

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta

**Uplatnění imunohistochemických metod v diagnostice
novotvarů**

bakalářská práce

Autor práce: Michala Velková
Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Holan

Datum odevzdání práce: 3.5.2013

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývala uplatněním imunohistochemických metod v diagnostice novotvarů. Jsou zde zmapovány indikace imunohistochemických metod podle jednotlivých oddělení Nemocnice Písek, a.s.

V teoretické části popisují poznatky o jednotlivých vyšetřovacích metodách. U imunohistochemie jsem se zaměřila na stanovení jednotlivých antigenů a použití vhodných primárních protilátek pro diagnostiku řady onemocnění, převážně novotvarů. Oddělení patologicko-anatomické má k dispozici 20 primárních protilátek.

V praktické části porovnávám konvenčního barvení a imunohistochemické metody s konvenčním barvením a speciálními barvicími metodami v histologii pro stanovení diagnózy novotvarů. Hematoxylin eosin slouží k odlišení základních buněčných součástí. Selektivní barvení umožňuje barevné odlišení různých tkáňových komponent. Pomocí imunohistochemie se prokazuje přítomnost určitých tkáňových antigenů díky protilátkové reakci s navázanými chemickými sloučeninami.

Toto porovnání jsem aplikovala při diferenciální diagnostice maligních melanomů a myogenních novotvarů na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s. U stanovení maligních melanomů byl prvotně vzorek histologicky zpracován a obarven základním barvením Hematoxylin eosin. Druhotně jsem použila argentafinní reakce na průkaz pigmentu melaninu a imunohistochemické barvení antigenu HMB 45 pomocí monoklonální myší protilátky proti HMB 45 od firmy Dako a proteinu S 100 pomocí polyklonální králičí protilátky proti S100 od firmy Dako. Takto bylo vyšetřeno 14 vzorků od pacientů s maligním melanomem. HMB 45 se barvilo pozitivně u 12 vzorků z celkových 14. Monoklonální protilátka proti HMB 45 je pro maligní melanom dosti specifická. S 100 protein byl detekován ve všech tkáňových vzorcích. Polyklonální protilátka proti S 100 vykazuje vyšší senzitivitu, není však příliš specifická. Spíše se používá k odlišení neuroektodermálních a nonneuroektodermálních lézí. Melanin byl prokázán u 11 tkáňových vzorků. Průkaz melaninu je též nespecifický a komplikovaný. Argentafinní reakce vykazuje zbarvení i u jiných látek obsažených v cytoplazmě jako

např. lipofuscin, proto je nutné k diagnostice melanomu použít i jiné metody např. imunohistochemii.

V diagnostice myogenních novotvarů se použilo základní barevní Hematoxylin eosin a následně jsem imunohistochemicky stanovovala hladkosvalový aktin a desmin pomocí monoklonálních myších protilátek od firmy Dako a přehledné barvení Hematoxylin van Gieson, které se využívá v menší míře než v minulosti. Celkem se vyšetřilo 94 myogenních novotvarů. 72 novotvarů obarvených Hematoxylinem van Giesonem vykazovalo pozitivní barevnou reakci svaloviny a 22 novotvarů slabou barevnou reakci. Hladkosvalový aktin a desmin byl imunohistochemicky detekován u 92 vzorků.

Hlavním problémem v barvení Hematoxylin van Gieson zůstává menší specifická a někdy i nejednoznačná diferencovatelnost barevných odstínů ve vlastním preparátu znesnadňující až znemožňující v některých případech spolehlivé stanovení diagnózy. Z tohoto důvodu je upřednostňován imunohistochemický průkaz hladkosvalového aktinu a desminu (mimo jiných) jako klíčových parametrů. S výhodou lze pak využít pozitivní protilátkové reakce s hladkosvalovým aktinem u myoepitelií při pátrání po eventuální invazivitě především k odlišení in situ a mikroinvazivních tumorů ve žlázových orgánech.

V diferenciální diagnostice tumorů myogenního původu se v současné době upřednostňují před speciálním barvením imunohistochemické metody pro vysokou míru senzitivity i specifity, stejně jako v diferenciální diagnostice maligního melanomu. V kombinaci se pak oba přístupy dobře doplňují a poskytují již poměrně vysokou míru jistoty při určování původu buňky.

Abstract

This thesis deals with the application of immunohistochemical methods in the diagnosis of neoplasms. Indications of immunohistochemical methods of particular departments in Hospital Písek, a.s. are outlined there. It describes the origins and development of this method in the Pathological Anatomy Department, Hospital Písek, a.s.

In the theoretical part, I describe knowledge of single methods. As for immunohistochemistry, I focused on the determination of antigens and the use of suitable primary antibodies for diagnosing diseases, mostly neoplasms. There are 20 primary antibodies available at the Department of Pathological Anatomy.

In the practical part, I compare conventional staining and immunohistochemical methods with conventional staining and special staining methods in histology for the diagnosis of tumours. Hematoxylin eosin serves for distinguishing of essential cellular components. Selective staining enables colour differentiation of various tissue components. Using immunohistochemistry, the presence of certain tissue antigens by antibody reaction with the immobilized chemical compounds is detected.

This comparison I was applied at the differential diagnosis of malignant melanoma and myogenic tumours at the Pathological Anatomy Department, Hospital Písek, a.s. For the determination of malignant melanomas, initially the sample was histologically processed and stained with Hematoxylin eosin staining base. Secondly, the argentaffin reaction was used to detect melanin pigment and immunohistochemical staining of antigen HMB 45 using a mouse monoclonal antibody against HMB 45 by Dako Company and S 100 protein using a polyclonal rabbit antibody against S 100 by Dako Company. 14 samples of patients with malignant melanoma were examined this way. HMB 45 was stained positively in 12 samples out of 14 in total. Monoclonal antibody against HMB 45 is for malignant melanoma quite specific. S 100 protein was detected in all tissue samples. Polyclonal antibody against S 100 shows higher sensitivity, however it is not very specific. It is more used to distinguish neuroectodermal and nonneuroektodermálních lesions. Melanin was detected in 11

tissue samples. Detection of melanin is also non-specific and complicated. Argentaffin reaction shows colouring of other substances contained in the cytoplasm, such as lipofuscin therefore it is necessary to use other methods for the melanoma diagnosis, e.g. immunohistochemistry.

In the diagnosis of myogenic neoplasms, Hematoxylin eosin basic staining was used and subsequently immunohistochemical examination followed to detect smooth muscle actin and desmin using monoclonal mouse antibodies by Dako Company and transparent Hematoxylin van Gieson staining, which is used less than in the past. A total of 94 myogenic neoplasms (leiomyomas uterus) were examined. 72 neoplasms stained with Hematoxylin van Gieson showed a positive colour reaction of muscle mass and 22 neoplasms weak colour reaction. Smooth muscle actin and Desmin was detected by immunohistochemistry in 92 samples.

The main problem of Hematoxylin van Gieson staining remains less specificity and sometimes ambiguous differentiability of colour tones in their own preparation impeding and preventing to set a reliable diagnosis in some cases. For this reason, immunohistochemical detection of Smooth muscle actin and Desmin (amongst others) is preferred as key parameters. Preferably, you can then use positive antibody reaction with Smooth muscle actin of myoepithelial cells in the search for possible invasiveness mainly to differentiate in situ and microinvasive tumours in glandular organs.

The differential diagnosis of myogenic origin tumours currently prefers immunohistochemical methods to special staining for high sensitivity and specificity, as well as in the differential diagnosis of malignant melanoma. When combined, both approaches complement each other well and provide relatively high degree of certainty in determining cells origin.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2013

.....

Michala Velková

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu své práce a primáři Oddělení patologicko-anatomickému, Nemocnice Písek, a.s MUDr. Pavlu Holanovi, který se mě ujal a umožnil mi realizovat tuto práci na svém pracovišti. S trpělivostí odpovídal na kladené dotazy a pomohl mi orientovat se v dané problematice. Poskytl mi cenné rady a odborné vedení.

Mé poděkování patří též vrchní laborantce Marcelce Máškové, DiS., která mi pomohla s orientací v problematice imunohistochemických metod.

Obsah

Úvod	12
1 Základní pojmy	14
2 Historie.....	15
3 Současný stav.....	16
3.1 Metody	17
3.1.1 Histologické vyšetření	17
3.1.1.1 Fixace.....	17
3.1.1.2 Zalévání do parafinu	19
3.1.1.3 Krájení parafinových bloků	19
3.1.1.4 Odparafinování řezů	20
3.1.1.5 Barvení histologických řezů	20
3.1.1.6 Montování histologických preparátů	23
3.1.1.7 Interpretace výsledků.....	23
3.1.2 Imunohistochemické vyšetření.....	24
3.1.2.1 Odběr a zpracování materiálu	25
3.1.2.2 Fixace materiálu.....	26
3.1.2.3 Zhotovení preparátu pro IHC.....	27
3.1.2.4 Revitalizace antigenu	27
3.1.2.5 Blokování endogenní aktivity enzymů	27
3.1.2.6 Blokování pozadí	28
3.1.2.7 Primární protilátky	30
3.1.2.8 Inkubace s primární protilátkou	30
3.1.2.9 Inkubace s detekčním systémem.....	31
3.1.2.10 Chromogeny.....	32
3.1.2.11 Barvení pozadí a montování preparátů	32
3.1.2.12 Kontroly	33
3.1.2.13 Interpretace imunohistochemických výsledků.....	33
3.1.2.14 Automatizace v IHC	33
3.1.2.15 Vývoj imunohistochemických metod na PAT, Nemocnice Písek, a.s... 34	
3.1.2.16 Vyšetřované antigeny a používané protilátky na PAT	39
4 Cíle práce	47
5 Metodika	48
5.1 Charakteristika	48
5.2 Preanalytická fáze	48
5.3 Analytická fáze	49
5.3.1 Základní histologické vyšetření.....	49
5.3.2 Barvení Hematoxylin van Gieson	50
5.3.3 Argentafinní reakce	51
5.3.4 Imunohistochemické metody.....	52
5.4 Postanalytická fáze	53
6 Výsledky.....	55

7 Diskuze	64
8 Závěr	66
9 Seznam použitý informačních zdrojů	67
10 Klíčová slova.....	72
11 Přílohy.....	73

Seznam použitých zkratek

ABC	Avidin-biotin-peroxidázový komplex
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole (chromogen)
APAAP	Alkalická fosfatáza-anti alkalická fosfatáza komplex
BCL2	BCL2 Oncoprotein
CD	Cluster of determination
CK	Cytokeratin
CK HMW	Cytokeratin High Molecular Weight (Cytokeratin o vysoké molekulární hmotnosti)
CK7	Cytokeratin 7
CK20	Cytokeratin 20
DAB	3,3- diaminobenzidín
DES	Desmin
E-cad	E-cadherin
ER	Estrogen receptor
HE	Hematoxylin eosin
HPV	Lidský papilomavirus
HSIL	High-grade squamous intraepithelial lesion (vysoký stupeň dlaždicové intraepiteliální léze)
CHRA	Chromogranin A
Ig	Imunoglobulin
IHC	Imunohistochemie
I-PAT	Instrukce- Oddělení patologicko-anatomické Nemocnice Písek, .a.s.
ISH	In situ hybridizace
Ki-67	Ki-67 Antigen
LIS	Laboratorní informační systém
LMW	Low Molecular Weight (nízká molekulová hmotnost)
LCA	Leucocyte Common Antigen

LSIL	Low-grade squamous intraepithelial lesion (nízký stupeň dlaždicové intraepiteliální léze)
ME	Melanosome
MSA	Muscle specific actin (svalový specifický aktin)
ORL	Otorhinolaryngologie
PAP	Peroxidáza-anti-peroxidáza komplex
PAT	Oddělení patologicko-anatomické
PR	Progesteron receptor
PSA	Prostate-Specific Antigen (Prostatický specifický antigen)
SABC	Streptavidin-biotin-peroxidáza- komplex
SMA	Smooth Muscle Actin (hladkosvalový aktin)
SOP-PAT	Standartní operační postup- Oddělení patologicko-anatomické Nemocnice Písek, a.s.
VIM	Vimentin

Úvod

V současné době dochází ke zvýšenému výskytu novotvarů zhoubných (maligních) i nezhoubných (benigních). Nezhoubné novotvary mají tendenci ovlivňovat zdraví, tím že mohou být poškozeny okolní tkáň rostoucím novotvarem nebo se vyvíjet v zhoubné novotvary (prekancerózy). Vhodnou léčbu je chirurgické nebo endoskopické odstranění celého novotvaru. Zhoubné novotvary rychle rostou a mají tendenci narušovat a ničit sousední tkáň. Postupem času poškozují životně důležité orgány např. plíce, játra, mozek. Nevýhoda zhoubných novotvarů je tvorba metastáz a šíření do celého organismu, proto se musí primární ložisko odstranit co nejdříve před vznikem metastáz. Léčba zhoubných novotvarů se zlepšuje kombinací chemoterapeutickými, radioterapeutickými a imunologickými postupy. Při včasném zahájení léčby se šance na úspěšnou léčbu zvyšuje. V tomto případě hraje velkou roli rychlé a přesné stanovení histologické diagnózy. [1]

V diagnostice řady chorob jsou uplatňovány histologické techniky s tím i související speciální barvicí metody, imunohistochemické a molekulárně-genetické metody.

Imunohistochemické barvicí metody se široce využívají k extrahování dalších informací, které nejsou k dispozici barvením Hematoxylin eosin a pomocí světelné mikroskopie nebo transmisní elektronové mikroskopie. [2]

Imunohistochemické reakce jsou uplatňovány jak ve výzkumných laboratořích, tak i pro obor patologické anatomie. Napomáhají nám ke stanovení histologických diagnóz morfologicky nerozlišených neoplazií a podtypů neoplazií, charakterizují primární místo zhoubné neoplazie, zkoumají prognostické faktory a terapeutické indikace některých nemocí a rozlišují buňky benigní a maligní povahy. [3]

Imunohistochemické techniky se uplatňují při hledání buněčných a tkáňových antigenů pomocí vazby antigenu a specifické protilátky s následnou vizualizací komplexu antigen-protilátka. [4]

V bakalářské práci se zaměřuji na diagnostiku novotvarů pomocí imunohistochemického vyšetření a vhodný výběr primárních protilátek a jejich

specifika na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s. Mezi své cíle jsme si také stanovila osvojit si tuto metodu. Zaměřuji se na porovnání imunohistochemického vyšetření a speciálních barvicích metod v histologii. Dále mapuji vývoj imunohistochemických metod na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s. Zjišťuji trendy v imunohistochemii a její uplatnění v budoucnosti.

Toto téma mě velmi zajímá, protože nádorová onemocnění jsou celosvětový problém, i když se stále zlepšuje diagnostika a vyvíjí se nové metody a léčebné postupy. Obor histologie, imunohistochemie a patologická anatomie nejsou i přes svůj nepochybný přínos pro diagnostiku stále v dnešní době mezi širší veřejností dostatečně ceněny.

1 Základní pojmy

Předmětem *patologie* je zkoumání nemoci z hlediska chorobných změn vzhledu a funkce. U nemoci se dále zabýváme příčinou a vývojem. *Patologická anatomie* se uplatňuje při studiu morfologických změn orgánů např. tvaru, velikosti a tuhosti. [1]

Histologie je vědní obor, který se zabývá studiem mikroskopické struktury buněk a tkání živočišného a rostlinného původu. [5] Sledování skladby organismu je důležité pro pochopení správné funkce a rozpoznání změn způsobených chorobným stavem. [6]

Histologické vyšetření patří k důležitým klinickým metodám. Zabývá se procesem zhotovením histologického preparátu z odebraného vzorku vhodného pro světelnou mikroskopii. [6]

Imunohistochemie slouží k vyhledávání konkrétních antigenů ve tkáních a buňkách pomocí specifických protilátek. [1]

Antigen je makromolekulární látka, kterou rozpozná imunitní systém jako cizí a reaguje na ni. Antigen může být protein, různé komplexní polysacharidy, lipidy a lipoproteiny. [7] Vazebné místo na antigenu, kde se váže protilátka, se nazývá *epitop*.

Protilátka je glykoprotein vykazující protilátkovou aktivitu. Protilátky produkují plazmatické buňky. *Imunoglobulin* je protein a má strukturu a funkci protilátky. Podílí se na humorální imunitě. Imunoglobuliny se rozdělují do 5 tříd (IgD, IgG, IgM, IgA, IgE). Molekula imunoglobulinu se skládá ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců spojených disulfidickými můstky. [8]

Imunokomplex vzniká vazbou antigenu s protilátkou. [7]

2 Historie

Imunohistochemie původně vycházela z histochemie (rozhraní histologie, analytické chemie a biochemie) a následně využívala poznatky z oboru imunologie.

