# Analýza obrazu v patologii

**Autor:** Pavel Hlava

Analýza obrazu v patologii je metoda, která si klade za cíl objektivizovat posuzování histopatologických preparátů. Nahrazuje subjektivitu vizuálního hodnocení, při kterém může docházet k rozdílům v hodnocení určitých znaků histopatologických preparátů. Princip metody spočívá v počítačovém vyhodnocení digitálního obrazu sledovaného objektu sejmutého digitální kamerou či fotoaparátem nebo slide scannerem.

## Virtuální preparát

Pojmem virtuální preparát označujeme kompletně digitalizovaný histologický preparát. Za výhodu virtuálního preparátu lze považovat to, že obtížný případ lze konzultovat s odborníkem patologem, jenž se na danou problematiku specializuje, byť se nachází na místě velmi vzdáleném. Digitalizované preparáty lze s výhodou také využít pro edukaci, či je přiložit k publikaci nebo učebnici. Jako nevýhodu lze uvést, že digitalizovaný preparát nelze použít k dalšímu zpracování, např. nelze dodatečně provést imunohistochemické barvení apod.

## Zhotovování imunohistochemických preparátů

Cílem imunohistochemie je detekovat specifické antigenní determinanty za využití základního principu interakce antigen-protilátka, kdy protilátky afinitně přisedají na cílový antigen, proti kterému byly vyprodukovány. Protilátky musejí být označeny, aby došlo k vizualizaci místa interakce a průkazu antigenů. Rozlišujeme dva základní typy imunohistochemických metod, a sice metodu přímou a metodu nepřímou.

Při metodě přímé je primární protilátka přímo označena fluoresceinem, enzymem nebo kovem, jehož rozmístění ve tkání posléze hodnotíme. Tuto metodu lze použít, pokud je ve tkáni antigen přítomen v dostatečně vysoké koncentraci.

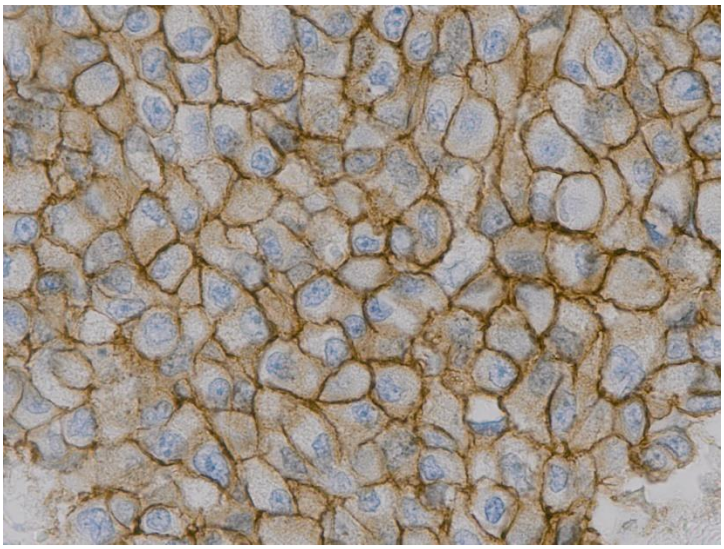
Při metodě nepřímé nejprve aplikujeme neoznačenou protilátku, která je specifická proti prokazovanému antigenu, tzv. primární protilátku. Poté aplikujeme protilátku proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete, které bylo dárcem protilátky primární, tzv. sekundární protilátku. Sekundární protilátka je značena fluorochromem nebo enzymem a imunologickou vazbou se váže na protilátku primární.

## HER2/neu u karcinomu prsu

Gen *HER2/neu* je protoonkogen, který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 17. Tento gen kóduje expresi transmembránového glykoproteinu, který je řazen do rodiny epidermálních růstových faktorů s tyrosin-kinázovou aktivitou. U karcinomu prsu je přítomna amplifikace oblasti chromozomu, kde je gen *HER2/neu* lokalizován. Zjištění amplifikace genu *HER2/neu* u karcinomu prsu je významné pro stanovení prognózy, neboť amplifikace genu *HER2/neu* je spojená s horším přežíváním u pacientek s metastatickým karcinomem prsu. Je prediktivním faktorem odpovědi na terapii trastuzumabem (Herceptin®), což je monoklonální anti-HER2 protilátka.

Při imunohistochemickém hodnocení histopatologického preparátu na HER2/neu se stanovuje stupeň proteinové exprese HER2/neu. Výsledek vyšetření se udává jako odstupňované skóre od 0 do 3+. Preparáty s detekovanou zvýšenou expresi (2+, 3+) jsou následně ověřovány metodou fluorescenční *in situ* hybridizace, která má za cíl určit počet kopií genu *HER2/neu* v jádře. Současně s tímto je nutné stanovit i počet kopií samotného chromozomu 17. Jestliže totiž dochází ke zmnožení celého chromozomu 17 v případě nepravé amplifikace genu *HER2/neu* neboli polyzomie chromozomu 17, je terapie trastuzumabem neúčinná.

