

ve formolem fixované a do parafínu zalité (FFPE) tkáni. Typickým příkladem je kodelece oblastí 1p/19q, která je přítomna u oligodendrogliomů. Také je možné hodnotit změny počtu chromozomů, jako např. trizomie chromozomu 7, 10 u glioblastomů bez mutace v genu *IDH1/IDH2*.

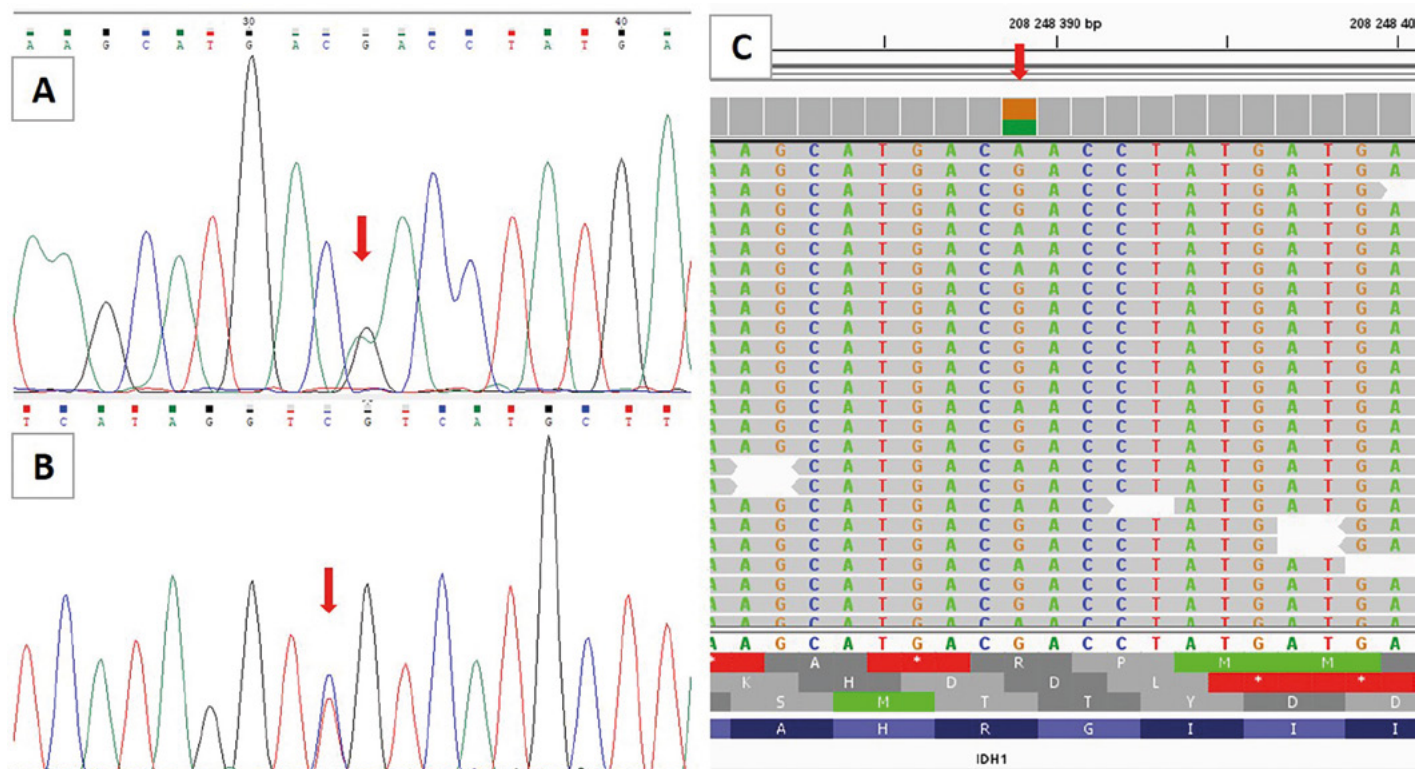
Následné metody využívají analýzu izolátu nukleových kyselin ze tkáni, kdy je nutné v první řadě znát stupeň degradace izolované nukleové kyseliny z fixované tkáně a procentuální zastoupení nádorových buněk. Doporučuje se fixovat tkáň buď zmrazením, nebo fixovat v alkoholu (40 a více procentním) či pufovaném formolu. Pro detekci mutací typu jednonukleotidové záměny či malé delece nebo inserce se využívá metoda mutačně specifického PCR, případně Sangerovo (přímé) sekvenování. Mutačně specifické PCR se využívá k průkazu specifických mutací, např. mutace v genu *BRAF* (p. V600E (NM_004333.6: c.1799 T>A) s citlivostí kolem 1 % (Obr. 2). Sangerovo sekvenování je vhodné pro sekvenování jakéhokoliv genu, nicméně je nutné mít v tkáni přítomno minimálně 15–20 % nádorových