První známky o IHC se datují od roku 1941, kdy byly poprvé detekovány antigeny ve tkáních pomocí fluoresceinem značené protilátky. Jednalo se o přímou metodu. Tuto metodiku zavedl Coonsom a Kaplan. Měla řadu nevýhod. Hlavně se vyšetřovalo pouze na nativních tkáních, což byl problém v klinické diagnostice. [8]

Roku 1976 připravili Milstein a Köhler protilátky namířené proti jednomu epitopu antigenní molekuly. [8]

Koncem 70. let se spojil enzym s protilátkou a tím došlo k zavedení imunohistochemie do praxe. [8]

Začátkem 80. let pro zvýšení citlivosti detekce primárních protilátek a pro zlepšení pozitivního signálu byly zavedeny metody používající tzv. PAP komplexy. [8]

Teprve od počátku 1990 našla metoda všeobecné uplatnění v chirurgické patologii. Díky technickému rozvoji byly vytvořeny řady citlivých detekčních systémů. Problémy, které nastaly ve vývoji imunoperoxidačních technik, souvisely s potřebou dosáhnout větší citlivosti. Týkalo se to nejjednodušších jednostupňových přímých metod až po vícešupňové detekční metody (např. PAP metody, avidin-biotin a biotin-streptavidin metody). [10]

V roce 1991 vyvinul Shi a jeho spolupracovníci na základě řady biochemických studií antigenní demaskovací techniku. Jednalo se o jednoduchou techniku, která zahrnovala demaskování za vysoké teploty před procesem imunohistochemického barvení. [11]

3 Současný stav

V současné době se mapuje stoupající tendence výskytu novotvarů zhoubných i nezhoubných. Rostoucí počet zhoubných novotvarů si můžeme vysvětlit stárnutím populace a zlepšením diagnostiky, též uskutečňováním programů celoplošných onkologických screeningů. Zhoubné novotvary jsou dlouhodobě druhou nejčastější příčinou úmrtí v České republice po kardiovaskulárních chorobách. Mezi nejpočetnější diagnózy zhoubných novotvarů patří zhoubný novotvar kůže, zhoubný novotvar kolorekta, zhoubný novotvar průdušnice, průdušek a plic, zhoubný novotvar prsu u žen a nádory prostaty u mužů. U těchto onemocnění je důležitý včasný záchyt onemocnění a následná léčba, což má vliv na další vývoj nemoci. K zachycení včasného stádia onemocnění napomáhá spolupráce s ostatními medicínskými obory.

Maligní melanom patří mezi zhoubné nádorové onemocnění především kůže. Jedná se o onkogenní mutaci melanocytů, kdy nedochází k účinné opravě. V konečné fázi nádorově transformované melanocyty nekontrolovaně rostou a mohou metastazovat. Vliv na vznik melanomu má kožní fototyp jedince, sluneční záření a opalovací návyky. Maligní melanom se vyskytuje stále více u mladší věkové populace. Důležitá je včasná diagnostika a chirurgické odstranění nádoru. Nezanedbatelným aspektem bývá tloušťka nádoru v milimetrech, které určují charakter nádoru- Breslow index. [12]

Myogenní novotvary obsahují ve své struktuře modifikovaná mikrofilamenta tzv. aktinová myofilamenta, která v interakci s myosinovými mikrofilamenty umožňují svalovou kontrakci. [6] Mezi myogenní tumory jsou řazeny dle typu svaloviny především leiomyom, rhabdomyom, jejich maligní formy, tedy leiomyosarkom, rhabdomyosarkom a smíšené mezenchymální varianty (např. angiomyolipom). Nejfrekventněji se v našich zeměpisných šířkách setkáváme s leiomyomy, především pak v děložní lokalizaci, méně v gastrointestinálním traktu a kůži. Rhabdomyosarkom je nejčastějším sarkomem měkkých tkání dětí a adolescentů. Význam myogenních novotvarů tkví v důležitosti včasné detekce jejich maligních forem a v náležité diferenciaci diagnostické rozvaze u jim podobných lézí. [13]

3.1 Metody

K určení histopatologické diagnózy napomáhá nejprve histologické vyšetření tkáně. Vzorek je obarven základním barvením Hematoxylin eosin. Druhotně se používají doplňkové metodiky: speciální barvicí metody v histologii a imunohistochemické metody.

3.1.1 Histologické vyšetření

Histologické vyšetření slouží k potvrzení či vyvrácení diagnózy klinického lékaře. Materiál odebraný pro histologické vyšetření může být buď získaný během operace z živého organismu (biopsie) nebo materiál odebraný během pitvy zemřelé osoby-mrtvého organismu (nekropsie). Odběr vzorku by měl být proveden rychle a šetrně. Objem vzorku nepřesahuje 1 cm³. Mezi způsoby odběru vzorku patří excize (vyříznutí), punkce (nabodnutí) a kyretáž (seškrábnutí). Po odběru se vzorek vkládá do označené nádoby s fixační tekutinou a s vyplněným průvodním listem se zasílá do histologické laboratoře. [4]

3.1.1.1 Fixace

Fixace zabraňuje autolýze a tím znemožňuje destrukci tkáně a buněk činností enzymů. Jsou dva možné způsoby fixace: fyzikální a chemická metoda. [4]

Fixační prostředky musí splňovat určité podmínky:

- Zachování struktury tkáně
- Zachování barvitelnosti tkáně
- Rychlé pronikání do tkáně [14]

Fyzikální fixace

Fyzikální fixační prostředky používané v histologii se užívá rychlé zmrazení tkáně pomocí kyseliny uhličitě- „suchého ledu“ nebo kapalných plynů (např. dusíku). Touto metodou se fixují vzorky pro enzymovou histochemii, pro imunohistochemické vyšetření nebo pro průkaz tuků. Mezi další fyzikální metodu patří freezing-drying (vysoušení za mrazu). Dochází k sublimaci vody v hlubokém vakuu. [4]

Chemická fixace

Chemické fixační přípravky jsou v histologii nejrozšířenější pro svoji snadnou přípravu a manipulaci. Při fixaci se musí dodržovat určité podmínky:

- Čerstvá tkáň musí být vložena do fixační tekutiny v co nejkratší době po odběru
- Nádobka musí obsahovat dostatečné množství fixační tekutiny (20x až 50x více než je objem tkáně)
- Fixační tekutina musí mít přístup ze všech stran [14]

Nejrozšířenější fixační tekutinou je 10% formol. 100% ethanol se používá k fixaci tkáně pro speciální účely např. průkaz vápníku, železa a v neurohistologii. Caynova tekutina je vhodná pro průkaz glykogenu a pro průkaz nukleových kyselin. Kyselina osmičelá je hojně využívána k fixaci tkáně pro elektronovou mikroskopii. Mezi další zástupce fixačních tekutin patří neutrální formol, fixační tekutiny s kyselinou pikrovou (Bouinova a Pasteelsova tekutina) a fixační tekutiny se sublimátem (SUSA, Zenkerova tekutina). [14]

3.1.1.2 Zalévání do parafinu

Účelem zalévání do parafinu je prosycení odvodněné tkáně rozehrátým parafinem při teplotě 56-58°C, kdy se vyplní mikroskopické štěrbiny parafinem. Tento proces se skládá ze 4 částí: Odvodnění tkáně, prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafin, prosycení tkáně parafinem a vlastní zalití. [14]

Vzestupnou řadou etanolů (70%, 80% a 96%) se odvodňuje vyšetřovaná tkáň. K prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafin se používají látky s nižším bodem varu (benzen), látky s vyšším bodem varu (např. metylbenzoát, metylsalicylát) nebo xylen. Odvodnění, prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafin a prosycení tkáně parafinem je možné automatizovat pomocí tkáňového automatu, který pojme velké množství materiálu. [14]

Po prosycení se tkáňové bločky zalévají tekutým parafinem do umělohmotných rámečků. Vlastní zalití se provádí na zalévacím automatu, kde je v zásobníku tekutý parafin opatřený ventilem a chladicí modul pro rychlé tuhnutí parafinových bloků. [4]

3.1.1.3 Krájení parafinových bloků

Ke krájení parafinových bloků slouží speciální zařízení- mikrotom (sáňkový a rotační). Mikrotom umožňuje krájení tenkých řezů. [4]

Ukrojené parafinové řezy se buď lepi směsí bílků s glycerinem nebo se napínají pomocí nádobek s teplou vodou (37-40°C) na podložní sklo natřené směsí bílku s glycerinem a nebo lepení řezů roztokem želatiny. Podložní sklo s nataženými parafinovými řezy se vloží do termostatu nebo na vyhřívanou ploténku, kde se řezy suší, aby nedocházelo k jejich ztrátě. [4]

3.1.1.4 Odparafinování řezů

Před vlastním barvením se musí parafinové řezy zbavit parafinu pomocí xylenu. Parafinové řezy se ponechají ve dvou lázních xylenu po 5 minutách. Protože je xylen ve vodě nerozpustný, řezy se musí vyprat v sestupné řadě etanolů a vodě. [14]

3.1.1.5 Barvení histologických řezů

V neobarvených řezech nevidíme ve světelném mikroskopu jednotlivé složky tkáně, proto se řezy barví. Různé složky tkáně na sebe váží histologická barviva. Kyselé (plazmatická) barviva barví cytoplazmu buněk. Zásadité (jaderná) barviva se váží na jádra buněk (jaderný chromatin). Nejpoužívanější zásadité barvivo je hematoxylin a zástupcem kyselého barviva je eosin. [14]

Pokud se nanese histologické barvivo ve vodném nebo alkoholovém roztoku na histologický preparát, jedná se o barvení přímé, které je nejčastěji používané. Mořidlové barvení je vhodné pro zvýšení intenzity a specifičnosti (např. kamencové a železité hematoxyliny). Při progresivním barvení se histologický preparát krátce obarví a kontroluje se, zda složky tkáně dosáhly požadovaného zbarvení. U regresivního barvení se histologický preparát přebarví a přebytečné barvivo se odstraní (diferencování). Sukcesivní barvení zahrnuje použití více barviv (např. Hematoxylin eosin). Při simultánním barvení se histologické preparáty barví v jedné lázni. [4]

Barvení Hematoxylin-eosin

Patří mezi základní a nejpoužívanější histologické barvení. Hematoxylin eosin odlišuje základní buněčné struktury. Roztok hematoxylinu sám o sobě jádra buněk nebarví, ale až po oxidaci v hematein. Hematoxyliny se dělí na: kamencové (Harrisův a Mayerův hematoxylin) a železité (Weigertův hematoxylin). Eosin se dělí podle svého chemického složení, barvy a rozpustnosti do dvou skupin. První skupinu zastupují bromeliny (eosin žlutý, červený a eosin v etanolu rozpustný). V druhé skupině se

nachází jodeoziny (erytroziny). Díky barvení Hematoxylin eosin jsou odlišeny jádra buněk tmavě modře, kolagenní vazivo růžově, svalstvo červeně a chrupavka modře. [14]

Speciální barvení

Selektivní barvení umožňuje barevné odlišení různých tkáňových komponent. Barvení Weigert van Gieson patří mezi přehledná barvení. Slouží k znázornění kolagenního vaziva a svalstva, kdy se barví jádra buněk modře, kolagenní vazivo třesňově červeně a svalstvo žlutě. Jako přehledná barvení se uplatňuje barvení azanem, barvení Dominici a barvení Massonovými trichromy (žlutý trichrom, modrý trichrom a zelený trichrom). [14]

K znázornění vazivových vláken se používá barvení na kolagen, barvení na elastiku a znázornění retikula. K průkazu elastických vláken je vhodné barvení orceinem, aldehydovým fuchsinem nebo rezorcinolovým fuchsinem (modifikace Weigertovy metody). K znázornění retikula slouží impregnační metoda pomocí dusičnanu stříbrného, impregnace podle Gomoriho a podle Foota. [14]

Mezi histopatologické metody patří průkaz amyloidu a bakterií v tkáňových řezech. Patologická bílkovina (amyloid) se prokazuje pomocí jódové a jódosírové reakce, barvením metylovou violetí a kongo červení. K znázornění bakterií slouží barvení metylénovou modří podle Löfflera a barvení dle Grama. Tuberkulózní bacily (mykobakteria) se barví dle Ziehl-Neelsena. [14]

Do neurohistologických metod patří barvení tigroidní substance (Nisslovy substance), myelinových pochev, impregnace nervových vláken a znázornění neuroglíí. Jako Nisslovy substance je pojmenováno granulární endoplazmatické retikulum a ribozomy v cytoplazmě nervových buněk. Nisslova substance se barví pomocí roztoku toluidinové modří. Myelinové pochvy obsahují fosfolipidy a proteiny. Na tomto poznatku jsou založeny metody k znázornění myelinových pochev, mezi které patří barvení dle Kulčického, barvení dle Spielmayera, barvení luxolovou modří a barvení degenerujících nervových vláken s myelinovou pochvou (např. pomocí oxidu osmičelého). Impregnační metody v neurohistologii slouží k znázornění nervových

fibril, nervových zakončení a neuroglií. Nervové fibril se impregnují podle Bielschowského, podle Schultze-Stöhra a podle Nauty. Pro impregnaci parafinových řezů se provádí Palmgrenova metoda a impregnace podle Richardsona. Znázornění neuroglie se rozděluje do dvou skupin. První skupina zahrnuje metody barvení nervových vláken Weigertovou metodou nebo modifikací této metody podle Holzera a Bendy. Druhou skupinou pro znázornění neuroglií je Hortegova metody a Cajalova metoda a její modifikace podle Globuse, které slouží k znázornění astrocytů. K znázornění oligodendroglíí se používá modifikace podle Penfielda. [14]

Mezi polysacharidy patří glykogen, proteoglykany (mukopolysacharidy) glykoproteiny. Mukopolysacharidy se dále dělí na kyselé a neutrální. Neutrální mukopolysacharid je přítomen v hleny žaludeční sliznice a kyselé mukopolysacharidy se vyskytují v hlenovitých sekretech (např. kyseliny hyaluronová). Mukoproteiny a glykoproteiny se nachází v hleny např. v slinných žlázách. Glykolipidy se vyskytují v mozkové tkáni. Pro průkaz polysacharidů se využívá PAS reakce, která je založena na oxidaci polysacharidů, kdy vznikají aldehydy reagující s Schiffovým reagens. Glykogen se prokazuje bestovým karmínem. Kyselé mukopolysacharidy se znázorňují barvením alciánovou modří nebo dialyzovaným železem (Hale). Hlen se barví mucikarmínem (podle Mayera). [14]

Zpracování tkáně pro průkaz lipidů má svá specifika, protože lipidy nesmí přijít do styku s organickými rozpouštědly (např. xylen). Tkáň se musí krájet na zmrazovacím mikrotomu a montovat do glycerinu, glycerinové želatiny nebo levulózového sirupu. K průkazu lipidů se nejvíce využívá sudan III. nebo IV., sudanová čern, olejová červeň, průkaz oxidem osmičelým a sulfátem nilské modře. [14]

Pigmenty jsou barevné produkty vznikající endogenně (hematogenní pigmenty, melanin a lipofuscin) nebo exogenně. Hemoglobin se prokazuje benzidinem, bilirubin a hematoidin Gmelinovou reakcí a žlučová barviva Lugolovým roztokem (Stein). Melanin je černohnědí produkt obsažený v buňkách nespodnější vrstvy pokožky (melanocytech), v některých nervových buňkách a nádorech. Melanin se prokazuje argentafilní reakcí, Bodianovou reakcí, průkazem dvojmocného železa (Lillie) nebo bělení melaninu peroxidem vodíku. Argentafilní reakce je založena na principu redukce

roztoku stříbra melaninem. Melanin a jiná argyrofilní granula se barví černě a jádra buněk červeně díky jádrové červeně. Lipofuscin tvoří žlutá až hnědá zrníčka. Prokazuje se podle Schmorla, sulfátem nilské modře nebo barvením chromitým hematoxylinem podle Gomoriho. [14]

V histologické technice se dají prokazovat i anorganické látky (železo a kalcium). Průkaz železa je založen na Pearslově reakci s trojmocným železem nebo na reakci železa s turnbullovou modří. Kalcium se vyskytuje nejčastěji ve formě fosforečnanů a uhličitanů. K průkazu vápenatých solí se používá metoda podle Kossy a metoda Goshova. [14]

3.1.1.6 Montování histologických preparátů

Projasněné řezy se montují pod krycí sklo pomocí montovacího média, čímž je zajištěna trvalost histologického preparátu. Montovací médium musí být průhledné, nesmí poškozovat zbarvení tkáně a musí mít vysoký index lomu. Montovací média se dělí na 2 skupiny. [14]

Montovací média nemísící se s vodou (nerozpustná ve vodě) se rozpouštějí v xylenu (např. kanadský balzám, syntetická pryskyřice). Před zamontováním se řezy musí odvodnit vzestupnou řadou etanolů a projasnit v xylenu. [14]

Mezi montovací média mísící se s vodou (rozpustná ve vodě) patří glycerin, glycerinová želatina, levulózový sirup a sirup z arabské gummy. Toto montování je vhodné pro barvení na průkaz tuků, kdy nesmí preparáty přijít do styku s koncentrovaným etanolem a xylenem. [14]

3.1.1.7 Interpretace výsledků

Při prohlížení histologických preparátů se zároveň sleduje několik aspektů, esenciálně pak tkáční vlastnosti sledovaných buněčných struktur v konvenčním

Hematoxylin eosinu, dále mitotická aktivita, (ne)přítomnost známek regrese, cirkulační změny, cytologické atypie, poruchy základní architektiky apod. V dalších krocích je podle potřeby vyšetření doplňováno speciálními barvicími technikami, imunohistochemií či molekulární genetikou. Celkový morfologický obraz/profil nálezu v korelaci s dostupnými klinickými daty umožní posléze stanovení přílehlé histologické diagnózy.

3.1.2 Imunohistochemické vyšetření

V imunohistochemii rozeznáváme v dvě základní metody: přímá a nepřímá.

