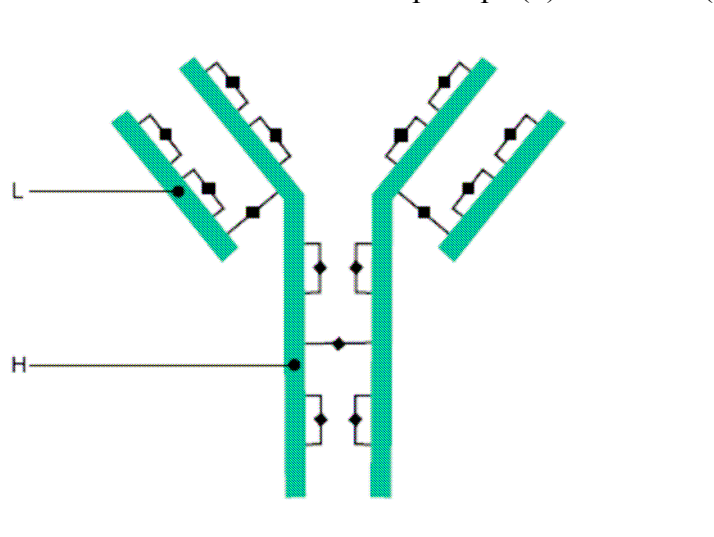


OSNOVE IMUNOHISTOKEMIJSKIH METODA

Termin imunohistokemije se odnosi na proces lokalizacije specifičnih antigena u tkivu, pomoću ciljno usmjerenih protutijela, koristeći osnovni princip u imunologiji da se određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen. Ukoliko se govori o lokalizaciji proteina u ili na stanici onda govorimo o imunocitokemiji. Imunohistokemija se razvila u snažno dijagnostičko sredstvo koje pruža dodatne informacije prilikom rutinske morfološke analize tkiva. Upotreba imunohistokemije da bi se procijenili odgovarajući stanični markeri koji definiraju specifični fenotip, omogućila je dobivanje važnih dijagnostičkih, prognostičkih i prediktivnih informacija neophodnih za klasificiranje i diferenciranje pojedinih bolesti. Osim u dijagnostičke svrhe imunohistokemija se također koristi i u znanstveno-istraživačke svrhe da bi se bolje razumjela distribucija i lokalizacija biomarkera i ekspresija pojedinih proteina u različitim tkivima. Upotreba protutijela na fiksiranom tkivu, da bi se izučavala patologija tkiva, zahtjevala je određenu prilagodbu i usklađivanje imunohistokemijskih tehnika. Budući da je očuvanost antigena u fiksiranom tkivu varijabilna kroz povijest su se imunohistokemijske tehnike unaprijeđivale kako bi se povećala osjetljivost analize.

Protutijela

Najvažniji reagens za svaku imunohistokemijsku tehniku je protutijelo. Protutijela spadaju u skupinu proteina koji se nazivaju imunoglobulini (Ig) i prisutni su u krvi imuniziranih životinja. U krvi nalazimo pet vrsta (klasa) imunoglobulina (idući od onih kojih ima u najvećoj količini prema onim kojih ima manje): IgG, IgA, IgM, IgD i IgE. Imunoglobulini su građeni od dva identična teška lanca (H) i dva laka lanca (L). Teški lanci se razlikuju u antigenim i strukturalnim karakteristikama i određuju klasu odnosno podklasu imunoglobulinske molekule. Dva laka lanca su ili tipa kapa (κ) ili lambda (λ). (SLIKA1)



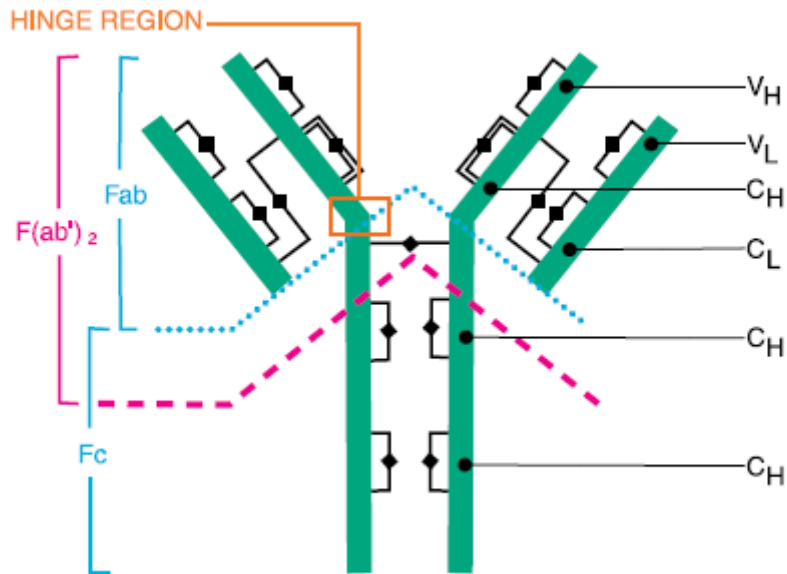
SLIKA 1. Struktura imunoglobulinske molekule - sastoji se od dva identična teška (H) i dva identična laka (L) lanca. Inter- i intra-lančane disulfidne veze (—◆—) doprinose stabilnosti strukture imunoglobulinske molekule.

Distribucija κ i λ lanaca razlikuje se u svih imunoglobulinskih klasa i podklasa kao i između različitih životinjskih vrsta. Lanci su međusobno kovalentno povezani pomoću disulfidnih mostova (L lanci sa H i H lanac sa H lancem), što dodatno povećava stabilnost

imunoglobulinske molekule i same tercijarne strukture proteina. Od pet klasa imunoglobulina u imunohistokemijske svrhe najčešće se koriste IgG i IgM.

IgG

IgG molekula težine 150kD, građena je od dva teška lanca (koja se u slučaju IgG molekule označavaju gama (γ) lancima) i dva laka lanca κ ili λ . Molekula IgG se može podijeliti i u takozvane domene, varijabilnu (V) i konstantnu (C) domenu. (SLIKA 2)

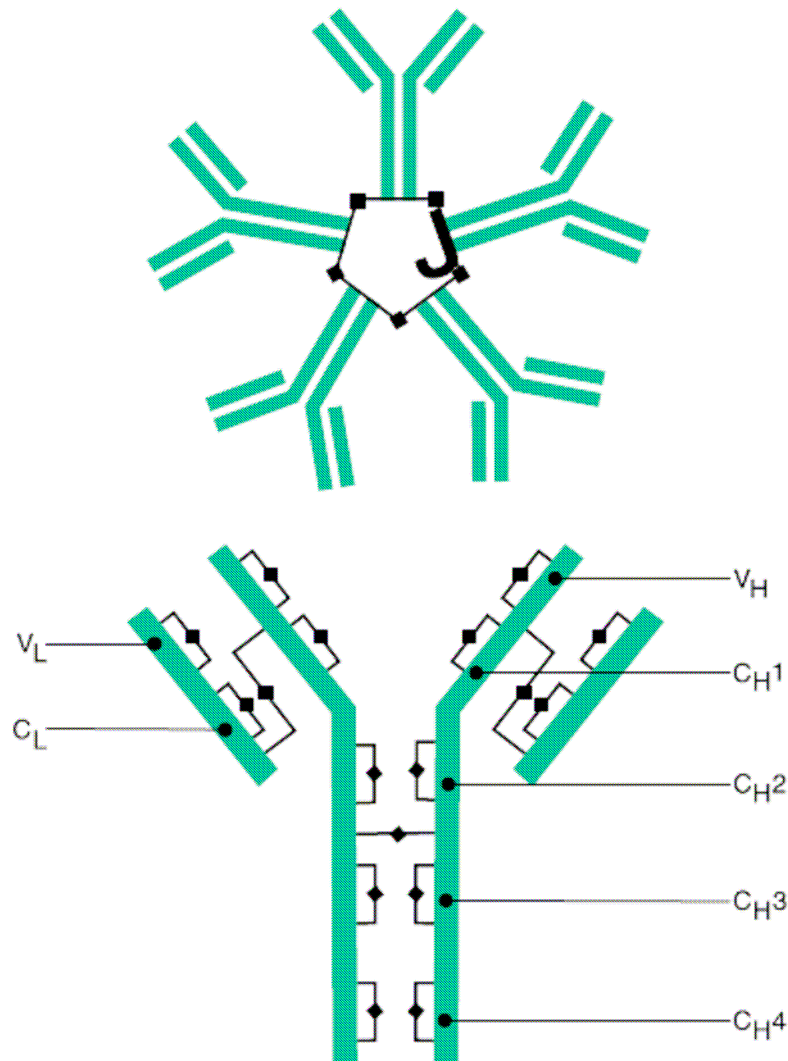


SLIKA 2. Struktura IgG - teški i laki lanci sastoje se od varijabilnih (V) i konstantnih (C) domena koje su povezane inter- i intra-lančanim disulfidnim vezama ($\text{---}\blacklozenge\text{---}$). Proteolitička digestija papainom (.....) proizvodi dva Fab fragmenta i jedan F_c fragment dok se digestijom sa pepsinom (-----) dobije jedan $F(ab')_2$ fragment.

