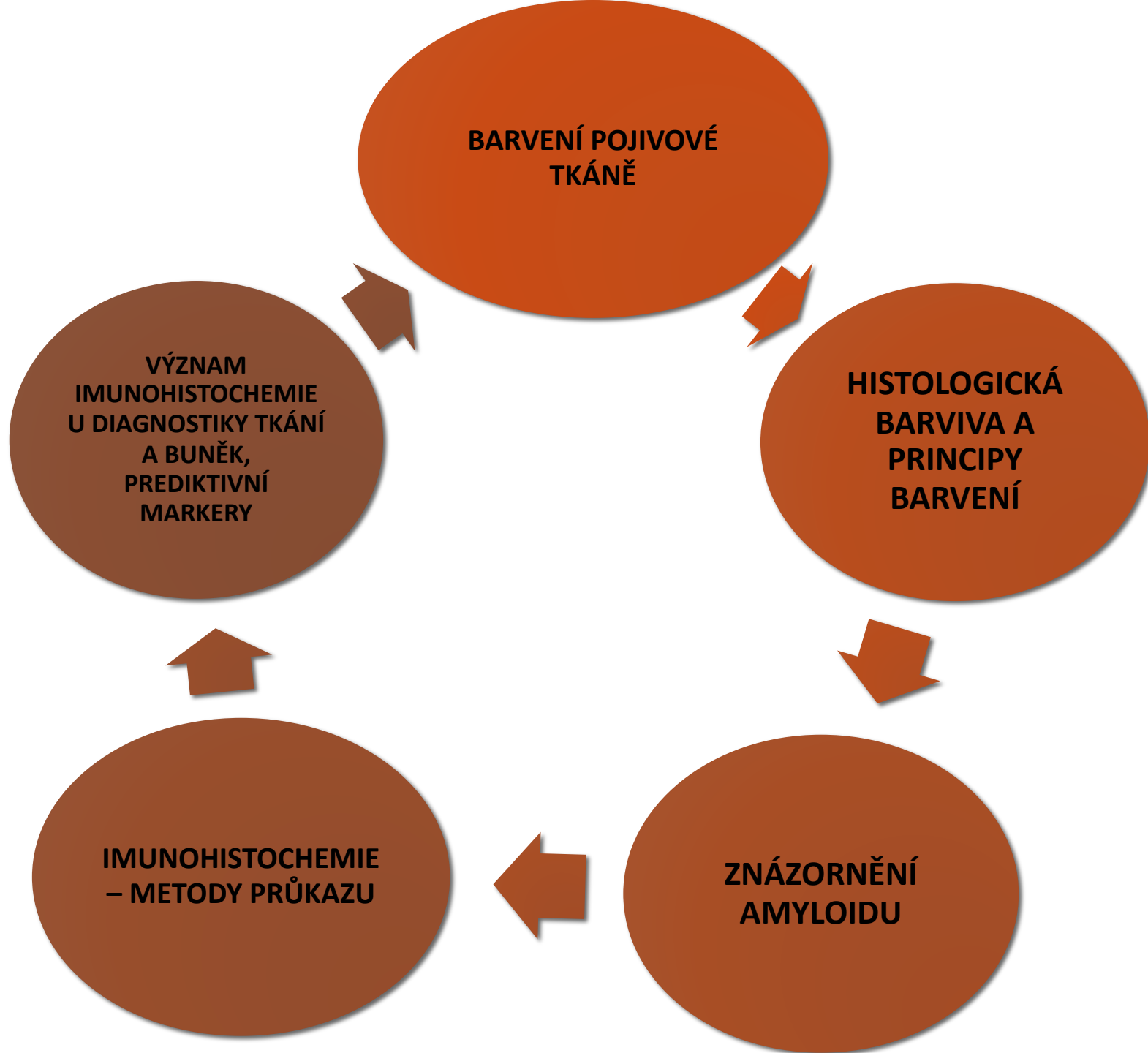


PATOLOGIE IV



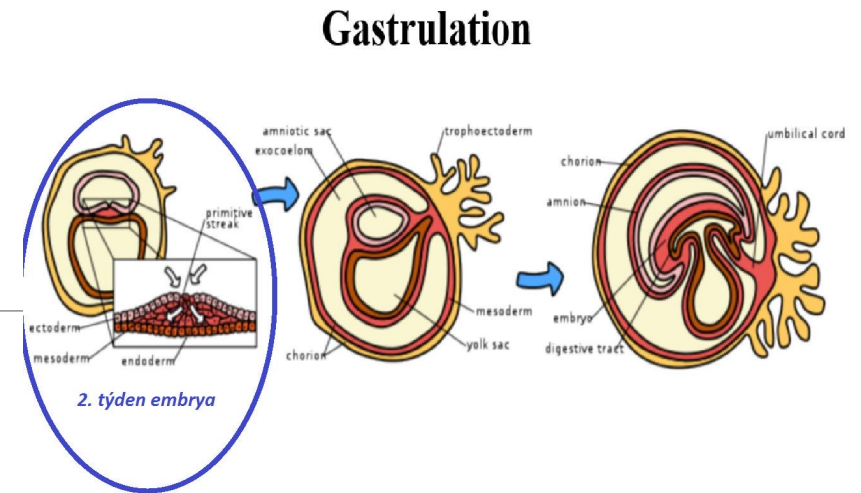
MATULOVÁ KVĚTOSLAVA

ÚPA FN BRNO

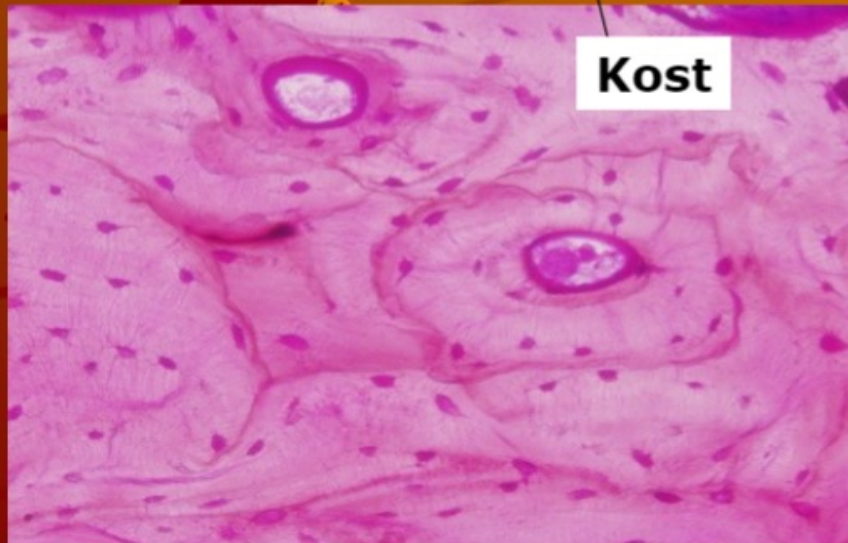


BARVENÍ POJIVOVÉ TKÁŇE

Pojivová tkáň



- původ v mezenchymu
 - vývojově první pojivová tkáň , která vzniká v oblasti těla zárodku – vycestováním bb ze zárodečných listů
- morfogenetické procesy- kondenzace, proliferace, apoptóza, migrace, tvorba mezibuněčné hmoty,
- stavební princip – rozvoj mezibuněčné hmoty- různé typy vláken a základní hmotu
- tvar, fce, složení mezibuněčné hmoty – pojiva :
 - vazivo, chrupavka, kost, (sklo., zubovina, cement)
 - pojivo s tekutou mezibuněčnou hmotou – krev a míza



