

A KÓRSZÖVETANI DIAGNOSZTIKA LEHETŐSÉGEI NAPJAINKBAN

Jung J.

Az európai pathológiában, az ókori görögöknél kialakult humorális szemlélet mintegy kétezer éven keresztül uralkodott.

Aszklepiádész solidar-pathológiai elmélete már egy kezdetleges morfológiai szemléletnek mondható, amely azonban, a vizsgáló módszerek és eszközök fejletlensége miatt, hosszú évszázadokon keresztül nem talált kellő visszhangra. A középkor végén, a reneszánsz korában, az egyre gyakrabban végzett boncolások eredményeként a pathológiában is mind nagyobb teret kapott a morfológiai szemlélet. Ennek tudományos megalapozásában jelentős lépés volt a mikroszkóp és a sejtek felfedezése, *Leeuwenhoeck*, illetve *Schleiden és Schwann* (1838) által. A sejtstruktúrák jelentőségére a pathológiában elsőként *Virchow* mutatott rá, megalapozva a sejtpathológia tanát.

A morfológiai szemlélet napjainkban is mind inkább érvényesül, nemcsak az elméleti, hanem a klinikai pathológiában is. Ezt igazolja a modern képalkotási eljárások gyors elterjedése, miáltal a gyakorló klinikus is egyre inkább a morfológiai elváltozások közvetlen megfigyelésére alapozza kórisméjét. Az endoscopos vizsgálatok mellett, a technika rohamos fejlődése tette lehetővé az ultrahangos, computer-tomographiás és mágneses rezonanciás tomographiás vizsgálatok bevezetését.

Annak ellenére, hogy az utóbbi években az endoscopia és radiológia „dominálta” a medicinát, a kórszöveti vizsgálat nem veszített jelentőségéből hanem módszereinek, szintén rohamos, bővülésével új helyet biztosított magának a diagnosztika és kutatás terén. A pathológia és a pathológus összekötő hidat képez az alapkutatás és a klinikum között. A pathológus, ismereteivel a beteget és nem a klinikust kell szolgálja.

A vizsgáló módszerek és eszközök függvényében a kórbonctan fejlődésében négy korszakot különíthetünk el: 1. a makroszkópos, 2. a fénymikroszkópos, 3. az ultramikroszkópos és 4. az immunhistochemia korszakát.

A múlt század második felében elterjedt *klasszikus szövettani módszerek* a század utolsó évtizedében már *histochemiai módszerekkel* bővültek. Ezáltal egyes biokémiai folyamatokat vagy elváltozásokat morfológiailag lehetett lokalizálni. Ilymódon, a pathológiában fokozatosan meg-honosodó biokémiai szemlélet összeötvöződött a morfológiai szemlélettel. További haladást jelentett a *histoenzymológiai eljárások* kidolgozása, miáltal a sejtek élettani és kóros anyagcserefolyamatainak egyes mozzanatait váltak ismertté.

A technika fejlődése újabb fénymikroszkópos módszerek bevezetését tette lehetővé. A *phasis-contrastmikroszkóppal* fixálás és festés nélkül lehet a sejteket vizsgálni. A *histo- és cytophotometria* segítségével quantitative is értékelni lehet a biokémiai elváltozásokat. Az *autoradiographia*

segítségével lokalizálni lehet a radioaktív izotópokkal jelzett különböző anyagok útját a szervezetben.

Kétségtelenül óriási jelentősége volt az *elektronmikroszkóp* bevezetésének, amely lehetővé tette a sejtorganellumok és különféle bonyolult sejtszerkezetek megismerését, valamint ezeknek változását kóros körülmények között. Ezáltal elkezdődött egy, a sejtorganellumokra épülő *szubmikroszkópos pathológia* körvonalazódása. Az elektronmikroszkóp segítségével, ma már nem csak jelentős nagyítás érhető el, hanem a vizsgált struktúra /képlet/ felszínéről térhatású relíefkép is nyerhető /scanning-elektronmikroszkópia/.

