

Υβριδισμός *in situ*: Η συμβολή της μεθόδου στη μελέτη των λεμφοϋπερπλαστικών εξεργασιών

Θ. Παπαδάκη

In situ Hybridization-Applications for the study of lymphoproliferative disorders. (Review Article).

Papadaki Theodora

"Evangelismos" General Hospital, Athens, Department of Hematopathology

Key words: Hybridization *in situ*, Lymphoproliferative disorders

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γεγονός ότι η μορφολογική αξιολόγηση εξακολουθεί μέχρι σήμερα ν' αποτελεί τον "θεμέλιο λίθο" στη διαγνωστική αιμοπαθολογοανατομία. Εντούτοις είναι πλέον αποδεκτό, ότι η συνδυασμένη εκτίμηση της "κλασσικής" μορφολογίας προς τα δεδομένα των κυτταροχημικών, ανοσοϊστοχημικών, κυτταρογενετικών και μοριακών μελετών είναι αποφασιστικής σημασίας στη διάγνωση, θεραπεία και κατανοήση της παθοφυσιολογίας των νόσων του αιμοποιητικού και λεμφοδικτυωτού ιστού.

Ο Υβριδισμός *In Situ* [*In Situ Hybridization (ISH)*], αποτελεί μια από τις βασικές τεχνικές του μοριακού υβριδισμού, μέσω των οποίων ανιχνεύονται ειδικές DNA ή RNA αλληλουχίες. Βασικό πλεονέκτημα του ISH, το οποίο τον διαφοροποιεί από τις υπόλοιπες τεχνικές μοριακού υβριδισμού (υβριδισμός φίλτρου, *in vitro* υβριδισμός) και την αλυσωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), είναι ότι το

DNA ή RNA στόχος ανιχνεύονται απευθείας στον ακέραιο ιστό, κύτταρο ή χρωμόσωμα. Αντίθετα, στις μοριακές τεχνικές που προαναφέρθηκαν, προηγείται η καταστροφή του ιστού ή κυττάρου για την απομόνωση του DNA ή RNA με αποτέλεσμα αδυναμία μορφολογικής αξιολόγησης. Η βασική αυτή διαφορά κάνει τον ISH τη μεθοδολογία εκλογής, ειδικότερα για τον παθολογοανατόμο, εφόσον παρέχει το αδιαμφισβήτητο πλεονέκτημα της άμεσης συσχέτισης των γονοτυπικών προς τους μορφολογικούς και ανοσοϊστοχημικούς χαρακτήρες σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου σε ιστολογικές τομές όσο και κυτταρολογικά παρασκευάσματα.

Σήμερα, μετά τη διαφοροποίηση και εξέλιξη της, η μεθοδολογία του ISH χρησιμοποιείται με ολοένα αυξανόμενη συχνότητα στο χώρο της αιμοπαθολογοανατομίας στο ερευνητικό επίπεδο όσο και την καθημερινή διαγνωστική πρακτική.

2. ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΤΟΥ ISH

Ο ISH, όπως ο υβριδισμός φίλτρου και ο *in vitro* υβριδισμός, στηρίζεται στη Βασική αρχή, ότι ειδικές αλληλουχίες του ιστικού ή κυτταρικού DNA ή RNA (στόχος (target)) δυνατόν να συνδεθούν (υβριδίσουν) με σεσημασμένους μονόκλωνους DNA ή RNA ανιχνευτές (probes) συμπληρωματικής αλληλουχίας, κάτω από κατάλληλες συνθήκες, έτσι ώστε να σχηματισθούν υβρίδια. Τα τελευταία αυτά δυνατόν να γίνουν ορατά με ειδικά συστήματα αναγνώρισης (Εικόνα 1).

Η επιτυχία του ISH εξαρτάται από πολλές παραμέτρους, οι βασικότερες των οποίων είναι: α) ο αριθμός των υπαρχόντων DNA ή RNA αντιγράφων, β) η επίδραση της επεξεργασίας και μονιμοποίησης του ιστού στη διατήρηση και προσπελασιμότητα του στόχου, γ) ο τύπος του ανιχνευτή, δ) η μέθοδος σήμανσης του ανιχνευτή, ε) η ευαισθησία της μεθόδου για την αναγνώριση του σήματος, και ζ) οι συνθήκες κατά και μετά τον υβριδισμό.

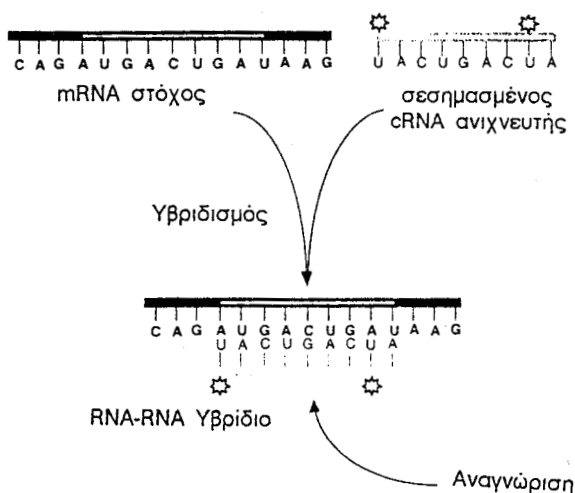
Η διεξοδική ανάλυση των παραμέτρων που προαναφέρθηκαν εκφεύγει των στόχων του συγκεκριμένου κεφαλαίου, οι οποίοι κατά Βάση εστιάζονται στις εφαρμογές του ISH σήμερα στην αιμοπαθολογοανατομία. Για τους λόγους αυτούς θα ακολουθήσει μια σύντομη αναφορά στις συγκεκριμένες παραμέτρους. Για εκτενέστερη ανάλυση της μεθοδολογίας του ISH ο

αναγνώστης παραπέμπεται στη βιβλιογραφική αναφορά¹.