Svaki L lanac ima jednu konstantnu (C_L) i jednu varijabilnu domenu (V_L), dok se H lanac sastoji od tri konstantne domene (C_H) i jedne varijabilne domene (C_L). Svaka domena se sastoji od 110 do 120 aminokiselina i jedne disulfidne veze unutar same domene. Aminoterminalni kraj imunoglobulinske molekule je smješten unutar varijabilne domene lakog (V_L) i varijabilne domene teškog lanca (V_H). Zajedno V_L i V_H formiraju specifično mjesto za vezivanje ciljnog antigena. Struktura IgG molekule je djelomično utvrđena proteinskom digestijom pomoću različitih enzima (papain, pepsin). Digestijom IgG papainom (papain presjeca vezu na N-terminalnom kraju među lančane disulfidne veze) dobiju se dva monovalentna antigen vezujuća fragmenta Fab i jedan F_c fragment. Pepsin presjeca γ lance na C-terminalnom kraju među lančane disulfidne veze stvarajući jedan bivalentni antigen vezujući fragment $F(ab')_2$, a F_c fragmenti su o ovom slučaju uništeni.

IgM

Molekula IgM je pentamer molekularne težine 900kD. Svaka od pet podjedinica povezana je sa sulfhidril-bogatim peptidom, koj se naziva J lanac, i ima molekularnu težinu 15kD. Svaka od pet podjedinica građena je od dva teška lanca (μ) i dva laka lanca tipa κ ili λ dok J lanac pridonosi integritetu i stabilnosti pentamera. (SLIKA 3)



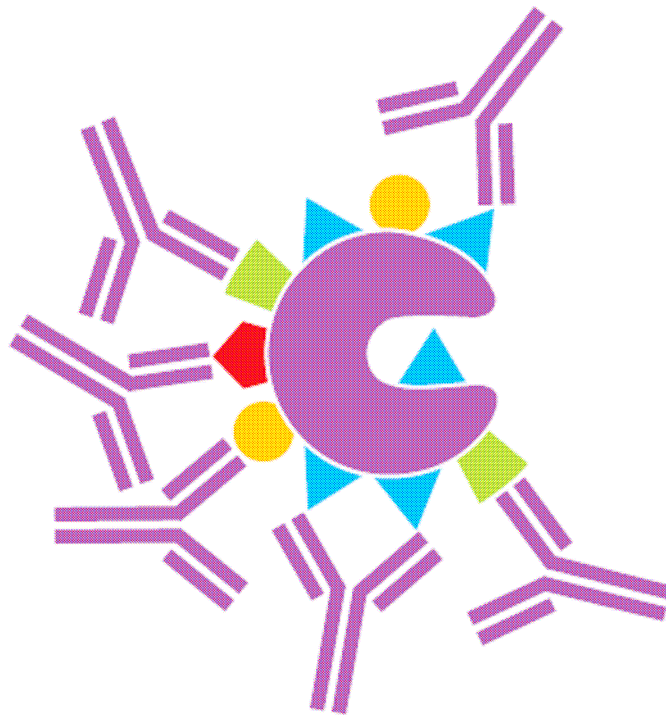
SLIKA 3. Dijagram koji prikazuje pet podjedinica IgM povezanih disulfidnim vezama (—◆—) i J lancem da bi stvorili prstenastu pentamernu strukturu. Svaka se od pet podjedinica sastoji od dva teška (H) lanca i dva laka (L) lanca koji se dalje mogu podijeliti na konstantne (C) i varijabilne (V) domene.

Kao i kod IgG, IgM pentamer se može proteinskom digestijom razdvojiti na podjedinice $F(ab')_2$, Fab i Fc te također na teške i lake lance. Fc fragment IgM je ciklički pentamer (molekularne težine otprilike 340kD). IgM protutijela se stvaraju u organizmu prilikom prvog kontakta sa antigenom. Stvaranje primarnih protutijela je proces koji se odvija u nekoliko faza, injicirani imunogen se unutar vaskularnog prostora fragmentira u manje dijelove, djeluje kao imunogen što za posljedicu ima stvaranje protutijela koja potom antigen

eliminiraju iz intravaskularnog prostora. Vremenski period od ulaska imunogena u organizam do pojave humoralog odgovora, tj. prvih IgM protutijela naziva se latentnim periodom i obično traje do jednog tjedna. Unutar dva tjedna ili kao odgovor na drugu injekciju antigena, pojavljuje se IgG klasa protutijela koja potom predominiraju. Kao i svaki proteini, protutijela su podložna kataboličkoj razgradnji. Dok IgM klasa protutijela ima kratko vrijeme poluživota otprilike od oko 4 sata do 6 dana, IgG protutijela imaju srednje vrijeme nešto duže, otprilike 3 tjedna. Ukoliko se ne daju opetovane dodatne doze imunogena, serumski nivo protutijela će se vremenom smanjiti.

Poliklonalna protutijela

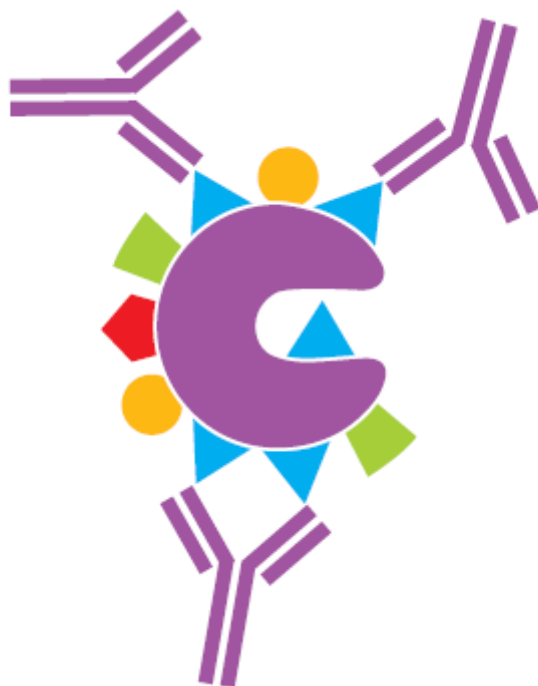
Poliklonalna protutijela proizvode različite stanice i posljedično tome su imunokemijski različita, pa se stoga vežu na različite epitope na antigenu. Dobiju se na taj način da se životinja (u najčešćem broju slučajeva je to zec) imunizira određenim antigenom i potom nakon sekundarnog imunog odgovora protutijela se izoliraju iz seruma životinje. (SLIKA 4)



SLIKA 4. Shematski dijagram koji prikazuje heterogenu mješavinu poliklonalnih protutijela koja prepoznaju različite epitope na antigenu.

Monoklonalna protutijela

Monoklonalna protutijela su produkt individualnog klona plazma stanica. Protutijela od istog klona stanica su imunokemijski identična i reagiraju sa istim specifičnim epitopom na antigenu protiv kojeg su usmjerena. Za produkciju monoklonalnih protutijela koriste se miševi gdje se nakon imunog odgovora, izoliraju B limfociti iz mišje slezene i potom fuzijom tih B limfocita sa mijelomskim stanicama dobije kultura stanica pomoću koje se monoklonalna protutijela proizvode u velikoj količini. (SLIKA 5)



SLIKA 5. Određeni klon monoklonalnih protutijela reagira sa specifičnim epitopom na antigenu.

TABLICA 1. Usporedba poliklonalnih i monoklonalnih protutijela.

	Poliklonalna protutijela	Monoklonalna protutijela
Sinteza:	Brojni klonovi B limfocita	Pojedinačni klonovi B limfocita
Vežu:	Brojne epitope svih antigena korištenih za imunizaciju	Pojedinačne epitope pojedinačnih antigena
Klasa protutijela:	Smjesa različitih klasa (izotipovi)	Svi su iste klase
Vezna mjesta za antigen:	Smjesa protutijela s različitim veznim mjestima	Sva protutijela imaju jednaka vezna mjesta za antigen
Moguća križna reaktivnost:	Visoka	Niska

Termin križne reaktivnosti (cross-reactivity) označava imunološku reakciju kada protutijelo prepoznaje dva ili više antigena ili obrnuto, kada antigen reagira sa više različitih protutijela. U imunohistokemiji do križne reaktivnosti može doći prilikom pre-analitičke obrade tkiva odnosno postupka tzv. razotkrivanja antigena kada može doći do induciranih promjena u epitopu što vodi do gubitka specifičnosti upotrijebljenog protutijela. Termin križne reaktivnosti također označava interakciju protutijela sa sličnim epitopom na potpuno drugom, neovisnom antigenu.

