

MODERN VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK A PATOLÓGIAI DIAGNOSZTIKÁBAN

Schaff Zsuzsa

az orvostudomány doktora, tanszékvezető egyetemi tanár
Semmelweis Egyetem II. sz. Patológiai Intézete
schaff@korb2.sote.hu

Nagy Péter

az orvostudomány doktora, egyetemi tanár
I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézete

A patológia a kórboncolásból az „élet tudományává” fejlődött, egyre inkább az élő szervezetből vett szövet-, sejtminták vizsgálata kerül előtérbe a betegségek pontosabb diagnosztikája céljából. A „klasszikus” mikroszkópos megjelenítést követően azonban óriási fejlődés ment végbe a patológia területén az elmúlt harminc–ötven évben, melyet a következőkben röviden összefoglalunk.

A vizsgálati módtól függetlenül a patológiai vizsgálat kiindulása mindig a szövet, illetve a sejt. Alapvetően két típusú mintát vizsgálhatunk; diagnosztikus célból eltávolított szövet-, illetve sejtmintát, illetve műtét során eltávolításra került, ún. „műtéti preparátumot”. Az alapvető különbség a kettő között, hogy míg a diagnosztikus célú szövetminta kizárólag a diagnózis megállapítását célozza, s ez alapján történik a beteg kezelése, az ún. sebészi vagy műtéti preparátumok a diagnózis megállapítása mellett terápiát is jelentenek, hiszen többnyire a kóros szövet eltávolításra került. Utóbbi természetesen nem jelenti azt, hogy ezen eltávolított szövet-tömegből felállított diagnózis nem alapvető a beteg további kezelése szempontjából.

A patológia alapvetően morfológiai tudományág; fő diagnosztikus eszköze ma is a mikroszkóp, melyet Rudolf Virchow vezetett be e területre. A mikroszkópos vizsgálat a legalapvetőbb módszer, meghaladja minden egyéb technika, eszköz használatát. Ez nem jelenti azt, hogy még ma is a klasszikus, egyszerű felépítésű mikroszkópokkal dolgozunk, hiszen ma már csaknem molekuláris szintig képesek a különböző mikroszkópok információt adni sejtekről, szövetekről.

A patológiai vizsgálatok alapvetően a morfológiai jegyek alapján különítik el a sejteket és szöveteket. Ezen megállapítás az elmúlt néhány év vagy évtized óriási fejlődése fényében már nem teljesen helytálló. Hiszen a molekuláris patológiai módszerek, az immunhisztokémia a sejtek molekuláris összetételéről is ad információt. Mielőtt a „modern”, vagy pontosabban újonnan bevezetett vizsgáló módszerekre rátérnénk, röviden összefoglaljuk a „klasszikusnak” nevezhető, azonban még ma is kiterjedten alkalmazott és az ún. *modern* diagnosztikákkal együtt alkalmazandó, gyakran azok előtt elvégezni szükséges módszereket.

I. „KLASSZIKUS” PATOLÓGIAI DIAGNOSZTIKAI MÓDSZEREK

1. *Preoperatív diagnosztika*

A műtéti beavatkozások előtt, mielőtt nagyobb tömegű szövetet távolítunk el, illetve a beteget egyáltalán műtéti beavatkozásnak tesszük ki, döntő a minél pontosabb diagnózis megállapítása az eltávolításra kerülő szövetből. Például: malignus daganat gyanúja esetén nem közömbös a beteg számára, hogy valóban rosszindulatú vagy esetlegesen jóindulatú daganatról, vagy éppen nem daganatos elváltozásról (például: gyulladásról) van-e szó. Ez alapvetően meghatározza az eltávolítandó szövetmassza mennyiségét, a masszával együtt eltávolított ép szövet kiterjedtségét, esetleges regionális nyirokcsomók eltávolításának szükségességét stb.