Přímá metoda se využívá v elektronové mikroskopii, protože pro světelnou mikroskopii není dostatečně citlivá. Dochází k aplikaci primární protilátky s navázanou značkou. [4] Primární protilátky mohou být značeny fluoresceinem, enzymem nebo kovem. Tato metoda se hojně používá v elektronové mikroskopii na nativních řezech. [8]

Známo je více nepřímých metod: dvoustupňová, kde se váže enzym na sekundární protilátku, nebo třístupňová, kdy se na označenou sekundární protilátku váže označená terciální protilátka. [9]

Princip trojstupňové metody spočívá ve vrstvení jedné nebo více neznačených imunoglobulinových reagensů na primární protilátku přímo vázané na antigen. PAP metoda využívá vazby křenové peroxidázy na sekundární protilátku. V prvním kroku se nanese primární protilátka na řez, který obsahuje prokazovaný antigen. V druhém kroku se vrství neznačená sekundární protilátka proti imunoglobulinům zvířete, ze kterého byly vyrobeny protilátky v obou krocích. Sekundární protilátka tvoří spojovací můstek. Musí být dodána v nadbytku, aby nebyla obsazena obě místa Ig molekuly. Ve třetím kroku se aplikuje peroxidáza-anti-peroxidáza komplex. [8]

U metody APAAP se nahrazuje PAP komplex alkalická fosfatáza-anti alkalická fosfatáza komplexem. [8]

ABC metoda (avidin-biotin-peroxidázový komplex) je založena na principu neimunologické reakce vaječného bílkovinného proteinu avidinu s vitamínem biotinem. Avidin může vázat čtyři molekuly biotinu. Primární protilátka se naváže na sekundární protilátku konjugovanou s biotinem. V další fázi se na sekundární protilátku váže komplex avidin-biotin-peroxidáza. Avidin se může získat i z bakterie *Streptomyces avidini*, tento komplex se pak nazývá streptavidin-biotin-peroxidáza komplex (SABC). [8]

Vlastní stanovení se provádí ve více krocích, mezi které patří příprava preparátu pro vlastní reakci (antigenní vyhledávání, blokace endogenní peroxidázy, inkubace primární protilátky, aplikace detekčního systému, montování vzorku) a vlastní hodnocení a interpretace výsledku imunohistochemické metody patologem. [3]

I imunohistochemie má svá úskalí, která se odvíjí od jejich optimalizace a standardizace. Důležitou úlohou pro stanovení je správně provedená preanalytická fáze zpracování primárního vzorku, která se odvíjí od použitého druhu fixačního činidla a trvání fixace. Dalším důležitým bodem pro vlastní stanovení je příprava tkáňového řezu. Optimální tloušťka řezu se pohybuje kolem 3 - 7 μm . Řezy tenké méně než 3 μm vykazují velmi slabou intenzitu zbarvení. Řezy silnější než 7 μm mohou vést ke ztrátě řezu či mohou bránit analýze. Největší problémy se vyskytují v načítání antigenů, ve výběru, citlivosti a ředění primární protilátky, protože protilátky proti stejným antigenům mohou poskytovat odlišné výsledky. Mezi další faktory patří použití detekčních systémů a interpretace výsledků podle zkušenosti patologa. [3]

3.1.2.1 Odběr a zpracování materiálu

Odebraný materiál pro imunohistochemické vyšetření je velmi cenný, proto se klade důraz na jeho odběr a zpracování. Manipulace s materiálem musí být rychlá a šetrná. [4]

Způsoby odběru:

- Excize (vyříznutí)
- Seškrábnutí malých částek tkáně pomocí kyrety (kyretáž)
- Punkce- napíchnutí orgánu dutou jehlou
- Odsátí [8, 14]

3.1.2.2 Fixace materiálu

Fixace je děj, při kterém dochází k vysrážení bílkovin protoplazmy buněk a tkání pomocí fixačního činidla. Fixace zabraňuje autolýze materiálu a vede k stabilizaci buněk a tkání. Fixace vždy ovlivňuje strukturu proteinu a aktivitu enzymů. Pro imunohistochemické vyšetření se používají kryostatové nebo parafinové řezy. Od toho se odvíjí způsob fixace. V bioptickém provozu je naprostá většina materiálu fixovaná formolem a zalitá v parafinu. Často není k dispozici dostatek informací o složení a pH fixační tekutiny, době fixace, době a teplotě při zalévání do parafinu, které ovlivňují následné imunohistochemické vyšetření. Citlivost řady epitopů je kolem teploty 60°C. [9]

Základní požadavky na fixaci:

1. prevence osmotických změn a morfologických změn
2. retence všech tkáňových a buněčných komponent
3. zachování všech původních vazeb a reaktivity proteinů, lipidů a ostatních buněčných složek [9]

Aldehydy

Zachovávají část enzymové a imunoglobulinové aktivity. Řadí se sem formolaldehyd, neutrální formol, absolutní alkohol, Methacarn, Carnoyova a Bouinova tekutina. [8]

Absolutní alkohol a Carnoyova tekutina dobře zachovávají cytoplazmatické intermediální filamentární proteiny. [8]

Bouinova tekutina pomaleji proniká do tkáně. Doporučuje se pro vyšetření endokrinní tkáně a tumorů. Skládá se z 40% formolu, 1% kyseliny pikrové a kyseliny octové. [8]

Methacarn patří k nejoblíbenějším fixačním tekutinám. Je složen z metanolu, chloroformu a kyseliny octové. Není vhodný pro fixaci větších bloků. [9]

Pro průkaz se také používají kryostatové řezy, které se fixují metanolem nebo acetonem. [4]

3.1.2.3 Zhotovení preparátu pro IHC

Příprava preparátu je obdobná jako u histologického vyšetření (viz kapitoly 2.1.1.3 Krájení parafinových řezů, 2.1.1.4 Odparafinování řezů)

3.1.2.4 Revitalizace antigenu

Vazebná místa na antigenu mohou být obsazena vlivem bílkovin při fixaci. Tyto místa se musí zpřístupnit pomocí natrávení proteolytickými enzymy např. trypsinem či pepsinem, povařením v citrátovém pufru v mikrovlnné troubě, tlakovém hrnci nebo vodní lázni. Využívá se zde fyzikálního a chemického působení na tkáň. Tento krok lze provést na deparifinovaných řezech [8]

3.1.2.5 Blokování endogenní aktivity enzymů

Pro průkaz vazby antigenu a protilátky se využívají protilátky značené enzymem (peroxidáza, alkalická fosfatáza). Protože mnoho typů buněk vykazuje vlastní aktivitu enzymů (např. peroxidázy), mohou negativně ovlivnit výsledek ve smyslu falešné reaktivity pozadí. Z toho vyplývá nutnost blokování aktivity enzymu. [8]

U protilátek značených peroxidázou se používá jako blokátor aktivity 1-3% roztok peroxidu vodíku (H_2O_2) v metanolu nebo destilované vodě po dobu 20-30 min. [8] Endogenní peroxidázovou aktivitu vykazují hemoproteiny, jako hemoglobin (erytrocyty), myoglobin (svalová vlákna), cytochromy (granulocyty, monocyty), a katalázy (játra a ledviny). [9]

V případě potlačení aktivity alkalické fosfatázy lze použít 1mM levamizolu v substrátovém roztoku (někteří doporučují 5mM roztok). Endogenní alkalická fosfatáza se vyskytuje v kosti, ledvinách, játrech a leukocytech. [9]

Pro blokování endogenní aktivity avidinu a biotinu se používá roztok 0,01% avidinu a 0,01% biotinu po dobu 20 min. Biotin je zastoupen v řadě tkání např. v játrech a ledvinách. [9]

3.1.2.6 Blokování pozadí

Nespecifické reakce pozadí způsobuje falešnou pozitivitu. Důvody nespecifické reakce pozadí:

- hydrofobní interakce
- elektrostatická vazba
- endogenní aktivita enzymů
- endogenní avidin-biotinová aktivita
- přirozené protilátky
- kontaminované reagensy
- křížová reakce protilátky s podobnými epitopy na různých antigenech
- difúze antigenu
- Fc receptory
- nekróza, poškození, vyschnutí [8]

Hydrofobní interakce

Tkáňové proteiny jsou více hydrofobní po fixaci fixačními tekutinami obsahující aldehydy a výrazně ovlivňují pozadí. Zamezení vazby tkáňových proteinů napomáhá optimalizace fixace (čas, pH s teplota). Do skupiny tkáňových proteinů patří pojivová tkáň (např. kolagen, laminin, elastin, proteoglykany), tukové pojivo a epitelie (např. keratin). Hydrofobní vazba je dále ovlivněna přítomností iontů v pufrch. Na snížení hydrofobní vazby se podílí fosfáty, sírany, chloridy, dusičnany, kationty NH_4^+ , K^+ , Na^+ a Ca^{2+} . Metoda vedoucí ke snížení hydrofobie je aplikace blokujícího roztoku proteinů v samotném roztoku nebo pufru. [8]

Elektrostatická vazba

Vzniká při setkání proteinů opačného náboje. Dá se eliminovat použitím pufrů s vyšší iontovou silou nebo přidáním 0.1 až 0,5M NaCl. [8]

Endogenní aktivita enzymů

Enzymová aktivita se odstraní blokováním enzymů jejich substrátem (viz kapitola 3.1.2.5 Blokování endogenní aktivity enzymů). [8]

Kontaminované reagentie cizorodými látkami

Kontaminace bývá způsobena nesprávnou manipulací a špatným skladováním. [8]

Fc receptory

Nespecifická reakce s Fc receptory jsou přítomny v cytoplazmatických membránách a často na makrofázích a granulocytech. [8]

3.1.2.7 Primární protilátky

Protilátky slouží k detekci genových abnormalit, včetně mutací, genových amplifikací a specifických chromozomálních přemístování spojených s novými chimérickými proteiny. Nové primární protilátky jsou vyráběny komerčně. Významným milníkem v imunohistochemické diagnostice jsou monoklonální myší protilátky, které vykazují uniformitu, čistotu a nekonečnou dostupnost. [15]

Jedna studie naznačila, že králičí monoklonální protilátky vykazují zvýšenou citlivost bez zjevné ztráty specifčnosti ve srovnání s odpovídajícími monoklonálními protilátkami myší. [16]

Protilátky se musí používat ve spojení s pečlivým hodnocením rutinního barvení Hematoxylin eosin v histologických preparátech a klinicko-patologickým vztahem. [10]

Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky se získávají imunizací experimentálního zvířete specifickým imunogenem, který nese příslušný antigen. Velký počet klonů plazmatických buněk produkuje protilátky. Výsledkem jsou polyklonální protilátky s lišící se specifitou vůči různým epitopům imunogenu. [4]

Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky jsou produktem jednoho klonu plazmatických buněk (hybridní buňky). Jedná se o buňky vytvořené z plazmatických a myelomových buněk. Myelomová buňka zajišťuje neomezený růst. Plazmatické buňky produkují stejné protilátky. Monoklonální protilátky mají známou specifitu ke konkrétnímu epitopu. [7]

3.1.2.8 Inkubace s primární protilátkou

Doba inkubace závisí na citlivosti a koncentraci použité primární protilátky, stejně jako na kvalitě řezu tkáně. Vlastní vazba tkáňového antigenu s primární protilátkou probíhá optimálně po dobu 30 minut při 37°C nebo při pokojové teplotě ve vlhké

komoře. I když nedochází k celkovému vysušení preparátu, může vlivem odpaření roztoku protilátky dojít k následnému zvýšení koncentrace protilátky, což může vést ke vzniku nežádoucího barevného pozadí. Vlhká komora obsahuje nosiče, na kterých ulpívají preparáty. Při inkubaci se musí zabránit odvodnění protilátky, aby se nedostala do oblastí ostatních preparátů. Inkubace může být také prodloužena za určitých okolností, zde je opět vlhká komora částečně naplněná vodou. Použijeme-li barvení přes noc, pokud to umožňují dané primární protilátky, při velmi vysokých ředění a jsme schopni často dosáhnout dobrých výsledků se sníženou nespecifickou reakcí barvení pozadí (vzít protilátku, zředit jí 10-krát nebo dokonce 100-krát, a pak se inkubují po dobu 12 do 24 hodin). Tento přístup šetří množství protilátky a snižuje barvení pozadí kvůli snížené nespecifické reakci protilátky (protilátka je přítomen v mnohem nižší koncentraci, čímž má vysokou afinitou k imunologickým reakcí). Při použití této metody (zředěné primární protilátky, prodloužení doby inkubace primární protilátky) je možná praktická úvaha pro zavedení do mnoha laboratoří a má výhody při harmonogramu práce a snížení nákladů na drahé protilátky na základě vyššího ředění primární protilátky. [10]

3.1.2.9 Inkubace s detekčním systémem

Nejprve je dobré dodržovat pokyny výrobce, pokyny pro koncentraci každého činidla a dodržení přesného postupu dle detekčního systému. Inkubace se provádí obvykle při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Aplikace činidla na každý preparát je jednoduchá, ale velmi důležitá. Musí být pokryt kompletně tkáňový řez. Opatrnosti je potřeba, protože celá část tkáně musí být ponořena v činidle. Nesmí se zde vyskytovat žádné vzduchové bubliny. [10]

3.1.2.10 Chromogeny

Vazba antigenu a protilátky není viditelné. Pro zviditelnění proběhlé reakce se používají chromogeny. [8]

K dispozici je několik různých chromogenů (detekční systémy způsobující barevné reakce). Detekční systém značený peroxidázou (např. PAP) se používá jako chromogen 3,3- diaminobenzidín (DAB). Křenová peroxidáza reaguje se substrátem H_2O_2 v roztoku, přičemž oxiduje DAB za vzniku hnědého produktu. [8] DAB je v alkoholu nerozpustný, což je vhodné pro použití s následnou širokou škálou barvicích a montovacích technik. AEC se stal více používaný. Je obecně považován za méně rizikový karcinogen než DAB a tak byl zvýhodněný obchodní dodavateli imunohistologických činidel. Nespotřebovaný roztok DABu musí být zlikvidován v nadbytku vody. v průběhu pracovního použití je DAB ředěný, nebezpečí je minimální. Výrobci poskytují DAB připravený k vlastnímu použití. To má nesporné výhody (např. pohodlí, bezpečnost a méně enviromentálního znečištění). [10]

Pro všeobecné účely se běžně používají DAB nebo AEC. AEC produkuje ostré červené zbarvení, které dobře kontrastuje s Hematoxylinem. Preparáty musí být zamontovány médiem mísící se s vodou (např. 80% glycerol), protože AEC vytváří produkty rozpustné v alkoholu. Dehydratace prostřednictvím etanolu je třeba se vyhnout. Glycerolové montovací přípravky mohou být trvale utěsněny potřením okraje krycího sklíčka lakem na nehty. [10]

3.1.2.11 Barvení pozadí a montování preparátů

Konečným krokem imunohistochemického stanovení je obarvení jaderných struktur Hematoxylinem a zamontování preparátu. Podle zkušeností a času expozice Hematoxylinu závisí částečně na tom, jak čerstvý roztok barviva je (čerstvě připravený roztok Hematoxylinu vyžaduje mnohem kratší dobu, než dělá expozice ve starém

roztoku). AEC se používá montovací médium mísící se s vodou. Montovací médium se zahřeje až zkapalní. Jedna ze dvou metod: buď je jedna kapka umístěna na tkáňovém řezu, a krycí sklo je pomalu položeno na podložní sklo nebo jedna kapka je umístěna ve středu podložního skla a krycí sklo se na ně přikládá. V obou případech se musí zabránit zachycení vzduchové bubliny mezi sklem a tkáňovým řezem. DAB tvoří produkty nerozpustné v alkoholu, pro lze použít trvalé montovací médium. Před vlastním zamontováním preparátů se musí tkáňové řezy odvodnit ponořením do vzestupné řady alkoholů (90% a 100%) a poté vložit do xylynu. [10]

3.1.2.12 Kontroly

V imunohistochemii se používají pozitivní a negativní kontroly. Pozitivní kontroly musí obsahovat příslušný antigen. Negativní kontroly potvrzují specifčnost použité metody a slouží ke zjištění přítomnosti nespecifického pozadí barvení. To je definováno barvením testovací tkáně v nepřítomnosti primární protilátky. Správné používání těchto kontrol je nezbytné pro správnou interpretaci imunohistochemických výsledků. [10]

3.1.2.13 Interpretace imunohistochemických výsledků

Posuzuje se přítomnost a nepřítomnost antigenu v materiálu. Jakékoli barvení se hodnotí vždy v kontextu klinické anamnézy pacienta a jiných diagnostických vyšetření provedených kvalifikovaným patologem. [17]

3.1.2.14 Automatizace v IHC

Vzhledem k velké variabilitě fixace vzorku a následného zpracování mezi laboratořemi, nebylo možné stanovit univerzální standardní postup pro IHC. Cílem se

stala standardizace metody v rámci jediné laboratoři, což je provedeno v přísném uplatňování kontrol, jakož i dodržováním všech aspektů metody, včetně přípravy preparátů, příprava a aplikace činidel, sledování inkubačních časů. Standardizace metody a reprodukovatelné testy, v kombinaci s rostoucí poptávkou po včasném a přesném výsledku, vyžaduje automatizaci. Samostatný postup barvení pro ruční metodu vyžaduje péči zručného laboranta k získání kvalitních výsledků. [10]

Automatizované nástroje jsou navrženy tak, aby napodobily ruční metody barvení. Zahrnují použití činidla, inkubaci tkání a opláchnutí preparátů. [10]

Použití automatizace pro imunohistochemické metody nabízí několik výhod. Skutečná výhoda automatizace je v tom, že poskytuje jednotné a standardizované prostředí. Malé množství činidel je dávkováno přesně. Šetří množství imunohistochemických činidel a tím i finanční náklady. Mnoho výrobců dodávat vlastní reagentie, enzymy, chromogeny a kontrastní barvení, které musí být použity ve spojení s jejich přístroji. Na reagentiích připravených k použití se nachází čárové kódy, které umožňují počítačově řízené sledování a monitorování objemu činidla, čísla šarže a data expirace. Použití automatizovaného přístroje sníží náklady na personální zdroje. [10]

Na trhu jsou k dispozici 2 typy automatizovaných barvicích automatů pro rutinní IHC a ISH- Leica BOND- MAX a Leica BOND III. Mezi jejich přednost patří minimální ztráta tkáně, vysoká kvalita barvení, dávkování malého množství reagentií, rychlost zpracování a tím i zkrácená doba vyšetření. Přístroje jsou plně automatizované s možností připojení na LIS, což zabrání dvojité manipulaci. Údržba přístrojů je méně náročná. [18]

3.1.2.15 Vývoj imunohistochemických metod na PAT, Nemocnice Písek, a.s.

Zrod Imunohistochemické laboratoře na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s. úzce souviselo se vznikem mamografického centra v Nemocnici, Písek, a.s. do té doby se v jihočeském kraji do roku 2006 nacházela pouze dvě akreditovaná mamografická centra se sídlem v Českých Budějovicích. Ženy

z píseckého, strakonického a tábořského regionu byly nuceny dojíždět na mamografické vyšetření do odlehlejších míst kraje. Dalším impulsem pro vznik mamografického centra byla horší návaznost následné péče. Doba od objevení nádoru k jeho léčbě se zbytečně prodlužovala. Nemocnice Písek, a.s. měla k dispozici tým erudovaných specialistů s několikaletými zkušenostmi na diagnostickém mamografu a sonografu. Přínosem se stala i komplexnost řešení pozitivně detekovaných pacientek léčených v krátkém časovém úseku. Po vyjednání smluvních podmínek se zdravotními pojišťovnami na kód preventivní mamografie mohlo mamografické centrum zahájit svou činnost. Z počátku se program potýkal s problémy s informovaností veřejnosti a klinických lékařů. Mamografický screening je plněn hrazen ženám od 45. roku věku ve dvouletých intervalech.

