



Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2. LF a FN v Motole  
přednosta: Prof. MUDr. R. Kodet, CSc.

# Svalová biopsie

**Josef Zámečník**

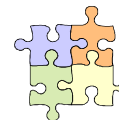
Laboratoř neuropatologie a svalových biopsií

- 1. Úvod**
- 2. Indikace ke svalové biopsii**
- 3. Výběr místa bioptického odběru svalu**
- 4. Odběr svalové tkáně**
- 5. Manipulace se svalovou biopsií po odběru, transport**
- 6. Zpracování vzorku v bioptické laboratoři**
- 7. METODY BIOPTICKÉHO VYŠETŘENÍ SVALOVÉ TKÁNĚ**
  - 7.1. Přehledná tkáňová barvení**
  - 7.2. Tkáňová histochemie, histochemie enzymů**
  - 7.3. Imunohistochemie, imunofluorescence**
    - 7.3.1. Diagnostika myodystrofií**
    - 7.3.2. Detekce antigenů, které nejsou ve tkáni za normálních okolností přítomny**
    - 7.3.3. Detekce strukturálních proteinů**
  - 7.4. Immunobloting (Western blot)**
  - 7.5. Elektronová mikroskopie**
- 8. Literatura**
- 9. Kontakty**

---

## 1. Úvod.

Svalová biopsie je integrální součástí diagnostiky pacientů s neuromuskulárními onemocněními. Mimo nečetných výjimek poskytuje základní kámen pro diagnózu pacientů se suspektní myopatií. Navíc může hrát rozhodující roli při posuzování pacientů s neurogení poruchou, zejména při rozlišování atypicky probíhajících neurogeních poruch od primárně myopatických. Svalová biopsie poskytuje v neposlední řadě informace pro diagnostiku mnoha systémových onemocnění.



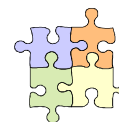
Ačkoli je vlastní chirurgická excize svalové tkáně pro bioptické posouzení relativně jednoduchá a přináší pro pacienta jen malá rizika, je třeba ji provést tak, aby byl výtěžek z vyšetření co největší. Indikující lékař musí nejprve racionálně diferenciatně diagnostickou rozvahou na podkladě klinického, laboratorního a elektrofyziologického vyšetření dospět k správnému načasování i určení takového místa odběru svalové tkáně, které by mohlo přinést validní diagnostické informace.

Každý myopatolog má v repertoáru sérii příběhů o biopsiích, které nebyly provedeny správně. Mnohé z těchto situací byly zachráněny a diagnóza nakonec byla stanovena, občas však bylo nutné celou biopsii zopakovat. Někdy je ale třeba biopsii provést znovu, aniž by šlo o pochybení: v případě normálního bioptického nálezu u pacienta s vysokým stupněm klinického podezření na onemocnění s fokální distribucí (hlavně polymyozitida) nebo při atypické prezentaci vzácné metabolické choroby, na kterou se za daných okolností nepomýšlelo. Není však omluvitelné, pokud nevhodná manipulace s odebranou tkání, suboptimální nebo neadekvátní svalová excize vzniká z nedostatku komunikace mezi jednotlivými pracovníky podílejícími se na celém procesu svalové biopsie (neurolog, chirurg, patolog, pracovníci histopatologické laboratoře). Sebelepší laboratorní technologie nezmůže nic, pokud svalová tkáň přichází do laboratoře znehodnocená např. vyschnutím nebo nevhodnou fixací. Dále, i precizní a správně načasovaný odběr a zpracování tkáně je zbytečným úsilím ve chvíli, kdy má diagnostikující myopatolog omezenou možnost interpretace nálezu nebo je dokonce zaveden na diagnostické scestí neadekvátní informací o klinickém průběhu a dalších laboratorních vyšetřeních. Myopatie je v rámci celé diagnostické histopatologie oborem s mimořádně nízkým procentem jednoznačných diagnóz s nezaměnitelnými patognomickými znaky. Naopak, nejčastěji je nutno poskládat informace poskytnuté jednotlivými histopatologickými vyšetřovacími metodami do mozaiky, která dává smysl, ladí s poskytnutými klinickými informacemi a vede k diagnóze. Nedostatek klinických informací vede k jedinému výsledku, kterým je pouhý popis histopatologického obrazu, mozaika diagnózy zůstává nesložena a efekt takové biopsie pro pacienta je sporný. Vždy je třeba, aby mohl patolog interpretací svalové biopsie zodpovědět diagnostický dotaz klinika, formulovaný v žádosti o vyšetření.

Co by nemělo **na žádance** ke svalové biopsii v žádném případě chybět:

- běžná osobní data pacienta
- stručný nástin klinického průběhu a symptomatologie svalových obtíží
- další důležitá onemocnění (hlavně známé systémové choroby, endokrinopatie, malignity, i podezření na ně)
- dlouhodobá terapie (zejména imunosupresiva, hormony atd.)
- výsledky informativních laboratorních vyšetření a jejich dynamika – zejména kreatinkináza, myoglobin, případně AST, ALT, laktát
- nález při elektrofyziologických vyšetření (EMG)
- klinická diagnostická rozvaha (a formulace diagnostické otázky pro patologa)
- přesné místo odběru svalové tkáně
- kontakt (telefon, e-mail) na ošetřujícího nebo indikujícího lékaře (neurologa), zejména pokud přichází žádanka z chirurgické ambulance.

**Obecně doporučujeme přiložit ke standardní žádance o histologické vyšetření kopii klinické zprávy** – není pak potřeba všechny informace do žádanky přepisovat. Důležitý je kontakt na ošetřujícího lékaře – telefon a e-mail.