složení a vlastnosti

plasticita – např. vznik kosti z chrupavky či vaziva

- např. nahrazení kostní dřeně kolagenním vazivem

regenerace – řídké kolagenní vazivo, kostní tkáň

- zralá chrupavka – omezena

kontakt – migrace

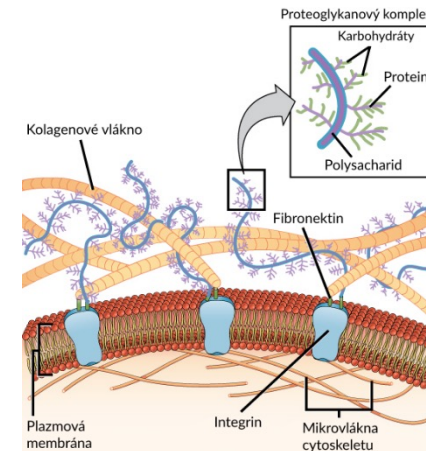
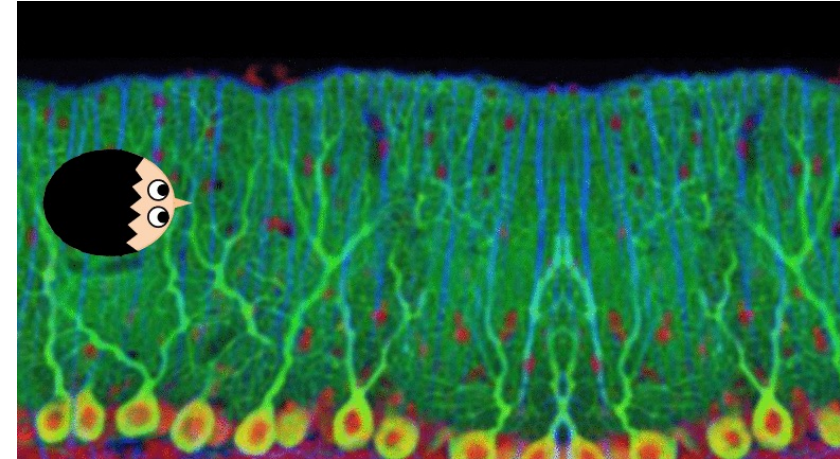
odolnost – tah – kolagen ve šlachách

