospital, Aarhus, Denmark

- Euro-FISH study (malignant lymphoma)
- 144 samples, 16 ISH probes
- Conclusions:
 - CISH is as reliable as FISH (only 2.58% discrepancies)
 - difficult to read FISH signals do not necessarily result in weak CISH signals
 - hematoxylin background staining correlates with CISH signal intensity

FISHING or CISHING/SISHING? Következtetések

- CISH/SISH rutinszerűen alkalmazható a daganatdiagnosztikában
- a biológiai és szövettani korlátok ugyanúgy érvényesek, mint FISH kapcsán
- fluoreszcenciáról chromogénre váltás lehetséges
- zárt, standardizált rendszerek kaphatók
- kevés a validált, klinikailag kipróbált teszt
- jelenleg kapható
 - Her2
 - Lymphoma

Szöveti minták rutin feldolgozása molekuláris vizsgálatok céljából





Köszönöm a figyelmet!