Vznik imunohistochemické laboratoře se datuje k červnu 2004. Do té doby PAT rutinně diagnostikovalo nádorové afekce prsu běžnou světelnou mikroskopií. Stanovení hormonálních receptorů (ER, PR), proliferativní aktivity (Ki-67) i c-erbB-2 onkoproteinu (HER2/neu) bylo prováděno formou konzultace v zařízení vyššího typu. Za podpory zkušenějšího personálu na Patologickém oddělení, Nemocnice České Budějovice, a.s. a po četných školeních PAT, Nemocnice Písek, a.s. převzala metodiku imunohistochemie a stala se soběstačnými. Po některých nezdarech na začátku se imunohistochemická metoda stala nepostradatelnou a PAT začala dosahovat validních výsledků, o které se může opřít diagnostika zhoubných novotvarů.

Na počátku byla laboratoř kompletně vybavena. PAT si zvolila jako dodavatele reagensů pro imunohistochemii firmu Dako. K demaskování epitopu byla zakoupena mikrovlnná trouba a používal se citrátový pufr o pH v rozmezí 6,0-6,2. Docházelo k silanizaci podložních skel, která napomáhala k udržení histologických řezů na sklech, protože tkáň během stanovení podléhá velkému zatížení (např. při demaskování epitopu, oplachování preparátu promývacím pufrům). Přes komplikace s demaskováním epitopů v mikrovlnné troubě byla v roce 2006 mikrovlnná trouba nahrazena varem preparátů v hrnci s citrátovým pufrům. Roku 2007 došlo k rozšíření palety primárních protilátek a PAT měla k dispozici 14 primárních protilátek od firmy Dako. Mezi těchto 14 primárních protilátek patří monoklonální myší protilátka ER (Monoclonal Mouse

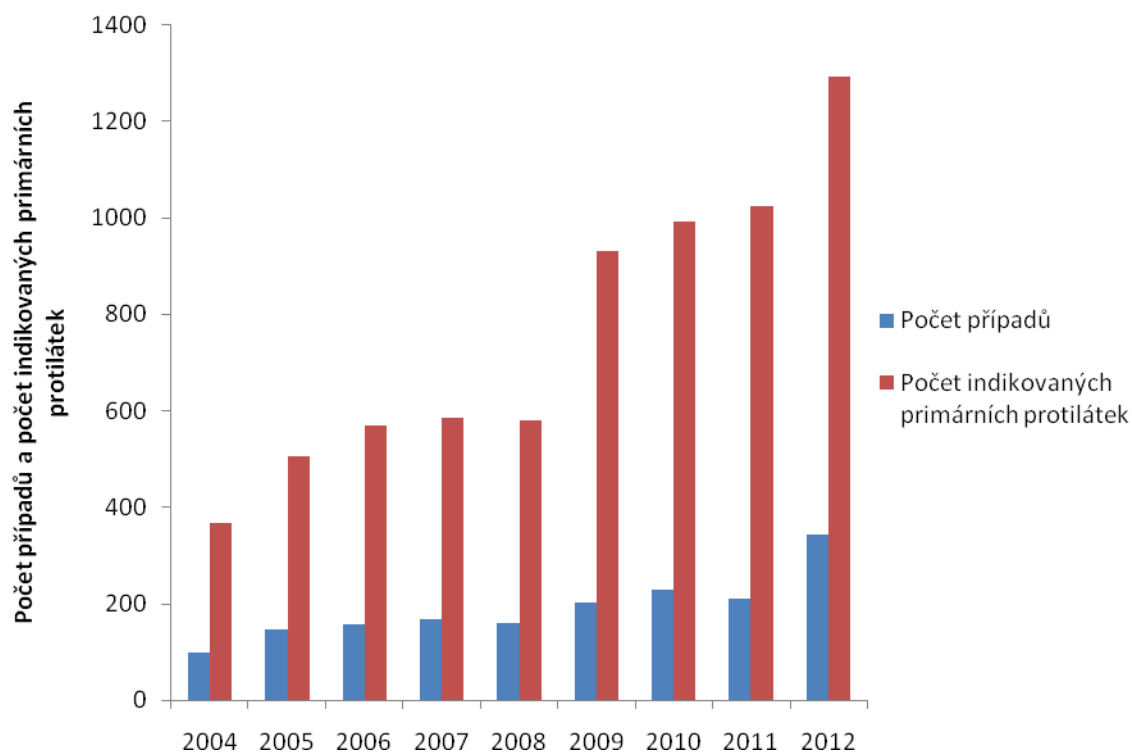
Anti-Human Estrogen Receptor α), monoklonální myší protilátka PR (Monoclonal Mouse Anti-Human Progesteron Receptor), monoklonální myší protilátka Ki-67 (Monoclonal Mouse Anti-Human KI-67 Antigen), polyklonální králičí protilátka c-erbB-2 (Polyclonal Rabbit Anti-Human c-erbB-2 Oncoprotein), polyklonální králičí protilátka S100(Polyclonal Rabbit Anti-S100), monoklonální myší protilátka SMA (Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin), monoklonální myší protilátka ME (Monoclonal Mouse Anti-Human Melanosome- klon HMB45), polyklonální králičí protilátka CHRA (Polyclonal Rabbit Anti-Human Chromogranin A, monoklonální myší protilátka BCL2 (Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2 Oncoprotein), monoklonální myší protilátka CD45/LCA (Monoclonal Mouse Anti-Human CD45, Leucocyte Commom Antigen), monoklonální myší protilátka CK AE1/AE3 (Monoclonal Mouse Anti-Human Cykeratin- klon AE1/AE3), monoklonální myší protilátka CK HMW (Monoclonal Mouse Anti-Human CK HMW High Molecular Weight). Všechny primární protilátky kromě polyklonální králičí protilátky c-erbB-2 se zakupují v balení, které je připraveno ihned k použití (ready to use). Polyklonální králičí protilátky c-erbB-2 se dodává v koncentrované formě, proto je nutno před použitím protilátku upravit na ředění, které doporučuje výrobce. V roce 2007 seznam primárních protilátek byl obohacen o další tři protilátky od stejné firmy monoklonální myší protilátka CD34 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD34 Class II), monoklonální myší protilátka DES (Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin) a polyklonální králičí protilátky PSA (Polyclonal Rabbit Anti-Human Prostate-Specific Antigen).

Roku 2009 PAT zavedlo do provozu vodní lázeň, která se velmi osvědčila při demaskování epitopu a byla nahrazena předešlou technikou. Postup demaskování se stal více kontrolovaným procesem a ustoupily problémy s poškozením řezů během vaření. V roce 2009 začalo PAT používat dalších 5 primárních protilátek. Mezi nejvýznamnější se zařadila monoklonální myší protilátka E-cad (Monoclonal Mouse Anti-Human E-Cadherin) a monoklonální myší protilátka VIM (Monoclonal Mouse Anti-Human Vimentin. Monoklonální protilátka E-Cadherin posunula diagnostiku karcinomu prsu o krok dál, protože díky této protilátce jsou lékaři schopni odlišit duktální a lobulární karcinom prsu.

V roce 2010 se PAT začala připravovat na akreditaci v návaznosti na normu ČSN EN ISO 15 189:2007 Zdravotnické laboratoře- Zvláštní požadavky na kvalitu a způsobilost. S tím souviselo zavedení odpovídající dokumentace a roku 2011 se zavedla verifikace imunohistochemických metod dle požadavků zmíněné normy. V březnu 2011 se opustila příprava silanizovaných skel. PAT podlehla trendu a začala si objednávat již komerčně připravená podložní skla Tissue-Tek® AutoWrite® StarFrost®White od firmy Sakura Finetek Europe B.V. StarFrosty se při imunohistochemickém vyšetření velmi osvědčily. Od roku 2010 PAT zaznamenala změnu demaskování epitopu, kdy výrobce primárních protilátek firma Dako doporučuje provádět revitalizaci antigenu v pufru o vyšším pH.

V roce 2012 úspěšně PAT dokončila akreditaci imunohistochemického vyšetření antigenů a zavedla 2 nové primární protilátky monoklonální myší protilátka CK 7 (Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 7) a monoklonální myší protilátka CK 20 (Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 20), což umožnilo patologům blíže specifikovat primární místo metastatického novotvaru. Po doporučení uvedlo PAT do provozu detekci p16^{INK4a} z cervikální biopsie pomocí CINtec© Histology Kitu.

V dnešní době má PAT k dispozici 20 primárních protilátek. Tato škála se zdá být dostačující pro diagnostiku „patologie okresního typu“. Každým rokem se zvyšují požadavky na imunohistochemické vyšetření, což zapříčinil nárůst výskytu novotvarů s rozvojem diagnostických metod. (Graf 1.)



Zdroj: LIS PAT

Graf 1. Schématické znázornění počtu případů a vyšetřených primárních protilátek na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s od roku 2004 do 2012

3.1.2.16 Vyšetřované antigeny a používané protilátky na PAT

p16

p16 je součástí buněčného cyklu pravidelné kaskády a je exprimována v jádrech a v cytoplazmě novotvarů spojených s lidským papilomavirem (HPV). Je zástupný ukazatel přítomnosti HPV. P16 potvrzuje zvýšené riziko HPV léze, jako invazivního cervikálního dlaždicového karcinomu nebo vysokého stupně dlaždicové intraepiteliální léze (HSIL), adenokarcinomu/adenokarcinomu in situ, a lehkého stupně dlaždicové intraepiteliální léze (LSIL). [10]

Na oddělení patologicko-anatomickém pro detekci p16^{INK4a} antigenu se používá monoklonální myší protilátka (klon E6H4TM) obsažená v CINtec© Histology Kitu od firmy mtm laboratoriem AG namířená proti lidskému p16^{INK4a} proteinu. Pozitivní nález p16^{INK4a} vykazuje souvislé barvení buněk bazální a parabazální vrstvy dlaždicového cervikálního epitelu nebo bez barvení buněk povrchových vrstev (difúzní typ barvení). [19]

S 100

S 100 proteinu je původně objevený v mozkové tkáni. S 100 se barví nukleárně nebo cytoplazmaticky. Studie za pomoci elektronového mikroskopu ověřila přítomnost S 100 proteinu v normálních i neoplastických melanocytech. Melanom je téměř vždy výrazně S 100 pozitivní. Pomocí S 100 lze identifikovat i varianty dalších novotvarů, včetně některých karcinomů, periferních nervových nádorů, a nádory, které obsahují myoepiteliální buňky, a v dendritických buňkách, které často doprovázejí novotvary. S 100 je specifický a cenný počáteční nástroj pro vyhledávání melanocytových nádorů. Diagnóza maligního melanomu může být potvrzena pozitivním barvením s protilátkami proti HMB-45 nebo Melan A (A103) v případech, kdy diagnóza zůstává nejasná. [10]

CD 45 (LCA)

CD 45 je znám pod pojmem leukocytům společný antigen (LCA). Jedná se o řadu transmembránových proteinů. Vyskytuje se na povrchu všech hematopoetických buněk kromě erytroidní a megakaryocytárních buněk. Komerčně dostupné monoklonální protilátky účinně označují lymfoidní buňky, a to jak benigní tak i maligní, a proto jsou vhodné pro rozlišení nádorů, které vycházejí z hemopoetických buněk. Barvení je obvykle membranózní. [10]

Vimentin

Vimentin je protein o hmotnosti 57 kDa, který byl původně izolován z kultury fibroblastů. Vimentin patří do intermediálních filament. Přítomnost vimentinu v měkkých tkáních omezuje jeho diagnostické využití v nádorové patologii. Nachází se v běžných proliferativních endometriálních epiteliálních buňkách a také ve většině endometriálních karcinomů. Koexpresi vimentinu a nízké molekulové hmotnosti cytokeratinu může pomoci v diferenciální diagnostice endocervikálního versus endometrického adenokarcinomu. [10]

Monoklonální myší protilátka proti Vimentinu od firmy Dako se uplatňuje při identifikaci buněk mezenchymálního původu v normálních i neoplastických tkáních. Buněčný vzor barvení je cytoplazmatický. [17]

Cytokeratiny

Běžně se používají cytokeratiny pro hodnocení lézí vrstvené dlaždicového epitelu vulvy, pochvy, děložního čípku. Patří sem AE1/AE3, CAM5.2 (cytokeratin o nízké molekulové hmotnosti) CK7 a CK20. CK7 a CK20 nejsou obvykle vyjádřeny v dlaždicovém epitelu. V endocervixu, žlázové buňky exprimují CK7 ale ne CK20, který je vidět v horní části pohlavního ústrojí (endometrium, ovaria a vejcovody). Hodnocení CK7 a CK20 je užitečné pro diferenciální diagnostiku Pagetovy nemoci vulvy a určujících nádorů negynekologického původu zahrnující dolní genitální trakt, jako je například přímé rozšíření z tlustého střeva nebo urologické nádory. [10]

Buňky značené monoklonální myší protilátkou Cytokeratin, klon AE1/AE3 (Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin, clone AE1/AE3 od firmy Dako) se barví cytoplazmaticky. [17]

Cytokeratin 7 (CK7)

CK7 se silně a difuzně barví u nádorů slinných žláz, plic, prsu, ovaria, endometria, močového měchýře a thymu, mezoteliomu, neuroendokrinních nádorů, adenokarcinomu pankreatu. CK7 různě barví nádory ze žaludku a žlučových cest. [10]

Buňky značené monoklonální myší protilátkou proti Cytokeratin 7 (Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 7 od firmy Dako) se barví cytoplazmaticky. [17]

Cytokeratin 20 (CK20)

CK20 se vyskytuje v gastrointestinálním epitelu a jeho nádorech a v ovariálních nádorech. CK 20 je fokálně pozitivní u nádorů prsu a plic. Slouží k identifikaci nádorů primárních nebo metastatických míst. Pozitivní prediktivní hodnota pomocí kombinace CK7 a CK20 pomáhá předpovědět přítomnost metastatického karcinomu tlustého střeva v játrech, na základě klinických výsledků. Použití panelu protilátek a intenzita imunohistochemického barvení je velmi důležitá v nejasných případech. [10]

Buňky značené monoklonální myší protilátkou proti Cytokeratin 20 (Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin 20 od firmy Dako) se barví cytoplazmaticky. [17]

Cytokeratin HMW

Keratiny HMW jsou pozorovány ve vrstevnatém epitelu a obecně nejsou přítomny v jednoduchém epitelu viscerálního typu. Bazální buňky prostaty a myoepiteliální buněčné populace a žlázo tkáně obsahují také hojně HMW typu II keratinů a LMW typu I keratinů. Praktické diagnostické použití protilátek je identifikovat bazální a myoepiteliální buňky v příslušných orgánech. Pro tkáně prostaty může přítomnost bazálních buněk vyloučit proces invazivního karcinomu. [10] Přestože absence bazálních buněk barvení v prostatě s touto protilátkou podporuje diagnózu karcinomu, nemůže být použit výhradně k diagnostice karcinomu v nepřítomnosti barvení. Výskyt

myoepiteliálních buněk v žláznových orgánech, jako jsou prsa, je důležité rozlišení benigní a maligních lézí. Tento keratin je také obvykle přítomen v dlaždicovém epitelu a použití vhodných protilátek je dobré pro detekci dlaždicového diferenciálního spinocelulárního karcinomu. [10]

Pozitivní barvení s monoklonální myší protilátkou proti CK HMW (Monoclonal Mouse Anti-Human Cytokeratin HMW) od firmy Dako napomáhá při rozlišení benigních žláz prostaty od adenokarcinomu prostaty a buněčný vzor se barví cytoplazmaticky. [17]

Stupeň imunohistochemického barvení s keratinem HMW a protilátkou je typicky silný, ale je vidět pouze fokálně ve viscerálních epitelových tkáních, jako je tlusté střevo, žaludek, ledviny a játra. [10]

Prostatický-specifický antigen (PSA)

PSA je jednořetězcový glykoprotein z 237 aminokyselin produkovaných výhradně prostatickými epiteliálními buňkami. PSA je rovnoměrně přítomen v apikální části sekrečních žlázek u normální nebo hyperplastické prostatě. Citlivost imunohistochemického barvení může být snížena ve špatně diferencovaných adenokarcinomech. PSA je citlivý a specifický imunohistochemický marker v diagnostice nádorů prostaty. [10]