## 2. Indikace ke svalové biopsii

Při klinickém podezření na myopatii je se vzácnými výjimkami indikována svalová biopsie. Ta je základem diagnózy zánětlivých, metabolických a kongenitálních myopatií a většiny svalových dystrofií.

Pouze některé zánětlivé myopatie mají v současnosti specifickou a efektivní terapii. Provedení svalové biopsie a stanovení diagnózy před zahájením takové terapie je důležité z následujících důvodů:

- imunosupresivní léčba přináší značnou zátěž pro pacienta, je proto racionální stanovit diagnózu s jistotou před zahájením terapie
- imunosupresivní léčba značně alteruje histopatologický obraz; svalová biopsie provedená až po zahájení terapie (pro malou nebo žádnou odpověď) může být špatně interpretovatelná nebo ji nelze interpretovat vůbec.

U pacientů s diagnostikovanou zánětlivou myopatií je indikováno opakované provedení biopsie, pokud po iniciálním zlepšení klinických obtíží při terapii nastupuje další svalová slabost. Biopsie pak může rozlišit mezi exacerbací původního onemocnění a rozvíjející se steroidní myopatií.

U ostatních onemocnění, u kterých zatím není specifická léčba dostupná, je také mnoho důvodů ke stanovení přesné diagnózy svalovou biopsií:

- v některých případech je indikována symptomatická léčba
- mnohá z těchto onemocnění jsou hereditární a správná diagnóza je podmínkou pro učení typu dědičnosti, stanovení rizikových členů v rodině, specifikaci jednotlivých rizik a prenatální diagnostiku
- pacient může mít prospěch z prognostické informace
- pacienti s určitými onemocněními se mohou stát součástí výzkumných nebo terapeutických studií.

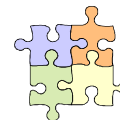
Častým důvodem ke svalové biopsii je potřeba rozlišit primární myopatie od neurogení svalové poruchy. Ačkoli je jejich typická klinická prezentace rozdílná, v praxi se jejich klinický průběh, symptomy i nálezy při laboratorním vyšetření mohou překrývat. Někdy může dojít k souběhu myopatie s neurogením postižením svalu, což dělá diferenciální diagnostiku ještě obtížnější.

**Indikací** pro primární provedení svalové biopsie **není** v současnosti klinické podezření na dystrofinopatie (DMD/BMD), facioskapulohumerální dystrofii, myotonickou dystrofii, periodickou paralýzu a endokrinní myopatie. Důvody jsou následující:

### *Dystrofinopatie a facioskapulohumerální dystrofie*

Recentní pokroky v molekulární genetice eliminovaly primární nutnost svalové biopsie u většiny pacientů s dystrofinopatiemi. Mutace dystrofinového genu (Xp21.2), nejčastěji delece a duplikace, mohou být odhaleny méně invazivním vyšetřením, což je podrobně jinde. Svalová biopsie je nutná pro stanovení diagnózy asi u 30%, u kterých nebylo genetické vyšetření z krve informativní (tzv. nedeleční formy).

Genetická analýza je dostupná i pro facioskapulohumerální dystrofii, a proto svalová biopsie, která v tomto případě ozřejmí jen nespecifické změny, není obecně indikovaná.



### *Myotonická dystrofie*

Možnost odhalení expanze trinukleotidových repetitivních sekvencí genu proteinkinázy myotonické dystrofie dává při podezření na toto onemocnění přednost genetickému vyšetření před svalovou biopsií. Histopatologický nálezn zde není specifický ani diagnostický, může však být užitečný pro podpoření klinické diagnózy a zejména pro vyloučení jiných poruch.

### *Periodické paralýzy*

Onemocnění způsobená mutacemi množství genů pro membránové iontové kanály (tzv. kanalopatie) mají velmi specifické klinické, biochemické a elektrodiagnostické znaky. Ačkoli je možné ve svalové biopsii zastihnout vakuoly a dilataci T-tubulárního systému, většina znaků není diagnostická a poskytne jen obraz nespecifických myopatických změn.

### *Endokrinní myopatie*

Myopatie může být také způsobena např. poruchami štítné žlázy, příštítných tělísek a nadledvin. Správná cesta k diagnóze endokrinní myopatie vede přes příslušná sérologická vyšetření.

## **3. Výběr místa bioptického odběru svalu**

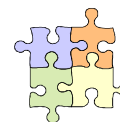
Svalová biopsie bývá většinou odebírána z jednoho z následujících končetinových svalů: m. biceps brachii a m. deltoideus, m. quadriceps femoris (vastus lateralis nebo rectus femoris), m. gastrocnemius nebo m. tibialis anterior. Ostatní svaly se bioptují vesměs ze speciálních důvodů (např. interkostální sval pro studium poruch neuromuskulární ploténky).

Žádoucí místo odběru je primárně determinováno klinickým obrazem onemocnění. Výtěžné informace většinou poskytne vyšetření symptomatického, ale jen středně nebo mírně postiženého svalu. Při výběru nejpostiženějších míst může být obraz změn tak pokročilý, že úbytek svalových vláken a jejich náhrada fibroadipózní tkání (tzv. end-stage muscle) zcela překryje i reziduální známky onemocnění, které k takovému stavu vedlo. Někdy lze v takových případech jen z přítomnosti svalových vřetének usuzovat na to, že se původně jednalo o svalovou tkáň.

V důsledku ložiskového charakteru některých myopatií (např. zánětlivých myopatií, zejména polymyozitidy) nemusejí být vždy v odebraném vzorku patologické změny zastíženy. Při podezření na myozitidu lze dnes proto s výhodou uplatnit při volbě místa odběru svalové tkáně vyšetření magnetickou rezonancí, která výborně lokalizuje oblasti edému a zánětu v příslušném svalu. Lze tak předejít rebiopsii. Nevhodným místem odběru svalové biopsie je dále oblast předešlého EMG vyšetření.