Erre a következő vizsgálati lehetőségek állnak rendelkezésre:

- *Citológia* – A sejtek vizsgálata; lényegében szöveti kötéleküktől függetlenül. E módszer elterjedése elsősorban a múlt század 40-es éveitől, George Nicholas Papanicolaou munkásságához köthető (Kopper – Schaff, 2004.). Ma is az egyik legelterjedtebb vizsgáló módszer, legkiterjedtebben a méhnyak citológiai szűrésére, a rák és rákelőző elváltozások megállapítására használják. A vizsgálat egyes sejtek mikroszkópos tanulmányozását jelenti. Alapvetően exfoliatív és aspirációs túbiopsziás formája ismert. Az exfoliatív citológia esetén a levált vagy leválasztott (exfoliált) sejteket vizsgáljuk valamely módon. Az egyre jobban elterjedő vékonytű aspirációs biopszia során megfelelő eszközzel kiszívjuk (aspiráljuk) a kérdéses elváltozásból a sejteket, gyakran valamely képalkotó eszköz (ultrahang, CT

stb.) kíséretével, „vezetésével”. A sejtmintából üveglemezre víve kenetet készítünk, melyet különböző módokon festünk és vizsgálunk.

- *Core- vagy vastagtű-biopszia* – Ezen eljárás a korábban említett aspirációs túbiopsziánál vastagabb kaliberű tűvel vesz mintát. Ez is történhet aspirációs úton, vagy kivágva a kérdéses szöveteket. A citológiai vizsgálattal ellentétben a beavatkozás során szövethengert kapunk, amelyet szövettani módszerekkel dolgozunk fel és értékelünk.
- *Próbakimetszés* – Bizonyos körülmények között nem lehetséges a fenti túbiopsziás vizsgálatok végzése. Ilyenkor sebészi úton, megfelelő eszközzel veszünk mintát a kérdéses szövetből. Ezen mintavételi eljárások közé sorolhatók az utóbbi években igen elterjedt endoszkópos mintavételi technikák is. Ezen beavatkozás során ugyancsak szövetmintát nyerünk, és az annak megfelelően kerül feldolgozásra és értékelésre.

2. *Intraoperatív diagnosztika*

Számos esetben szükséges a diagnózis pontosítása műtét során. Annak eldöntése, hogy milyen mértékű legyen a kérdéses szövet eltávolítása, a sebésznek néha a műtét közben is meg kell győződnie az elváltozás természetéről. Ugyancsak fontos, hogy a kóros szövet eltávolítása mindig épben történjék, ami néha szabad szemmel nem ítéltető meg, ezért mikroszkópos vizsgálatra van szükség. Az intraoperatív diagnosztika módszere lehet az ún. fagyasztásos szövettani vizsgálat. Ennek során fixálás nélkül, gyorsfagyasztással történik a preparátumok készítése, melyet a patológus értékel. Fenti eljárás igen rövid időt kell hogy igénybe vegyen (max. 10–15

percet), mivel ezen idő alatt a műtét „áll”, és a beteget a műtőasztalon altatni szükséges. Újabbán a fagyasztásos vizsgálat mellett intraoperatív citológiai vizsgálatra is sor kerülhet, a korábban elmondottak alapján.

3. *Posztoperatív diagnosztika*

A műtét során eltávolított szövetek vizsgálata alapvető a későbbi kezelés megállapításához. Ezen vizsgálat adja a végleges patológiai diagnózist. A diagnózis felállításával mellett a leletben többnyire a várható kórlefolyásra, illetve a kezelésre vonatkozóan is ajánlást tesz a patológus, bár ez utóbbit nem kötelezően.

A szem ellenőrzése mellett történik az ép és kóros területek elválasztása és a megfelelő mintarészletek szövettanra történő kiválasztása. Erre azért van szükség, mivel a gyakran igen nagy területű eltávolított szövet teljes egészében nem kerülhet feldolgozásra.

A diagnózis megállapítása lényegében a megfelelő módon elkészített szövettani metszeten „hagyományos” fénymikroszkóppal történik. A terápiás lehetőségek fejlődésével a jó- és rosszindulatúság meghatározása mellett további csoportok elkülönítése is döntő a beteg további sorsa, betegségének prognóza szempontjából. Ennek megfelelően az esetek jelentős részében újabb vizsgálati módszereket kell alkalmazni a hagyományos fénymikroszkópos eljárás mellett.

