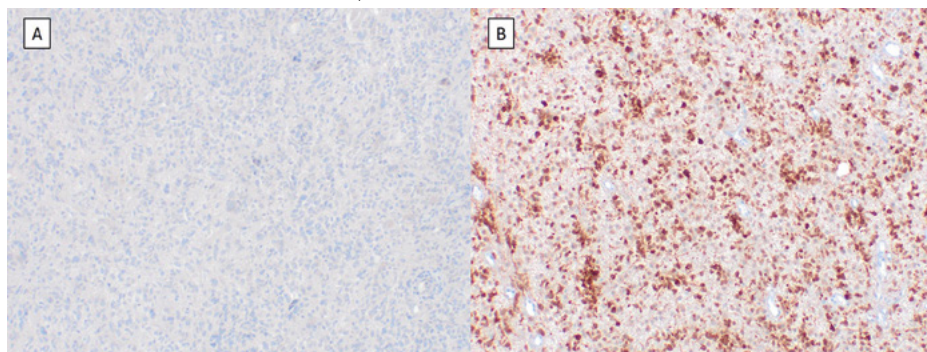
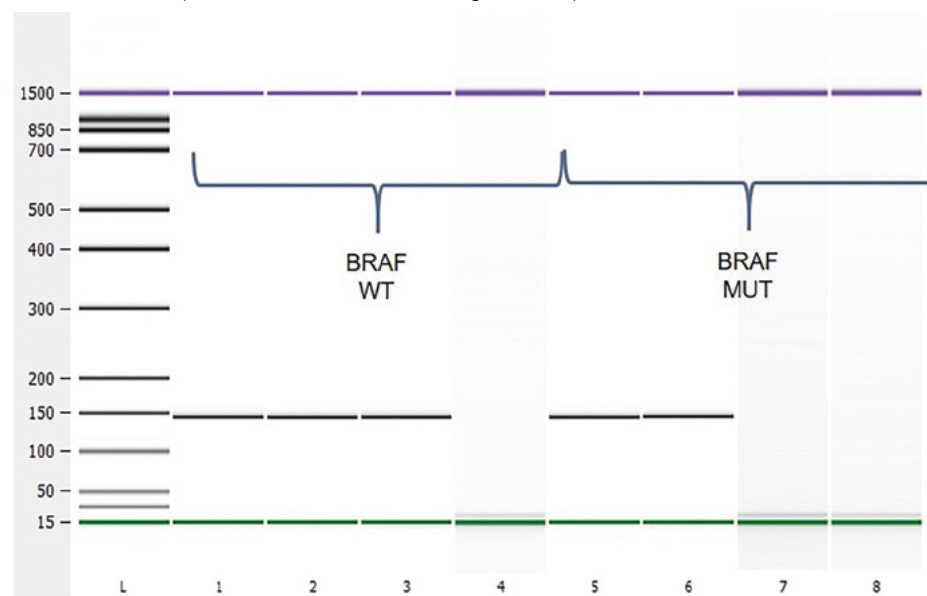


Obr. 1. Imunohistochemická detekce proteinu IDH1 R132H

Negativita (A) imunohistochemického průkazu IDH1 R132H u glioblastomu. Pozitivní (B) imunohistochemický průkaz IDH1 R132H u IDH mutovaného glioblastomu. Původní zvětšení 200x

Obr. 2. Mutačně specifické PCR, detekce mutace v genu BRAF p.V600E

Na obrázku je zobrazen výsledek mutačně specifického PCR pro detekci mutace v genu BRAF, p.V600E (NM_004333.6: c.1799T>A). PCR produkty jsou detekovány pomocí čipové elektroforézy na přístroji 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara). Pro každý vzorek probíhají dvě reakce. Vzorky 1–4 jsou amplifikovány s primery BRAF bez mutace (wild type: wt), slouží jako kontrola amplifikace a kontrola přítomnosti wtBRAF. Vzorek 1: pacient, vzorek 2: pozitivní kontrola BRAF p.V600E, vzorek 3: wt BRAF kontrola, vzorek 4: negativní kontrola (voda). Vzorky 5–8 jsou amplifikovány s mutačně specifickými primery pro mutaci p.V600E. Vzorek 5: pacient – amplifikace s mutačně specifickým primerem znamená přítomnost dané mutace, vzorek 6: pozitivní kontrola mutační, vzorek 7: kontrola wt, vzorek 8: negativní kontrola (voda)