## **4. Odběr svalové tkáně**

Před vlastním bioptickým odběrem by mělo být samozřejmostí včasné kontaktování myopatologické laboratoře a chirurga (viz níže) a zajištění okamžitého zpracování tkáně po odběru. Zpracování svalové biopsie vyžaduje zvláštní přístup, který se liší od zpracování jiných tkání v histopatologické laboratoři. Je neomluvitelnou chybou provést svalovou excizi a až poté začít organizovat další zpracování. Dlouhý časový odstup, případně nevhodné uložení a fixace tkáně, může celý proces svalové biopsie nevratně znehodnotit a bez domluvy s laboratoří je lepší svalové biopsie vůbec neprovádět.



Svalová tkáň může být získána buď otevřenou biopsií nebo punkcí bioptickou jehlou. Někteří autoři preferují jehlovou biopsii, která je jednodušší, rychlejší a levnější metodou. Není to však nutně metoda méně bolestivá pro pacienta, získá se jí většinou jen velmi malé množství svalové tkáně s obtížnou orientovatelností, drobná částka se také rychleji deformuje a ve tkáni vznikají artefakty. Malé množství tkáně většinou umožní jen základní morfologické vyšetření, na immunobloting, izolaci mRNA nebo případné další analýzy svalové tkáně u metabolických onemocnění se často nedostává. Pro tyto nedostatky je pak nutné opakování odběru.

Naše laboratoř dává přednost odběru tkáně otevřenou metodou. Otevřené svalové biopsie mohou být u většiny starších dětí a dospělých pacientů prováděny v lokální anestézii. U malých dětí a u dospělých lze za určitých okolností provést odběr v krátké celkové anestézii, většinou podpořené lokální anestézií. Halotan a sukcinylcholin by však neměly být aplikovány u pacientů s podezřením na onemocnění spojená s maligní hypertermií a u Duchennovy myodystrofie (DMD). U DMD může dojít k srdeční arytmií, myoglobinurii a dalšímu zvýšení kreatinkinázy v séru. U většiny otevřených biopsií postačí infiltrace kůže a podkoží lokálním anestetikem (bez adrenalinu). Je však třeba vyhnout se infiltraci odebíraného svalu! Incize 3-5 cm ve směru dlouhé osy končetiny poskytuje dostatečně pole pro odběr svalu, kterého je třeba podle možností odebrat asi 100 mg (tedy bloček o rozměrech zhruba 12x7x6 mm). Takové množství tkáně většinou pro pacienta neznamena funkční deficit. Při zachování vysokého chirurgického standardu jsou komplikace takového výkonu (hematom, herniace svalu defektem ve fascii, dehiscence rány nebo infekce) zcela výjimečné.

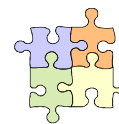
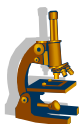
Kontakty na chirurgická pracoviště, které s naší laboratoří spolupracují na programu svalových biopsií, je na konci statě, v kapitole 9.

**Při nevyhnutném odběru svalové biopsie mimo FN Motol je třeba předem se domluvit s naší laboratoří a synchronizovat odběr a rychlé dopravení nativní tkáně do našich laboratoří!**

## 5. Manipulace se svalovou biopsií po odběru, transport

Je-li svalová biopsie prováděna v blízkosti myopatologické laboratoře, vyjmutý vzorek svalu šetrně uložíme do Petriho misky na mul navlhčený fyziologickým roztokem a okamžitě jej transportujeme do bioptické laboratoře. Vlhké prostředí by mělo zabránit vysychání tkáně. Sval by však v žádném případě neměl plavat ve fyziologickém roztoku – tak dojde ve tkáni poměrně rychle k tvorbě artefaktů. V žádném případě by neměl být vzorek vložen do formolu! Takto fixovaný a posléze do parafínu zalitý sval je pro standardní myopatologické vyšetření po krátké chvíli zcela znehodnocen – velmi rychle dochází ke kontrakčním artefaktům, k extrakci lipidů, vyplavení glykogenu a hlavně k inaktivaci svalových enzymů. Naopak, svalová tkáň má po určité době (až několik hodin) po excizi zachovanou enzymatickou aktivitu, která se dá prokazovat enzymovou histochemií ve zmrazených řezech. Takovou tkáň lze také podrobit analýzám ve specializovaných laboratořích zkoumající metabolické či mitochondriální poruchy. Formol v neposlední řadě zničí důležité epitopy svalových proteinů, které prokazujeme imunohistochemicky; protilátky používané v myopatologii totiž zatím téměř výlučně vyžadují nefixovanou mraženou tkáň.

Je-li odběr prováděn **mimo přímý dosah** myopatologického centra a svalovou tkáň není možné na místě odběru příslušným způsobem zmrazit, je vhodné svalový bloček šetrně umístit do uzavřené zkumavky s vloženým navlhčeným tampónem. Uzavřenou zkumavku je



potom třeba umístit do termosky se směsí vody a ledu a ihned transportovat. Doba od odběru po definitivní zpracování by i při tomto opatření neměla přesáhnout dvě až tři hodiny. Pak již ve tkáni počínají autolytické změny.