II. ÚJABBAN ALKALMAZOTT PATOLÓGIAI MÓDSZEREK

1. *Immunhisztokémia*

Az immunhisztokémia lényegében olyan immunreakció, melyet *in situ*, azaz a sejteken, szöveteken végzünk el. A specifikus antitestel detektáljuk a szövetekben elhelyezkedő antigént.

Az immunhisztokémiai reakciókat legkiterjedtebben a daganatok diagnosztikájában, elsősorban a tumorok szöveti, sejteredetének meghatározásában, differenciáltsági fokának megállapításában alkalmazzuk. A kórokozók diagnosztikájában, így baktériumok, vírusok detektálásában is egyre nagyobb jelentőségűek ezen vizsgálatok. Ugyancsak döntő fontosságú a technika egyes receptorok megjelenítésében. Például emlődaganatok esetében a beteg további kezelése attól függ, hogy a kérdéses daganat ösztrogén vagy progesteron receptort tartalmaz-e, vagy expresszája-e a HER-2/neu antigént stb.

A leggyakrabban alkalmazott immunhisztokémiai reakciók a következők;

- Hámmarkerek, cytokeratinok (CK)
- Kötőszövetmarkerek
- Hormonok, hormonreceptorok
- Melanomamarkerek
- Limfómamarkerek
- Egyéb markerek

2. *Elektronmikroszkópia*

Húsz évvel ezelőtt az elektronmikroszkópia az egyik legmodernebb, a diagnosztikában is kiterjedten alkalmazott módszer volt (Lapis – Schaff, 1979). Az utóbbi években azonban háttérbe szorult, főleg munkai igényessége és drágasága miatt. Jelenleg csaknem kizárólag a vesebetegségek diagnosztikájában, ritkán egyes tumorok differenciálásában, és ugyancsak viszonylag ritkán a máj egyes betegségeinek kimutatására szolgál.

3. *Citometria*

A diagnosztikában lényeges lehet egyes sejtek különböző jellemzőinek a megismerése. A korábban bemutatott vizsgálatok lényegében *in situ* módon, azaz „helyben” detektálták az elváltozásokat. Ennek megfelelően a sejtek

összetevői nem feltétlenül voltak teljes egészükben vizsgálhatók. Ezen probléma megoldását küszöböli ki a citometria, melynek során nagyszámú izolált sejtet elemzünk megfelelő műszer, ún. citométer segítségével. Ezen módszer alkalmazása a vérből, esetlegesen a csontvelőből könnyen kinyerhető sejtek, daganatok esetében elterjedt, így különösen a limfómák, leukémiák esetében. Újabban azonban egyéb laza szerkezetű tumorkból is végeznek áramlásos citometriai vizsgálatot, bár lényegesen körülményesebben, mivel nehezebb a sejtek kinyerése a szöveti kötéllekből.

4. Molekuláris patológia

A molekuláris biológiai technikák fejlődése új távlatokat nyitott a patológiai diagnosztikában is. Bár a különböző daganatok osztályozása jelentősen változott az immunhisztokémia alkalmazásával, azonban egyes esetekben változatlanul kétségek merültek fel a tumorok osztályozásával, szöveti eredetével kapcsolatban.

A szemléletváltáshoz nagyban hozzájárult a *Human Genome Project* sikere, az emberi genom szekvenciájának megismerése. Némileg módosult ezen lelkesedés, amikor a génszekvencia ismerete és a funkció nem haladt mindig párhuzamosan. Az ezzel kapcsolatos kutatások viszont alapját adták annak, hogy a géntechnológiai módszerek, a funkcióváltást is nyomon kísérve számos területre, így a patológiába is bevonuljanak. Ma már ezen eszköztár a korábban bemutatott technikákat is alkalmazva, arra épülve, a patológiának is részét képezi.

A molekuláris biológia adatai alapján átalakult szemléletünk azon struktúrákkal kapcsolatban, amelyek a korábban elmondottak alapján a diagnózisunk alapjául szolgál-

tak. A gének jobb megismerésével lehetőség van génszinten, illetve fehérjeexpresszió szintjén is megismerni az egyes betegségekben létrejövő molekuláris változásokat.