elementů. Sangerovo sekvenování u nádorů CNS využíváme k detekci mutací v genu *IDH1* a *IDH2* (IDH mutované tumory (Obr. 3)) tam, kde je *IDH1* imunohistochemicky negativní, případně je nutné potvrzení interpretace nálezu. Mutace v promotorové oblasti genu *TERT* není tumorově specifická pro astrocytární nádory, můžeme ji detekovat u oligodendrogliomů, glioblastomů a meningiomů. V diagnostice meduloblastomů a určení jejich podtypů napomáhá vyšetření mutace v genu *CTNNB1* (WNT aktivovaný). U pediatrických pacientů se v rámci diagnostiky high-grade gliomů (HGG) specificky vyšetřují mutace v genech kódujících histony H3 (*H3F3A*), mutace p. K27, případně p. G34, vyšetřování dětských nádorů CNS je předmětem jiného článku tohoto speciálního čísla (Koblížek et al., 2024).

Metodika NGS („next generation sequencing“) je stále častěji využívána v rámci testování somatických variant nádorové tkáně. Dnešní metody umožňují testování až celých genomů, z pohledu diagnostiky nádorů je však celogenomové nebo i celoxomové sekvenování nevýhodné. Sekvenování genomů

nebo celých exomů generuje velké množství dat, z nichž velká většina není pro diagnostiku významná. Tak velké množství dat je značně náročné pro následnou analýzu, a především interpretaci nalezených variant, což prodlužuje celý proces. Proto je pro diagnostiku somatických variant dnes nejvíce využíváno cílené sekvenování panelů genů, které jsou spjata s diagnostikou, prognózou a cílenou terapií nádorových onemocnění. Pro samotnou metodiku je důležité mít DNA v dostatečné kvalitě i kvantitě, což může být někdy problematické u FFPE vzorků. Kvalita i kvantita DNA se ověřuje hned několikrát během procesu přípravy vzorku. Pro samotnou interpretaci nalezených variant se uplatňuje několik kritérií, kdy se v potaz berou varianty jen s dostatečným počtem sekvenačního čtení, které danou variantu obsahují, a dostatečné celkové procentuální zastoupení dané varianty (nejčastěji se toto rozmezí pohybuje od 100 do 300 čtení a minimálně 3–5 % pro každou variantu). Nicméně metodika NGS umožní nejen detekci variant, ale dává i informaci o alelové frekvenci dané varianty. Metodou

Obr. 3. Sangerovo sekvenování a NGS, detekce mutace v genu *IDH1* p.R132H



Obrázky A–C zobrazují detekci mutace v genu *IDH1* (NM_005896.4):c.395G>A, p.(Arg132His). Na obrázcích A, B jsou zobrazeny sekvenogramy získané Sangerovým sekvenováním. Mutace je zobrazena červenou šipkou ve „forward“ (A) i „reverse“ (B) sekvenci. Obrázek C ukazuje danou mutaci získanou pomocí metody NGS a vizualizovanou programem IGV (Thorvaldsdóttir et al., 2013). V daném místě (znázorněném červenou šipkou) jsou zobrazena jednotlivá čtení, kde lze vidět báze odpovídající wild type (G) i mutované (A) sekvenci. Ve všech případech je sledovaná sekvence zaručena k referenční sekvenci, která je na obrázku C zobrazena v dolní části