tlak – glykosaminoglykany v chrupavce

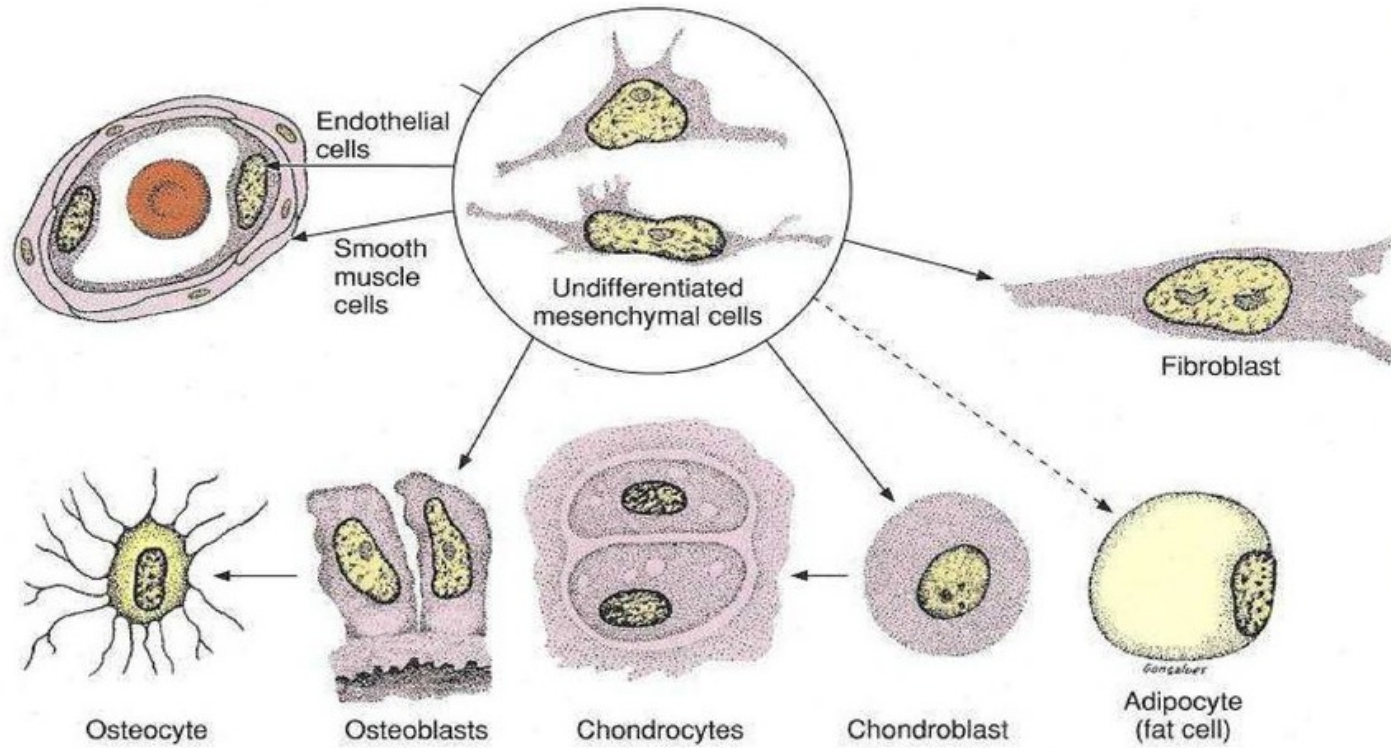
tvrdost – anorganické krystaly

přenášení síly - pevné a pružné kolagenní a elastické vazivo

pevná opora – kostní tkáň



Buňky



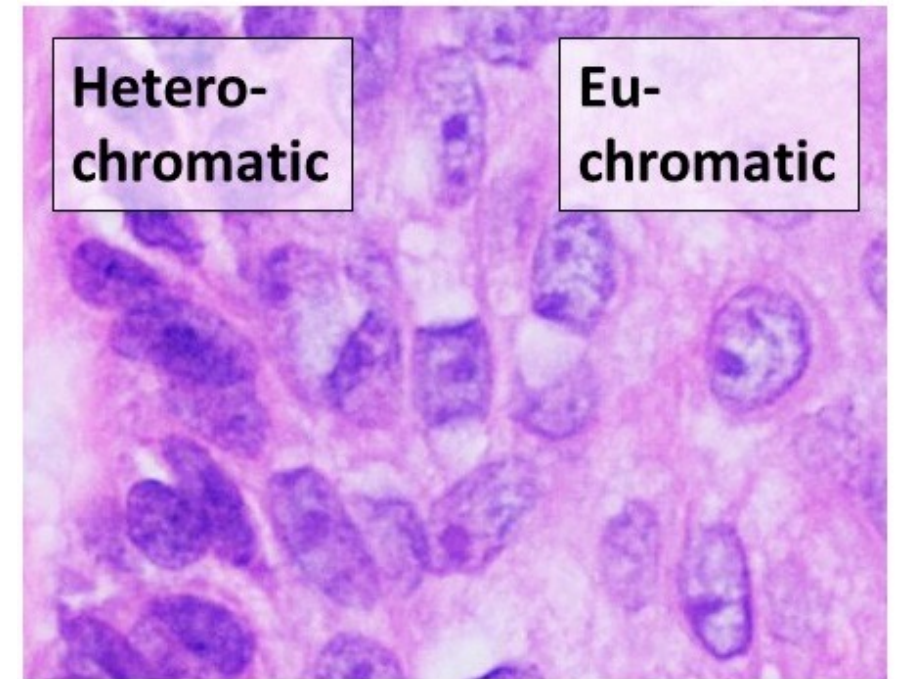
vazivo

chrupavka

kost

bb krvetvorné

bb endotelové



mesenchymová
buňka

chondroblast

lipoblast

fibroblast

osteoblast

myoblast

chrupavka

adipocyt

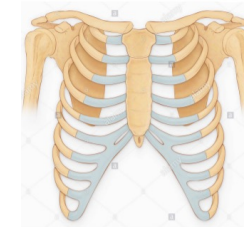
vazivo, vazy,
vazivová pouzdra
šlachy

kost

sval