zhodnocení tkáně s imunohistochemickým průkazem molekul ozřejmující histogenezi (např. GFAP jako marker astrocytární diferenciace). Metodu nepřímé imunohistochemie lze využít nejen k detekci dalších důležitých markerů (proliferací index měřený Ki-67, exprese proteinu p53 a podobně), ale i ke stanovení expresního statutu specifického mutovaného proteinu, např. standardizovaná protilátka k detekci mutovaného proteinu IDH1 (izocitrátdehydrogenáza 1) R132H (Anti-Human IDH1 R132H Myší monoklonální protilátka klon H09 (Obr. 1). Výhodou imunohistochemického průkazu je rychlost vyšetření, lokalizace proteinu a cenová/přístrojová nenáročnost. Na základě indi-

kace patologa/onkologa probíhá následně molekulárně-patologické vyšetření, které se liší dle změny, kterou je zapotřebí prokázat, a detekčním limitem jednotlivých metod. Lze využít molekulární vyšetření na úrovni DNA, RNA, případně metylace DNA.

Strategie molekulárního testování:

- analýza genů *IDH*: *IDH1/IDH2* (geny pro izocitrátdehydrogenázu),
- u IDH mutovaných gliomů analýza kódelece 1p/19q,
- u IDH mutovaných bez kódelece mutační analýza v genu *ATRX*, společně s posouzením mutace v genu *TP53*,
- u IDH mutovaných astrocytomů analýza homozygotní delecce *CDKN2A/CDKN2B*,

- u glioblastomů bez mutace v *IDH* vyšetření metylace promotoru *MGMT*,
- vyšetření mutace promotoru genu *TERT* (oligodendrogliomy a glioblastomy bez mutace v *IDH*),
- difúzní gliomy bez *IDH* mutace grade 2–3, vyšetření zisku chromozomu 7 a ztráty chromozomu 10 (+7/-10), amplifikace genu *EGFR* a mutace promotoru *TERT* (určení diagnózy IDHWG GBM, WHO grade 4),
- vyšetření mutace histonu *H3F3A* p. K27 u středočarových gliomů,
- testování mutace histonu *H3F3A* p. G34, genu *MYBL1*, genu *FGFR1* u dětí a mladých dospělých pacientů bez mutace v genu *IDH*,
- testování mutace v genu *BRAF* (cílená terapie),
- průkaz fúzí specifických pro daný subtyp CNS tumoru: *ZFTA:C11orf95*, *KIAA1549:BRF* atd.

(upraveno dle: KDP [online]. Praha: ÚZIS ČR, 2020 [cit. 2023-12-21]. Dostupné z: <https://kdp.uzis.cz>). Více se strategii molekulárního testování nádorů CNS věnuje další článek tohoto čísla (Švajdler et al., 2024).

Před každým molekulárním vyšetřením je nutné určit procentuální zastoupení nádorových buněk ve vzorku biopsie, kterou provede patolog. Úzká spolupráce mezi laboratořmi (molekulárním biologem/genetikem) a vyšetřujícím patologem je stěžejní pro správnou indikaci vyšetření, výběr optimální tkáně a molekulární metodiky. Bez této úzké spolupráce může docházet ke zcela zavádějícím výsledkům (vyšetřování nenádorové tkáně či metastáz extrakraniálních nádorů v mozkové tkáni), které v konečném důsledku mohou vést k závažnému poškození pacienta. Dle 5. revize nádorů CNS je rovněž jedním z indikačních kritérií podrobnějšího molekulárně-patologického vyšetřování věk pacienta. Sice je arbitrárně stanoven věk 55 let, ale nejde jen o absolutní číslo, vždy je třeba vzít v úvahu biologický stav nemocného, jeho klinický stav a perspektivu. Z toho plyne úzká spolupráce s ošetřujícím neuroonkologem v rámci neuroonkologického multidisciplinárního týmu. V případech detekce velkých delecí, kódelecí, amplifikací (celých genů, případně oblastí na chromozomu) využíváme fluorescenční in situ hybridizaci na interfázních jádrech (I-FISH), kdy vyšetřujeme přímo DNA v jádře