Obrázek 1 - Preparát s HER2/neu pozitivními membránami, pozitivita 3+ (snímek poskytnul Ing. Mgr. Ivo Überall z ústavu Klinické a molekulární patologie LF UPOL a FNOL)



**Fluorescenční *in situ* hybridizace**

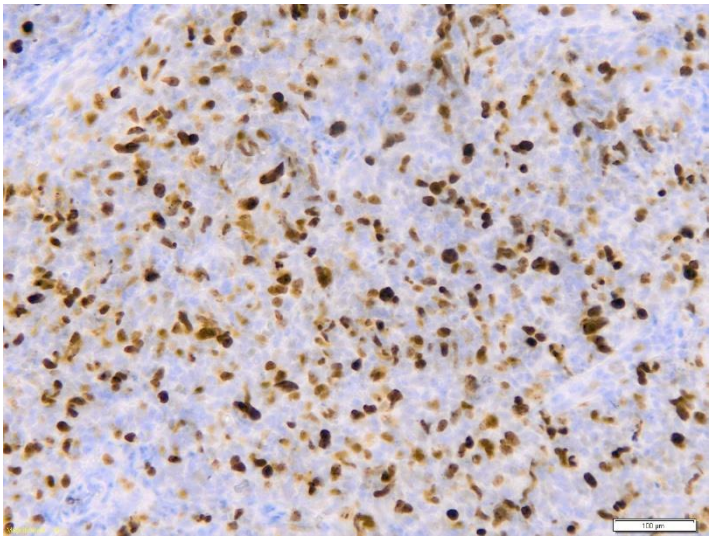
Cílem metody je zviditelnit sekvence nukleových kyselin přímo na preparátech, jež obsahují morfologicky zachovalé chromozomy. Principem metody je užití značené jednořetězcové hybridizační sondy, tj. krátkého úseku DNA. Tato sonda se v důsledku komplementarity bází může po denaturaci vázat k cílové sekvenci DNA buněk. Nejčastěji jsou používány DNA sondy, jejichž nukleotidy jsou konjugovány s fluorescenčními barvivy. Místo kde se sonda

navázala, můžeme identifikovat jako barevné signály ve fluorescenčním mikroskopu. Poloha a počet jednotlivých signálů podává informaci o možných početních i strukturních změnách chromozomů.

**Ki-67**

Ki-67 je jaderný antigen, jež je exprimován v buňkách v G1, S a G2 fázi buněčného cyklu a v mitóze, nikoliv však v G0 fázi. Ki-67 má prognostický i prediktivní význam. K detekci Ki-67 se využívá protilátka MIB1, která detekuje Ki-67 antigen v rutinně zpracovaných histopatologických preparátech. Frakce Ki-67 pozitivních buněk často koreluje s klinickým průběhem nádorového onemocnění.

Obrázek 2 - Preparát s Ki-67 pozitivními jádry, pozitivita 34 %(snímek poskytnul Ing. Mgr. Ivo Überall z ústavu Klinické a molekulární patologie LF UPOL a FNOL)



**Hodnocení Ki-67**

Pokud je přítomno méně než 10 % pozitivních jedná se o nízkou proliferaci. 10 až 20 % pozitivních jader je označováno za hraniční. Více než 20 % pozitivních jader lze považovat za tkáň vysoce proliferující.

**Seznam použité literatury**


Odborné publikace

SLABÝ, Ondřej. *Molekulární medicína*. Praha: Galén, c2015. ISBN 9788074921216.

Internetové zdroje

*LF* [online]. Copyright © [cit. 12.04.2018]. Dostupné z: http://old.lf.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/hippokrat/Pracoviste/Patologie/03_Analyza_obrazu__morfometrie__virtualni_mikroskopie.pdf

*Lékařská fakulta v Plzni | Univerzita Karlova* [online]. Copyright © [cit. 12.04.2018]. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/Histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf

**Seznam fotografií, obrázků**

Obrázek 3 - Preparát s HER2/neu pozitivními membránami, pozitivita 3+ (snímek poskytnul Ing. Mgr. Ivo Überall z ústavu Klinické a molekulární patologie LF UPOL a FNOL)

Obrázek 4 - Preparát s Ki-67 pozitivními jádry, pozitivita 34 %(snímek poskytnul Ing. Mgr. Ivo Überall z ústavu Klinické a molekulární patologie LF UPOL a FNOL)