mezibuněčná hmota
– vlákna
– základní amorfní substance

vazivo a chrupavka



VAZIVO

CHRUPAVKA

buňky – fixní a volné

vlákna:

kolagenní – např. kůže, šlachy, vazy

elastické – vazy

retikulární – opora LEU, krevních bb v KD,
mízních uzlinách, slezině,

fce: stavební podpora

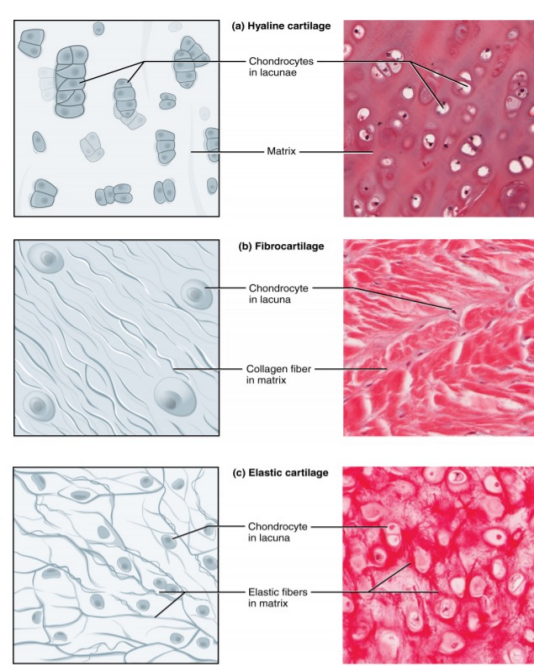
mechanická ochrana

výživa

imunita

hojení

reparace



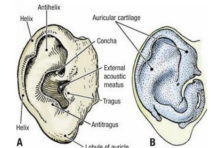
hyalinní – kostra plodu, konce žeber, kloubní
hlavice, skelet hrtanu, průdušnic a bronchů

