

## **Imunofluorescenční vyšetření svalové biopsie**

Denisa Bošková, Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví, 3. ročník

Školitel: Petr Ferczadi, Dis

### **Princip metody**

Pro myopatologii jsou nejčastěji značeny fluorescenční protilátky pomocí FITC (fluorescein isothiocyánát), fluoresceinem nebo Cy3. Na základě nejednoznačného imunohistochemického nálezu jsou tato vyšetření prováděna. Nejčastěji se imunofluorescence provádí pro průkaz exprese nebo chybění dystrofinu. Výhodou této metody je zvýšená senzitivita a omezení rušivého vlivu okolí tkáně.

### **Úskalí metody**

Zpracování svalové biopsie v laboratoři vyžaduje zvláštní přístup, který se velmi liší od zpracování klasické biopsie. Tkáň může být nevratně poškozena a znehodnocena nevhodnou fixací, dlouhým časovým odstupem a uložením svalové elize. Nejprve se vzorek musí zbavit okolní tkáně, která může být přítomna a poté se rozdělí se na 4 části. Do nádobky s mRNA stabilizačním médiem se umístí první část. Tato část je určena pro molekulárně-genetické vyšetření. Pro vyšetření ultrastruktury buněk elektronovým mikroskopem se použije druhá část, která se fixuje ve 4 % paraformaldehydu. Dvě další části se urychleně zamrazí. Před zmražením je nutno svalovou tkáň zorientovat pomocí lupy nebo preparačního mikroskopu. Jeden bloček by měl být orientován kolmo na dlouhou osu vláken a druhý podélně. Poté se do vymraženého izopentanu vloží na 15-20 sekund korková podložka, na které je umístěna zorientovaná tkáň. Následně se zmražený bloček okamžitě transportuje do kryostatu nebo dohlubokomrazicího boxu (-80°C). Při přípravě histologických preparátů nebo další manipulaci je důležité, aby jednou zmražená tkáň nerozmrzla. V kryostatu se ze zmražených bločků krájí řezy. Které jsou 8-10 µm silné pro histochemické reakce a 4-6 µm silné pro potřeby imunohistochemie.

### **Uplatnění metody (změny při patologických stavech)**

Při klinickém podezření na myopatii je indikována svalová biopsie. Základ pro diagnózy metabolických, kongenitálních a zánětlivých myopatií a svalových dystrofií je bioptické vyšetření svalové tkáně. Biopsii je zapotřebí provést opakovaně u některých onemocnění, jako jsou zánětlivé myopatie. Mnohá z těchto onemocnění jsou hereditární a správná diagnóza je nutná k určení typu dědičnosti, stanovení rizik pro prenatální diagnostiku a vytipování rizikových členů v rodině. Svalové biopsie se často provádí k rozlišení neurogenických svalových poruch od primární myopatie. Tyto onemocnění se klinickým průběhem, laboratorními výsledky i symptomy mohou překrývat, i když je jejich klinická prezentace rozdílná.

### **Potřebné přístrojové vybavení**

Fluorescenční mikroskop

<b>Podmínky</b>	<b>odběru</b>	<b>a</b>	<b>transportu</b>	<b>materiálu</b>
Pokud lékař svalovou biopsii odebírá, musí být předem domluven s laboratoří. Je velkou chybou sval odebrat a až následně řešit zpracování. Jehlová biopsie může být pro pacienta velmi bolestivá, i když je místo vpichu pod kůží v lokální anestezii. Sval, který bude bioptován se nesmí znecitlivit. Získá se				

relativně malé množství tkáně, u které může dojít k deformaci a vzniku nežádoucích artefaktů. U malých dětí a některých dospělých se otevřená biopsie může provádět v krátké celkové anestezii nebo stačí anestezie lokální bez infiltrace odebíraného svalu. Řez kůží při výkonu se provádí ve směru osy končetiny a délky 3-5 cm. Odebírá se vzorek cca 100 mg (tedy bloček o rozměrech zhruba 12x7x6 mm).

Vzorek musí být doručen do laboratoře co nejrychleji. Vyjmutý vzorek se musí uložit do Petriho misky s gázou namočenou ve fyziologickém roztoku. Ihned se transportuje do laboratoře. Vzorek se donese bez fyziologického roztoku, když probíhá zpracování mimo zařízení. Následně se rozdělí na několik částí, ihned se namrazí v kapalném dusíku a zašle do laboratoře. Ve zmražených řezech prokazujeme enzymovou histochemií zachovalou enzymatickou aktivitu, kterou má určitou dobu po odběru svalová tkáň. V žádném případě nesmí být vzorek po odebrání vložen do formaldehydu. Zachovalou tkáň můžeme podrobit analýzám v laboratořích zkoumající mitochondriální a metabolické poruchy.