Kezdetben csaknem kizárólag friss műtéti anyagokból, ill. közvetlenül a vérből, csontvelőből vagy szövetekből nyert sejteket, szöveteket használtak molekuláris patológiai vizsgálat céljaira. Újabban már formalinban fixált és archivált mintákból is értékes vizsgálatokat végezhetünk génanalízis céljából.

Jelenleg a molekuláris patológiai módszereket elsősorban a tumorok diagnosztikájára, egyes fertőző ágensek (baktériumok, vírusok stb.) kimutatására, génhibák feltárására alkalmazzák. A következőkben a molekuláris patológiában jelenleg leggyakrabban alkalmazott módszereket tekintjük át.

- *Citogenetika* – E módszer lényegében kromoszomális diagnosztikai eljárás, mely az örökítő anyag strukturális és funkcionális szerveződésével és működésével foglalkozik (Kopper – Schaff, 2004.). A módszer megjeleníti a kromoszómákat, és detektálja azok számbeli eltérését (monoszómia, triszómia) és/vagy szerkezeti átrendeződését (transzlokáció, inzerció, delécio, inverzió).

A „rutin” kariotipizáláson túl érzékenyebb módszereket, így ma leggyakrabban a fluorescens *in situ* hibridizációt (FISH, lásd később) alkalmazzák, melynek számos módosítása (például *dual-color* FISH) ismert. Ezen technika csúcsa az M-FISH (spektrális kariotipizálás), amikor az összes kromoszómát festjük.

- *In situ hibridizáció* – Az *in situ* hibridizáció során specifikus DNS-szakaszokat mutatunk ki a kromoszomális vagy az interfázisban lévő sejtmagok DNS-ében. E módszer során a mintában jelen lévő,

egyszálúvá tett DNS a komplementer, a próbában lévő jelölt DNS-sel hibridizál. Az eljárást mind friss, mind beágyazott szövettani metszeteken, citológiai preparátumon, csontvelőből, vérmintából is elvégezhetjük. Az immunhisztokémiához némileg hasonló irányelveket követve, megfelelő jelölő anyaggal láthatóvá tehető a hibridizációs reakció, és az mikroszkópban vizsgálható. A jelölés a korábbi években izotóppal történt, azonban erre manapság már ritkán kerül sor, különböző hisztokémiai reakciókkal vagy fluorescens jelöléssel (fluorescens *in situ* hibridizáció – FISH) detektáljuk a hibridizáció bekövetkeztét. Ezen vizsgálatok eredménye igen informatív lehet, például emlődaganatokban a már korábban említett Herz gén amplifikáció vagy *Helicobacter pylori* antibiotikum rezisztenciájának kimutatásában, mely során a mutált gént tudjuk detektálni (Morris et al., 2005).

A komparatív genomikus hibridizáció (CGH) a FISH-hez nagymértékben hasonlít. Ezen eljárás során különböző fluorescens festékekkel festjük a normális sejtek és a kérdéses tumorsejtek DNS-ét, és ezeket együtt normális kromoszómákra hibridizáljuk. A két fluoreszcencia intenzitásának aránya jelzi az eltérést, azaz hogy a tumorsejtek DNS-éből kromoszómaszakaszok hiányoznak vagy felszaporodnak.

- **Polimeráz láncreakció (PCR)** – A friss vagy már fixált és paraffinba ágyazott anyagból DNS-t izolálunk. A vizsgálandó DNS-szakaszokat speciális polimeráz enzim (Taq-polimeráz) és ún. primerek segítségével felszaporítjuk (amplifikáljuk). Minden ciklus után duplázódik a kiválasztott DNS-szakasz, így a „reakciólánc” végére a kiindulási DNS-szakasz

jelentősen, a kívánt mennyiségre felszaporodhat. A kvalitatív PCR-reakció csak arra képes választ adni, hogy jelen van-e a mintában a kérdéses DNS-szakasz.

A PCR-technikát kiterjedten alkalmazzák az egyes kórokozók, baktériumok, vírusok kimutatására. Ugyancsak alkalmas egyes daganatokban, például emlőrákban a HER2/neu amplifikáció kimutatására, valamint génátrendeződések, pontmutációk stb. azonosítására. Egyes esetekben *in situ* PCR-reakció végzésére is lehetőség adódik (Lotz et al., 2002).