Priprema uzorka/tkiva u imunohistokemiji

Fiksacija

U imunohistokemiji priprema tkiva je kamen temeljac same analize. Da bi se osigurala arhitektura tkiva i morfologija samih stanica, brza i odgovarajuća fiksacija tkiva je neophodna. Neodgovarajuća odnosno preduga fiksacija značajno umanjuje sposobnost protutijela da se veže na odgovarajući antigen. Nažalost, ne postoji univerzalni fiksativ koji je idealan za prikazivanje svih antigena. Međutim, općenito gledano većina antigena se može uspješno prikazati ("razotkriti") iz tkiva fiksiranog u formalinu i potom uklopljenog u parafinu. Idealni fiksativ bi trebao imati sljedeće karakteristike:

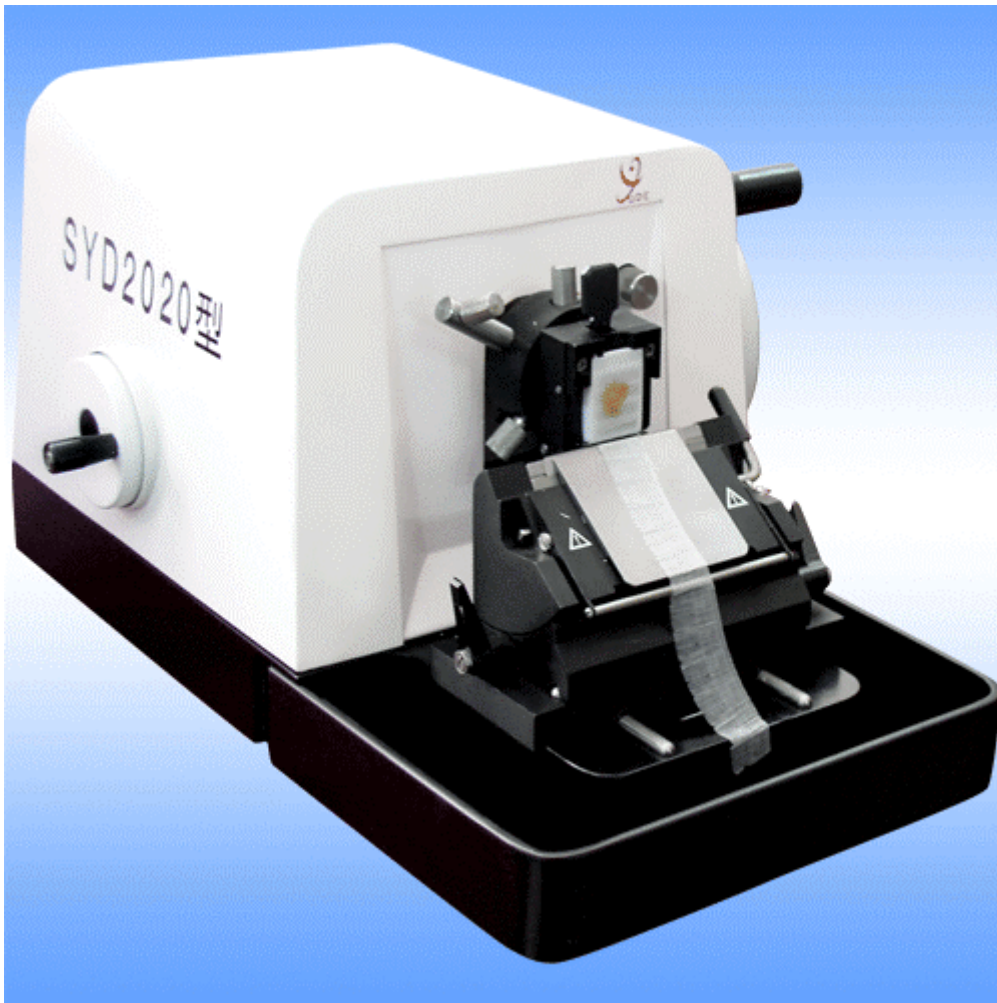
1. Očuvanja tkiva odnosno stanica bez bubrenja, smanjenja ili bilo kakvog deformiranja stanica i staničnih komponenata
2. Da spriječi raspadanje stanica uzrokovano bakterijama ili autolizu uzrokovanu katepsinom
3. Da stabilizira i zaštiti tkivo i stanice od štetnih utjecaja prilikom daljnje obrade tkiva tijekom postupka bojanja tkiva.

Izbor samog fiksativa ovisi o vrsti uzorka i odabiru staničnih struktura koje se žele prikazati. Nažalost može se desiti da metoda koja je najprikladnija za očuvanje strukture tkiva/stanica u isto vrijeme dovodi i do promijena u proteinima, što može maskirati epitope te pri tome onemogućiti detekciju ciljnog proteina. Stoga je važno imati na umu, da prije no što se odustane od same analize određenim protutijelom, treba pokušati podesiti eksperimentalne uvjete tj. upotrijebiti drugi fiksativ ili metodu razotkrivanja antigena. Nekoliko je principa djelovanja fiksativa na tkivo: formacija unakrsnih veza između aminokiselinskih ostataka proteina (npr. aldehidi kao što je glutaraldehid ili formalin), koagulacija proteina (npr. aceton i metanol) ili kombinacijom ova dva principa. Najčešće korišteni fiksativi su oni bazirani na formalinu, pa se stoga kao fiksativ uglavnom koristi neutralni puferirani formalin ili otopina 10% formalina u vodi. Uz sam izbor fiksativa jako je važna dužina vremena fiksacije, temperatura i pH. Vrijeme fiksacije uvelike ovisi o veličini uzorka, da bi se postigla ravnomjerna fiksacija važno je da uzorci tkiva ne budu deblji od 3-4 mm.

Uklapanje

Najveći udio uzoraka tkiva koji se priprema za imunohistokemijska bojanja uklapa se u parafin jer omogućava odličnu rezoluciju i očuvanost detalja. Parafin koji se danas koristi mješavina je parafinskog voska i smola i predstavlja odličan medij za uklapanje preventivno stoga što se može potpuno otopiti do tekućeg stanja, potom hlađenjem ponovno pretvoriti u čvrsto stanje i osigurati strukturnu potporu prilikom narezivanja te se može razgraditi i ukloniti sa tkiva pomoću ksilena. Kao fiksativ u kombinaciji sa parafinom najčešće se koristi formalin, te se nakon 24 satne fiksacije tkivo uklapa u parafin, a potom slijedi narezivanje tkiva pomoću mikrotoma. (SLIKA 6) Određeni antigeni ne mogu podnijeti postupke rutinske fiksacije i uklapanja u parafin pa se u tim slučajevima tkivo samo smrzava i posljedično se radi imunohistokemija na smrznutim rezovima. Nedostaci smrznutih rezova su: loša morfologija, slaba rezolucija na većem povećanju, teže narezivanje, teže je raditi neke retrospektivne studije na takvom tkivu i potrebni su posebni uvjeti spremanja i čuvanja tkiva. Također u nekim slučajevima se za uklapanje koriste smole. Uklapanje tkiva u smole nudi određene prednosti u odnosu na parafin i smrzavanje, a to su tanji rezovi koji omogućavaju

bolju morfologiju tkiva i manje skupljanje tkiva. Također kalcificirani materijal se može narezivati bez prethodnog dekalificiranja i infiltracije akrilnim smolama.



SLIKA 6. Mikrotom - na slici je prikaz uređaja za narezivanje tkiva uklopljenog u parafin.

Razotkrivanje antigena

Da bi se omogućila reakcija protutijela sa antigenima na fiksiranom tkivu potrebno je razotkriti antigen. Postoji nekoliko postupaka razotkrivanja antigena, a također različita protutijela, odnosno antigeni zahtijevaju odgovarajući postupak razotkrivanja antigena. U obzir također treba uzeti tip i trajanje fiksacije, varijacije u samoj obradi tkiva, odabir reagensa i način na koji je tkivo narezano, nanoseno na staklo i osušeno. Postoje znatne varijacije u načinu na koji se ovi postupci provode u pojedinom laboratoriju stoga pojedina metoda razotkrivanja antigena može biti optimalna za jedno protutijelo i uvjete pripreme tkiva ali ne i za neko drugo protutijelo i preanalitičke postupke. Pokazalo se da razotkrivanje antigena povećava reaktivnost s protutijelima za većinu antigena u tkivu, dok se taj postupak rijetko primjenjuje na stanicama. Većina postupaka razotkrivanja antigena radi se na tkivu koje je uklopljeno u parafin i fiksirano u formalinu. Fiksativi bazirani na aldehidu, kao npr. formalin, stvaraju intra- i inter molekularne veze među proteinima što za posljedicu ima da su pojedini antigeni sakriveni i nedostupni da bi ih određeno protutijelo prepoznalo. Ovakav

nepovoljan učinak posljedica je stvaranja metilenskih mostova između reaktivnih mjesta na tkivnim proteinima, a reaktivna mjesta su najčešće primarni amini, amino grupe, tioli, alkoholne hidroksi skupine i ciklički aromatski prsteni. Za razotkrivanje antigena najčešće se koristi ili enzimatska digestija ili razotkrivanje epitopa pomoću topline (uz pomoć mikrovalne pećnice, autoklaviranjem ili iskuhavanje pod visokim tlakom).

Enzimatska digestija

Ova tehnika uključuje skidanje parafina, rehidraciju tkiva i ispiranje tkiva u vodi. Uzorak se potom uroni u otopinu proteaznog pufera i enzima te potom inkubira najčešće na 37°C ili sobnoj temperaturi. Od enzima najčešće se koriste tripsin i pepsin. Uvjeti pod kojim se radi digestija su jako važni, od same koncentracije enzima, temperature, dužine trajanja digestije, zbog toga da bi sam enzim mogao razgraditi veze stvorene tijekom fiksacije i pri tome razotkriti ciljni antigen, a da ga u potpunosti ne razgradi. Npr. kada se tripsin koristi za digestiju (razotkrivanje antigena) optimalana temperatura bi trebala biti 37°C, a pH proteaznog pufera 7.8. Sama reakcije se dodatno poboljšava dodavanjem ko-enzima, kalcij-klorida. Uz to potrebno je znati da tripsin ostaje aktivan otprilike 30 minuta, stoga ako je vrijeme inkubacije duže od toga treba se dodati nova otopina proteaznog pufera i tripsina. Enzimatska aktivnost tripsina se zaustavlja na taj način da se staklo sa tkivom uroni u hladni pufer (4°C). Naravno ova metoda razotkrivanja antigena ne može se primjeniti za sve antigene jer će se neki tijekom digestije izmijeniti ili potpuno uništiti i neće se moći na njih vezati ciljno protutijelo.