## 6. Zpracování vzorku v bioptické laboratoři

Svalová tkáň je ihned po převzetí zpracována, většinou frakcionovaně. Ve většině případů je drobný svazček z bločku oddělen žiletkou, napnut na špejli a fixován v paraformaldehydu pro potřebu polotěných řezů a elektronmikroskopické vyšetření. Pokud je materiálu dostatek, je drobnější úsek fixován také 10% pufovaným formolem a zhotovuje se parafinový bloček. Takto zpracovaný sval poskytuje možnost lepší identifikace zánětlivých elementů, zejména při podezření na zánětlivé myopatie. Většina odebrané tkáně se ale mrazí v mrazicím mediu, které poskytne dostatečný teplotní spád, ale zároveň nevyvolá ve svaly mrazové artefakty. Při prostém zmražení svaly v tekutém dusíku, který má velmi nízkou teplotu, dojde k tvorbě krystalů, které zdestruují svalovou tkáň. V naší laboratoři proto používáme tekutý *izopentan*, který je umístěn v nádobce ponořené v tekutém dusíku. Dosáhneme tak mírnější, ale dostatečnou teplotu pro zmražení a k tvorbě mrazových artefaktů nedochází. S úspěchem lze také používat směs zkapalněného propanu a butanu; tato směs je však výbušná a v rutinním nemocničním provozu vyžaduje její používání příslušná bezpečnostní opatření.

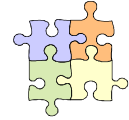


Svalovou tkáň je nutno před zmražením zorientovat (lupou nebo pomocí preparačního mikroskopu) tak, aby byl vždy jeden bloček orientován kolmo na dlouhou osu vláken, druhý je lépe zmrazit podélně. Zorientovaná tkáň je uložena na korkovou podložku a vložena na 15-20 sekund do vymraženého izopentanu. Poté je třeba zmražený bloček okamžitě transportovat do kryostatu nebo do hlubokomrazicího boxu (-80°C), kde lze takto upravenou tkáň uchovávat po dlouhou dobu. Důležité je, aby jednou zmražená tkáň při další manipulaci a při přípravě histologických preparátů nerozmrzla. Opětovně zmražení by vyvolalo ve tkáni množství artefaktů. Ze zmražených bločků se v kryostatu krájí 8-10  $\mu\text{m}$  silné řezy pro histochemické reakce a 4-6  $\mu\text{m}$  silné řezy pro potřeby imunohistochemie.

## 7. METODY BIOPTICKÉHO VYŠETŘENÍ SVALOVÉ TKÁNĚ

### 7. 1. Přehledná tkáňová barvení.

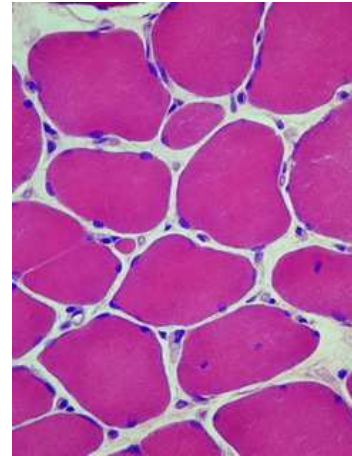
Při vyšetřování svalové biopsie je prvním krokem vždy vyšetření řezu barveného klasickou metodou **hematoxylinem a eozinem**. Toto obecné tkáňové barvení je



nezastupitelné, poskytuje velkou řadu informací a do značné míry ovlivňuje indikaci k provedení speciálních metod.

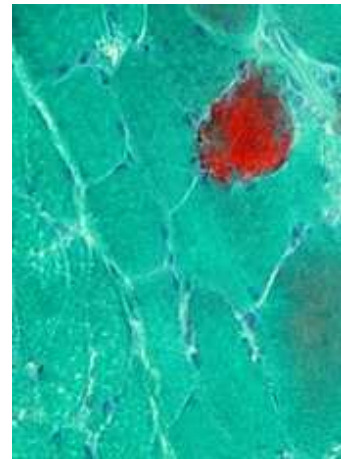
#### Základní nálezy a diagnostický přínos:

- velikostní kolísání svalových vláken
- kulatá atrofická vlákna (spíše myopatie)
- angulární atrofická vlákna (spíše neuropatie)
- skupinová atrofie svalových vláken (neuropatie)
- perifascikulární atrofie (dermatomyozitida)
- hypertrofická vlákna (spíše myopatie)
- další složky myopatického vzorce
  - přítomnost naštípnutých vláken (tzv. fiber splitting)
  - zmnožení vnitřních jader
- přítomnost nekrotických a regenerujících vláken (destruktivní myopatie)
- hyalinní vlákna (dystrofinopatie)
- přítomnost patologických vakuol (metabolické myopatie, periodické paralýzy, myozitida s inkluzními tělísky atd.)
- přítomnost patologických inkluzí (myozitida s inkluzními tělísky, kongenitální myopatie atd.)
- stupeň endomysiální a perimysiální fibrózy až "end-stage muscle"
- přítomnost, složení a distribuce zánětlivé celulizace (zánětlivé myopatie)
- alterace cév (např. fibrinoidní nekróza stěny cév při vaskulitidách)
- alterace nervových (avšak pouze hrubé posouzení struktury)
- změny svalových větének



#### Trichrom modifikovaný podle Gomoriho.

Klasické barvení trichromem na průkaz kolagenu bylo pro vyšetření svalové tkáně modifikováno. Jeho největší přínos je v detekci tzv. ragged red fibers (RRF) se zvýšeným obsahem mitochondrií ukazující na mitochondriální poruchu, dále ve znázornění patologických inkluzí ve vláčkách, jako u myozitidy s inkluzními tělísky nebo u tyčinkové (nemalinové) myopatie.

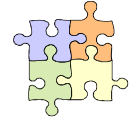


## 7.2. Tkáňová histochemie, histochemie enzymů

Při každém vyšetření kosterního svalstva je nutné provést alespoň základní histochemické reakce. Tyto reakce poskytují odpovědi na určité otázky – znázorní distribuci a změny jednotlivých typů svalových vláken, přítomnost oxidativních enzymů (mitochondrií), lysozomů, glykogenu, glykolytických enzymů, lipidů atd. Nejčastěji používané metody jsou diskutované v následujícím textu.