- kolagen II



elastická – pružná – ušní boltec, hrtan, stěna
cív

- kolagen II



vazivová – svazky kolagenních vláken (I)

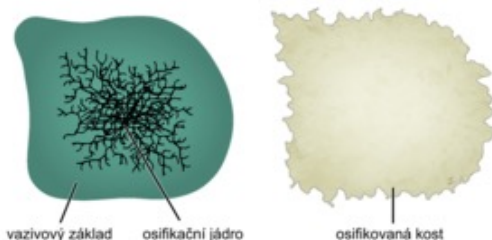
- plotenky, disky, menisky

- neobsahují cévy – výživa difuzí

- nulové hojení

Kost

Desmogenní osifikace ploché kosti



mineralizovaná pojivová tkáň

vzniká procesem zvaným **osifikace**

osteoblastů -produkují kostní matrix

-kolagen I, glykoproteiny, proteoglykany

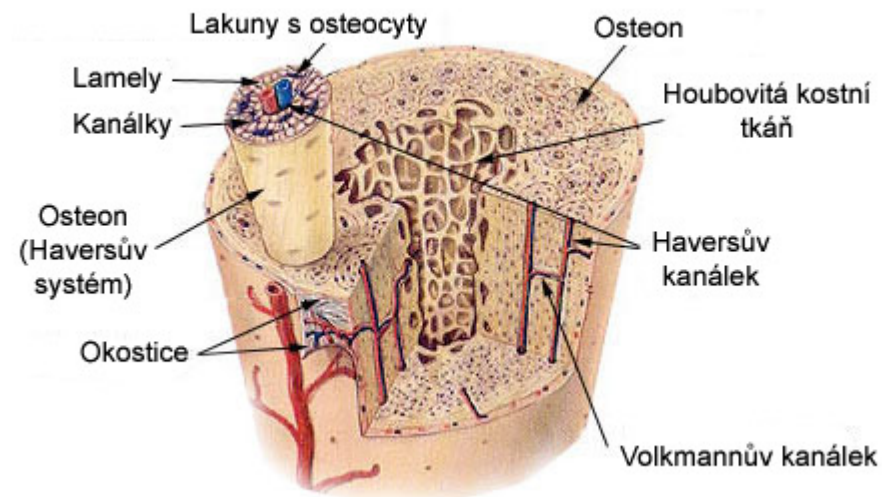
osteocyty -v kostní tkáni

- těla a výběžky v lakunách a kanálcích

osteoklasty – kostní makrofágy

výměna iontů mezi tělními tekutinami a kostní hmotou – hormony

Kompaktní a spongiosní tkáň



USPOŘÁDÁNÍ KOLAGENNÍCH VLÁKEN

- Vlákenná kost – nahodilé uspořádání, hydroxyapatit
- Lamelární kost – lamely se střídají s vrstvami kosti
- kompaktní - hutná
- trámčitá – houbovitá, spongiózní
- Na kostru se upínají svaly a vazy
- povrch – vazivový obal periost
- vnitřní povrch - endos

barvicí metody - Hematoxylin-eozin



extrakt z kampeškového dubu (*Haematoxylon campechianum*), patří mezi bazická (jádrová) barviva

nebarví přímo - oxidace na hematein

přidávají se oxidační činidla (jodičnan sodný)

vzdušný kyslík (na vzduchu cca 1 měsíc)