Protilátka proti PSA se nachází na více než 95% karcinomů prostaty, ale jsou zde některé abnormality. PSA byl nalezen jako nerovnoměrné barvení v některých duktálních karcinomech slinných žláz, až u jedné třetiny karcinomů prsu a nádorů potních žláz, v periuretrálních žlazách u obou pohlaví, a v některých análních žlazkách. [10]

Polyklonální králičí protilátka proti PSA (Polyclonal rabbit Anti-Human Prostate-Specific Antigen) se barví v přítomnosti antigenu cytoplazmaticky. [17]

Ki-67

Jedná se o proliferační marker, který se používá k získání objektivních dat k zařazení nádorů a některých chorob. Ki-67 je nukleární protein, který se vyskytuje

ve všech fázích buněčného cyklu kromě klidové fáze G₀. Tento index zhruba koreluje s nádorovou třídou, a je důležitý v diferenciální diagnostice některých nádorů. [10]

Ki-67 byl rovněž zjištěn u benigních a reaktivních stavů, ve kterých je ztráta normálního dlaždicového zrání. Marker buněčné proliferace slouží jako diagnostická pomůcka a může poskytnout objektivní metodu k diagnostice lézí. Expresí Ki-67 antigenu není pozitivní nebo negativní nálezy. Hodnotí se procento pozitivních buněk a jejich konkrétní umístění. Ki-67 je snadno interpretovatelný, jako jaderná barvení je ostrý a jasný. Kromě toho, že je vždy pozitivní kontrola na preparátu, a to buď v epitelu nebo v lymfocytech. [10]

Chromogranin

Chromograniny jsou monomerní proteiny, které tvoří větší část rozpustný bílkovinný extrakt neurosekrečních granulí v neuroendokrinních buňkách. [20]

Buňky značené polyklonální králičí protilátkou proti Chromogranin A (Polyclonal Rabbit Anti-Human Chromogranin A) se barví cytoplazmaticky nebo granulačně. [17]

BCL-2 Oncoprotein

BCL2 onkoprotein je blokátorem smrti apoptických buněk. BCL2 byla první translokačně přidružená bílkovina identifikovaná v lymfomu. Přibližně tři čtvrtiny folikulárních lymfomů nesou translokaci, což vede k BCL2 overexpresi. BCL2 je obvykle přítomna v cytoplazmě B lymfocytů, příležitostně zárodečných centrech buněk a mnoha T lymfocytů. Je obsažen ve většině lymfomů z malých lymfocytů, včetně přibližně 80% folikulárních lymfomů. [10]

Buňky značené monoklonální myší protilátkou proti BCL2 onkoprotein (Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2 oncoprotein) se barví cytoplazmaticky. [17]

Aktiny

Mezi nejužitečnější skupinu cytoplazmatických determinant pro definici myogenní diferenciace je bílkovina aktin. [21] Existuje šest hlavních izoform těchto mikrofilamentárním kontraktilních polypeptidů, které byly určeny pro svalové tkáně:

α kosterního svalu (skeletal muscle-alpha), α a γ hladkého svalu (smooth muscle-alpha a gamma), α srdečního svalu (cardiac muscle-alpha), β a γ aktiny. [22]

Protilátka označuje buňky hladké svaloviny, myofibroblasty a myoepitelové buňky. Protilátka je užitečná pro identifikaci leiomyomů a leiomyosarkomů. [10]

Monoklonální protilátka proti SMA (Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin) od firmy Dako vykazuje cytoplazmatické barvení. [17]

CD 34

CD 34 je možný ukazatel cévní diferenciace. Je velmi citlivý na endoteliální diferenciaci, bez ohledu na stupeň nádoru. Běžně se používá jako doplněk k diagnóze některých nádorů. [10]

Monoklonální protilátka proti CD 34 (Monoclonal Mouse Anti-Human CD 34) od firmy Dako vykazuje membránovní barvení. [17]

Desmin

Desmin je cytoplazmatický intermediální filamentární protein. Nachází se ve svalových buňkách a v novotvarech s nimi spojených. Desmin se uplatňuje jako specifický marker pro myogenní diferenciaci nádorů z měkké tkáně (např. leiomyomy). [10]

Monoklonální primární protilátka proti Desminu (Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin) vykazuje cytoplazmatické zbarvení a může mít charakter vláken. [17]

c-erbB-2 Oncoprotein (HER2)

Jedná se o transmembránovou tyrosinkinázu o relativní molekulové hmotnosti 185 kDa, která patří k epidermálním růstovým faktorům. Aktivace onkoproteinu je klíčová pro růst a diferenciaci. Overexprese onkoproteinu c-erbB-2 je patrná u lidských karcinomů. [10] Tento receptor se vyskytuje u 20-30% karcinomů prsu. Imunohistochemické stanovení Her2 je screeningový test a má důležitou roli v diagnostickém testování Her2 pro léčbu trastuzumabem. Pokud je barvitelnost nejednoznačná detekuje se amplifikace genu Her2 fluorescenční hybridizací in situ. [23]

Monoklonální protilátka HerceptinTM blokuje aktivaci onkoprotein c-erbB-2 a využívá se pro léčbu karcinomu prsu. [10]

Polyklonální králičí protilátka proti c-erbB-2 onkoprotein slouží pro diagnostiku karcinomu prsu, plicních adenokarcinomů, kolorektálních adenokarcinomů, plicních adenokarcinomů z dlaždicového epitelu a karcinomů žaludku. Pro onkoprotein c-erbB-2 je specifické barvení buněčné membrány. [17]

Progesteron receptor (PR), Estrogen receptor (ER)

ER a PR jsou důležitými prognostickými faktory u karcinomů prsu. Pokud je ER přítomen v nádorových buňkách karcinomu prsu, předpokládá se, že je nádorový růst endokrinně řízen. [24] Přítomnost ER a PR je dobrý předpoklad úspěšnosti terapie tamoxifenem a jiných endokrinních terapií. Nepřítomnost ER a PR předpovídá časnou recidivu a nízkou šanci na přežití. Monoklonální protilátka je vhodná pro stanovení hladiny exprese progesteronového receptoru v tkáni u karcinomu prsu. Imunohistochemické vyšetření se hodnotí semikvantitativně. Buňky značené monoklonální protilátkou proti ER (Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor α) nebo monoklonální protilátkou proti PR (Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor) vykazuje jaderné barvení. [17]

Melanosome klon HMB 45

Antigen indikuje aktivní tvorbu melanosomu, a tedy melanocytickou diferenciaci. [10]

Monoklonální myší protilátka proti Melanosome klon HMB 45 je vhodná pro identifikaci melanocytů s tvorbou nezralých melanosomů v normální kůži, nervu a tkáni melanomu. Výsledky napomáhají k zařazení melanomů a melanocytových lézí a při rozlišování nemelanotických melanomů od špatně diferencovaných nádorů nejasného původu. Buněčný vzor je cytoplazmatický. [17]

E-cadherin

E-cadherin je transmembránový protein. E-cadherin se nachází v duktálním karcinomu prsu a v lobulárním karcinomu chybí, což napomáhá k jejich odlišení. [10]

Monoklonální protilátka proti E-cadherinu (Monoclonal Mouse Anti-Human E-cadherin) dává mebranózní a nebo cytoplazmatické zbarvení. [17]

4 Cíle práce

Cílem práce je porovnat speciální metodiky k dourčení novotvarů- histologické (základní) vyšetření a od toho se odvíjí výběr speciálních (dourčovacích) metod speciální barvicí metody v histologii versus imunohistochemické metody. Dále chci zmapovat vývoj imunohistochemických metod a volbu primárních protilátek a jejich uplatnění na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s. a zjistit nové trendy v imunohistochemii a její uplatnění v budoucnosti.

5 Metodika

5.1 Charakteristika

Na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s. jsem zpracovávala praktickou část bakalářské práce, která se uskutečnila od 1.1.2011 do 31.12.2012.

Vyšetřovaný soubor se skládal ze vzorků, které byly morfologicky posouzeny dle histologického vyšetření lékařem jako maligní melanomy. U těchto vzorků bylo použito k potvrzení diferenciální diagnostiky maligního melanomu imunohistochemické vyšetření pomocí monoklonální myší protilátky proti ME (klon HMB45) od firmy Dako a polyklonální králičí protilátky proti S100 proteinu od firmy Dako a speciální barvicí techniku v histologii pomocí argentafinní reakce, kterou se prokazuje pigment melanin. Za rok 2012 jsem jich takto vyšetřila 14.

Další vyšetřovaný soubor se týkal vzorků myogenních novotvarů a jejich rozlišení. Po základním histologickém vyšetření bylo 94 vzorků postupně ještě imunohistochemicky vyšetřeno pomocí monoklonální myší protilátky proti SMA a monoklonální myší protilátky proti DES od firmy Dako a provedeno přehledné barvení Hematoxylin van Gieson. Pomocí barevní Hematoxylin van Gieson odlišují jádra buněk, kolagenní vazivo a svalovina, což se uplatňuje u myogenních novotvarů, které obsahují svalová vlákna.

5.2 Preanalytická fáze

Zásady pro správný odběr materiálu jsou popsány v Laboratorní příručce Oddělení patologicko-anatomického, Nemocnice Písek, a.s. [25]

Odebraný materiál se ihned vkládá do nádoby naplněné z části fixační tekutinou. Podle objemu vzorku se fixační tekutina doplní. Autolyzovaný materiál je hůře zpracovatelný a pro většinu metod nevhodný. Nejčastěji se používá v běžné praxi

10% formol. Primární vzorek se s průvodním listem zašle na PAT, kde je zkontrolována správnost údajů na nádobce s primárním vzorkem a průvodním listem. Po kontrole údajů jsou vzorky přijímány pod laboratorním číslem do LISu.

5.3 Analytická fáze

5.3.1 Základní histologické vyšetření

Po příjmu vzorku lékař makroskopicky popíše primární vzorek a ukrojí z tkáně morfoloicky abnormální části a vybere následný typ vyšetření nezbytný pro stanovení diagnózy. [26]

Tkáňové bloky jsou následně vkládány do umělohmotných či kovových kazet opatřených víčkem. Tyto krabičky mají různé rozměry podle velikosti a objemu daného materiálu. Kazeta je označena laboratorním číslem pacienta a obsahuje údaje o počtu tkáňových bloků a typu indikovaného barvení. Poté se kazety vkládají do kovového košíku a propírají se pod tekoucí vodou 10 minut. Košíček s kazetami se vloží do tkáňového automatu Histomaster DDM- P800 od firmy MDS Group- Bavimed GmbH (viz Příloha 1), který je naprogramovaný, aby se košík přenášel do určitých lázní s roztoky v časovém intervalu a udržoval tekutý parafin při teplotě 65°C. Odvodnění tkáně pomocí vzestupné řady etanolu, prosycení tkáně xylenem a parafinem probíhá na PAT přes noc. [26]

Následující pracovní den se tkáňové bloky zalévají do tekutého parafinu přehřátého na teplotu 62°C pomocí parafinové zalévací linky TES 99 od firmy Medite- Medizintechnik (viz Příloha 2). Parafinové bločky se chladí na chladícím modulu TES 99.410 od firmy Medite- Medizintechnik GmbH přibližně 30 minut až 1 hodinu. Zchlazené parafinové bločky se krájí na mikrotomu HM 200 Ergostar od firmy Microm GmbH (viz Příloha 3). Pomocí tohoto mikrotomu histologické řezy dosahují tloušťky 3 až 4 µm. Ukrojené tenké řezy se napínají na vodní lázni, která obsahuje roztok destilované vody s želatinou. Zde probíhá selekce ukrojených řezů.

Nejkvalitnější histologické řezy se natahují na označené podložní sklo a histologické preparáty se vkládají do nosiče. [26]

Barvení Hematoxylin eosin

PAT k základnímu histologickému barvení využívá barvicí automat AutoStainer XL (ST 5010) od firmy Leica Microsystems (viz Příloha 4). Barvicí automat má k dispozici píčku, kde se suší histologické preparáty při teplotě 63°C po dobu 15 minut. Poté se preparáty v nosiči dopraví do lázní s xylenem, kde probíhá odparafinování histologických řezů 21 minut. Následně se nosič oplachuje ve 3 lázních 96% etanolu od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové 1 minutu a 30 vteřin a ve 2 lázních s tekoucí vodou po dobu 1 minuty a 30 vteřin. Histologické řezy jsou nyní připraveny k vlastnímu barvení. Nosič se vkládá do Harrisova hematoxylinu od firmy Merck spol. s.r.o., kde se histologické řezy barví 2 minuty. Diferenciace jader probíhá v tekoucí vodě v časovém intervalu 4 minut. Nosič se barví v 1% etanolovém roztoku eosinu od firmy SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH 2 minuty. Poté se histologické řezy oplachují v lázních s 96% etanolem, aceton, v roztoku acetonu s xylenem v poměru 1:1 a xylenu od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové 2 minuty a 45 vteřin. Histologické řezy se uzavírají pod krycí sklo pomocí montovacího média Entellanu od firmy Merck spol. s.r.o. [27]

5.3.2 Barvení Hematoxylin van Gieson

Hematoxylin van Gieson patří na PAT mezi ruční metody barvení. Před vlastním barvením se musí histologické řezy ukrojit, natáhnout na podložní sklo, usušit v biologickém termostatu BT 120 od firmy Laboratorní přístroje u.p. při teplotě 60°C po dobu 20 minut, odparafinovat v xylenu 20 minut a proprat histologické řezy v sestupné řadě etanolů (96%, 80%, 70%) od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové. Skleněný nosič se vloží na 2 až 5 minut do Harrisova hematoxylinu od firmy Merck spol. s.r.o. Po uplynutí této doby se histologické řezy oplachují pod tekoucí

vodou do zmodrání jader. Poté se histologické preparáty barví 5 až 10 minut v roztoku van Gieson od firmy SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH. Jak bylo zmíněno již dříve, histologické preparáty se v dalším kroku oplachují v 96% etanolu, acetonu a xylynu dodané od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Barvení hematoxylin van Gieson se též montuje do Entellanu od firmy Merk spol. s.r.o. [27]

5.3.3 Argentafinní reakce

Nejprve se ukrojí histologické řezy z parafinového bloku a natáhnou se na podložní sklo. Preparáty se suší 20 minut v biologickém termostatu BT 120 od firmy Laboratorní přístroje u.p. při teplotě 60°C. Po usušení se řezy před vlastním provedením reakce odparafinují 20 minut v xylynu a oplachují sestupně řadě etanolů (96%, 80%, 70%) od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové a ve vodě. v prvním kroku argentafinní reakce se odparafinované řezy oxidují v Lugolově roztoku připraveném v Lékárně, Nemocnice Písek, a.s. 10 minut. Opláchnuté řezy destilovanou vodou se impregnují ve tmě 24 hodin v amoniakálním roztoku stříbra od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové. Po uplynutí stanovené doby se řezy opláchnou v destilované vodě a fixují se 5 minut v roztoku 5% thiosíranu sodného od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové. Následně se řezy opět propírají v tekoucí vodě po dobu 5 minut a v destilované vodě. Jádra se dobarvují jádrovou červení SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH 5 minut. Řezy se oplachují pod tekoucí vodou a odvodňují v 96% etanolu, oplachují v acetonu a aceton-xylynu a projasňují v xylynu od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové. Obarvené preparáty se montují do Entellanu od firmy Merk spol. s.r.o. [27]

5.3.4 Imunohistochemické metody

Při imunohistochemickém vyšetření antigenů se klade důraz na informace vyplývající z doporučení výrobce, což je v případě PAT firma Dako.

Před každým imunohistochemickým vyšetřením se musí zkontrolovat pH promývacího pufru o pH 7,4- 7,8 (Wash Buffer) od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové a pufru, který slouží k demaskování epitopů o pH 9 (Epitope Retrieval Solution) od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové.