### 1. Myofibrilární ATPáza.

Histochemická reakce na průkaz myofibrilární ATPázy je standardem pro rozlišení jednotlivých typů svalových vláken. Tyto reakce se provádějí jednak s preinkubací při pH 9,6 (tmavá jsou pak vlákna 2. typu), jednak při pH 4,3 s reverzním kontrastem (tmavá jsou vlákna 1. typu). To má svůj prozaický důvod, vždy se lépe posuzuje to, co má tmavší barvu.



Je-li zapotřebí dále rozlišit subtypy vláken 2. typu (2A, 2B, 2C), je nutné provést tuto reakci ještě s preinkubací s pH 4,6. Pro posuzování distribuce typů svalových vláken a jejich změn je zásadní znalost místa odběru. Zastoupení jednotlivých typů vláken se v různých svalech velmi liší. Zatímco například v m. tibialis ant. je normou až 75% vláken 1. typu, v jiném svalu bychom toto museli hodnotit už jako predominanci typu svalových vláken.

#### *Základní nálezy a diagnostický přínos:*

- Predominance typu svalových vláken - u kongenitálních myopatií
- Selektivní atrofie vláken 1. typu - často zároveň s početní predominancí u kongenitálních myopatií, např. CFTD (kongeniální disproporce typů vláken), tyčinková myopatie atd.; myotonická dystrofie; Werdnig-Hoffmannova choroba
- Selektivní atrofie vláken 2. typu - steroidní myopatie a Cushingův syndrom, kachexie, proteinová malnutrice, léze horního motoneuronu, myasthenia gravis
- Seskupování typu svalových vláken a skupinová atrofie - neurogení změny
- Fokální defekty v barvení, snížení obsahu nebo chybění myozinu (ATPáza je součástí myozinové molekuly) - "core - myopathies", myopatie se ztrátou myosinu



#### *2. Oxidativní enzymy (dehydrogenázy - NADH-TR, SDH), cytochrom c oxidáza (COX)*

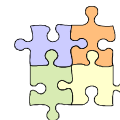
Nikotinamid adenin dinukleotid-tetrazolium reduktáza (NADH-TR) i sukcinát dehydrogenáza (SDH) jsou enzymy lokalizované v mitochondriích a jejich detekce tedy slouží k posouzení jejich množství a distribuce. V těchto reakcích se jako akceptor vodíku používá nitro-blue tetrazolium, které dává po své redukci charakteristickou šedo-modrou barvu. SDH je přítomna jen v mitochondriích, zatímco NADH-TR je obsažena také v cytozolu, resp. v sarkoplazmatickém retikulu. Pomocí reakce na NADH-TR ozřejmíme tedy nejen mitochondrie, ale také tubulární agregáty. Všechny podjednotky SDH jsou kódovány jadernými geny a reakce na průkaz SDH tedy detekuje jak normální, tak abnormální mitochondrie. U mitochondriálních myopatií bývají mitochondrie zmnoženy, což se projeví akumulací SDH-reakčního produktu. Při podezření na mitochondriální myopatii se dále provádějí reakce na průkaz cytochrom-c-oxidázy (COX), enzymu kódovaného mitochondriální DNA. U mitochondriálních poruch se často projeví deficitem - vznikají COX negativní (deficientní) vlákna. Kombinace nálezu zmnožené reakce SDH a přítomnost COX negativních vláken je tedy nejčastějším ukazatelem mitochondriální poruchy. Izolované zmnožení SDH reakce subsarkolemálně však může sekundárně doprovázet další destruktivní myopatie, nárůst je také zřetelný s rostoucím věkem. Definitivní potvrzení mitochondriální myopatie tak náleží laboratoři specializované na diagnostiku mitochondriálních poruch. Vzhledem k rozdílnému obsahu mitochondrií ve vláknech 1. a 2. typu mohou tyto reakce také doplnit představu o distribuci jednotlivých typů svalových vláken.



#### *Základní nálezy a diagnostický přínos:*

- zvýšená subsarkolemální akumulace oxidativních enzymů (hlavně SDH) - suspektní mitochondriální porucha
- COX - negativní vlákna - mitochondriální myopatie
- terčovitá vlákna („target fibers“): vlákna s centrálním defektem, kde chybí NADH-TR, SDH i ATPázová aktivita. Kolem defektu bývá zóna vyšší reakce, proto vlákna





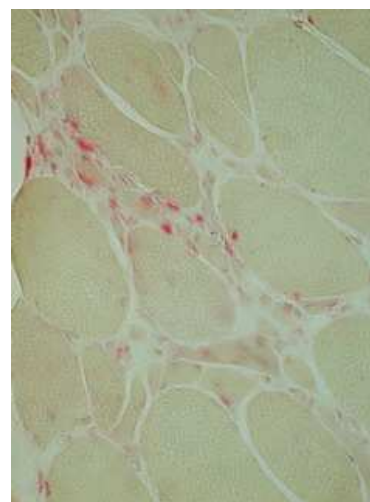
terčovitá. Pokud tato zóna chybí, jedná se o tzv. „targetoid fibers“ – známka reinervace

- „central cores“, „multicores“ a „minicores“ – podobný defekt, většinou selektivně ve vláknech 1. typu – základní kameny diagnózy příslušných kongenitálních myopatií
- „moth-eaten fibres“: množství drobných defektů v průřezu oxidativních enzymů – u facioskapulohumerální dystrofie, pletencových myodystrofií, okulofaryngeální dystrofie, dermatomyozitidy atd.
- řada dalších nespecifických obrazů je nad rámec tohoto sdělení.