Razotkrivanje epitopa pomoću topline

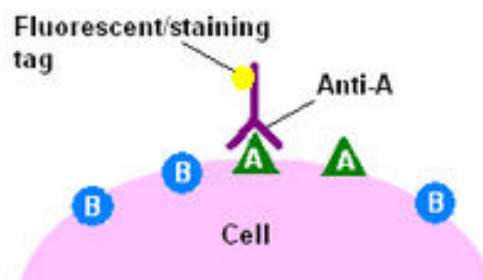
Još nije u potpunosti objašnjen mehanizam koji stoji u pozadini ovog načina razotkrivanja antigena. Jedna od teorija je da soli teških metala djeluju kao precipitirajući faktor na proteine formirajući netopive komplekse sa polipeptidima te stoga fiksativi koji precipitiraju proteine pokazuju bolju očuvanost antigena nego aldehidni fiksativi. Druga teorija je da se za vrijeme formalinske fiksacije stvaraju inter- i intra- molekularne veze (nastaju molekularni metilenski mostovi i slabe Schiff-ove baze). Ove unakrsne veze mijenjaju konformaciju proteina (antigena) tako da ga specifično protutijelno ne može prepoznati. Smatra se da prilikom razotkrivanja antigena toplinom dolazi do uklanjanja slabih Schiff-erovih baza ali ne i do raskidanja metilenskih mostova tako da su konformacijske promjene proteina negdje između, tj. između konformacije koju protein ima kada je u "fiksiranom" stanju i konformacije kada je u "ne fiksiranom" stanju.

I prilikom upotrebe mikrovalne pećnice, autoklava i iskuhavanjem stakalca pod visokim tlakom, usljed povećane temperature dolazi do pucanja veza između peptida/proteina koje nastaju tijekom fiksacije, mada točan mehanizam nije u potpunosti jasan. Iako je tijekom ovog postupka najvažnija postignuta temperatura također u obzir treba uzeti pH i sastav otopine u kojoj se razotkrivanje radi, odnosno u koju je staklo sa tkivom uronjeno.

Imunohistokemijsko bojanje

Direktna metoda

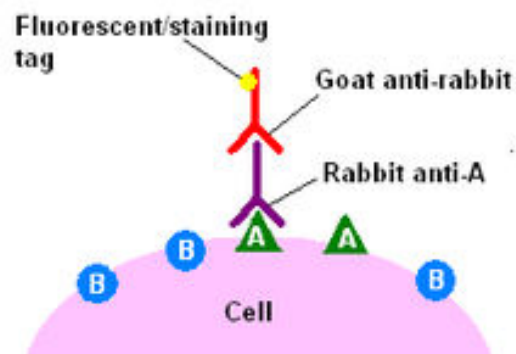
Antigeni u tkivu se mogu imunohistokemijski detektirati na dva načina, direktnom ili indirektnom metodom. Direktna metoda uključuje upotrebu označenog protutijela (protutijelo koje na sebi ima vezan enzim npr. alkalna fosfataza ili peroksidaza ili neku fluorescentnu molekulu npr. FITC) koje reagira direktno sa ciljnim antigenom. (SLIKA 7) U ovoj metodi koristi se samo jedno protutijelo, stoga je postupak relativno jednostavan i brz. Glavni nedostatak ove metode je slabija osjetljivost zbog nedostatka pojačanja signala pa se stoga rjeđe koristi u odnosu na indirektnu metodu.



SLIKA 7. Direktna metoda imunohistokemijskog bojanja - obilježeno protutijelo direktno se veže na ciljni antigen.

Indirektna metoda

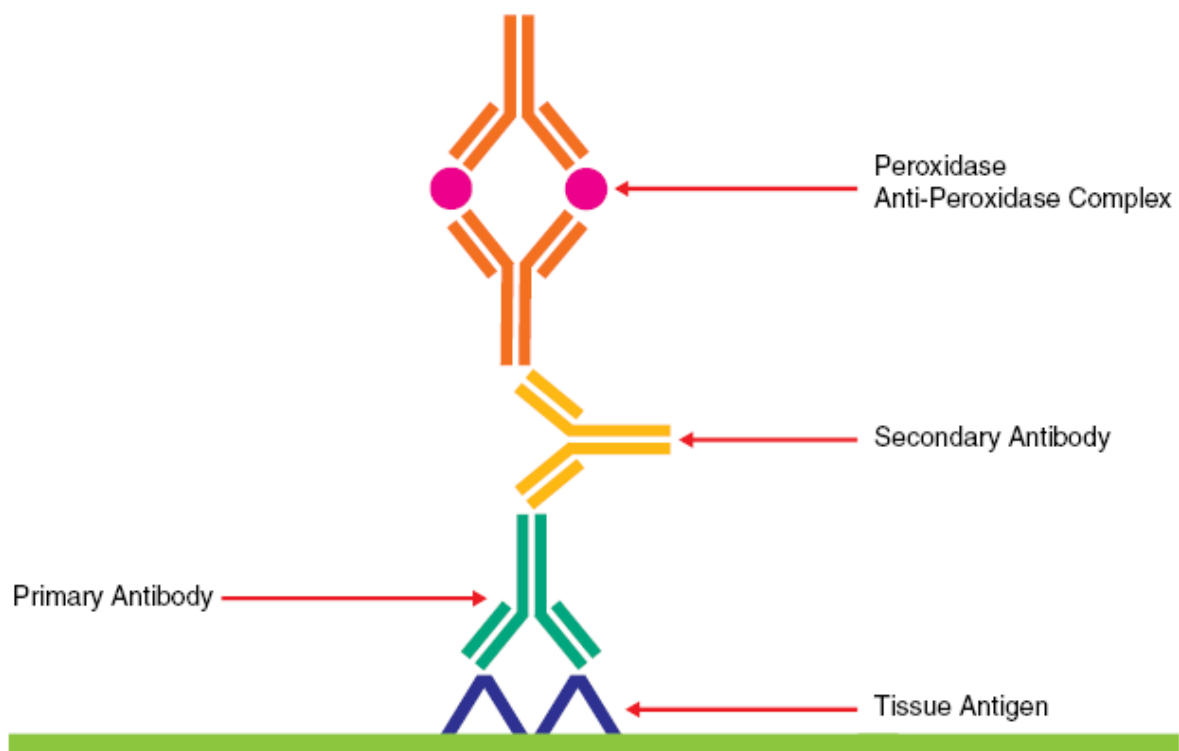
Kod indirektna metode prvo se primarno protutijelo (protutijelo koje se veže na antigen i nije označeno) veže na ciljno mjesto, a potom se sekundarno protutijelo (koje je obilježeno i ciljno usmjereno na Fc fragment primarnog protutijela) veže na primarno protutijelo. (SLIKA 8) Važno je da sekundarno protutijelo koje se koristi, mora biti ciljno usmjereno na IgG životinjske vrste u kojoj je primarno protutijelo producirano (npr. ako je primarno protutijelo IgG mišjeg porijekla onda sekundarno protutijelo mora biti usmjereno na Fc fragment IgG miša). Ova metoda je osjetljivija zbog pojačavanja signala putem sekundarnog protutijela.



SLIKA 8. Indirektna metoda imunohistokemijskog bojanja - prvo protutijelo prepoznaje ciljni antigen, a drugo protutijelo koje je obilježeno, prepoznaje i veže se na primarno protutijelo.