Oproti histologickému vyšetření se tkáňové řezy natahují na speciální podložní potažená skla- Tissue-Tek® AutoWrite® StarFrost®White od firmy Sakura Finetek Europe B.V. Preparáty se suší v nosiči v biologickém termostatu BT 120 od firmy Laboratorní přístroje u.p. při teplotě 60°C optimálně po dobu 24 hodin. Po uplynutí stanovené doby se preparáty ponoří do xylenu na 20 minut, kde dochází k deparafinaci. Po vyjmutí nosiče se preparáty oplachují v sestupné řadě etanolů (96%, 80%, 70%) od firmy Dr. Kulich Pharma, s.r.o. Hradec Králové a destilované vodě. Následuje vložení nosiče do nádobky s pufrem o pH 9, který je umístěný ve vodní lázni. V digitální vodní lázni GTR 190 od firmy I.S. Co srl Sede Operativa Via Sardegna (viz Příloha 5) dochází k demaskování epitopů při teplotě 97°C po dobu 20 minut. Po uplynutí této doby se nádobka s nosičem vyjme a nechá se chladnout při pokojové teplotě 20 minut. Po zchlazení se preparáty oplachují v kyvetě v promývacím pufru 5 minut. Před vlastní aplikací reagensů je nutno udělat kroužek kolem tkáňového řezu tužkou PAP-PEN, aby se zabránilo roztékání chemikálií po celém preparátu. Tužka obsahuje lipidní substance. Dalším krokem je zablokování endogenní peroxidázy, kdy se na preparáty nanese 10% roztok peroxidu vodíku od firmy OVERLACK AG EURO-ŠARM s.r.o. a nechá se působit 10 minut ve vlhké komoře, aby nedocházelo k vyschnutí tkáňových řezů. Po uplynutí stanovené doby se preparáty vyjmou z vlhké komory a oplachují se v kyvetě promývacím pufrem. Na jednotlivé řezy se aplikuje primární protilátka pro diagnostiku maligního melanomu monoklonální myší protilátka proti ME (Monoclonal Mouse Anti-Human Melanosome- klon HMB45) od firmy Dako a polyklonální králičí protilátka proti S100 (Polyclonal Rabbit Anti-S100) od firmy

Dako. V případě diagnostiky myogenních novotvarů se aplikuje monoklonální myší protilátka proti DES (Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin) od firmy Dako a monoklonální myší protilátka proti SMA (Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin) od firmy Dako. Takto nanesené primární protilátky se inkubují 30 minut ve vlhké komoře. Poté se řezy opět oplachují promývacím pufrem. Na jednotlivé řezy se aplikuje značený polymer Dako Envision + Dual Link System- HRP od firmy Dako a nechá se inkubovat 30 minut ve vlhké komoře. Následně se preparáty oplachují v promývacím pufru. Po odstranění přebytku promývacího pufru se na tkáňové řezy nanáší směs DAB+ Chromogenu a DAB+ Substrate Buffer od firmy Dako, který se před aplikací musí naředit (1 kapka DAB+ Chromogenu a 1 ml DAB+ Substrate Buffer). Preparáty se takto ponechají ve vlhké komoře 10 minut. Pokud tkáňový řez obsahoval prokazovaný antigen, výsledkem je hnědé zbarvení vytvořených imunokomplexů. Po uplynutí stanovené doby se preparáty oplachují v kyvetě s destilovanou vodou. V další fázi se obarví preparáty Harrisovým hematoxylinem po dobu 1 minuty, což slouží k zvýraznění jader. Preparáty se oplachují vodou dokud nezmodrají jádra. V posledním kroku se preparáty oplachují v 96% etanolu, acetonu, acetonu s xylenem a v xylenu. Po vyjmutí z xyleny se preparáty uzavírají pod krycí sklo pomocí Entellanu od firmy Merk spol. s.r.o. a jsou připraveny pro mikroskopické hodnocení. [27]

5.4 Postanalytická fáze

Diagnostika, kterou provádí lékař (patolog), je založena na komparaci zjištěných morfologických změn (nejčastěji buněk či tkání) a odborných zkušeností ke stanovení závěrečné diagnózy, které získal v rámci svého dosavadního vzdělávání v oboru patologická anatomie. K tomuto účelu navíc využívá dostupnou odbornou literaturu včetně obrazových atlasů, medicínské webové servery i pomoc svých kolegů v rámci konzultací. [26]

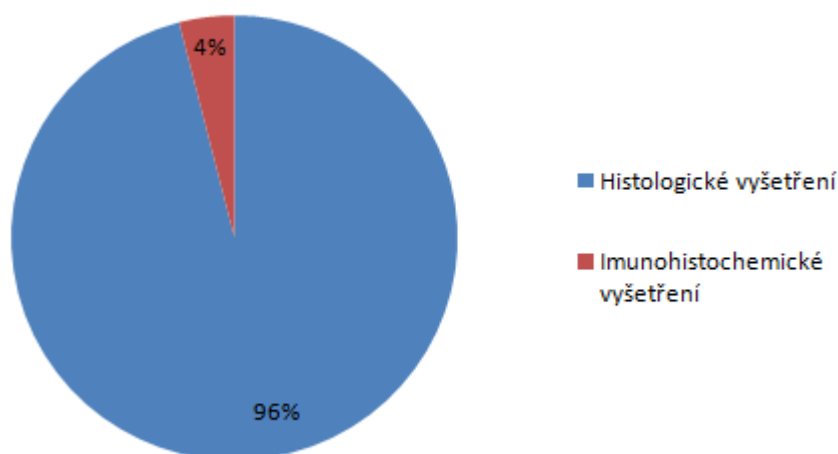
Histologicky zpracované preparáty obarvené Hematoxylinem eosinem a speciálními technikami v histologii se mikroskopicky prohlížejí při zvětšení 40x, 100x, 200x a 400x oproti imunohistochemické metodě, kdy se preparáty sledují při zvětšení 100x, maximálně 200x.

Při diagnostice maligního melanomu se sledují z Hematoxylinu eosinu buněčné struktury a přítomnost melaninu (Příloha 6, Příloha 7), transepidermální propagace (Příloha 8) a mitotická aktivita (Příloha 9). V dalších krocích je vyšetření doplňováno o imunohistochemické stanovení S 100 proteinu a HMB 45 a o argentafinní reakci, kde se prokazuje přítomnost melaninu. Melanin vykazuje při impregnaci amoniakálním roztokem stříbra černé zbarvení (Příloha 10). S 100 protein se barví při pozitivní reakci s příslušnou protilátkou cytoplazmaticky nebo nukleárně a HMB 45 cytoplazmaticky.

Při diagnostice myogenních novotvarů např. leiomyomů se bere na zřetel z Hematoxylinu eosinu buněčná struktura a její vlastnosti, (ne)přítomnost známek regrese, cirkulační změny, cytologické atypie, poruchy základní architektiky (Příloha 13, Příloha 14, Příloha 15). U barvení Hematoxylin van Gieson se sleduje přítomnost svaloviny, která se barví při pozitivní reakci žlutě někdy slabě žlutě (Příloha 16). Při imunohistochemickém vyšetření desminu a hladkosvalového aktinu se pozoruje přítomnost či nepřítomnost těchto antigenů, které se s příslušnými protilátkami barví cytoplazmaticky (Příloha 17, Příloha 18).

6 Výsledky

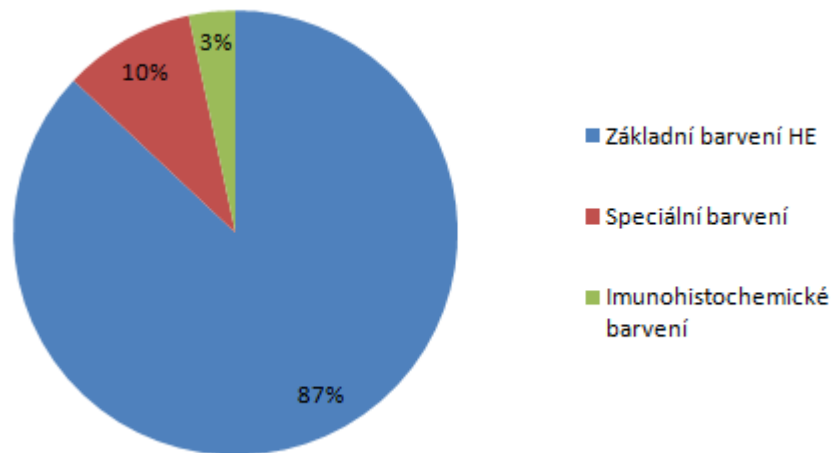
Od 1.1.2011 do 31.12.2012 bylo histologicky vyšetřeno 8 221 vzorků z toho imunohistochemicky 334 vzorků (Graf 2.).



Zdroj: Autor

Graf 2. Znázornění poměru počtu histologických a imunohistochemických vyšetření na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s. za rok 2012

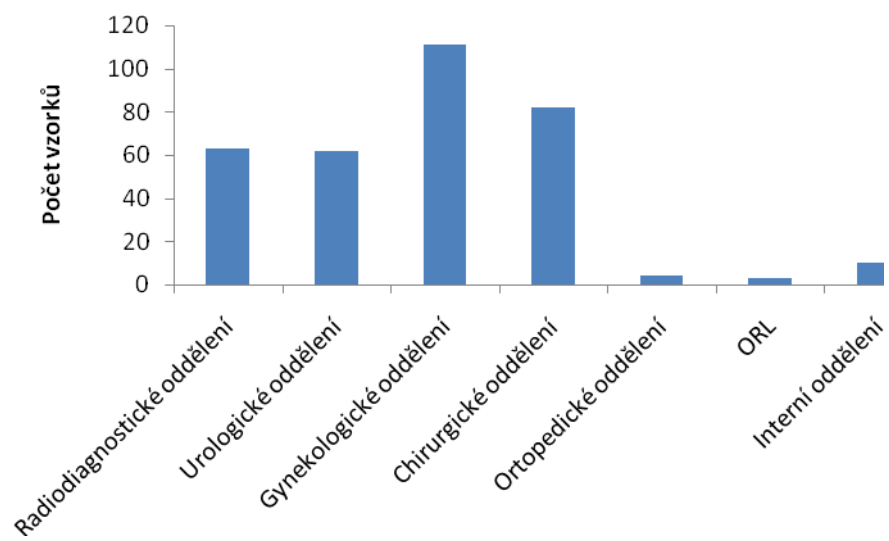
U histologických vzorků bylo vytvořeno 33 169 základních preparátů obarvených barvením Hematoxylin eosin a 3 660 preparátů, kde byly použity speciální barvicí metody v histologii. Při imunohistochemickém vyšetření bylo vytvořeno 1 237 preparátů (Graf 3.).



Zdroj: Autor

Graf 3. Znázornění poměru počtu histologických preparátů obarvených barvením Hematoxylin eosin (HE), speciálními barvicími metodami v histologii a imunohistochemickým barvením na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s. za rok 2012

Z níže uvedeného grafu (Graf 4.) je patrné, u kterých pacientů se nejčastěji provádí imunohistochemické vyšetření. Nejvíce imunohistochemických vyšetření se indikuje z gynekologického, chirurgického a urologického oddělení, což souvisí s operativními zákroky. Z gynekologického oddělení se nejvíce detekuje p16^{INK4a} z konizátu cervixu nebo cervikální biopsie pomocí CINtec© Histology Kitu. Z oddělení urologie dominuje v našem portfoliu profilování punkčně biopťovaných vzorků z předstojné žlázy, dále z resekátů močového měchýře popř. z varlat pomocí škály cytokeratinů a prostatického specifického antigenu. Z oddělení chirurgie a radiodiagnostiky nejčastěji doplňuje imunohistochemické vyšetření stavu hormonálních receptorů, proliferační aktivity prostřednictvím klonu MIB 1 indexu a dále eventuálně overexprese Her-2/neu onkoproteinu u mammárního karcinomu.



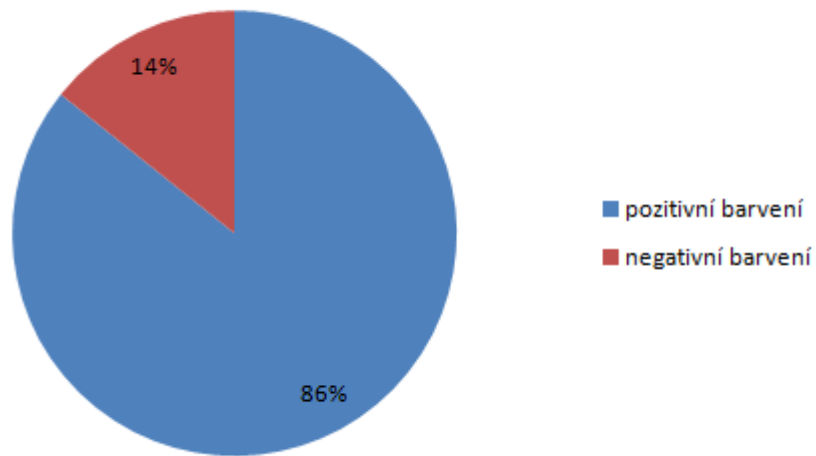
Zdroj: Autor

Graf 4. Znázornění počtu vzorků vyšetřených imunohistochemicky podle jednotlivých oddělení v Nemocnici Písek, a.s. za rok 2012

Tab. 1 Výsledky stanovení maligního melanomu pomocí imunohistochemické metody (monoklonální myší protilátka proti ME klon HMB45 a polyklonální králičí protilátka proti S100, oboje od firmy Dako) a argentafinní reakce

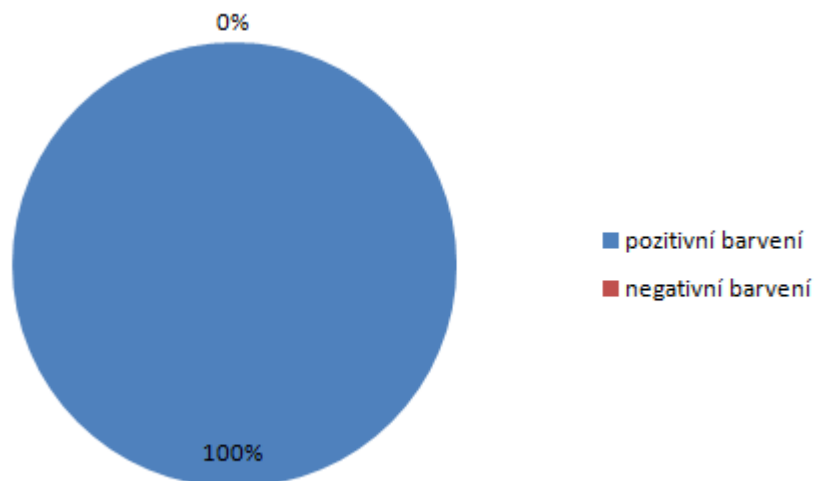
Typy vyšetření	Počet vzorků
Počet maligních melanomů diagnostikovaných v roce 2012	14
Imunohistochemické vyšetření pomocí protilátky anti-S100:	
Pozitivní barvení	14
Slabě pozitivní barvení	0
Negativní barvení	0
Imunohistochemické vyšetření pomocí protilátky anti-HMB45:	
Pozitivní barvení	12
Slabě pozitivní barvení	0
Negativní barvení	2
Speciální barvení- argentafinní reakce:	
Pozitivní barvení	11
Slabě pozitivní barvení	0
Negativní barvení	3

Zdroj: Autor



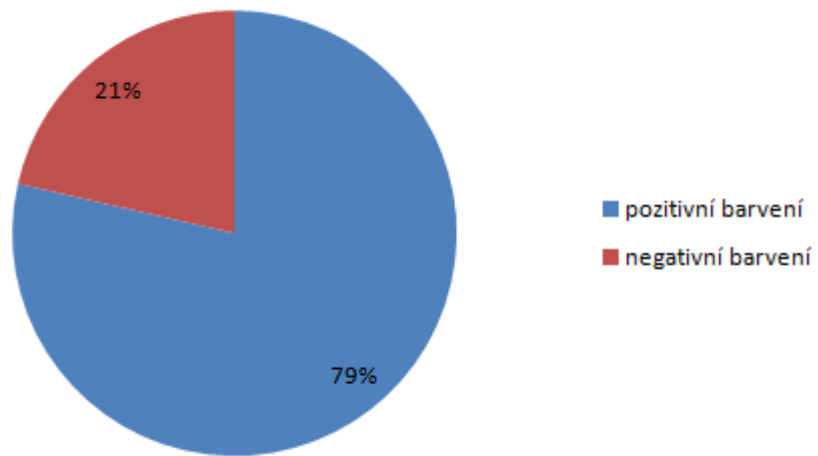
Zdroj: Autor

Graf 5. Znázornění přítomnosti HMB 45 pomocí imunohistochemie ve vyšetřovaných maligních melanomech



Zdroj: Autor

Graf 6. Znázornění přítomnosti S 100 proteinu pomocí imunohistochemie ve vyšetřovaných maligních melanomech



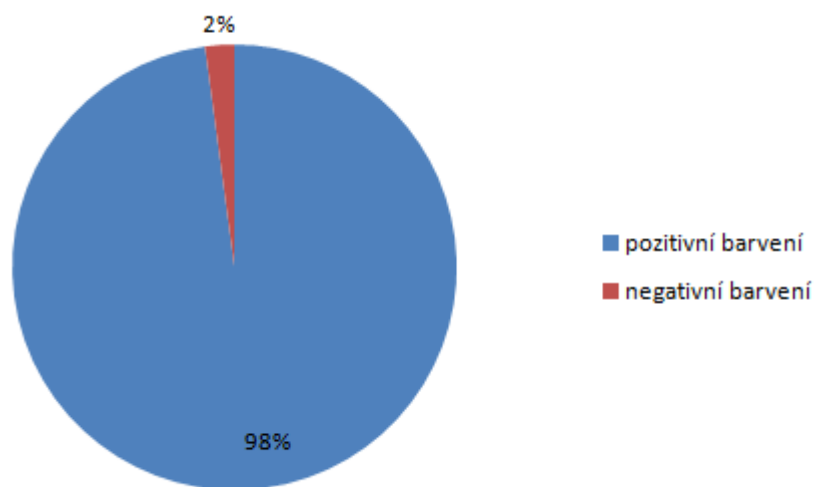
Zdroj: Autor

Graf 7. Znázornění přítomnosti melaninu pomocí argentafinní reakce v maligních melanomech

Tab. 2 Výsledky stanovení myogenních novotvarů pomocí imunohistochemické metody (monoklonální myši protilátky proti SMA a proti DES od firmy Dako) a Hematoxylinu van Gieson

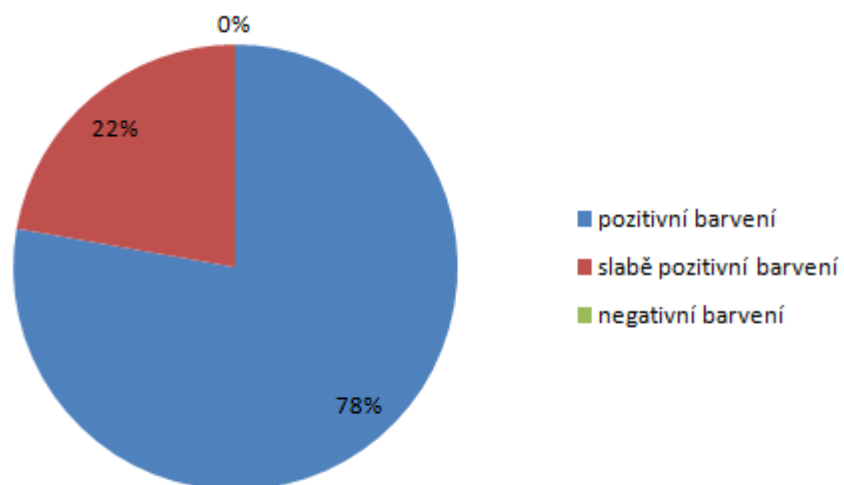
Typy vyšetření	Počet vzorků
Počet myogenních novotvarů diagnostikovaných v roce 2012	94
Imunohistochemické vyšetření pomocí protilátky anti-SMA:	
Pozitivní barvení	92
Slabě pozitivní barvení	0
Negativní barvení	2
Imunohistochemické vyšetření pomocí protilátky anti-DES:	
Pozitivní barvení	92
Slabě pozitivní barvení	0
Negativní barvení	2
Speciální barvení dle Hematoxylin van Giesona :	
Pozitivní barvení	72
Slabě pozitivní barvení	22
Negativní barvení	0

Zdroj: Autor



Zdroj: Autor

Graf 8. Znázornění přítomnosti desminu a hladkosvalového aktinu stanoveného pomocí imunohistochemie ve vyšetřovaných myogenních novotvarech



Zdroj: Autor

Graf 9. Znázornění zastoupení svalstva zviditelněné barvením Hematoxylin van Gieson ve vyšetřovaných myogenních novotvarech

Tab. 3 Specifita a senzitivita speciálního barvení v histologii a imunohistochemie

	Speciální barvení	Imunohistochemie
senzitivita	nižší	vysoká
specifita	nižší	vysoká

Zdroj: Autor

7 Diskuze

V bakalářské práci se zaměřuji se na porovnání speciálních metodik k dourčení maligních melanomů a myogenních novotvarů pomocí histologického (základního) vyšetření a od toho se odvíjejícího výběru speciálních (dourčovacích) metod- speciální barvicí metody v histologii versus imunohistochemické metody.