Το βασικότερο ίσως πρόβλημα στην εφαρμογή του ISH είναι η εξασφάλιση του κατάλληλου ανιχνευτή. Οι ανιχνευτές, προκειμένου για την ανίχνευση DNA στόχων, αφορούν σε δίκλωνο DNA, συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (μονήρη ή πολλαπλά) και μονόκλωνο DNA. Για την ανίχνευση εξάλλου RNA στόχων χρησιμοποιούνται ανιχνευτές του τύπου είτε του μονόκλωνου αντισυνθετικού (antisense) RNA, είτε συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (μονήρη ή πολλαπλά).

Οι εν χρήσει σήμερα ανιχνευτές είναι είτε ραδιενεργά σεσημασμένοι συνήθως με ³⁵S, ³H και ³²P και ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία είτε μη ραδιοϊσοτοπικά σεσημασμένοι συνήθως με Βιοτίνη ή διγοξιγενίνη. Η τελευταία αυτή υπερεχει της βιοτίνης, λόγω του ότι η ενδογενής βιοτίνη των ιστών δυνατόν να έχει ως αποτέλεσμα μη ειδική αντίδραση με το σύστημα αναγνώρισης. Μια παρεξήγηση, η οποία εξακολουθεί ακόμη και σήμερα να ισχύει, είναι ότι οι ραδιενεργά σεσημασμένοι ανιχνευτές έχουν μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανίχνευση των στόχων σε σχέση προς τους μη ισοτοπικά σεσημασμένους. Είναι γεγονός ότι η άποψη αυτή αλήθευε μέχρι προ 3-5 χρόνων. Σήμερα εν τούτοις η εισαγωγή μη ισοτοπικά σεσημασμένων ανιχνευτών κυρίως με διγοξιγενίνη, σε συνδυασμό με τη χρησιμοποίηση ευαίσθητων ενζυμικών ή ανοσοενζυμικών συστημάτων αναγνώρισης στο φωτομικροσκόπιο, έχει σημαντικά αυξήσει την ευαισθησία των μη ισοτοπικών μεθόδων ISH. Οι τελευταίες αυτές τείνουν να υποκαταστήσουν τα ραδιοϊσοτοπικά συστήματα, έναντι των οποίων πλεονεκτούν κατά το ότι χαρακτηρίζονται από ασφάλεια, ταχύτητα, σταθερότητα, υψηλή διακριτικότητα (resolution), διατήρηση των μορφολογικών χαρακτήρων, δυνατότητα σύγχρονης εφαρμογής ISH και ανοσοϊστοχημείας καθώς και ανίχνευσης περισσότερων του ενός στόχων.

Όσον αφορά εξάλλου στην επίδραση των συνθηκών υβριδισμού στην αποτελεσματικότητα του υβριδισμού θα πρέπει να αναφερθεί ότι η ισχύς του υβριδισμού στον ISH εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες όπως το μήκος του ανιχνευτή, η θερμοκρασία, το PH, η συγκέντρωση του αποδιατακτικού (denaturant) (π.χ. φορμαμίδιο), η συγκέντρωση του άλατος στο ρυθμιστικό διάλυμα του υβριδισμού και ο



Εικόνα 1. Αντισυνθετικός RNA ανιχνευτής με σεσημασμένη ουρακίλη έναντι του mRNA στόχου (* παριστά σήμανση του ανιχνευτή)

[Από Höffler H and Müller J. Verh Dtsch Ges Path 1994]

βαθμός της ομολογίας του ανιχνευτή προς το στόχο.

Στον πίνακα 1 αναφέρονται τα βασικά διαδοχικά στάδια κατά την εφαρμογή ενός κλασσικού πρωτοκόλλου ISH σε τομές παραφίνης καθώς και ο σκοπός του κάθε σταδίου.

III. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ISH

ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ

Βασικά αίτια μη ειδικής αντίδρασης στον ISH αποτελούν: 1) η ομολογία του ανιχνευτή με Αλληλουχίες άλλες εκτός του προς ανιχνευση στόχου, 2) μη ειδική σύνδεση του ανιχνευτή προς το ριβοσωμικό RNA (που αποτελεί το 90% του ολικού κυτταρικού RNA), 3) ποικιλίες όσον αφορά το μήκος και τον τύπο του ανιχνευτή, 4) συνθήκες μειωμένης αυτηρότητας (low stringency) κατά τον υβριδισμό και 5) μη ειδικές αντιδράσεις στο σύστημα αναγνώρισης όπως η ενδογενής βιοτίνη όταν χρησιμοποιούνται βιοτινιλιωμένοι ανιχνευτές.

ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ

Ένα από τα Βασικά πλεονεκτήματα του ISH είναι ο υψηλός βαθμός ευαισθησίας που δυνατόν να επιτευχθεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Μερικά από τα προβλήματα μειωμένης ευαισθησίας στον ISH δυνατόν να προκύψουν λόγω: 1) ακατάλληλης επεξεργασίας των ιστών με αποτέλεσμα είτε απώλεια των mRNA στόχων είτε έντονης διασταυρούμενης αντίδρασης από το μονιμοποιητικό υγρό με αποτέλεσμα δυσχέρεια προσπέλασης του στόχου από τον ανιχνευτή, και 2) προβλημάτων στη δομή και σήμανση του ανιχνευτή.

MARTYRES

Εκ των ων ουκ άνευ παραμέτρους στην επιτυχία του ISH αποτελούν οι επαρκείς μάρτυρες, μέσω των οποίων θα επιβεβαιωθεί, ότι τα ανιχνευόμενα σήματα παριστούν όντως υβρίδια ανιχνευτών/στόχων. Οι εκάστοτε χρησιμοποιημένοι μάρτυρες εξαρτώνται από τον ανιχνευτή όσο και το πυρηνικό οξύ στόχο.