Napjainkban a pathológia újjászületésének vagyunk tanúi, mert új immunológiai, cytogenetikai és molekulárbiológiai módszerek bevezetésével, soha nem remélt diagnosztikai pontosságra és kutatómunkára nyílik lehetőség. A fluoreszcens vagy egyéb anyagokkal jelzett immunsavók és monoklonális antitestek alkalmazása és rohamos elterjedése az *immunhistochemiai és immuncytochemiai* eljárások kidolgozását, illetve tökéletesítését tette lehetővé. A közelmúltban bevezetett *in situ* hibridizáció révén a vírusok egyes komponenseinek szövetekben történő immunhistochemiai kimutatására nyílik lehetőség.

Az immunhistochemiai módszerek elterjedését követően, jogosan állapíthatjuk meg, hogy a pathológia új korszakba lépett. Ennek az új korszaknak a jelentőségét még nem áll módunkban felbecsülni, de minden esetre a *pathológia reneszánszának* tekinthető.

Az immunhistochemiai módszerekkel fajlagosan és szelektíven lehet sejt és szöveti antigéntermészetű anyagokat kimutatni.

A Coons és Kaplan által kidolgozott módszer az antigén-antitest komplexum lokalizációjának kimutatásával számos kórfolyamat pathogenesisét sikerült tisztázni. Az eredeti módszer szerint fluoreszkáló anyaggal /FITC-fluoresceinisothiocyanat/ jelzett antitestet /savót/ visznek fagyasztott metszetekre. Az antitest a neki megfelelő antigént tartalmazó sejt vagy szövetstruktúrákhoz kapcsolódik, amelyek jellegzetes fluoreszcenciát mutatnak.

Az eredeti módszer bonyolultsága és a metszetek gyors elhalványulása miatt több, érzékenyebb és fixált szöveteken is elvégezhető módszert dolgoztak ki. Ezek közül legelterjedtebbek a *Sternberger* és munkatársai kidolgozta immun-enzimátikus módszerek, amelyekben enzim-substratumot használnak /peroxidázt, borjúból alkalikus foszfátázt, béta-galaktozidázt/. Ez a szintelen chromogent színes /barna/ végtermékké alakítja át.

A *direkt módszerben* az antigént egy festékkel jelzett primaer antitesttel mutatjuk ki. Az *indirekt módszerben* az antigénhez nem jelzett primaer antitestet kapcsolnak, majd ez ellen az antitest ellen termelt és festékkel jelzett secundaer antitestet visznek a metszetre. Ez a módszer sokkal érzékenyebb mint a direkt eljárás. Magas specificitású az *enzim-immunkomplex módszer*, amikor a peroxidáz-antiperoxidáz komplexel jelzett secundaer antitestet használnak (*Larsson és Schwartz — 1977*). A *haptén-sandwich* módszerben a primaer antitestet egy hapténnel (aranylsav, paraaminobenzoylglycin, stb.) kapcsolják, a kimutatás pedig egy haptén-ellenes antitesttel vagy peroxidáz-antiperoxidáz komplexel történik (*Cammsuli és Wofsy-1976, Mason és mtsai-1983*). Újabban leg-

elterjedtebb az *avidin-biotin módszer*, amely az avidin (tojásfehérjéből kivont glikoprotein) biotin (vitamin) iránti affinitásán alapszik. A biotin számos anyaghoz (immunglobulinokhoz, hormonokhoz, nukleinsavakhoz, lektinhez) kötődik. Az ily módon biotinilált anyagot fluorochrommal, peroxidázzal, arannyal vagy ferritinnel jelzett avidinnal lehet kimutatni. Ennek a módszernek több változatát dolgozták ki, de mindegyiknek lényege, hogy nagyon érzékeny és specifikus.

Az immunhistochemiai módszerekben használt, ma már rendkívül sokféle *monoklonális antitest* segítségével sejteket és szöveteket lehet azonosítani (jellemezni), sejtreceptorokat, hormonokat, kóros anyagcsere-termékeket (pl. amyloidot), vírusokat, tumor-antigéneket lehet kimutatni.

A monoklonális antitestek bevezetésének felbecsülhetetlen jelentősége van a *daganatok pontos kórismezésében és elkülönítésében*. A tumor-markerek meghatározásának azonban nem csak diagnosztikai jelentősége, hanem *prognosztikai értéke* is van. Ugyanakkor a daganatok immunhistochemiai jellemzése hozzásegíti az onkológust a legmegfelelőbb *kezelési eljárás megválasztásában*.