Při diferenciální diagnostice maligního melanomu se uplatňují barvicí metodiky na průkaz pigmentu melaninu, mezi které patří argentafinní reakce. Argentafinní reakce není specifická, protože se kromě melaninu roztokem stříbra impregnují i jiné látky přítomné v cytoplazmě např. lipofuscin a granula v některých buňkách. Průkaz pigmentu je značně komplikovaný, protože většina reakcí není dost specifická. Je vhodné používat kromě průkazu pigmentu více metod a porovnat jejich výsledky např. metoda na průkaz polysacharidů (PAS reakce) a lipidů (sudanová čerň). [14]

Při stanovení diagnózy maligního melanomu je nezbytné posuzovat více parametrů, jež odpovídají morfologickým atypiím a biologickému chování novotvaru. Imunohistochemické vyšetření je důležité indikovat v případech, kdy není možné jednoznačně stanovit diagnózu ze základního barvení Hematoxylin eosin. Toto se může aplikovat u amelanotický melanomů, u nádorů s pagetoidním růstem bez dalších známek svědčící pro melanom nebo u některých malobuněčných nádorů napodobující melanom. Nejčastěji se indikuje protilátka proti S 100 proteinu a protilátka HMB 45, Mart-1/Melan a a Ki-67. [12]

S 100 protein je senzitivní, ale nepříliš specifický diagnostický prostředek. Není vhodný pro rozlišení maligních a benigních melanocytových lézí. Slouží k odlišení melanomu od jiných diferencovaných nemelanomových novotvarů. [12] Monoklonální protilátka S 100 značila 100% kožních melaninů.

Naopak monoklonální protilátka HMB 45 vykazuje vysokou specifitu s melanomem, ale reaguje s omezeným počtem jiných novotvarů např. prsu. [12] Autoři Šaty A. M., Vogel A. M., Hoak D., Gough F. a McNutt M. A. poukázali na absolutní specifitu pro hodnocení melanocytárních nádorů, kdy monoklonální protilátka HMB 45

reagovala s 60 z 62 melanomů. Protilátka HMB 45 je vhodná pro rozlišení špatně diferencovaných nádorů nejistého původu. [28]

Amelanotické melanomy jsou obtížně odlišitelné od jiných epiteliálních a nonepiteliálních maligních lézí vzhledem k absenci pigmentu melaninu, proto je nutné provést imunohistochemické vyšetření. Amelanotické melanomy vykazují imunoreaktivitu na HMB 45, S 100 proteinu a Melanu. [29]

Při diferenciální diagnostice myogenních novotvarů se v současné době uplatňuje přehledné barvení Hematoxylin van Gieson v podstatně menší míře, než tomu bylo v minulosti. Hlavním problémem zůstává menší specifita a někdy i nejednoznačná diferencovatelnost barevných odstínů ve vlastním preparátu znesnadňující až znemožňující v některých případech spolehlivé stanovení diagnózy. Z tohoto důvodu je dnes v případě potřeby verifikace myogenní charakteristiky novotvaru v mnoha laboratořích upřednostňován imunohistochemický průkaz hladkosvalového aktinu a desminu (mimo jiných) jako klíčových parametrů. S výhodou lze pak využít pozitivní protilátkové reakce s hladkosvalovým aktinem u myoepitelíí při pátrání po event. invazivitě především k odlišení in situ a mikroinvazivních tumorů ve žlazových orgánech.

Mezi hladkosvalové markery patří desmin, hladkosvalový aktin (SMA) a svalový specifický aktin (MSA). U 30 leiomyosarkomů byly imunohistochemicky vyšetřeny hladkosvalové markery. Desmin byl nalezen u 28 leiomyosarkomů, SMA u 30 leiomyosarkomů a MSA u 29 leiomyosarkomů. [30]

V kombinaci se pak oba přístupy dobře doplňují a poskytují již poměrně vysokou míru jistoty při určování původu buňky.

8 Závěr

Na Oddělení patologicko-anatomickém, Nemocnice Písek, a.s. byly za rok 2012 vyšetřeny imunohistochemicky 4% všech přijatých vzorků. Z celkového počtu histologických preparátů bylo obarveno 87% preparátů pouze Hematoxylinem eosinem, 10% preparátů navíc speciální barvicí metodou v histologii a 3% doplněno o imunohistochemií. Nejvíce se imunohistochemie uplatňuje v operativních oborech gynekologie, chirurgie a urologie a díky otevření mamografického centra a možnostech screeningového programu i radiodiagnostický obor.

Imunohistochemické vyšetření použité v diagnostice maligních melanomů pomocí monoklonální protilátky proti HMB 45 bylo úspěšné v 86% a u polyklonální protilátky proti S 100 ve 100% oproti barvení argentafinní reakce na průkaz pigmentu melaninu, které napomohlo v diagnostice ze 79%. Tímto souborem se vyšetřilo 14 vzorků v roce 2012.

U myogenních novotvarů se vyšetřilo 94 vzorků, u kterých pozitivita barvení pomocí monoklonální protilátky proti SMA a proti Desminu dosahovala 98%. Hematoxylin van Gieson barvil 78% svaloviny se silnou intenzitou a 22% se slabou pozitivitou.

V diferenciální diagnostice tumorů myogenního původu se v současné době upřednostňují před speciálním barvením imunohistochemické metody pro vysokou míru senzitivity i specificity, stejně jako v diferenciální diagnostice maligního melanomu.

9 Seznam použitý informačních zdrojů

1. Stříteský J. *Patologie*. 1. vyd. Olomouc: Epava, 2001, 338 s. ISBN 80-862-9706-3.
2. Idikio H. A. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life- cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains [online]. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009 November 25. 3:169-176. [cit. 2013-02-20].
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809997/>
3. Matos L. L., Trufelli D. C., De Matos M. G., Da Silva Pinhal M. A. Immunohistochemistry as an important tool in biomarkers detection and clinical practice [online]. *Biomark Insights*. 2010 February 9. 5:9-20. [cit. 2013-02-20]
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2832341/>
4. Jirkovská M. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 1. vyd. Praha: Galén, ©2006, 2009, 80 s. ISBN 978-80-7262-263-4.
5. Konrádová V., Uhlík J., Vajner L. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: HaH Vyšehradská s.r.o., 2000. 291 s. ISBN 80-86022-80-3.
6. Vacek Z. *Histologie a histologická technika: Histologie I. část*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1995 [1996]. 332 s. ISBN 80-7013-201-9.
7. Hořejší V., Bartůňková J. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. 316 s. ISBN 978-807-3872-809.

8. Gomolčák P. *Základy imunohistochémie v patologii*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1997, 91 s. ISBN 80-701-3239-6.
9. Lukáš Z., Dráberová E., Feit J., Vojtěšek B. *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice*. 1. vyd. Brno: Lékařská fakulta Masarykovy universitu v Brně, 1997, 147 p. Sborník prací Lékařské fakulty v Brně, č. 112. ISBN 80-210-0620-X.
10. Dabbs D. *Diagnostic immunohistochemistry*. 2nd ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2006. 828 s. ISBN 04-430-6652-3.
11. Shi S. R., Key M. E., Kalra K. L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven rating of tissue sections [online]. *J Histochem Cytochem*. 1991 Jun. 39(6):741-8. [cit. 2013-02-25].
Dostupné z: <http://jhc.sagepub.com/content/39/6/741.long>
12. Krajsová I. *Melanom*. 1. vyd. Praha: MAXDORF s.r.o nakladatelství odborné literatury, 2006. 332 s. ISBN 80-7345-096-8.
13. Fletcher CH. D. M., Unni K. K., Mertens F. *Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. 1. vyd. Lyon: IARC Press, 2002. 427 s. World Health Organization classification of tumours, vol. 4. ISBN 92-832-2413-2.
14. Vacek Z. *Histologie a histologická technika: Histologická technika II. část*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1995 [1996]. 184 s. ISBN 80-7013-202-7.

15. Leong A. S., Leong T. Y. Newer developments in imunohistology [online]. *J Clin Pathol.* 2006 November. 59 (11):1117-1126. [cit. 2013-02-21]. DOI: 10.1136/jcp.2005.031179.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1860504/>
16. Rossi S., Laurino L., Furlanetto A., Chinellato S., Orvieto F., Facchetti F., Dei Tos A. P. O. D. Rabbit monoclonal antibodies: a komparative study between a novel category of immunoreagents and the corresponding mouse monoclonal antibodies [online]. *Am J Clin Pathol.* 2005 August. 124(2):295-302. [cit. 2013-02-24].
Dostupné z: <http://ajcp.ascpjournals.org/content/124/2/295.long>
17. Materiály firmy Dako.
18. Materiály firmy Leica Microsystems.
19. Materiály firmy mtm laboratoriem AG), Germany.
20. Wilson B. S., Lloyd R. Detection of chromogranin in neuroendocrine cells with a monoclonal antibody. *Am J Pathol* [online]. 1984 June. 115(3):458–468. [cit. 2013-02-26]
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1900512/>
21. Miettinen M. Antibody specificity to muscle actins in the diagnosis and clessification of soft tissue tumors [online]. *Am J Pathol.* 1988 January. 130(1):205-215. [cit. 2013-03-11].
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1880550/>

22. Schurch W., Skalli O., Seemayer T. A., Gabbiani G. Intermediate filament proteins and actin isoforms as markers for soft tissue tumor differentiation and origin. I. Smooth muscle tumors [online]. *Am J Pathol.* 1987 June. 128(1):91-103. [cit. 2013-02-26].
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1899783/>
23. Ainsworth R., Bartlett J. M., Going J. J., Mallon E. A., Forsyth A., Richmond J., Angerson W., Watters A., Dunne B. IHC for Her2 with CBE356 antibody is a more accurate predictor of Her2 gene amplification by FISH than HercepTest in breast carcinoma [online]. *J Clin Pathol.* 2005 October. 58(10):1086-90. [cit. 2013-04-06].
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1770743/>
24. Abrahámová J., Povýšil C., Horák J. a kolektiv. *Atlas nádorů prsu.* 1. vyd. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2000, 328 s. ISBN 80-7169-771-0.
25. Laboratorní příručka Oddělení patologicko-anatomické, Nemocnice Písek, a.s.
Dostupné z: http://www.nemopisek.cz/images/stories/oddeleni/Patologie/PAT_Laborator_%20prirucka%2005.pdf
26. Instrukce- Oddělení patologicko-anatomické, Nemocnice Písek, a.s
27. Standardní operační postup- Oddělení patologicko-anatomické, Nemocnice Písek, a.s
28. Gown A. M., Vogel A. M., Hoak D., Gough F., McNutt M. A. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes [online]. *Am J Pathol.* 1986 May, 123(2):195-203. [cit. 2013-04-11].
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1888307/>

29. Shetty K. J., Prasad H. L., Rai S. Primary amelanotic melanoma of vulva in a young, lactating female [online]. *Indian J Surg Oncol*. 2012 March. 3(1):36-7. [cit. 2013-04-22]. DOI: 10.1007/s13193-011-0118-y.
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3372597/>
30. Hasegawa T., Hasegawa F., Hirose T., Sano T., Matsuno Y. Expression of smooth muscle markers in so called malignant fibrous histiocytomas [online]. *J Clin Pathol*. 2003 September. 56(9):666-71. [cit. 2013-04-22].
Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1770045/>

10 Klíčová slova

Argentafinní reakce

Imunohistochemie

Histologické vyšetření

Hematoxylin eosin

Hematoxylin van Gieson

Maligní melanom

Myogenní novotvary

11 Přílohy

Příloha 1: Tkáňový automat Histomaster DDM- P800 od firmy MDS Group- Bavimed GmbH



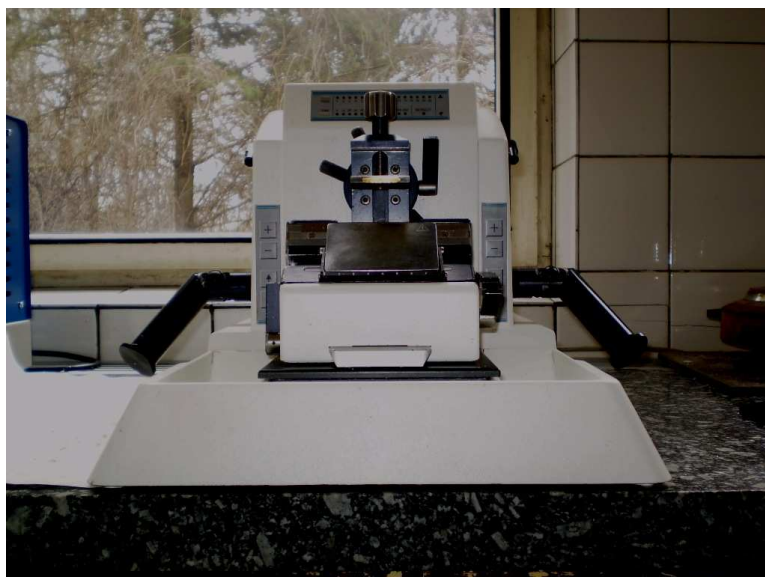
Zdroj: Autor

Příloha 2: Parafinová zalévací linka TES 99 od firmy Medite- Medizintechnik



Zdroj: Autor

Příloha 3: Mikrotom HM 200 Ergostar od firmy Microm GmbH



Zdroj: Autor

Příloha 4: Barvicí automat AutoStainer XL (ST 5010) od firmy Leica Microsystems



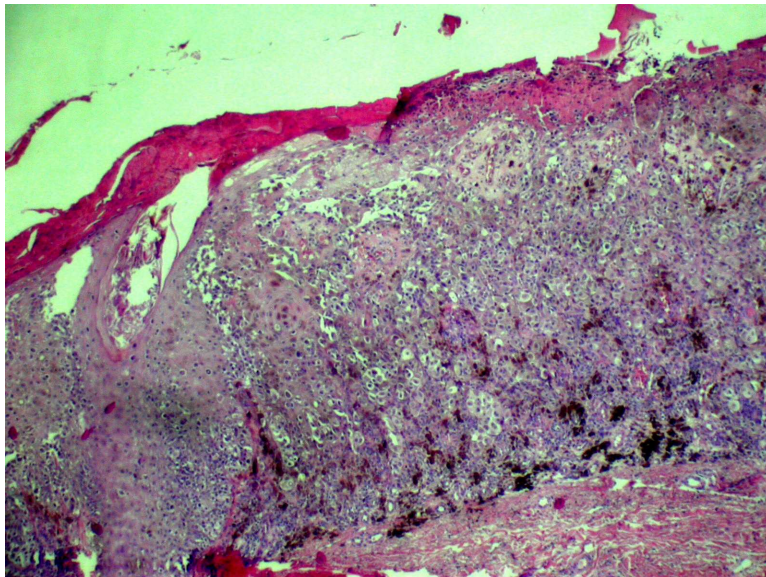
Zdroj: Autor

Příloha 5: Digitální vodní lázeň GTR 190



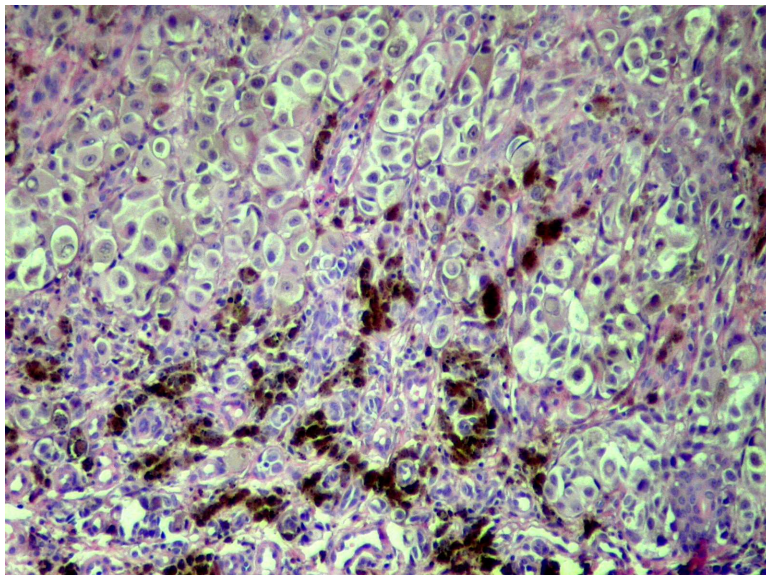
Zdroj: Autor

Příloha 6: Maligní melanom- obarvený HE (40x)