Στον πίνακα 2 αναφέρονται οι Βασικότεροι κατά περίπτωση μάρτυρες στο ISH.

Πίνακας 1.

Στάδια ISH	Σκοπός
• Εμβάπτιση κενών αντικειμενοφόρων πλακών σε οργανοσιλάνιο	↔ Παρεμπόδιση αποκόλλησης ιστολογικής τομής
• Επεξεργασία ιστού - Μονιμοποίηση σε 10% ρυθμ. διάλυμα φορμόλης (pH 7.0) - Επεξεργασία ιστολογικών τομών με πρωτεάσες	↔ Διατήρηση ικανοποιητικής μορφολογίας. ↔ Επίτευξη υβριδισμού ικανοποιητικής ισχύος ↔ Αύξηση της προσπελασιμότητας του στόχου από τον ανιχνευτή
• Ετοιμασία μίγματος σεσημασμένου ανιχνευτού και αποδιατακτού	
• Εφαρμογή του μίγματος ανιχνευτού /αποδιατακτού στην ιστολογική τομή σε θερμοκρασία 95-100°C	↔ Αποδιάταξη στόχου και ανιχνευτού DNA/RNA
• Τοποθέτηση ιστολογικών τομών σε 37°C επί 2 ώρες	↔ Υβριδισμός στόχου/ανιχνευτού
• Πλύσιμο τομών μετά υβριδοποίηση με 2,5% αντιορό αλβουμίνης βοοειδούς	↔ Μείωση μη ειδικής αντίδρασης ανιχνευτή προς άλλα εκτός του στόχου μόρια DNA, RNA, πρωτεΐνες
• Εφαρμογή συστήματος αναγνώρισης ■ για βιοτίνη: σύμπλοκο στρεπταβιδίνης /αλκαλικής φωσφατάσης ■ για δινοξινένινη: σύμπλοκο αντιδιγοξινένινης /αλκαλικής φωσφατάσης - Αντίχρωση με nuclear fast red - Κάλυψη ιστολογικών τομών - Μικροσκόπηση	↔ Ανίχνευση σήματος υβριδισμού στο φωτομικροσκόπιο

(Από Nuovo G., 1994)

Πίνακας 2. Μάρτυρες στον ISH

- Κυτταρικές σειρές (θετικοί και αρνητικοί μάρτυρες)
- Υβριδισμός κατά Southern και Northern Blot
- Συνδυασμός ISH και ανοσοϊστοχημείας
- Υβριδισμός με διαφορετικούς ανιχνευτές συμπληρωματικής αλληλουχίας προς το ίδιο DNA ή RNA στόχο.
- Προϋβριδισμός του ανιχνευτού με cDNA ή cRNA.
- Υβριδισμός με μη ομόλογους ανιχνευτές με όμοιο μήκος.
- Προεπεξεργασία του ιστού με RNAάση και DNAάση.

[Από Höffler H. and Müller J. Verh Dtsch Ges Path 1994]

IV. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ISH ΣΤΗΝ ΑΙΜΟΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΑ (Πίνακας 3)**A. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΙΩΝ**

Την "κλασική" μεθοδολογία στην ανίχνευση ιογενών λοιμώξεων αποτελεί κατά κανόνα η ανοσολογική μελέτη της έκφρασης των ιογών αντιγόνων είτε στον ορό είτε στον ιστό (ανοσοϊστοχημικά) με αντισώματα έναντι των δομικών ιογών πρωτεϊνών. Εντούτοις οι "κλασικές" αυτές ανοσολογικές μέθοδοι αδυνατούν ν' ανιχνεύσουν ιογενή λοίμωξη επί: 1) μη παραγωγικών ή ελάχιστα παραγωγικών ιογών λοιμώξεων και 2) ανοσοκαταστολής. Ο ISH με την απευθείας ανίχνευση ιογενούς DNA, ανεξαρτήτως του ρυθμού μεταγραφής ή και πρωτεϊνικής του έκφρασης, υπερέχει αναμφίβολα

Πίνακας 3. Εφαρμογές του ISH στην Αιμοπαθολογοανατομία

- Ανίχνευση ιών με δυναμικότητα αιτιοπαθογενετικής συσχέτισης προς αιματολογικές κακοήθειες (EBV, HHV-6, HHV-8, HTLV-1).
- Κυτταρογενετική αιματολογικών κακοηθειών (FISH)
- Ανίχνευση γονιδίων και προϊόντων έκφρασης γονιδίων (mRNA)
 - Ταξινόμηση Οξείων Λευχαιμιών
 - Ανίχνευση mRNA μυελοϋπεροξειδάσης
 - Καθορισμός Κυτταρικής Προέλευσης και Κλωνικότητας
 - κ/λ ελαφρές άλυστοι ανοσοσφαιρινών
 - β-άλυσος του T- κυτταρικού υποδοχέα
 - Έκφραση Ογκογονιδίων
 - ras, bcl-2, myc
 - Έκφραση κυττοκινών

των ανοσολογικών/ανοσοϊστοχημικών μεθόδων στη μελέτη των ιώσεων, εφόσον παρέχει τη δυνατότητα ανίχνευσης πρώιμης ή λανθάνουσας ιογενούς λοίμωξης με υψηλό βαθμό ευαισθησίας και ειδικότητας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ανίχνευση του HIV-I σε ένα πολύ μικρό ποσοστό μονοκυττάρων του περιφερικού αίματος σε ασθενείς οροαρνητικούς κατά τη φάση διενέργειας της μελέτης. Μείζον πλεονέκτημα του ISH σήμερα, αποτελεί η δυνατότητα εφαρμογής του σε ιστολογικές τομές, νωπού ή μονιμοποιημένου ιστού με μη ραδιοϊσοτοπικά συστήματα ανίχνευσης και αναγνώρισης, τα οποία κυκλοφορούν πλέον ευρέα. Εξάλλου ο ISH, πάντα με την έννοια της δυνατότητάς της απευθείας ανίχνευσης της ιογενούς λοίμωξης, είτε σε επίπεδο DNA ή RNA, θεωρείται αδιαμφισβήτητης σπουδαιότητας στη μελέτη των ιώσεων εφόσον επιτρέπει:

1. Τη σύγκριση και ταξινόμηση των ιών σε τύπους, υποτύπους και ομάδες. Η δυνατότητα αυτή συμβάλλει ουσιαστικά στην απάντηση επιδημιολογικής φύσεως ερωτημάτων.
2. Την ανάλυση του τρόπου μόλυνσης και τροπισμού σε επίπεδο μεμονωμένου κυττάρου είτε ανεξαρτήτως είτε σε συνδυασμό με την ανοσοϊστοχημεία. Μερικά μόνο παραδείγματα των πλεονεκτημάτων της συγκεκριμένης μεθοδολογίας αποτελούν η ανίχνευση: α) του HIV-I στα δενδριτικά δικτυοκύτταρα των βλαστικών κέντρων των λεμφοζιδίων, τα κύτταρα Langerhans του δέρματος, καθώς και τα μεγακαρυοκύτταρα και CD4⁺ λεμφοκύτταρα στον μυελό HIV-1⁺ ασθενών και β) του ανδρώπειου ερπητοϊού 6 (HHV-6) στα T-, B- λεμφοκύτταρα, τα μεγακαρυοκύτταρα και επιθηλιακά κύτταρα.
3. Την ταυτοποίηση και κυτταρική εντόπιση περισσότερων της μιας ιογών λοιμώξεων, όπως η σύγχρονη ανίχνευση του νέου ανδρώπειου ερπητοϊού 8 [Human Herpes Virus 8 (HHV-8)], και του EBV στα λεμφωματώδη κύτταρα του λεμφώματος των κοιλότητων του σώματος [Body Cavity Based Lymphoma (BCBL)].
4. Την ανίχνευση ιογενούς λοίμωξης σε κακοήδεις όγκους. Από ετών ήδη έχει επιχειρηθεί η αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ των λεμφοτρόπων ιών, συμπεριλαμβανομένων του EBV, του HHV-6 και του HTLV-1 και ορισμένων τύπων λεμφοϋπερπλαστικών εξεργασιών. Ειδικότερα όσον αφορά τον EBV,

οι μελέτες με ISH συνέβαλαν καθοριστικά στην τεκμηρίωση της εντόπισής του στα νεοπλασματικά και μη κυτταρικά στοιχεία διαφόρων ομάδων κακοήδων λεμφουπερπλαστικών εξεργασιών. Είναι γεγονός, ότι κατά καιρούς, επιδημιολογικές, ορολογικές και μοριακές μελέτες (Southern blot, PCR) είχαν επισημάνει τη συσχέτιση μεταξύ EBV και ορισμένων τύπων κακοήδων λεμφουπερπλαστικών εξεργασιών όπως το λέμφωμα Burkitt και η νόσος του Hodgkin. Παρέμενε εντούτοις αδιευκρίνιστο ποιος κυτταρικός πληθυσμός αποτελούσε τον ξενιστή του EBV. Ο ISH επέτρεψε για πρώτη φορά την άμεση ανίχνευση του DNA του EBV στα λεμφωματώδη κύτταρα του λεμφώματος Burkitt καθώς και τα Reed-Sternberg, τα Hodgkin κύτταρα και τα μικρά λεμφοκύτταρα της νόσου του Hodgkin, στους ιστολογικούς υποτύπους της μικτής κυτταροβρίδειας και της οζώδους σκλήρυνσης. Εξάλλου τα αποτελέσματα μεταγενέστερων μελετών με τη μεθοδολογία του RNA-ISH έναντι μικρών μη μεταγραφόμενων RNAs (EBER-I) επιβεβαίωσαν την ύπαρξη του EBV, εκτός του λεμφώματος Burkitt και της νόσου του Hodgkin, στα νεοπλασματικά κύτταρα και άλλων ομάδων λεμφουπερπλαστικών εξεργασιών όπως το Ki-1 αναπλαστικό λέμφωμα από μεγάλα λεμφοκύτταρα, το αγγειο-ανοσοβλαστικού τύπου περιφερικό T-λέμφωμα, η λευχαιμία από τριχωτά λεμφοκύτταρα και τα RS-like κύτταρα ορισμένων τύπων μη Hodgkin λεμφωμάτων, μεταξύ των οποίων και το διάχυτο B-λέμφωμα από μικρά λεμφοκύτταρα.

Η ανίχνευση του EBV στα νεοπλασματικά κύτταρα των κακοήδων λεμφουπερπλαστικών εξεργασιών, χωρίς να τεκμηριώνει, ενισχύει την άποψη της αιτιολογικής συσχέτισης του EBV στην παθογένεση των συγκεκριμένων λεμφουπερπλαστικών εξεργασιών.

Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ένα νέο μέλος της ομάδας των ερπητοϊών, φερόμενο ως Ανθρώπιος Ερπητοϊός 8 [Human Herpes Virus 8 (HHV-8)]. Μελέτες με ISH και ISH-PCR έδειξαν ότι ο HHV-8 ανιχνεύεται σε ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις στα νεοπλασματικά κύτταρα του συνόλου των σαρκωμάτων Karosi καθώς του σπάνιου τύπου λεμφώματος, το οποίο φέρεται ως λέμφωμα των κοιλοτήτων του σώματος [Body Cavity Based Lymphoma (BCBL)] και παρατηρείται με αυξημένη συχνότητα στους

HIV-1⁺ ασθενείς. Επί τη βάση των δεδομένων αυτών εκφράζεται η άποψη της στενής αιτιοπαθογενετικής συσχέτισης μεταξύ HHV-8 αφενός και του σαρκώματος Karosi όσο και του BCBL αφετέρου.

B. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΑΝΩΜΑΛΙΩΝ

Η ανίχνευση χρωμοσωμικών ανωμαλιών (μεταθέσεων, πολλαπλασιασμών και ελλείψεων τμημάτων χρωμοσωμάτων) με τη χρησιμοποίηση ISH και ειδικών χρωμοσωμικών ανιχνευτών αποτελεί σήμερα μια από τις πλέον ευρέα διαδεδομένες εφαρμογές του ISH. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία (σε αντίθεση με την κλασική κυτταρογενετική) επιτρέπει τη μελέτη των χρωμοσωμάτων τόσο κατά τη μετάφαση όσο και κατά την ενδιάμεση φάση (interphase) και φέρεται στη βιβλιογραφία ως κυτταρογενετική ενδιάμεσης φάσης (Interphase Cytogenetics) - Χρωμοσωμικός ISH (Chromosomal ISH (CISH)/ Fluorescent ISH (FISH)).

Με την FISH είναι δυνατή η μελέτη αριθμητικών όσο και δομικών χρωμοσωμικών ανωμαλιών στο σύνολο σχεδόν των μελετώμενων κυττάρων. Παράλληλα η FISH δυνατόν να χρησιμοποιηθεί σε ιστολογικές τομές παραφίνης η κυτταρολογικά παρασκευάσματα με αποτέλεσμα δυνατότητα άμεσης συσχέτισης της χρωμοσωμικής ανωμαλίας προς την αρχιτεκτονική, μορφολογία και σε συνδυασμό με ανοσοϊστοχημεία, και τον ανοσοφαινότυπο. Χαρακτηριστικά παραδείγματα συνδυασμού FISH και ανοσοϊστοχημείας σε τομές παραφίνης αποτελούν 1) η ανίχνευση τρισωμίας 3 α) στο 30% του συνόλου των μελετηθέντων γαστρικών, χαμηλής κακοήθειας λεμφωμάτων τύπου MALT σε ορισμένες μελέτες και β) σε μικρότερο συγκριτικά ποσοστό περιφερικών T-λεμφωμάτων του τύπου κατεξοχή της αγγειοανοσοβλαστικής λεμφαδενοπάθειας, 2) η παρουσία αυξημένων αντιγράφων του χρωμοσώματος 7 στα υψηλής κακοήθειας περιφερικά T-λεμφώματα και 3) η ανίχνευση της μετάθεσης bcr-abl στο 50% σχεδόν των ασθενών με χρόνια μυελογενή λευχαιμία (μικτού κοκκιο-μεγακαρυοκυτταρικού υποτύπου), τόσο στα κυτταρικά στοιχεία της μυελικής όσο και μεγακαρυοκυτταρικής σειράς σε τομές παραφίνης οστεομυελικής βιοψίας.

Γ. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΜΕ ISH ENANTI ΤΟΥ mRNA

Η ανίχνευση της έκφρασης των γονιδίων είτε σε επίπεδο mRNA είτε πρωτεΐνης είναι αποφασιστικής σημασίας στην περαιτέρω ταυτοποίηση των φυσιολογικών όσο και νεοπλασματικών κυτταρικών πληθυσμών. Η ανίχνευση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται συνήθως με τη χρησιμοποίηση ειδικών αντισωμάτων έναντι των προς ανίχνευση πρωτεϊνών. Εν τούτοις, παρά την ύπαρξη ενός καθημερινά διευρυνόμενου φάσματος ειδικών (μονοκλωνικών) αντισωμάτων και τη χρησιμοποίηση ευαίσθητων ανοσοϊστοχημικών τεχνικών, η ανοσοϊστοχημεία αδυνατεί να ταυτοποιήσει με απόλυτη ασφάλεια το κύτταρο, στο οποίο συντίθεται η ανοσοϊστοχημικά ανιχνευόμενη πρωτεΐνη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ό,τι ένα ανιχνευόμενο πεπτιδίο δυνατόν να συντίθεται σε άλλο κύτταρο και να προσλαμβάνεται μέσω πινοκύττωσης ή ενδοκύττωσης από άλλο κύτταρο, στο οποίο και δυνατόν να ανιχνεύεται ανοσοϊστοχημικά. Εξάλλου ο βαθμός ανοσοδραστικότητας ενός πεπτιδίου επηρεάζεται από το ρυθμό σύνδεσης, αποδόμησης ή και εκκρίσής του. Έτσι κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν αυξημένο ρυθμό σύνδεσης ενός πεπτιδίου δυνατόν στον ανοσοϊστοχημικό έλεγχο να είναι αρνητικά για το συγκεκριμένο πεπτιδίο, λόγω της ταχείας αποδόμησης ή και εκκρίσής του. Τέλος μη ειδική, διασταυρούμενη ανοσοαντίδραση, λόγω μερικής ομολογίας αλληλουχιών των πολυκλωνικών όσο και των μονοκλωνικών αντισωμάτων, δυνατόν να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Χαρακτηριστικά αναφέρεται η διασταυρούμενη ανοσοαντίδραση αντισωμάτων έναντι των πρωτεϊνών του κυτταροσκελετού προς προϊόντα έκφρασης ογκογονιδίων και ιών. Εξάλλου τα αθροισμένα πλέον βιβλιογραφικά δεδομένα, επισημαίνουν τον υψηλό βαθμό διασταυρούμενης ανοσοαντίδρασης μεταξύ των αντισωμάτων έναντι των προϊόντων έκφρασης των ογκογονιδίων. Επί τη βάση των δεδομένων αυτών είναι πλέον προφανές, ότι η ανοσοϊστοχημική ανίχνευση των προϊόντων έκφρασης ορισμένων ογκογονιδίων ή αυξητικών παραγόντων και σπανιότερα των γόνων των ανοσοσφαιρινών είναι προβληματική ή και αδύνατη.