Peroxidaza anti-peroxidaza (PAP) metoda

Daljim razvojem indirektna metode nastao je PAP. U ovom slučaju uvodi se treći sloj protutijela tj. zečije protutijelo na peroksidazu koje je ujedno združeno s peroksidazom stvarajući stabilan kompleks peroksidaze - antiperoksidaze. Ovaj kompleks je preko sekundarnog protutijela vezan za primarno protutijelo koje prepoznaje antigen. (SLIKA 9)

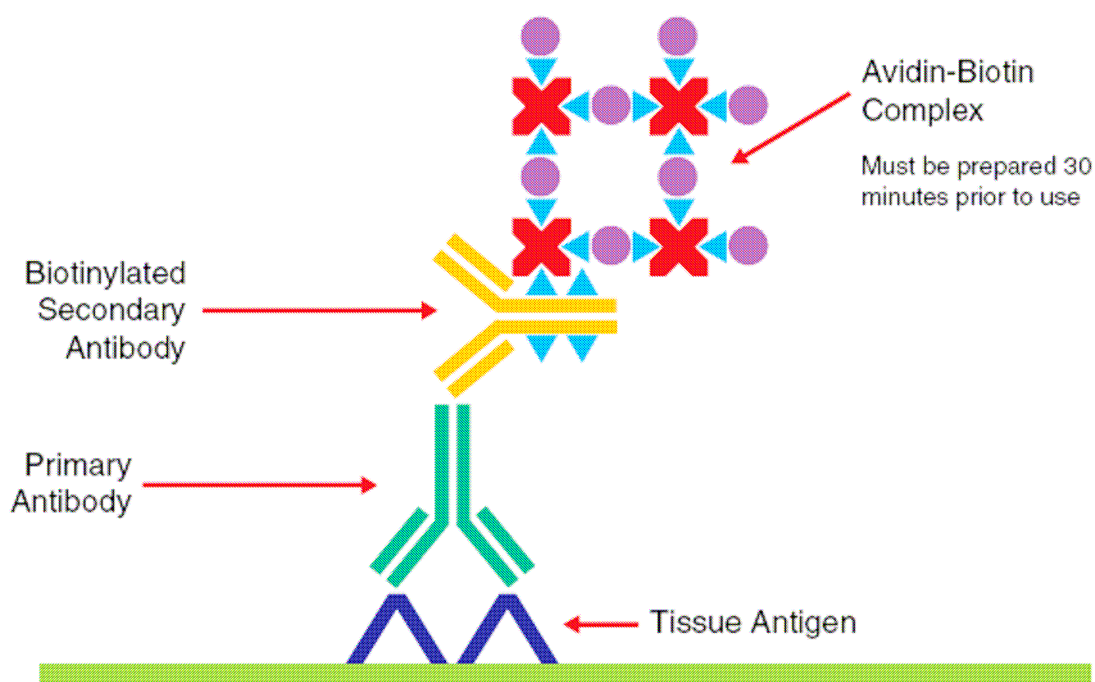


SLIKA 9. Peroxidaza anti-peroxidaza (PAP) metoda

Osjetljivost ove metode je 100 do 1000 puta veća, budući da peroksidaza nije samo kemijski vezana na sekundarno protutijelo već je stvoren imunološki kompleks između peroksidaze i protutijela stoga nema gubitaka enzimatske aktivnosti. Također primarno protutijelo se u ovom slučaju dodaje u mnogo manjem razrijeđenju te se na taj način troši manje protutijela i smanjuje nespecifično pozadinsko bojanje.

Avidin - biotin kompleks (ABC) metoda

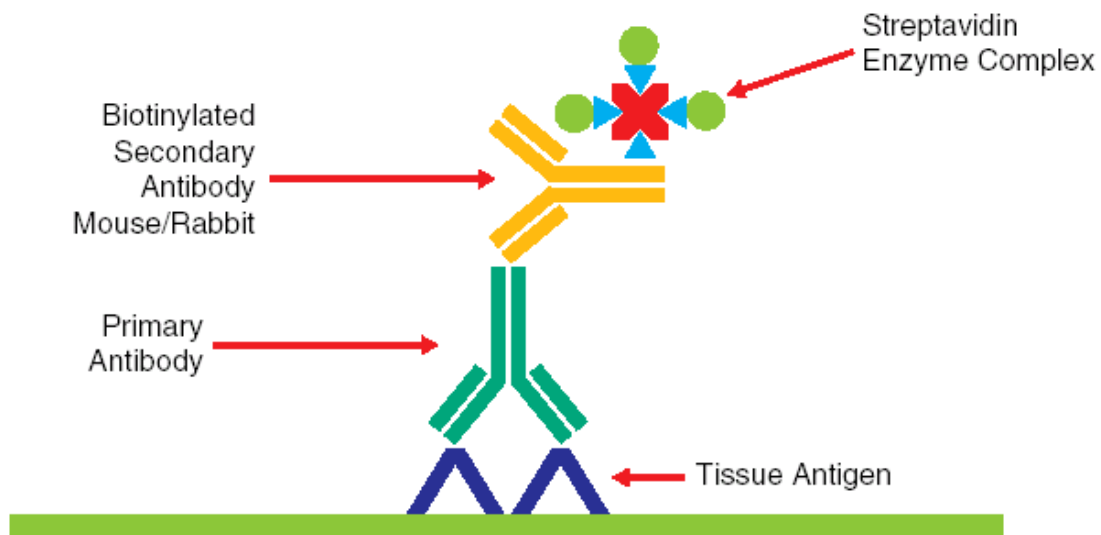
ABC metoda predstavlja standard današnje imunohistokemije i jedna je od najčešće korištenih tehnika. Avidin je veliki glikoprotein koji se može obilježiti sa peroksidazom ili fluoresceinom i ima četiri vezna mjesta na koja se visokim afinitetom veže biotin. Biotin je vitamin male molekularne težine i na njega se mogu vezati različite biološke molekule među ostalim i protutijela. U ABC metodi na sekundarna protutijela veže se biotin i djeluje kao poveznica između primarnog protutijela vezanog na antigen i avidin-biotin-peroksidaznog kompleksa. (SLIKA 10)



SLIKA 10. Avidin - biotin kompleks (ABC) metoda

LSAB (Labeled StreptAvidin Biotin) metoda

Streptavidin, derivat *Streptococcus avidini*, je najnovija zamjena za avidin. Streptavidin kao i avidin ima četiri vezna mjesta za biotin ali za razliku od njega gotovo da nema naboja (izoelektrična točka (pI) streptavidina je blizu nule, a avidina je 10) tako da je elektrostatsko vezivanje s tkivom u ovom slučaju eliminirano. Uz to streptavidin ne sadrži ugljikohidratne skupine koje se mogu vezati na tkivne lektine što može rezultirati nespecifičnim pozadinskim bojenjem. LSAB metoda je u principu tehnički slična standardnoj ABC metodi. Primarno protutijelo se veže na ciljni antigen, a sekundarno protutijelo obilježeno biotinom je poveznica između primarnog protutijela i enzim-streptavidin kompleksa (enzim može biti ili peroksidaza ili alkalna fosfataza). (SLIKA 11) U obe metode ABC i LSAB jedno primarno protutijelo je povezano sa mnogo molekula peroksidaze i upravo zbog tog velikog omjera enzimskih molekula u odnosu na protutijelo znatno se podiže osjetljivost u odnosu na direktnu metodu.

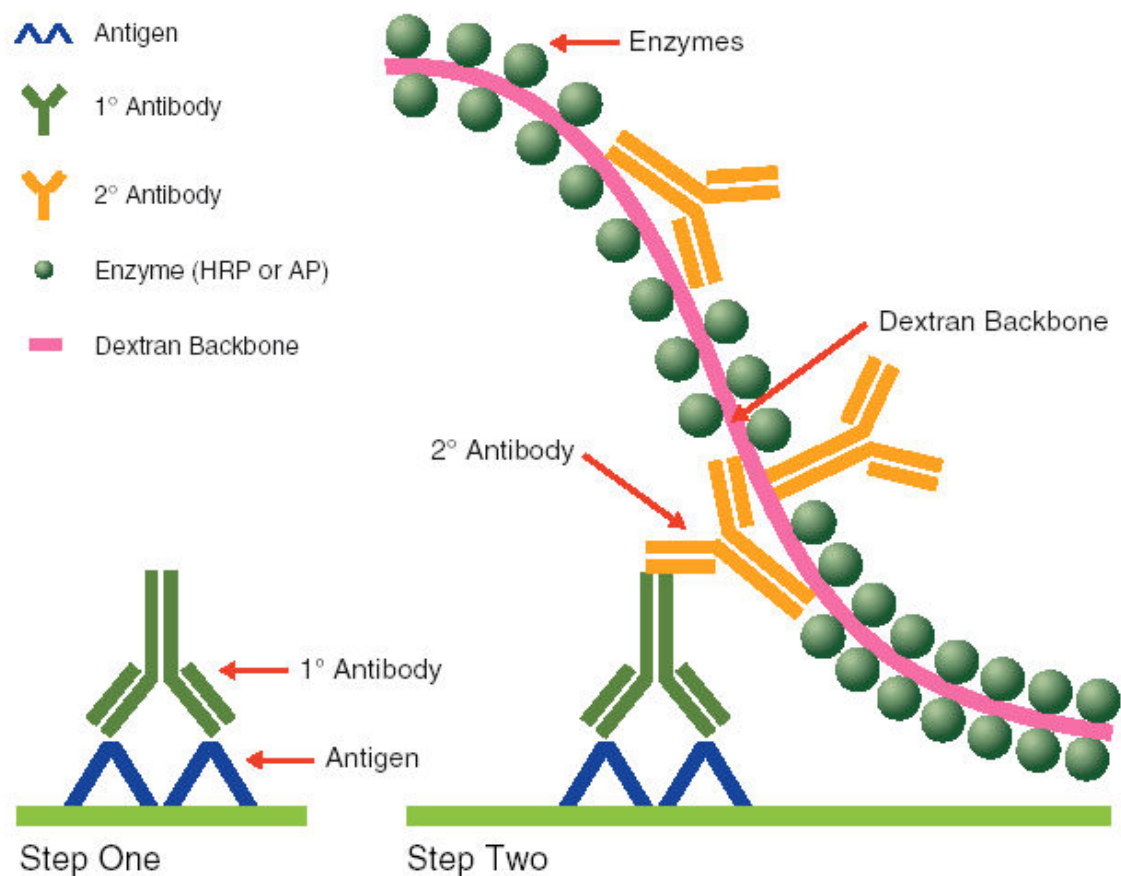


SLIKA 11. LSAB (Labeled StreptAvidin Biotin) metoda

Polimer bazirajuće metode

Iako se strept/avidin-biotin metode i dalje na široko koriste dakako da i one imaju svoje nedostatke. U određenim okolnostima prisutnost endogenog biotina u tkivu doprinosi povećanju nespecifičnog pozadinskog bojanja. Foramlinska fiksacija i uklapanje u parafin značajno reduciraju ekspresiju endogenog biotina, ali ona se ne može u potpunosti reducirati u nekim tkivima kao npr. u jetri ili bubregu. Također razotkrivanje antigena toplinom može pridonijeti povećanju nespecifičnog bojanja opet zbog aktivnosti biotina u tkivu. Metode za blokiranje reaktivnosti tkivnog biotina samo su djelomično učinkovite i dodatno kompliciraju i onako kompleksne procedure. Sve se dodatno komplicira ako je uzorak na predmetnom