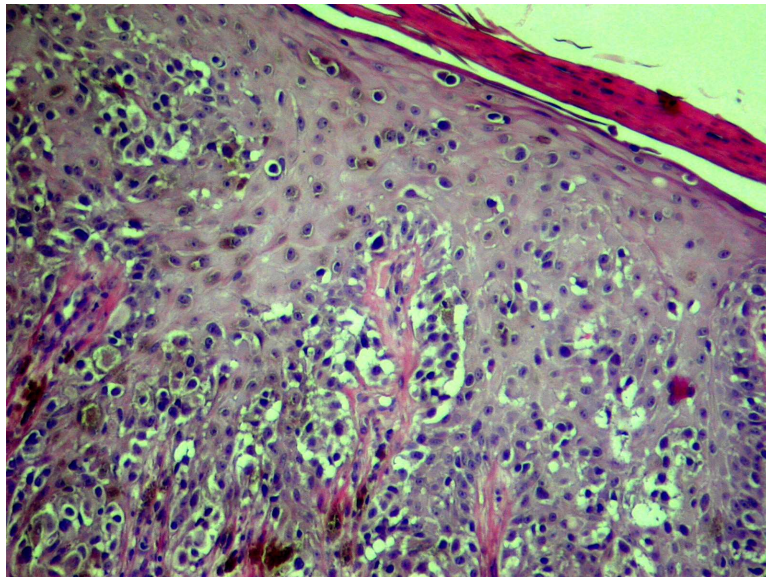
Zdroj: Autor

Příloha 7: Maligní melanom- obarvený HE (100x)



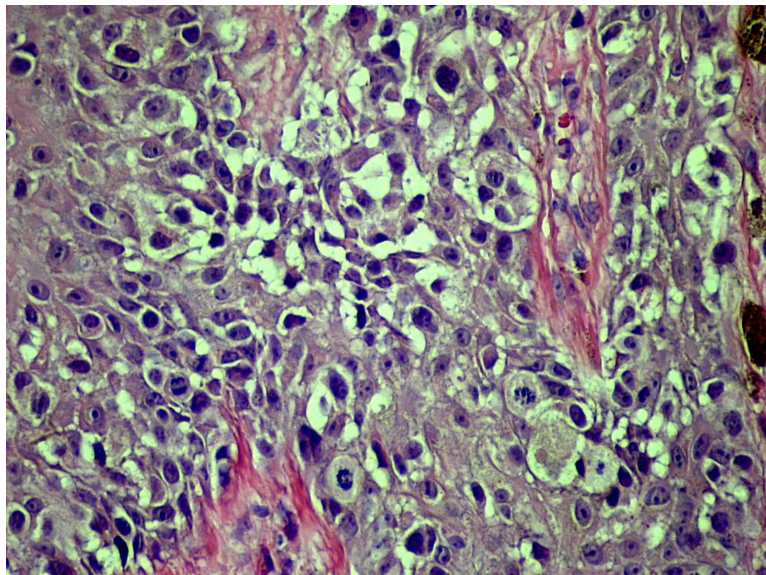
Zdroj: Autor

Příloha 8: Maligní melanom- transepidermální propagace v HE (100x)



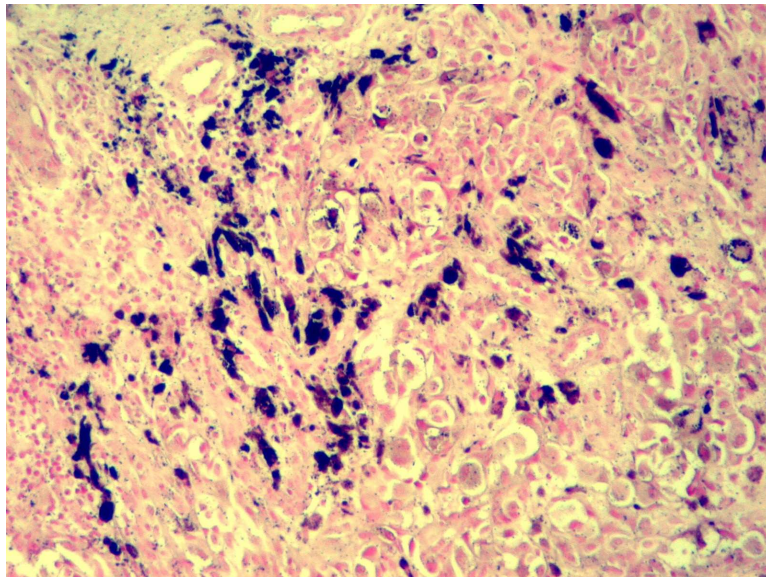
Zdroj: Autor

Příloha 9: Maligní melanom- mitotická aktivita v HE (200x)



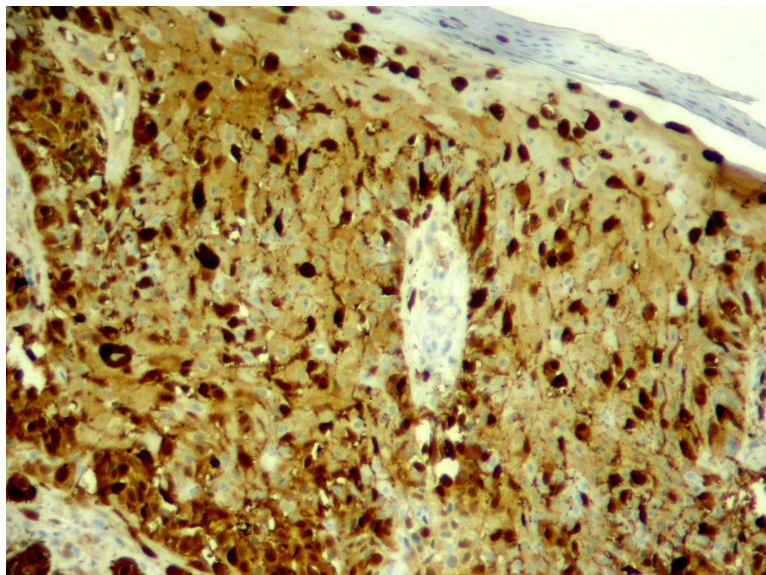
Zdroj: Autor

Příloha 10: Maligní melanom- pozitivní argentafinní reakce na průkaz melaninu (100x)



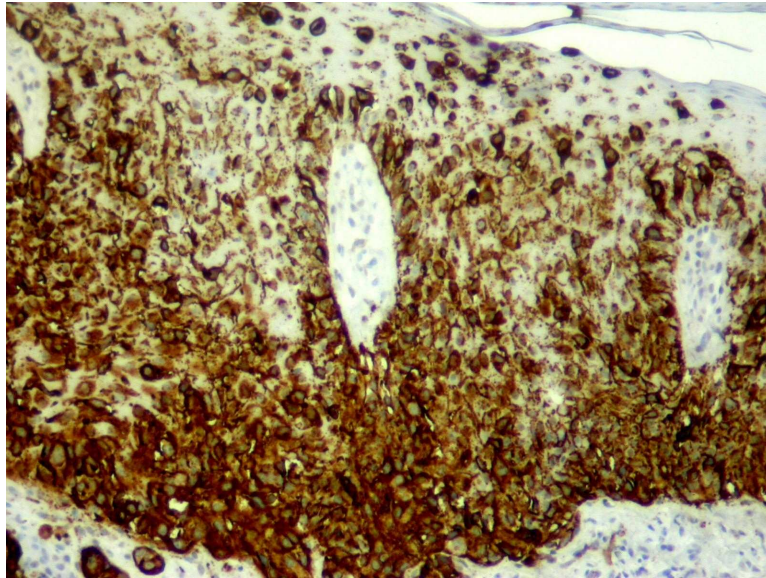
Zdroj: Autor

Příloha 11: Maligní melanom- pozitivní reakce k průkazu s 100 proteinu (100x)



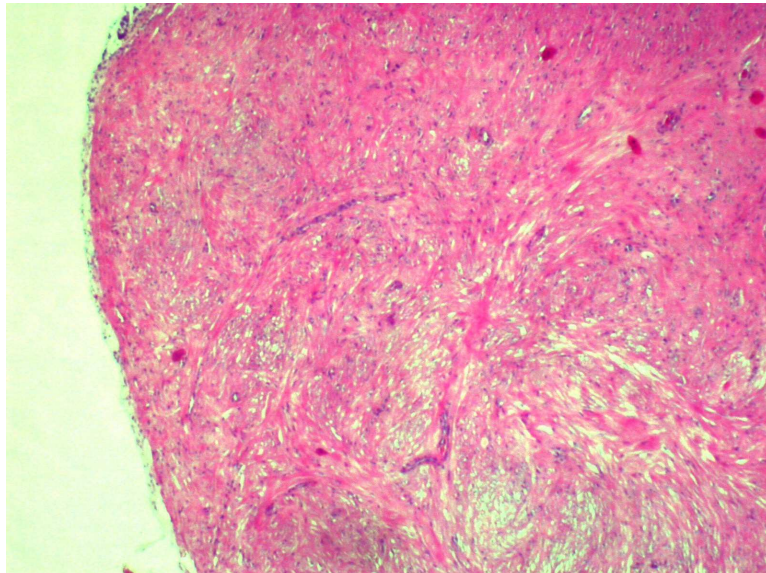
Zdroj: Autor

Příloha 12: Maligní melanom- pozitivní reakce k průkazu HMB 45 (100x)



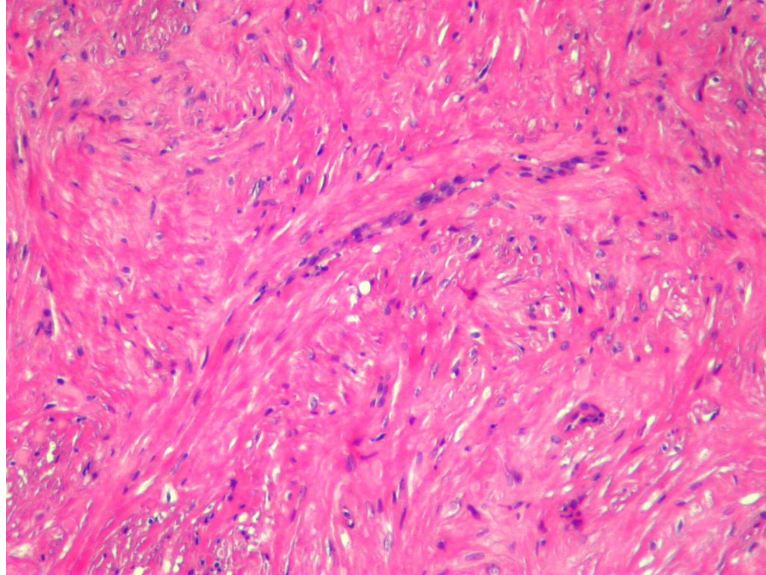
Zdroj: Autor

Příloha 13: Leiomyom- HE (40x)



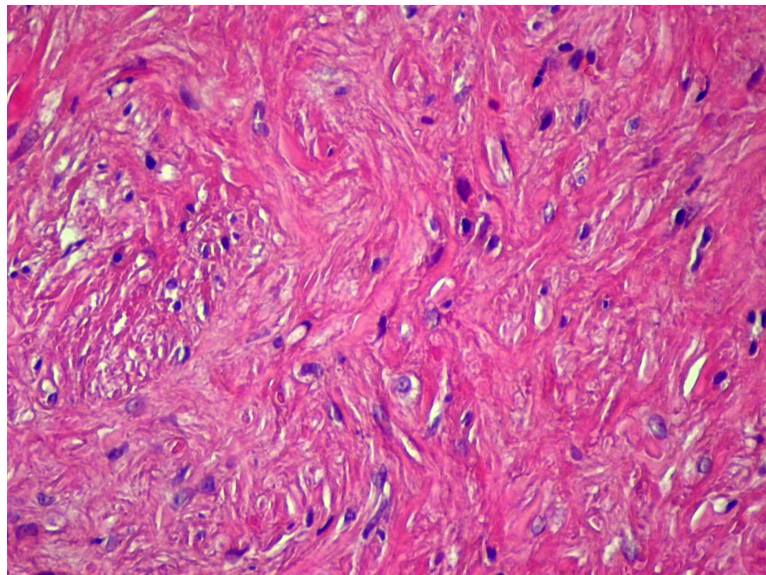
Zdroj: Autor

Příloha 14: Leiomyom- HE (100x)



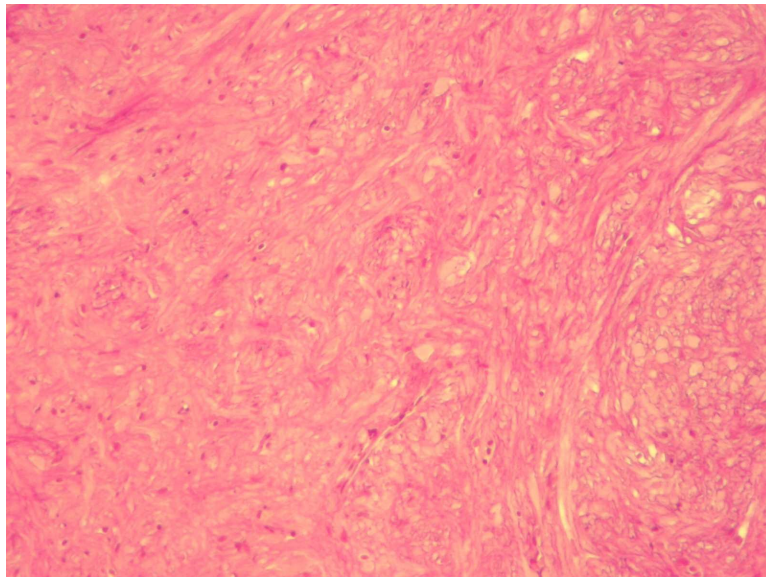
Zdroj: Autor

Příloha 15: Leiomyom- HE (200x)



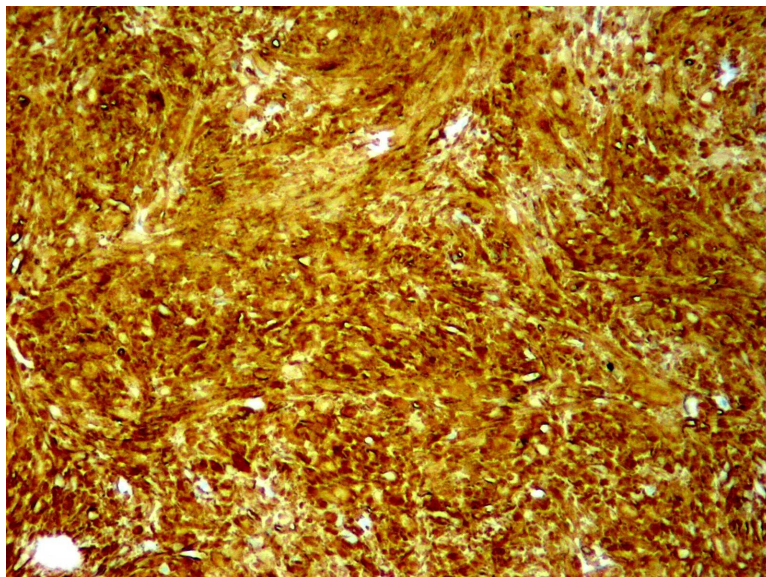
Zdroj: Autor

Příloha 16: Leiomyom- Hematoxylin van Gieson (100x)



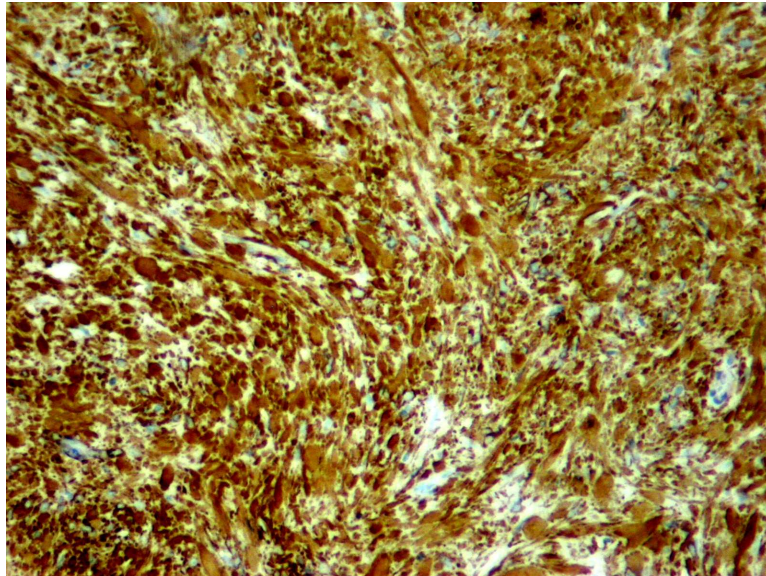
Zdroj: Autor

Příloha 17: Leiomyom- pozitivní reakce k průkazu hladkosvalového aktinu (100x)



Zdroj: Autor

Příloha 18: Leiomyom- pozitivní reakce k průkazu Desminu(100x)



Zdroj: Autor