Στους περιορισμούς αυτούς της ανοσοϊστοχημείας, ο ISH αποτελεί σημαντική εναλλακτική λύση, εφόσον επιτρέπει την ταυτοποίηση ενός κυτταρικού πληθυσμού, επί τη βάσει της

ποσοτικής ανίχνευσης των ειδικών mRNAs, τα οποία κωδικοποιούν για τα προς ανίχνευση προϊόντα. Με τη μεθοδολογία αυτή είναι παράλληλα δυνατή η εκτίμηση του ενεργητικού ρυθμού μεταγραφής ενός ειδικού γονιδίου.

Κατόπιν αυτών ο RNA ISH είτε ανεξάρτητα, είτε σε συνδυασμό με την ανοσοϊστοχημεία, χρησιμοποιείται με ολοένα αυξανόμενη συχνότητα στον χώρο της αιμοπαθολογοανατομίας. Βασικές εφαρμογές του αποτελούν η επιβεβαίωση κυτταρικής προέλευσης και κλωνικότητας στις λεμφοϋπερπλαστικές συνήθως εξεργασίες καθώς και η ανίχνευση της έκφρασης των ογκογονιδίων και αυξητικών παραγόντων (κυττοκινών).

1. Ταυτοποίηση κυτταρικής προέλευσης και κλωνικότητας

Είναι πλέον γεγονός, ότι η μονοκλωνικότητα δεν αποτελεί έννοια ταυτόσημη της κακοήθειας. Παρ' όλα αυτά η κατάδειξη της μονοκλωνικής φύσης μιας λεμφοκυτταρικής διήθησης αποτελεί ουσιαστική παράμετρο κατά τη διαγνωστική αξιολόγηση των λεμφοϋπερπλαστικών εξεργασιών.

Κλασσικά χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες στην κατάδειξη κλωνικότητας αποτελούν: 1) η κυτταρομετρία ροής και η ανοσοϊστοχημική μελέτη τομών κρουστάτου στις Β-λεμφοϋπερπλαστικές εξεργασίες με στόχο την ανίχνευση περιορισμού ελαφρών αλύσεων σε επίπεδο ανοσοσφαιρίνης επιφανείας (SIg) και 2) η κατά Southern blot και PCR ανάλυση για την ανίχνευση κλωνικότητας στις Β- και Τ- λεμφοϋπερπλαστικές εξεργασίες με την έννοια ανίχνευσης κλωνικών ανασυνδυασμών των γόνων των ανοσοσφαιρινών (Ig) και του Τ-κυτταρικού υποδοχέα (TCR) αντίστοιχα. Εντούτοις οι συγκεκριμένες μεθοδολογίες παρουσιάζουν μειονεκτήματα όπως: 1) αναγκαιότητα μελέτης νωπού ή κατεψυγμένου ιστού, 2) περιορισμένη ειδικότητα και ευαισθησία καθώς και ανάγκη ύπαρξης μεγάλης ποσότητας ιστού στην κατά Southern και Northern blot ανάλυση και 3) αδυναμία αξιολόγησης, σε ορισμένες περιπτώσεις, των ανοσοϊστοχημικών ευρημάτων σε τομές κρουστάτου είτε λόγω της εξωκυττάριας ανοσοσφαιρίνης είτε μη ειδικής προσρόφησης από άλλα, εκτός των Β-λεμφοκυττάρων, κυτταρικά στοιχεία.

Ο ISH, και ειδικότερα ο μη ισοτοπικός ISH (Non isotopic *in situ* hybridization (NISH)) με

διγοξινική ως μόριο σήμανσης του ανιχνευτού, παρακάμπτοντας τους παραπάνω περιορισμούς συμβάλλει καθοριστικά στην ταυτοποίηση Β- και Τ- κλωνικότητας με την έννοια ανίχνευσης του mRNA των ελαφρών αλύσεων και του Τ-κυτταρικού υποδοχέα αντίστοιχα. Το σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθοδολογίας, είναι ότι δυνατόν να εφαρμοσθεί με επιτυχία και σε τομές παραφίνης. Η αξία της ανίχνευσης με RNA ISH του mRNA των ελαφρών αλύσεων των ανοσοσφαιρινών είναι αδιαμφισβήτητη, εφόσον επιτρέπει την τεκμηρίωση κλωνικότητας α) σε μη εκκριτικά (non secreting) ή και μη παραγωγικά (non-producing) μυελώματα και β) σε άλλες Β-λεμφοϋπερπλαστικές εξεργασίες αρνητικές για ανοσοσφαιρίνη επιφανείας ή κυτταροπλάσματος όπως το σκληρυντικό λέμφωμα του μεσοθωρακίου από μεγάλα διαυγή κύτταρα, ή ανοσοϋπερπλαστική νόσος του λεπτού εντέρου (IPSID), καθώς και ορισμένοι τύποι οζώδων ή άλλων Β-λεμφομμάτων. Με την τροποποίηση της μεθοδολογίας του RNA ISH, για την ανίχνευση του mRNA των ελαφρών αλύσεων των ανοσοσφαιρινών, με τη χρησιμοποίηση μικροκυμάτων, έγινε για πρώτη φορά δυνατή, σχετικά πρόσφατα, η επιβεβαίωση τόσο της Β-κυτταρικής προέλευσης όσο και κλωνικότητας των L and H κυτάρων του οζώδους λεμφοεπικρατούντος τύπου της νόσου του Hodgkin. Πιο συγκεκριμένα με τη συγκεκριμένη μεθοδολογία ανιχνεύθηκε mRNA των ελαφρών αλύσεων των ανοσοσφαιρινών (κ ή λ) στα L and H κύτταρα σε ποσοστό 60% των μελετηθέντων περιστατικών οζώδους λεμφοεπικρατούντος υποτύπου.