### 3. Lysozomální hydrolázy (kyselá fosfatáza – ACP, nespecifická esteráza – NSE).

ACP: v normálních svalových vláknech často nalezneme drobné pozitivitu odrážející akumulaci lipofuscinu. Při stárnutí nebo denervaci se množství lipofuscinu i reakce ACP zvyšuje, stále je však lokalizována subsarkolemálně v blízkosti jádra. Difúzní intenzivní reakce jak na periferii tak v centru vlákna bývá znakem lysozomálního střeďavého onemocnění, avitaminózy E nebo doprovází myotonickou dystrofií. Lysozomy jsou přirozeně prominentní i ve fagocytujících makrofázích.

NSE: reakce bývá silná v oblasti neuromuskulární junkce (pro vysoký obsah cholinesterázy). Také může znázornit lysozomy, má však sníženou specifitu než ACP.



### 4. Periodic acid - Schiff (PAS) reakce, glykogen-fosforyláza a fosfofruktokináza

Metodou PAS lze prokázat glykogen, stejně jako glykolipidy a glykoproteiny. Znázorní se tak také bazální laminy. Specifitu reakce pro glykogen lze zhodnotit kontrolní reakcí s vymizením PAS pozitivitu po natrávení diastázou. Vymizení nebo oslabení aktivit určitých glykolytických enzymů ve svalové tkáni je specifické pro příslušná střeďavá onemocnění.

#### Základní nálezy a diagnostický přínos:

- výrazné zmnožení glykogenu u střeďavých chorob (glykogenózy)
- zmnožení glykogenu bývá též v ragged red fibers
- ztráta glykogenu z vlákna po denervaci
- mírné snížení aktivity glykogen-fosforylázy – glykogenózy typu II a III
- chybění aktivity glykogen-fosforylázy – glykogenóza typu V
- deficit aktivity fosfofruktokinázy - glykogenóza typu VII

## 7.3. Imunohistochemie, imunofluorescence

### Zjednodušený princip metody:

Imunohistochemie umožňuje vizuální detekci a lokalizaci antigenu ve tkáni pomocí vazby se specifickou protilátkou. Po přípravě tkáňového řezu s tepelnou revitalizací antigenů se tkáň inkubuje s primární protilátkou (dnes většinou monoklonální). Na tu se po inkubaci navazuje detekční systém tvořený sekundárními a terciárními protilátkami, které fungují jednak jako určitý zesilovač, jednak je na nich navázána látka (většinou enzym), která po následné reakci s dodaným chromogenem vyvolá barevnou reakci. Nejčastěji se používá peroxidázová metoda – na protilátku je navázána peroxidáza, která v reakci s 3,3'-



diaminobenzidinem (DAB) vyvolá ve tkáni hnědé zbarvení příslušného místa. Po dobarvení hematoxylinem lze tedy ve tkáni lokalizovat přítomnost zkoumaného antigenu.

*Imunofluorescence* – podobná metodika, detekční protilátky (někdy rovnou primární protilátky) jsou však značeny fluorescenčně (nejčastěji Cy3 nebo fluorescein, FITC). Výhodou této metody je zvýšená senzitivita a omezení rušivého efektu okolní tkáně. Nevýhodou je nestálost preparátu a nutná dostupnost kvalitního fluorescenčního mikroskopu. Při hodnocení svalových biopsií nejčastěji přistupujeme k imunofluorescenčnímu vyšetření až při nejednoznačném nálezů imunohistochemickém.

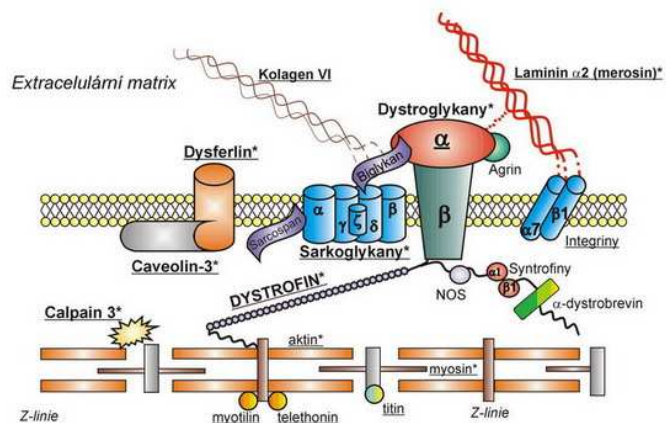
K imunohistochemickému vyšetření přistupujeme k němu až na základě nálezů v základních barveních a histochemických reakcích, přirozeně také podle klinické diagnózy. Jsou tři základní využití imunohistochemie v diagnostické myopatologii:

1. detekce proteinů v rámci diagnostiky myodystrofií
2. detekce antigenů, které nejsou ve tkáni za normálních okolností přítomny - imunologické mechanismy a zánětlivé buňky
3. detekce strukturálních svalových proteinů - sledování změn v kvantitě nebo v distribuci.

### 7.3.1. Diagnostika myodystrofií

Detekujeme proteiny asociované s jednotlivými svalovými dystrofiemi. Nejčastěji pozorujeme absenci příslušných proteinů, je-li protein ve tkáni přítomen, sledujeme oslabení reakce nebo ložiskové výpadky v jeho imunoexpresi. U všech těchto analýz je třeba pečlivě provádět pozitivní i negativní kontroly a výsledky korelovat.

Spektrum komerčně dostupných protilátek se neustále rozšiřuje a nelze je všechny v rámci této statě postihnout, doporučuji proto sledovat nabídky příslušných firem. Zde se omezíme na protilátky většinou používané v naší laboratoři s racionálním diagnostickým významem. Tento výčet bude jistě v budoucnosti podle potřeby upraven.