A kvantitatív vizsgálat a DNS-szakaszok mennyiségét is képes mérni. A fluorescens festékekkel jelölt alkotórészek intenzitása alapján, a jelet detektálva, minden ciklus végén mérhetjük a képződött DNS mennyiségét. Ezen technikát nevezük „valós idejű” (real-time) PCR-módszernek (Bernard – Wittwer, 2002).

A PCR-technika alkalmas az RNS vizsgálatára is, mely számos esetben igen lényeges egyes sejtek, szövetek funkciójának megítélése szempontjából – elsősorban a *messenger* RNS (mRNS) kimutatása lényeges. A mintából izolált RNS-t reverz transzkriptáz segítségével cDNS-formába írjuk át, majd végrehajtjuk az amplifikációt (rt-PCR). Jelenleg a tumor-diagnosztikában ezt a módszert alkalmazzuk legelterjedtebben. Mindezen módszerek igen érzékenyek, és rendkívüli gondos kivitelezést igényelnek. A molekuláris patológiai technikákat végző laboratóriumoknak különösen magas szintű minőségi követelményeknek kell eleget tenniük (Timár et al., 2002).

- **Szöveti chip technológia** – E módszer lényege, hogy megfelelő berendezéssel (vagy akár egyszerű vékony tüvel) kicsiny hen-

gert emelnek ki a szövetblokkokból. Mindezt megfelelő módon paraffinblokkba helyezve, egyszerre akár 50–300, vagy ezt is meghaladó mintasor vizsgálható egyidejűleg. Ezen módszer segítségével például többféle szöveti szerkezetű daganat vagy egy daganatnak többféle stádiuma hasonlítható össze. Értékes technika lehet új antitestek kipróbálására, illetve gyógyszerhatások vizsgálatára (Lódi et al., 2006).

- *DNS-chip (DNS array, microarray)* – A DNS-chip technológia rendkívül ígéretes módszer, mely során lehetővé válik számos, akár több ezer vagy tízezer gén expressziós profiljának a vizsgálata (Murphy, 2002). A módszer lényege, hogy különböző hosszabb-rövidebb DNS-szakaszokat, illetve oligonukleotid szakaszokat viszünk fel, „nyomatunk” egy kicsiny, vékony lapra. Nagyon lényeges, hogy a felvitt szakaszok mindegyikének szekvenciája egyértelműen tisztázott legyen. Ezt követően az *in situ* hibridizációhoz hasonló módon a kérdéses, vizsgálni kívánt DNS-t visszük fel a több száz, illetve több tízezer gént tartalmazó chipre. Komplementer, kiegészítő szekvencia esetén a kötődést megfelelő színreakció jelzi. A rendkívül nagyszámú mintakapcsolás kiértékelése bonyolult programokkal és igen fejlett számítógépes technikával történik. Az eljárással képet kaphatunk egyes gének föl-, illetve alulexpresszáldásáról. Egyes daganatokban expresszáldó gének, az ún. génmintázat, a normálissal, illetve különböző daganattípusok egymással hasonlíthatók össze. Ennek eredményeképpen a daganatok a génexpressziós profil alapján egymástól elkülöníthetők. A számítógéppel elemzett ada-

tokat tovább kell analizálni. Megfelelő módon összehasonlítva ún. hierarchikus csoport- (cluster) analízis végezhető, vagy „önszerveződő térképek” (Self-organizing maps – SOM). Egy-egy kézjegy olyan gének *clusterét* mutatja, amelyek egymáshoz hasonló funkciójú fehérjéket kódolnak (Eisen, 1998).

A fenti modern technikák alkalmazása egyre kiterjedtebb. Leggyakrabban a következő területen képezik a diagnosztika részét:

Daganatok: Számos daganatban észleltek eltéréseket fenti technikák segítségével. Ezen eltérések felismerésének a daganat pontos diagnózisának, osztályozásának, fokozatának megállapításában, a prognózis, a terápiás célpontok lehetséges megállapításában és a kezelés hatásosságának lemérésében egyaránt szerepe van.

A leggyakrabban a következő daganatok esetén alkalmazunk jelenleg molekuláris patológiai módszereket: leukémia, limfóma, emlőrák, lágyszövetdaganatok, neuroblasztóma, vese- és hólyagdaganatok, tüdőrák, kolorektális daganatok, gastrointesztinális sztromális tumorok stb.