A daganatok kórismezéséhez, illetve immunhistochemiai jellemzésére ma már nagyon sok monoklonális antitestet állítanak elő. Ezek között vannak olyanok, amelyeket diagnosztikus célból, másokat inkább kutatási célból használnak. Az alábbiakban a fontosabb sejt- illetve tumor-markereket tekintjük át.

1. *Hámsejt-markerek*

A hámszövetekben és hámeredetű daganatokban mutathatók ki.

1. Általános hámsejt-markerek: a Cytokeratin és a desmoplakin.
2. Széles spektrumú markerek: TPA-Tissue Polypeptide Antigen, EMA-Epithelial Membrane Antigen, Cytokeratin-polypeptid (CK 1-19).
3. Szelektív hámsejt-markerek: CEA- Carcinoembryonális antigén, AFP- Alphafetoprotein, prostata specifikus antigén, amylase, hormonok stb.

Egyes hámdaganatokban vimentin (mesenchymális marker) is kimutatható: pleomorph adenomában, pajzsmirigy carcinomában, az endometrium adenocarcinomában, mesotheliomában, granulosa-sejtes tumorban stb. Más hámdaganatokban neurofilament-protein mutatható ki, pl. bronchus-carcinomában, pancreas sziget-adenomákban, bronchus carcinoidban stb.

II. *Mesenchymális tumor-markerek.*

Legáltalánosabb mesenchymális marker a Vimentin, amely az alábbi daganatokban exprimált:

- lágyrészdaganatokban, beleértve a myoma myoblasticumot és glomus-tumort, kivéve a sarcoma synovialet;
- csontdaganatokban;
- lymphomákban, leukaemiákban (heterogén pozitívítás);
- melanoma malignumban.

Számos vimentin-pozitív mesenchymális daganatban más típusú markerek is kimutathatók. Ilyenek:

- a desmin, amely izomdaganatokban mutatható ki, az aktin, miozin és mioglobin mellett;
- az endothel-markerek: a VIII-as faktorról asszociált antigén (F VIII-RAG) és a BMA-120, amelyek érdaganatokban exprimálódnak;

— a lysosim és az alfa-1-antitrypsin, a histiocytomákban.

— a Protein S-100, a perifériás idegdaganatokban, a myoma myoblasticumban, melanoma malignumban, chondromában, glioblastomában, pleomorph adenomában.

Egyes mesenchymális daganatok cytokeratin pozitivitást is mutatnak: sarcoma synoviale, epitheloid sarcoma, chordoma.

III. Idegszövet-markerek.

Az idegszövetben és a belőle származó daganatokban számos marker mutatható ki:

1. Astroglia markerek: GFAP- glial fibrillary acid protein, Protein S-100.

2. Oligodendroglia és Schwannsejt-markerek: Protein S-100, MAG-myelin-associated glycoprotein.

3. Neuron és neuroendocrin sejtmakerek: NF- neurofilament-protein, NSE — neuron-specifikus enolase, Chromogranin, biogén aminok (dopamin, adrenalin, noradrenalin, serotonin), synaptophysin stb.

IV. Hormonális tumor-markerek

Minden hormont, a neki megfelelő monoklonális antitesttel pontosan lokalizálni lehet az ép és a daganatszövetben.

V. Víruseredetű tumor-markerek

HTLV, Epstein-Barr virus, Hepatitis B virus, human papilloma vírusok, az in situ hibridizációs módszerrel, szövetekben is kimutathatók.

VI. Leukocyta markerek

A CD1—CD45 jelzésű human leukocyta antigének ellen termelt monoklonális antitestek és a CD rendszertől független antigének ellen irányuló antitestek számos típusa segítségével a myeloid és lymphoid sejt sor minden eleme jellemezhető. Néhány, a gyakorlatban gyakrabban használt antitest: az LC (CD45) — leukocyta common antigen; az L26—B-sejt antigen; az UCHL1- a T-sejt antigen; a MAC 387 — a histiocyta, monocyta antigen; az M1- a Sternberg-sejt és granulocyta antigen; a Ki1 (CD30) — a Sternberg-sejt antigen; a CD4 — a helper lymphocyta antigen; a CD8 — a suppressor lymphocyta antigen ellen termelt monoklonális antitestek.