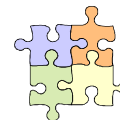


a. *Protilátky proti proteinům dystrofin-glykoproteinového komplexu*; u příslušného proteinu je uvedeno onemocnění, které je patogeneticky spojeno s jeho deficitem:

#### **dystrofin**

- tyčinková doména dystrofinu (DYS1, aminokyseliny 1181-1388) – DMD/BMD
- C-terminální doména dystrofinu (DYS2, aminokyseliny 11255-11296) – DMD/BMD
- N-terminální doména dystrofinu (DYS3, aminokyseliny 308-351) – DMD/BMD

**dysferlin** – LGMD 2B



**$\alpha$  - sarkoglykan** (adhalin) – LGMD 2D

**$\beta$  - sarkoglykan** – LGMD 2E

**$\gamma$  - sarkoglykan** – LGMD 2C

**$\delta$  - sarkoglykan** – LGMD2F

**$\alpha$  - dystroglykan - LGMD 2I**

**$\beta$  -dystroglykan - ?**

**caveolin-3** - LGMD 1C

*b. Proteiny jaderné membrány*

**emerin** – X-vázaná forma Emeryho-Dreifussovy svalové dystrofie

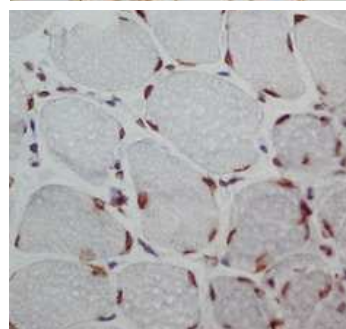
*c. Proteiny bazální membrány a extracelulární matrix*

**merosin** ( $\alpha 2$ -laminin) – merosin-negativní kongenitální svalová dystrofie

*d. Proteiny svalové membrány mimo dystrofinovou osu*

**spektrin** – chybí na nekrotických vláknech, ale je přítomen na vláknech s deficientním dystrofinem

**utrophin-N**, utrophin-C – za normálních okolností jsou exprimovány jen v oblasti neuromuskulární junkce, u dystrofinopatií dochází k jejich upregulaci na povrchu vláken



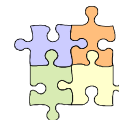
### 7.3.2. Detekce antigenů, které nejsou ve tkáni za normálních okolností přítomny

*a. Detekce imunologických mechanismů*

- útočný komplex komplementu (MAC, C5b-9) – normálně není přítomen, u dermatomyozitidy nalézáme depozita MAC ve stěně kapilár a drobných cév, dokonce i v místech bez přítomnosti zánětlivého infiltrátu
- HLA antigeny I. třídy – normální svalové vlákno je negativní, u jednotlivých zánětlivých myopatií dochází k různému stupni upregulace a povrch vláken se stává pozitivním. Za normálních okolností je tento antigen exprimován jen endoteliálními buňkami, lymfocyty, ale také na povrchu regenerujícího vlákna.

*b. Základní imunofenotypizace zánětlivého infiltrátu – hraje důležitou úlohu v rozlišování jednotlivých zánětlivých myopatií*

- LCA (CD45RB) - leucocyte common antigen – exprimován na povrchu lymfoidních buněk
- L26 (CD20) - B- lymfocyty
- CD3 - T-lymfocyty
- CD4 - T-lymfocyty (CD4+)
- CD8 - T-lymfocyty (CD8+)
- CD68 (PGM1) - makrofágy



### 7.3.3. Detekce strukturálních (sarkomerických) proteinů

Tyto proteiny jsou ve tkáni normálně přítomny, ale u patologických procesů může být změněna jejich kvantita nebo distribuce.

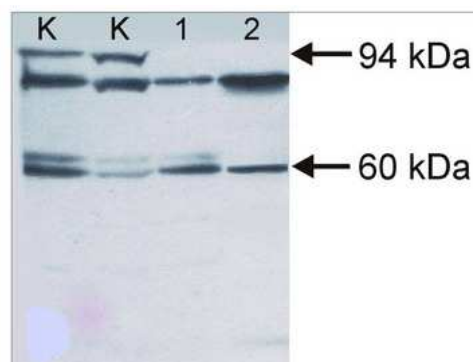
- myoziny
- protilátky proti těžkému řetězci myozinu – podle specifity lze rozlišit jednotlivé podtypy svalových vláken (tzv. „slow“ a „fast“ myoziny)
- fetální/embryonální myozin – detekuje regenerující svalová vlákna
- desmin – výrazně zvýšená reakce a změna distribuce u desminopatií
- laminin – selektivní znázornění kapilár (pro potřebu kvantitativní analýzy)
- aktin

### 7.4. Immunobloting (Western blot)

Jedná se podobně jako v případě imunohistochemie o průkaz antigenu (proteinu) ve tkáni, avšak nikoli s možností lokalizace antigenu ve tkáňovém řezu, ale z tkáňového homogenizátu. Využívá se buď u takových antigenů (proteinů), které zatím není z technických důvodů možno prokázat ve tkáni imunohistochemicky (např. **calpain-3**), nebo v případě potřeby prokázat změnu délky prokazovaného proteinu nebo jeho porušenou kvantitu (**dystrofin** u Beckerovy myodystrofie).

*Zjednodušený princip metody:*

Zmražená svalová tkáň se homogenizuje a provede se izolace proteinů. Ty jsou posléze elektroforeticky rozděleny na polyakrylamidovém gelu a přebíjeny na membránu. Membrána je pak inkubována s primární protilátkou. Komplex antigen-protilátka se poté vizualizuje fluorescenčně značeným detekčním systémem expozicí na film. Po vyvolání filmu jsou patrné proužky v příslušných vzdálenostech odpovídající velikosti proteinů; hodnotí se pomocí velikostního markeru.