Η επιβεβαίωση Τ-κλωνικότητας με RNA μη ισοτοπικό ISH σε τομές παραφίνης περιγράφηκε πολύ πρόσφατα. Η μεθοδολογία αυτή, επιτρέποντας την ανίχνευση του mRNA του Tcrβ, με τη χρησιμοποίηση ειδικών κλωνικών ανιχνευτών σεσημασμένων με διγοξινική αποτελεί αδιαμφισβήτητο απόκτημα στο χώρο των λεμφοϋπερπλαστικών εξεργασιών. Η αξία της συγκεκριμένης μεθόδου γίνεται προφανής, αν ληφθεί υπόψη, ότι προκειμένου για την Τ-κυτταρική σειρά, δεν υφίσταται ανοσοϊστοχημικός δείκτης κλωνικότητας, όπως ο περιορισμός των ελαφρών αλύσεων στη Β-κυτταρική σειρά.

2. Ανίχνευση έκφρασης ογκογονιδίων

Ο ρόλος των ογκογονιδίων στην ογκογένε-

ση είναι πλέον αδιαμφισβήτητος. Μελέτες των μη Hodgkin λεμφωμάτων με RNA ISH όσον αφορά την έκφραση των πρωτοογκογονιδίων fos, c-myc, myb, Ki-ras, Ha-ras και N-ras έδειξαν συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του Ki-ras και των υψηλής κακοηθείας περιφερικών Τ-λεμφομμάτων. Άλλες εξάλλου μελέτες με RNA ISH όσον αφορά στην έκφραση του mRNA του bcl-2 ογκογονιδίου σε φυσιολογικούς λεμφαδένες και οζώδη λεμφώματα κατέδειξαν την υψηλότερη έκφρασή του αντίστοιχα προς τα βλαστικά κέντρα των αντιδραστικών λεμφοζιδίων. Το εύρημα αυτό αποκτά ιδιαίτερη αξία, αν ληφθεί υπόψη, ότι τα βλαστικά κέντρα των αντιδραστικών λεμφοζιδίων χαρακτηρίζονται από απουσία έκφρασης της bcl-2 πρωτεΐνης.

3. Ανίχνευση έκφρασης αυξητικών παραγόντων

Οι κυττοκίνες αποτελούν διαλυτούς διαμεσολαβητές με καθοριστικό ρόλο στην κυτταρική επικοινωνία και τη φυσιολογική ανοσολογική απάντηση. Μεταξύ των ποικίλων βιολογικών ιδιοτήτων των, οι κυττοκίνες θεωρούνται βασικοί παράγοντες στην έναρξη του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, τη διαφοροποίηση και ενεργοποίηση των αιμοποιητικών κυτταρικών στοιχείων. Επί τη βάση των δεδομένων αυτών είναι προφανές, ότι η μελέτη της παραγωγής και έκφρασης των κυττοκινών in situ από τα νεοπλασματικά όσο και αντιδραστικά κυτταρικά στοιχεία δυνατόν να συμβάλλει 1) στην περαιτέρω ταξινόμηση των λεμφοϋπερπλαστικών εξεργασιών και 2) να αποτελέσει τη βάση για δυναμικές θεραπευτικές παρεμβάσεις όπως με τα μονοκλωνικά αντισώματα και τα αντι-συνδεδικά ολιγονουκλεοτίδια.

Τη μεθοδολογία εκλογής στη μελέτη της έκφρασης των κυττοκινών, αποτελεί ο RNA ISH, για τους λόγους που αναλυτικά εκτέθηκαν στην εισαγωγή του κεφαλαίου της έκφρασης γονιδίων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα της συμβολής της συγκεκριμένης μεθοδολογίας στον χώρο των λεμφοϋπερπλαστικών εξεργασιών αποτελούν: 1) Η ανίχνευση ιντερλευκινών (IL), όπως της IL-1a, IL-5, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9 και TNF τόσο στα νεοπλασματικά όσο και τα μικρά λεμφοκύτταρα της νόσου του Hodgkin. Πιο συγκεκριμένα η παρουσία της IL-5 στα R-S κύτταρα, στην πλειονότητα των περιπτώσεων μικτής κυτταροβρίδειας και οζώδους σκλήρυνσης, συνδέεται προς την ηωσινοφιλία, η οποία χαρακτηριστικά συνοδεύει τους συγκεκριμένους υποτύπους της νόσου του

Hodgkin. Εξάλλου η έκφραση TGF- β στα ηωσινόφιλα λευκοκύτταρα της οξείας σκλήρυνσης συνδέεται με τη σκλήρυνση, η οποία χαρακτηρίζει τον συγκεκριμένο υπότυπο. Είναι επί του προκειμένου γνωστή η δράση της συγκεκριμένης κυττοκίνης ως παράγοντος υποβοηθούντος τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών και τη σύνδεση κολλαγόνου.

Προς το παρόν τουλάχιστον η σημασία της εκλεκτικής έκφρασης των κυττοκινών στη νόσο του Hodgkin, είναι άγνωστη. Εντούτοις αρκετές από αυτές δυνατόν να συνδέονται και να εξηγούν τόσο τα μορφολογικά όσο και τα κλινικά γνωρίσματα της νόσου.