staklu ustvari samo smrznuto tkivo u kojem je količina endogenog biotina mnogo veća u odnosu na tkivo koje je uklopljeno u parafin. Upravo zbog ovih ograničavajućih faktora u imunohistokemiji povećava se upotreba i popularnost metoda koje se baziraju na polimerima. Ove metode zasnivaju se na posebnoj tehnologiji gdje određeni polimer (npr. dekstran) služi kao okosnica na koju se vežu mnoga protutijela i enzimske molekule (peroksidaza ili alkalna fosfataza). (SLIKA 12) Npr. EnVision system - na molekulu dekstrana vezano je otprilike 70 molekula enzima i oko 10 sekundarnih protutijela. Prednost metoda koje se baziraju na polimerima je da imaju veću osjetljivost, a nespecifično pozadinsko bojanje je svedeno na minimum.



SLIKA 12. EnVision™ – imunohistokemijska metoda koja se bazira na polimerima.

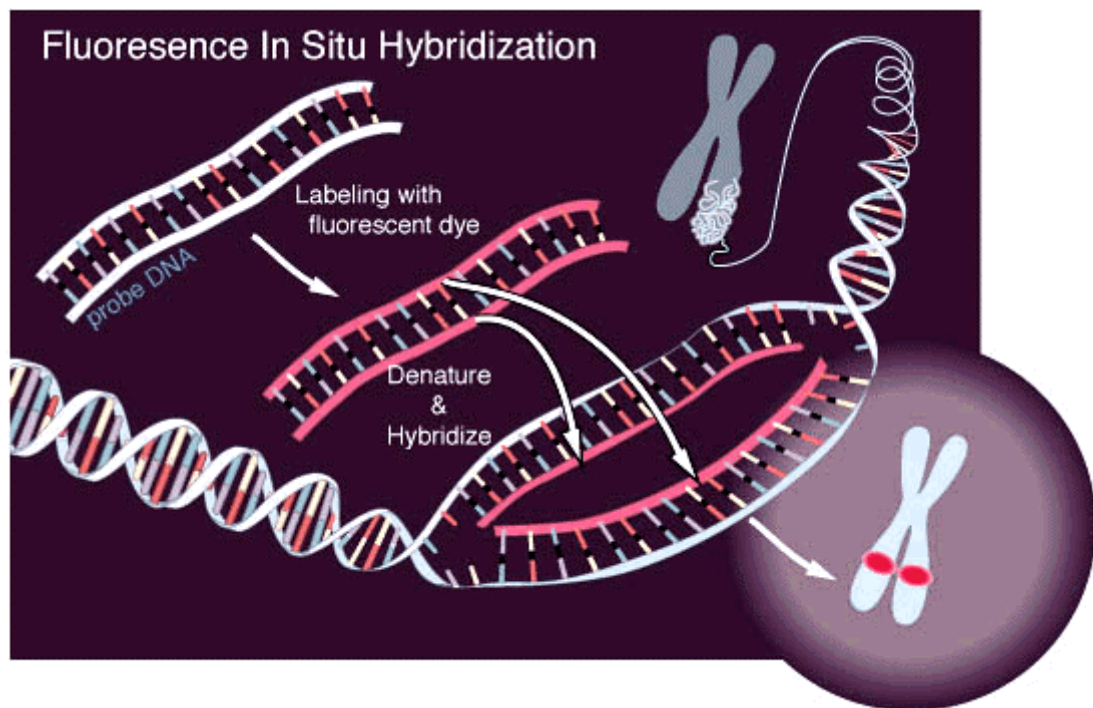
Imunofluorescencija

Još krajem 19 stoljeća kreirane su prve fluorescentne boje no tek su se pedesetih godina 20 stoljeća protutijela počela obilježavati fluorescentnim bojama da bi se na taj način mogle vizualizirati strukture unutar tkiva. Ovako obilježene stanice i tkiva moraju se pregledati pod fluorescentnim mikroskopom. Komponenta koja u ovom slučaju omogućava vizualizaciju naziva se fluorokrom. “Fluorokrom” je kompleks koji kada se obasja svjetlošću

određene valne duljine ima mogućnost apsorpcije te energije da bi potom isijavao svjetlost druge boje, a tu pojavu nazivamo fluorescencijom. Komponenta fluorokroma koja omogućava fluorescenciju je molekula koja se naziva “fluorofor”. Primjer fluorofora je fluorescein izotiocianat (FITC) koji se može vezati na neku drugu molekulu (npr. protutijelo) da bi potom ovaj novi kompleks imao sposobnost fluorescencije. Najveći nedostatak imunofluorescencije jeste da s vremenom dolazi do ireverzibilne degradacije fluorofora što dovodi do smanjenja intenziteta emitirane svjetlosti i na kraju potpunog gubitka signala.

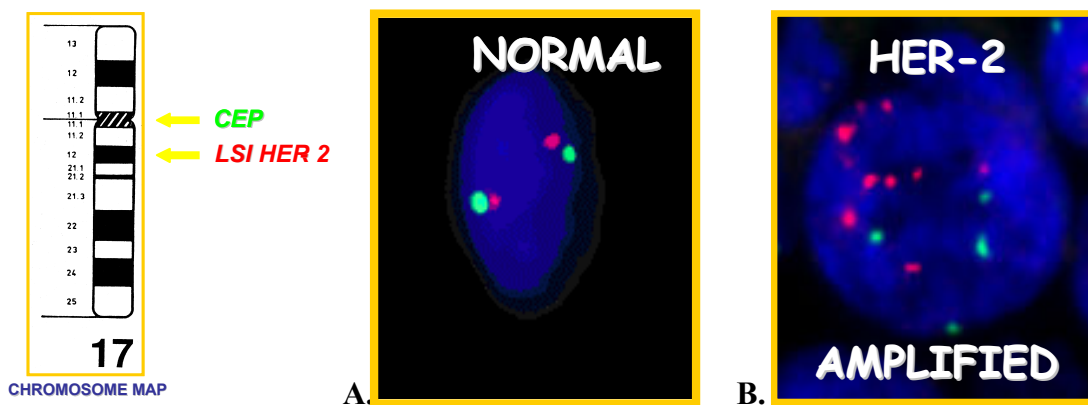
IN SITU HIBRIDIZACIJA (ISH)

In situ hibridizacija (ISH) je tehnika koja omogućava detekciju nukleinskih kiselina odnosno detekciju specifičnih ciljnih sekvenci unutar stanice uz istovremeno očuvanje stanične i tkivne morfologije. ISH se zasniva na principu komplementarnosti, tj. denaturirana proba će se hibridizirati točno na komplementarnu ciljnu sekvencu nukleinske kiseline (najčešće je to DNA). Termin *in situ* znači “na uobičajenom mjestu”, tj. hibridizacija se odvija unutar stanice gdje se ciljna DNA ili RNA normalno i nalazi. (SLIKA 13)



SLIKA 13. In situ metode se zasnivaju na principu komplementarnosti – denaturirana proba prepoznaje ciljnu sekvencu gena unutar kromosoma po principu komplementarnosti te će se na tome mjestu hibridizirati. Ciljna regija može biti gen, kromosomska regija ili cijeli kromosom.

Ova metoda je znatno unaprijeđena u posljednjih deset godina i danas na tržištu postoje razne vrste proba. Proba je kratki segment nukleinske kiseline koji je obilježen nekom fluorescentnom bojom (npr. kod FISH-a) i koji je komplementaran ciljnoj sekvenci koja se želi detektirati. Probu je potrebno obilježiti zato da bi se mogla točno odrediti njena lokalizacija te da bi se mogla odrediti količina ciljne sekvence. Dakle, imajući na umu da su u normalnoj stanici (osim gena koji se nalaze na X i Y kromosomu kod muškaraca) prisutne po dvije kopije svakog gena, in situ hibridizacijom, se dobiju po dva signala za bilo koju probu koja se koristi. Stoga vodeći se ovim principom ISH omogućava identifikaciju numeričkih (aneusomija-višk ili manjak kromosoma, amplifikacija ili delecija gena) i strukturalnih kromosomskih promjena (translokacije gena). (SLIKA 14) Za razliku od citogenetskih analiza, ISH metode ne zahtijevaju uzgoj kulture stanica ili mitotske stanice te se mogu primjeniti direktno na stanice u interfazi. Također ISH analiza se može primjeniti na širok spektar uzoraka od staničnih kultura, svježih i smrznutih uzoraka, citoloških uzoraka, tkiva fiksiranog u formalin i uklopljenog u parafin te na tkivne mikroareje.