Klasszikus szövettani módszerekkel a daganatok mintegy 80—85 % -ában lehet, napjaink követelményeinek megfelelően, pontos diagnózist és prognózist megállapítani. A rutin vizsgálatot histochemiai módszerekkel kiegészítve, ez az arány 90—95 %-ra nő. Immunhistochemiai vizsgálatok nélkül a daganatok 5—10 %-át nem lehet pontosan jellemezni. Ide sorolhatjuk a malignus lymphomákat, egyes lágyszövet-tumороkat, neurogen és a neuroendocrin (APUD) sejtekből származó daganatokat. Az emlőcarcinomát is csak akkor jellemezhetjük pontosan, ha oestrogen-receptor meghatározást végeztünk. A kisesejtes tüdőcarcinoma kórisméje is csak akkor mondható teljesnek, ha neurosecretiós jellegét meghatároztuk, ugyanis ennek prognosztikai értéke van. A carcinoidok érettségi foka is csak immunhistochemiailag állapítható meg. Az éretlen carcinoidok Cytokeratin-pozitivitása, míg a differenciáltabbak Chromogranin-pozitivitása erősebb.

A továbbiakban, a gyakoribb daganattípusok kórismézéséhez és elkülönítéséhez ajánlott immunhistochemiai „programot” mutatunk be, amelyet a daniiai, monoklonális antitesteket előállító „DAKOPATTS” cég közölt.

LYMPHOMA Cytokeratin neg LC poz.	CARCINOMA Cytokeratin poz. EMA poz.	EGYÉB DAGANATOK Cytokeratin neg. EMA neg LC neg.
T-sejtes lymphoma	UCLH—1+	S-100 ← Melanoma
B-sejtes lymphoma	L-26 + 4KB 5 +	Desmin ← Izom-dag.
Histiocyt. lymphoma	Lysozym + MAC 387 +	NF ← Neuroblastoma Paraganglioma Phaeochromocytoma
Hodgkin-lymphoma vegyes s.	M-1 + CD30 +	Vimentin + ← sarcomák
Hodgkin-kór, ly-cyta pred.	L-26 + M-1 — CD30 —	

Ezek a reakciók paraffinba ágyazott anyagon is elvégezhetők, inkább differenciáldiagnosztikai jelentőségük van, mert a daganatok részletesebb jellemzésére nem elegendők.

Az immunhistochemiai módszereknek nem csak a tumor-diagnosztikában, hanem számos más kórfolyamat pathogenesisének tisztázásában is jelentőségük van. Mindenek előtt a sokasodó hypersensitiv immunfolyamatok és autoimmun körképek, valamint gyulladásos reakciók megismerésében nélkülözhetetlennek bizonyulnak a monoklonális antitestek.

Az eredetileg szinte kizárólag kutatási célokat szolgáló vizsgálati eljárások fokozatosan rutin-módszereké válnak és a pathológia fejlődésének új lendületet adnak.

Irodalom

1.) Seifert G.: Die Zukunft der Pathologie. Verh. Dtsch. Ges.Path. (1986), 70, 39-44; 2.) Denk H.: Morphologische Nachweismethoden. Verh. Dtsch. Dtsch. Ges. Path. (1986), 70, 18-27; 3.) Moll R.: Epitheliale Tumormarker. Verh. Dtsch. Ges. Path. (1986), 70, 28-50; 4.) Altmannsberger M., Alles J.U., Fitz H., Jundt G., Osborn M.: Mesenchymale Tumormarker. Verh. Dtsch. Ges. Path. (1986), 70, 51-63; 5.) Schwechheimer K.: Nervale Tumormarker. Verh. Dtsch. Ges. Path. (1986), 70, 82-103; 6.) Löning Th. Milde K.: Virale Tumormarker. Verh. Dtsch. Ges. Path. (1986), 70, 104-115; 7.) Boenisch Th.: Basic Enzymology. „Handbook Immunochemical Staining Methods“. DAKO Corporation, 1989; 8. Monoclonal Antibodies, DAKO Corporation, 1990.