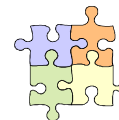
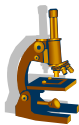


Můžeme sledovat:

- přítomnost nebo úplnou absenci sledovaného proteinu
- změny v délce proteinu
- změnu v množství proteinu

### 7.5. Elektronová mikroskopie

Před zmražením svalové tkáně se téměř pokaždé fixuje drobná část svalu paraformaldehydem pro potřebu provedení ultrastrukturálního vyšetření, které však není zahrnuto v rutinním diagnostickém schématu.



Po penetraci tkáně paraformaldehydem je bloček fixován ještě 3% glutaraldehydem. Po fixaci je tkáň rozdělena do zhruba 1 mm<sup>3</sup> velikých bločků, fixována tetraoxidem osmia a zalita do pryskyřice. Na ultramikrotomu s diamantovými noži jsou nejdříve krájeny tzv. poloténkové řezy o síle asi 1 μm, které jsou barveny toluidinovou modří; ty se prohlížejí ve světelném mikroskopu. Některé myopatologické školy používají tyto řezy jako základ diagnostiky místo přehledného barvení hematoxylinem a eozinem. V další fázi se vyberou vhodné úseky, které jsou nakrájeny na ultratenké řezy. Ty se následně barví uranylacetátem a citrátem olovnatým, jsou přeneseny na kovovou sítku a mohou se prohlížet, v rozsahu velkých zvětšení podle možnosti elektronového mikroskopu.

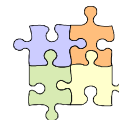


Elektronová mikroskopie je nákladná, časově náročná a vyžaduje speciální erudici pracovníků laboratoře. Další nevýhodou této metody je možnost zkoumat jen zcela minimální vzorek tkáně. Rozvoj moderních technologií zpracování tkáně, zejména imunohistochemie, postupně omezil význam elektronové mikroskopie a určil její diagnostický přínos jen na omezenou skupinu onemocnění. V myopatologii zůstávají tyto racionální indikace k jejímu použití:

- identifikace inkluzí pozorovaných na úrovni světelné mikroskopie (inclusion body myositis, tyčinková myopatie a případně další kongenitální myopatie), viz obrazová příloha, obr. 14-15
- identifikace střádaného materiálu a určení jeho intracelulární lokalizace
- ve sporných případech při podezření na dermatomyozitidu může ultrastrukturální vyšetření identifikovat tubuloretikulární inkluze v endoteliálních buňkách
- elektronová mikroskopie může hrát důležitou roli při diagnostice akutní steroidní myopatie (ztráta tlustých filament) a může podpořit diagnózu mitochondriální myopatie (zmnožení mitochondrií, změny v jejich tvaru, intramitochondriální inkluze).

## 8. Literatura

1. Vogel H., Zámečník J. (2005) Diagnostic immunohistology of muscle diseases. *J Neuropath Exp Neurol* 64(3): 181-193.
2. Zámečník J. (2004) Svalová biopsie. Speciální myopatologie. V: Maříková T. a kolektiv, *Neurogenetika svalových dystrofií a kongenitálních myopatií*. Praha: Maxdorf, s. 142-283.
3. S. Carpenter, G. Karpati: *Pathology of Skeletal Muscle*. Oxford University Press; 2nd ed., 2001.
4. G. Karpati: *Structural and Molecular Basis of Skeletal Muscle Diseases*. ISN Neuropath Press, Basel 2002.
5. A. G. Engel, C. Armstrong: *Myology*. 3rd ed., McGraw-Hill Publisher, 2003.



## 9. Kontakty

**Adresa:** Ústav patologie a molekulární patologie UK 2. LF a FN Motol  
Laboratoř neuropatologie a svalových biopsií  
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

**Lokalizace:** Fakultní nemocnice v Motole, modrá budova (dospělá část), uzel A, 2. patro

**Příjem materiálu:** Po – Pá: 7,30 - 15 hodin; modrá budova FN Motol (dospělá část), uzel A, 2. patro, tel. 224 435 615. Nejlépe po domluvě s p. Cibulou (tel. 224 435 636) nebo s doc. Zámečnickem (tel. 224 435 635).

Doc. MUDr. Josef Zámečník, Ph.D. tel. 224 435 635 josef.zamecnik@lfmotol.cuni.cz  
Adrian Cibula, vedoucí laborant tel. 224 435 636 C.Adrian@seznam.cz

Svalové biopsie provádí spolupracující chirurgická pracoviště FNM:

- *Dospělí pacienti* v rámci jednodenní chirurgie - MUDr. P. Libánský, III. chirurgická klinika UK 1. LF a FN Motol, kontakt pro domluvení termínu biopsie: libanskyp@seznam.cz.  
Další možnost: prim. MUDr. J. Adámek, I. chirurgická klinika UK 2. LF a FN v Motole
- *Dětsí pacienti* - Klinika dětské chirurgie UK 2.LF a FN Motol, většinou MUDr. J. Trnková
- Pokud je primární podezření na *mitochondriální onemocnění* je s výhodou nejdříve zkontaktovat Laboratoř pro studium metabolických poruch UK. 1. LF a VFN (MUDr. L. Wenchich, tel. 224 967 749; wlaca@centrum.cz), kde lze rovněž zajistit odběr svalové tkáně, která bude frakcionovaně zpracována v naší i jejich laboratoři. Některá vyšetření na mitochondriální poruchy totiž vyžadují čerstvou tkáň. Případně lze domluvit účast pracovníka mitochondriální laboratoře při odběru jinde.

**Pouze pokud není možné provést odběr tkáně ve FN Motol, lze domluvit i odběr na jiném místě. Nutno však dopravit do FN Motol do dvou hodin od odběru.**

V Praze 25.2.2007

Doc. MUDr. Josef Zámečník, Ph.D.