Όσον αφορά στα μη Hodgkin λεμφώματα μεταξύ των τύπων οι οποίοι έχουν κατά καιρούς συνδεθεί με δράση κυττοκινών, αναφέρονται τα περιφερικά T-λεμφώματα, το κεντροβλαστικό-κεντροκυτταρικό λέμφωμα και το αναπλαστικό Ki-1 λέμφωμα από μεγάλα λεμφοκύτταρα.

V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η ανίχνευση και εντόπιση ειδικών αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων στα κύτταρα μέσω του ISH αποτελεί τη γέφυρα μεταξύ της μοντέρνας μοριακής βιολογίας αφενός και της παραδοσιακής "καθαρά μορφολογικής" παθολογικής ανατομικής αφετέρου. Βασική προϋπόθεση για την επιτυχία του ISH αποτελεί η επιλογή του καταλληλότερου κατά περίπτωση τύπου ανιχνευτού, τρόπου σήμανσης και συστήματος αναγνώρισης. Έτσι η ιστοπική σήμανση θεωρείται ότι αποτελεί ακόμη τη μεθοδολογία εκλογής στην ανίχνευση μικρού αριθμού αντιγράφων mRNA. Για την ανίχνευση αντίθετα DNA ή μεγάλου αριθμού αντιγράφων mRNA χρησιμοποιούνται με ικανοποιητικά αποτελέσματα μη ιστοπικές μέθοδοι.

Ειδικότερα στην αιμοπαθολογοανατομία, ο ISH έχει τύχει ευρείας εφαρμογής στη μελέτη: α) ιογενών αλληλουχιών, και β) χρωμοσωμικών ανωμαλιών. Άλλες εφαρμογές του, όπως η ανίχνευση προϊόντων έκφρασης κυτταρικών γονιδίων, δεν χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα, λόγω της σχετικά μειωμένης ευαισθησίας της μεθόδου, που οφείλεται στην παρουσία μικρού αριθμού αντιγράφων mRNA. Στις περιπτώσεις αυτές σημαντική εναλλακτική λύση αποτελεί ο πολλαπλασιασμός αρχικά του προς ανίχνευση στόχου, μέσω PCR και εν συνεχεία ISH με τον κατάλληλο ανιχνευτή στα

πλαίσια PCR *in situ* υβριδισμού (PCR *in situ* Hybridization). Θα πρέπει εντούτοις να σημειωθεί ότι παρά τα αδιαμφισβήτητα πλεονεκτήματά της, η συγκεκριμένη μεθοδολογία, προς το παρόν τουλάχιστον δεν έχει τύχει ευρείας εφαρμογής, λόγω τεχνικής καθαρά φύσεως προβλημάτων.

Εξάλλου, η μεθοδολογία του συνδυασμού ISH και ανοσοϊστοχημείας αυξάνει σημαντικά την ευαισθησία της μεθόδου, εφόσον επιτρέπει την αναγνώριση και κυτταρική εντόπιση ειδικών DNA ή RNA στόχων μέσα από ένα ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό.

Η συνδυασμένη χρησιμοποίηση του ISH προς άλλες μοριακές, ανοσοϊστοχημικές και κυτταρογενετικές τεχνικές και η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των, πάντα στα πλαίσια της "κλασσικής μορφολογίας", συμβάλλει ουσιαστικά στη διάγνωση, θεραπευτική αντιμετώπιση και κατανόηση της αιτιοπαθογένειας των νόσων του αιμοποιητικού ιστού. Η αλματώδης πρόοδος της τεχνολογίας, με τη διαφοροποίηση των μοριακών τεχνικών αφενός και την εισαγωγή ενός συνεχώς διευρυνόμενου φάσματος κλωνοποιημένων αλληλουχιών αφετέρου, αποτελεί εγγύηση, ότι ο ISH θα αποτελέσει στο μέλλον μεθοδολογία ρουτίνας με ευρύ φάσμα εφαρμογών στη διαγνωστική και ερευνητική αιμοπαθολογοανατομία. Επί τη βάση των τελευταίων αυτών δεδομένων, είναι προφανής η υποχρέωση του παθολογοανατόμου του σήμερα να μεριμνήσει για τη δημιουργία τράπεζας ιστών, είτε με την έννοια κατεψυγμένου υλικού είτε κύβων παραφίνης, οι οποίοι δυνατόν να αποτελέσουν το αντικείμενο μελλοντικών μοριακών ή άλλων μελετών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Nuovo GJ (Ed). PCR *in situ* Hybridization Protocols and Applications. Raven Press, New York 1994.
2. Ewig M (a.G), Nolte M (a.G), Werner M, et al. FISH plus Immunohistochemie von Paraffineingebetten Knochenmarkbiopsien: Nachweis und Charakterisierung Ph⁺ - positiver zellen. *Verh Dtsch Ges Path* 79: 349, 1955.
3. O'Leary JJ, Chetty R, Graham AK and McGee O'D. *In Situ* PCR: Pathologist's Dream or Nightmare? *J Path* 178: 11-20, 1996.
4. Carbone A, Gloghini A, Zanette I, et al. Demonstration of Epstein-Barr Viral Genomes by *In Situ* Hybridization in Acquired Immunode-

- iciency Syndrome-Related High Grade and Anaplastic Large Cell CD30⁺ Lymphomas. *Am J Clin Path* 99: 289-297, 1993.
5. Harper SJ, Pringle JH, Gillies A, et al. Simultaneous in situ hybridization of native mRNA and immunoglobulin detection by conventional immunofluorescence in paraffin wax embedded sections. *J Clin* 45: 114-119, 1992.
6. Hodges E, Howell WM, Tyacke SR, et al. Detection of T-cell Receptor δ Chain mRNA in Frozen and Paraffin - Embedded Biopsy Tissue using Digoxigenin-Labelled Oligonucleotide Probes in situ. *J Path* 174: 151-158, 1994.