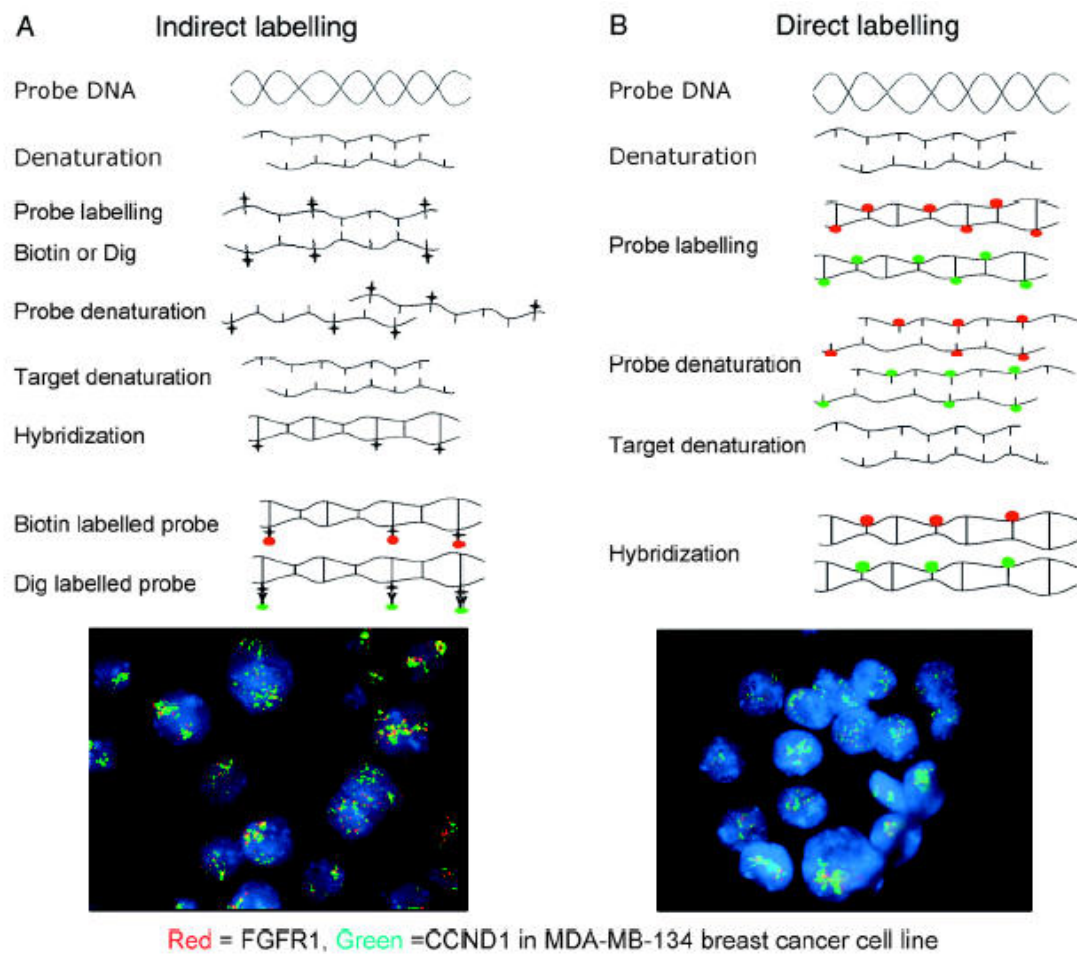


SLIKA 14. FISH HER-2 – evaluacija statusa HER-2 gena u raku dojke. Shematski prikaz položaja probe za HER-2 gen i kontrolne centromerne probe na 17. kromosomu. **A)** Normalna stanica pokazuje 2 signala za HER-2 gen (crveni signali) i 2 kontrolna centromerna signala (zeleni signali). **B)** Stanica raka dojke u kojoj se nalazi amplifikacija HER-2 gena (> 2 crvena signala) u odnosu na kontrolni gen.

Postoji nekoliko vrsta proba koje se koriste za ISH. Najčešće se koriste DNA probe, kako u kliničke tako i u znanstveno-istraživačke svrhe. DNA probe je relativno jednostavno proizvesti u velikim količinama, najbolje su izdiferencirane i njihove značajke su bolje opisane od RNA proba. Veličina DNA proba može biti od kratkih oligonukleotidnih fragmenata do velikih megabaznih fragmenata. RNA probe se još nazivaju i “riboprobama”, a dobiju se sintezom putem vektora pomoću RNA polimeraze. Budući da su RNA probe jednostruke uzvojnice (za razliku od DNA proba) nije ih potrebno denaturirati (tj. razdvojiti niti nukleinske kiseline) te se hibridiziraju nešto bolje od DNA proba. Veličina im može biti od kratkih oligonukleotidnih fragmenata do nekoliko kilobaza. Glavni nedostatak RNA proba je njihova nestabilnost zbog ubikvitarnosti prisutnosti RNAaza. PNA probe su najnoviji dodatak u ovoj kategoriji. Ovaj tip proba građen je od istih baza kao DNA ili RNA probe, međutim u ovom slučaju one su međusobno povezane amidnim vezama (kao proteini), a ne putem šećera i fosfata kao u DNA i RNA. Ovakve modificirane strukture za posljedicu znatno brže

hibridiziraju od DNA proba. Glavni nedostatak im je da njihove značajke još nisu dovoljno dobro proučene, imaju slabiju topivost te da su jako kratke (dužine maksimalno do 30 baza).

Od ISH metoda najčešće se koriste fluorescentna in situ hibridizacija (FISH) i kromogena in situ hibridizacija (CISH). Prema samom nazivu može se isčitati glavna razlika između FISH-a i CISH-a, a ona leži u načinu na koji se vizualiziraju signali proba. **(TABLICA 2)** Kod FISH-a proba se vizualizira preko fluorokroma, dok se kod CISH-a za vizualizaciju koriste kromogeni. U ISH metodama mogu se koristiti fluorokromom obilježene probe (to se naziva direktnim obilježavanjem) ili probe obilježene biotinom ili digoksinom koje se potom vizualiziraju protutijelima obilježenim fluorokromom/enzimom (to se naziva indirektnim obilježavanjem). **(SLIKA 15)** CISH upravo daje najbolje rezultate sa indirektnim obilježavanjem veznog mjesta probe. Važno je napomenuti da fluorokromi imaju veću osjetljivost, spektralnu fleksibilnost i bolju rezoluciju u odnosu na kromogene, stoga za CISH veličina probe mora biti nešto veća. FISH se danas smatra zlatnim standardom za određivanje broja kopija određenog gena, budući da današnji komercijalni FISH kitovi (dual color) obično imaju probu specifičnu za gen i kontrolnu centromernu probu obilježene različitim fluorokromima. Stoga teoretski u normalnoj stanici bi morali imati po 2 signala specifična za gen i 2 kontrolna signala. **(SLIKA 14A)**

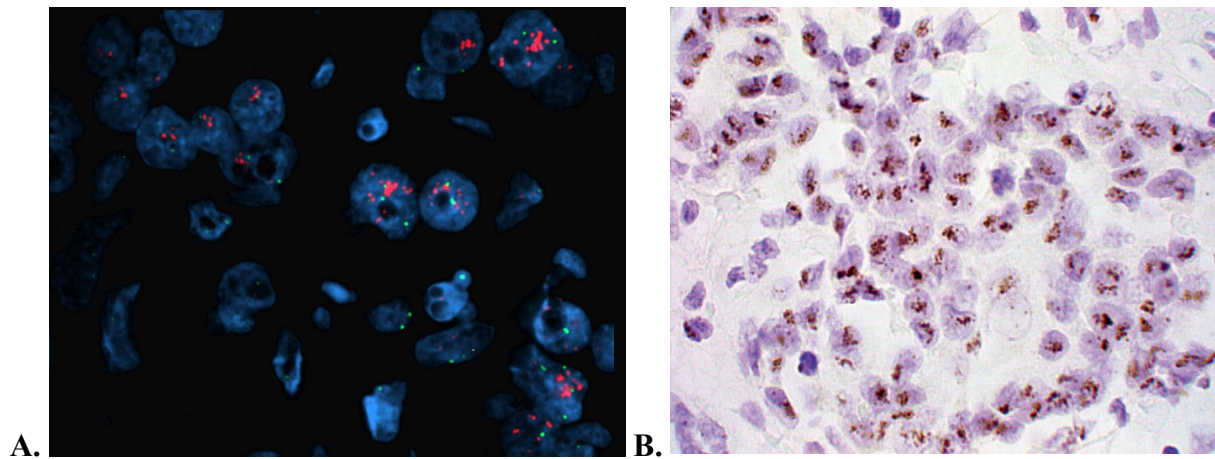


SLIKA 15. Princip direktnog i indirektnog obilježavanja komplementarne probe.