Fertőző ágensek: Igen ígéretes alkalmazási terület, mely már számos baktérium, vírus kimutatása céljából bevonult az eszköztárba. A patológiában a leggyakrabban a következő kórokozók kimutatását végezzük molekuláris patológiai módszerrel: humán papilloma vírus (HPV) tipizálás (magas és alacsony kockázatú típusok), *Helicobacter pylori* antibiotikum (elsősorban clarithromycin) érzékenységének meghatározása, Epstein–Barr-vírus (EBV), Cytomegalovírus (CMV), *Mycobacterium tuberculosis* kimutatás.

A fenti rövid összefoglalás azon módszereket kívánta bemutatni, melyeket jelenleg alkalmazunk a patológiai diagnosztikában.

Fenti módszereket *modernnek* tekinthetjük, annak ellenére, hogy néhány közülük már több mint száz éve alkalmazott. Ezen „klasszikus”, de még ma is időszerű, tehát modernnek nevezhető eljárásokat azért építettük be ezen áttekintésbe, mert ezek nélkül a XXI. század molekuláris patológiai módszerei alap

nélküliek, akár félrevezetőek is lehetnek. A patológiai alapdiagnosztikára építve szükséges megteremteni századunk új technikáinak kritikus alkalmazását.

Kulcsszavak: *patológia, diagnosztika, hisztológia, molekuláris patológia*

IRODALOM

- Bernard, Philip S. – Wittwer, Carl T. (2002): Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry*. 48, 8, 1178–1185. Review.
- Eisen, Michael B. – Spellman, P. T. – Brown, P. O. – Botstein, D. (1998): Cluster Analysis and Display of Genome-Wide Expression Patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95, 14863–14868.
- Glasz Tibor (2000): *A kórszövettani indítás és klinikai vonatkozása*. Medicina, Budapest
- Kopper László – Schaff Zsuzsa (2004): *Patológia*. 1–2. Medicina, Budapest
- Lapis Károly – Schaff Zsuzsa (1979): Acute Viral Hepatitis. In: Johannessen, J. V. (ed.): *Electron Microscopy In Human Medicine*. Vol. 8. The Liver. The Gallbladder And Biliary Ducts. McGraw-Hill, New York, 124–136.
- Lotz Gábor – Simon Zs. – Szalay F. – Firneisz G. – Aboinyi M. – Lengyel G. – Telegdy L. – Ibrányi E. – Nemes B. – Schaff Zs. (2002): Localization of Hepatitis C Virus RNA on Human Red Blood Cells by RT in situ PCR Technique. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 37, 578–584.
- Lódi Csaba – Szabó E. – Holczbauer Á. – Batmunkh, E. – Szijártó A. – Kupcsulik P. – Kovalszky I. – Paku S. – Illyés Gy. – Kiss A. – Schaff Zs (2006): Claudin-4 Differentiates Biliary Tract Cancers from Hepatocellular Carcinomas. *Modern Pathology*. 19, 460–469.
- Morris, Julie M. – Reasonover, A. L. – Bruce, M. G. – Bruden, D. L. – McMahon, B. J. – Sacco, F. D. – Berg, D. E. – Parkinson, A. J. (2005): Evaluation of Seafast, A Rapid Fluorescent in situ Hybridization Test, for Detection of Helicobacter Pylori and Resistance to Clarithromycin in Paraffin-Embedded Biopsy Section. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 3494–3496.
- Murphy, David (2002): Gene Expression Studies Using Microarrays: Principles, Problems, and Prospects. *Advances in Physiology Education*. 26, 256–270. Review.
- Schaff Zsuzsa – Hsia, C. C. – Sárosi I. – Tabor E. (1994): Overexpression of TGF- α in Benign and Malignant Liver Tumors from European Patients. *Human Pathology*. 25, 644–651.
- Tímár József – Csuka O. – Orosz Zs. – et al. (2002): Molecular Pathology of Tumor Metastasis. II. Molecular Staging And Differential Diagnosis. *Pathology and Oncology Research*. 8, 204–219.