Sama procedura FISH/CISH analize je dugotrajna i traje otprilike 2 dana. Nekoliko je važnih koraka u postupku ISH-a, pretretman tkiva, hibridizacija i sama evaluacija. Pretretman je ključni korak kojim se tkivo ustvari priprema za hibridizaciju, odnosno gen na kromosomu čini dostupnim probi koja će se upotrijebiti. Nukleinska kiselina se učini dostupnom proteinskom denaturacijom i proteinskom digestijom. U pretretmanu tkiva se koristi natrij isotiocijanat (NaSCN), on kida protein:DNA komplekse, što poboljšava DNA:DNA hibridizaciju. Potom slijedi proteinska digestija koja mora biti optimalno podešena za pojedino tkivo, ako je predugačka onda će tkivo biti predigestirano i proba se neće imati na što vezati, ali također ako je digestija prekratka proba neće moći doprijeti do ciljnog mjesta. Sljedeći ključni korak je hibridizacija, tj važno je monitorirati temperaturu o kojoj ovisi sama uspješnost vezivanja probe na ciljno mjesto. Ako je temperatura preniska onda se proba neće vezati na ciljno mjesto na kromosomu i pod fluorescentnom mikroskopom će se vidjeti samo slabi signali ili ih neće ni biti. I na kraju potrebno je educirati osoblje koje će evaluirati preparat i adekvatno analizirati njegovu valjanost te ocijeniti da li su ključni koraci izvedeni pod optimalnim uvjetima.

TABLICA 2. Usporedba FISH i CISH metode

	FISH	CISH
Mikroskop	Fluorescentni	Svjetlosni
Morfološka procjena tkiva	Jako teško	Bez problema
Broj proba	Jedna ili više	Samo jedna zbog loše rezolucije
Veličina probe	Najčešće oko 200kb	Potrebna je nešto veća veličina probe oko 300kb
Obilježavanje vezanja probe na ciljno mjesto	Direktno ili indirektno	Indirektno
Stabilnost signala	Signali s vremenom slabe, blijede	Nema izbljeđivanja, trajni preparat
Pozadinsko bojanje	Varijabilno	Obično slabo prisutno
Detekcija niskog stupnja amplifikacije gena	Precizno	Jako teško
Detekcija amplifikacije gena	Precizno	Precizno
Detekcija delecija	Precizna	Nepouzdana
Heterogenost tumora	Teško uočljiva	Lako uočljiva
Reproducibilnost	Visoka	Visoka
Cijena opreme	Vrlo skupa	Jeftinija



SLIKA 16. Analiza statusa HER-2 gena u raku dojke FISH i CISH metodom. **A.** FISH analiza – uzorak pokazuje amplifikaciju HER-2 gena, **B.** CISH analiza – uzorak pokazuje amplifikaciju HER-2 gena (vide se nakupine amplificiranog HER-2 gena = eng. clusters).

Kako to izgleda u praksi - primjer patohistološke dijagnostike kod raka dojke

Kada se uzorak tkiva zaprimi, prvo mu se dodijeli odgovarajući broj, prema redosljedu. Patolog makroskopski pregleda uzorak, određuje veličinu, margine...itd. Tkivo se potom izreže i odrede se komadi koji će ići na mikroskopski pregled. Komadi tkiva ne smiju biti veći od 3-4mm. Tako narezani komadi se stavljaju u plastične kasete i vraćaju u formalin. (SLIKA 17) Uzorci se fiksiraju nekoliko sati, a neki se čak uzorci fiksiraju preko noći u formalinu prije makroskopskog pregleda da bi se mogli lakše secirati.



SLIKA 17. Narezani komadići tkiva 3-4mm, smješteni u kasete.

Tkivo se mora dehidrirati prije no što se može uklopiti u parafin, u automatskom tkivnom procesoru, tkivo se provlači kroz gradijent alkohola preko noći tako da ujutro bude spremno za uklapanje. (SLIKA 18)



SLIKA 18. Tkivni procesor u kojem se odvija dehidracija tkiva.

Tkivo se stavlja u otopljeni parafin na 52-56°C na nekoliko minuta (uklapanje tkiva u parafin), dok se parafin ne stvrdne da bi samo tkivo bilo spremno za narezivanje. (SLIKA 19)



SLIKA 19. Uklapanje tkiva i parafin.

Tkivo se potom narezuje na mikrotomu, rezovi debljine 5µm za HE bojanje, dok su tanji rezovi potrebni za imunohistokemijska bojanja i in situ hibridizaciju (3 µm). (SLIKA 20)



SLIKA 20. Narezivanje tkiva na mikrotomu.

Rezovi se zatim stave u vodenu kupelj (40°C) da bi se u potpunosti izravnali i potom ručno prenesu na predmetno staklo. (SLIKA 21)



SLIKA 21. Tanki rezovi tkiva se pomoću vodene kupelji prebace na predmetno staklo.

Na taj način pripremljena predmetna stakla, sa nanesenim tkivom se prosuše i idu prvo na bojanje hemalaun-eozinom (HE).

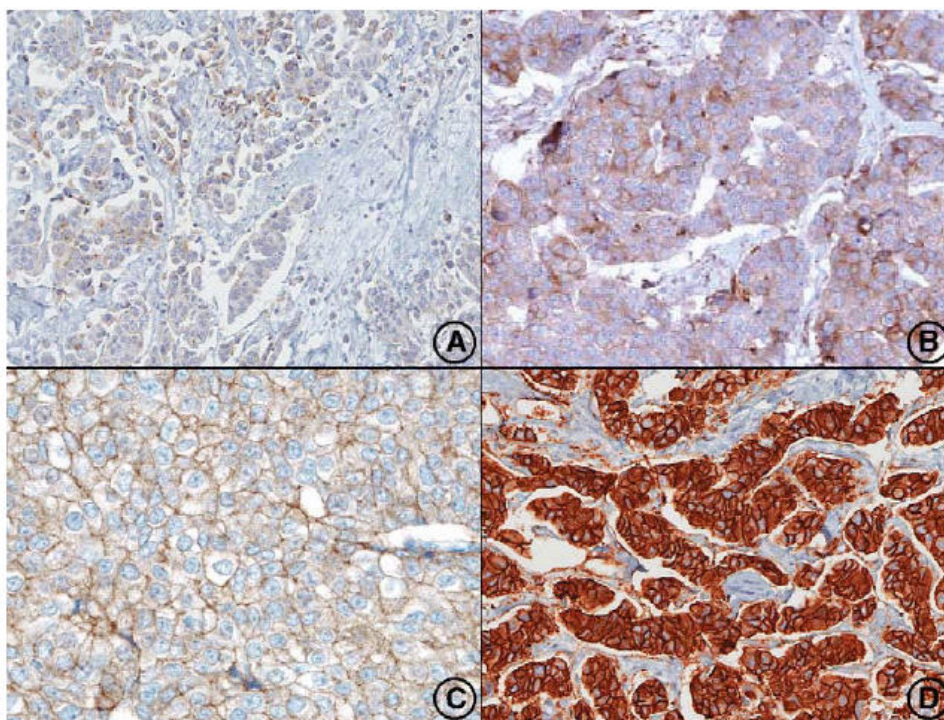
Patolog pregleda HE staklo sa tkivom, odredi da li se radi o raku dojke ili ne. Ako jeste rak dojke tumor se mora dalje izdiferencirati, odrediti patohistološki tip raka, histološki stupanj...itd.

Potom se radi imunohistokemija – kod raka dojke obavezno je učiniti bojenje na:

- 1.) e-kadherine da se izdiferencira lobularni od duktalnog raka dojke,
- 2.) potrebno je odrediti hormonske receptore u tumoru (da bi se odredila eventualno hormonska terapija za pacijenta) i
- 3.) bojanje membrane tumorskih stanica na HER-2 (da bi se odredilo da li je pacijent kandidat za imunoterapiju-HERCEPTIN). (SLIKA 22)

TABLICA 3. Američko društvo za kliničku onkologiju (American Society of Clinical Oncology, ASCO) 2007 smjernice za HER-2 imunohistokemijsku evaluaciju

Kategorija rezultata	Imunohistokemijska validacija	Kriteriji za interpretaciju
Pozitivno	3+	Snažno, kompletno, homogeno membransko bojanje u >30% stanica
Granično	2+	Snažno, kompletno, homogeno membransko bojanje u ≤30% stanica; slabo ili umjereno heterogeno kompletno membransko bojanje u najmanje 10% stanica
Negativno	0, 1+	Nema bojanja (0) ili slabo inkompletno membransko bojanje (1+) u bilo kojem postotku stanica



SLIKA 22. Imunohistokemijsko bojanje tkiva raka dojke na HER-2. **A)** Stanice pokazuju parcijalno membransko bojanje u >10% tumorskih stanica, 1+ **B)** Heterogeno kompletno membransko bojanje u >10% tumorskih stanica, 2+ **C)** Kompletno, homogeno membransko bojanje u >30% tumorskih stanica, 3+ **D)** Snažno, kompletno, homogeno membransko bojanje u >30% tumorskih stanica, 3+.

U slučaju kada je membransko bojanje na HER-2 (2+) onda je potrebno učiniti FISH HER-2 analizu jer je neophodno u tom slučaju učiniti analizu statusa HER-2 gena u raku dojke, jer su kliničke studije pokazale da povoljan odgovor na terapiju Herceptinom imaju samo one pacijentice koje pokazuju amplifikaciju HER-2 gena. (SLIKA 16A)