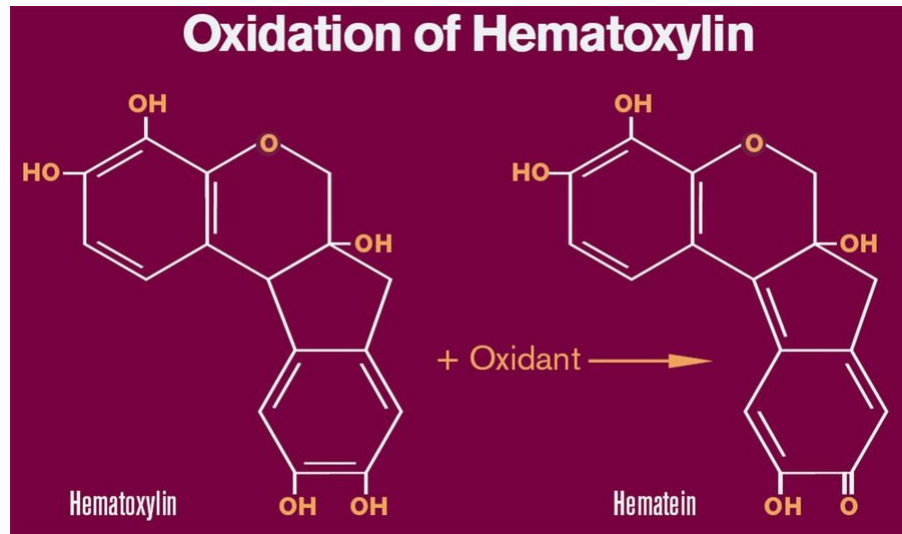
hematein má slabou afinitu ke tkáním

- použít mořidla

barví barevný lak hemateinu

kamencové hematoxyliny: odvozené od kamence hlinitoamonného, jádra – modrá

železité hematoxyliny: odvozené od kamence železitoamonného, jádra - hnědočerně



název	oxidační činidlo	mořidlo
Mayerův hematoxylin	jodid sodný	síran hlinitodraselný
Harrisův hematoxylin	oxid rtuťnatý nebo jodid sodný (příp. draselný)	síran hlinitoamonný
Ehrlichův hematoxylin	přirozená oxidace (2 měsíce)	síran hlinitodraselný
Weigertův hematoxylin	chlorid železitý	

Eosin



vzniká působením bromu na fluorescein

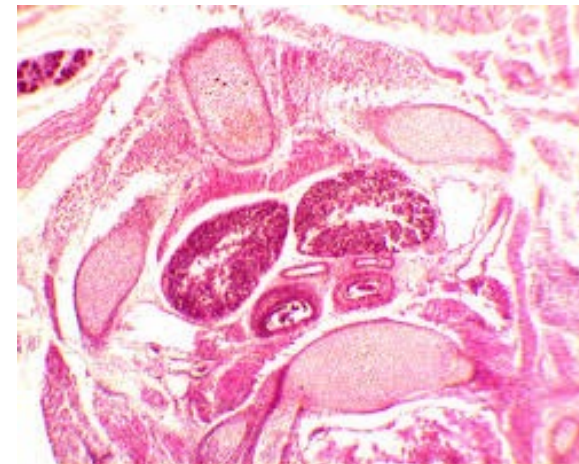
Barvení cytoplasmy, kolagenu a svalových vláken.

Struktury, které se snadno barví eosinem, se označují jako eosinofilní.

Eozinů existuje několik druhů, liší se svou rozpustností, chemickým složením a také barvou:

bromeosiny – eozin žlutý, červený

jodeosiny – erytrosiny



Hematoxylin-eozin

1. Odparafínování	3. Odvodnění
xylen 1- 5 min. xylen 2- 5 min. xylen 3- 5 min. 96% alkohol 1- 5 min. 96% alkohol 2- 5 min. H ₂ O-praní 30 s.	96% alkohol 1-5 min. 96% alkohol 2- 5 min.
2. Barvení	4. Projasnění
Mayerův hematoxylin- 10 min. H ₂ O-modrání- 5 min. Eozin- 20 s. H ₂ O-praní- 1 min.	xylen 1- 5 min. xylen 2- 5 min. xylen 3- 10 min.
	5. Montování

Výsledek

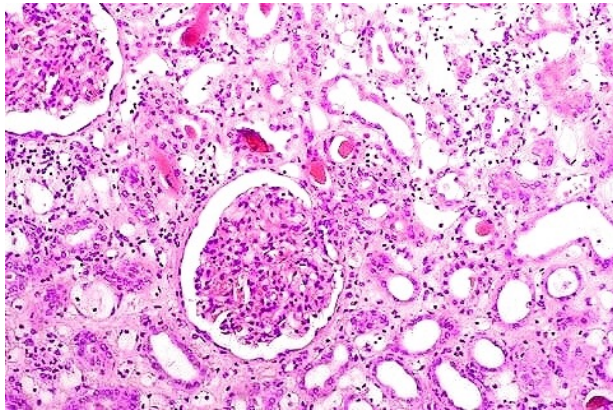
jádra buněk modře

vazivo růžově

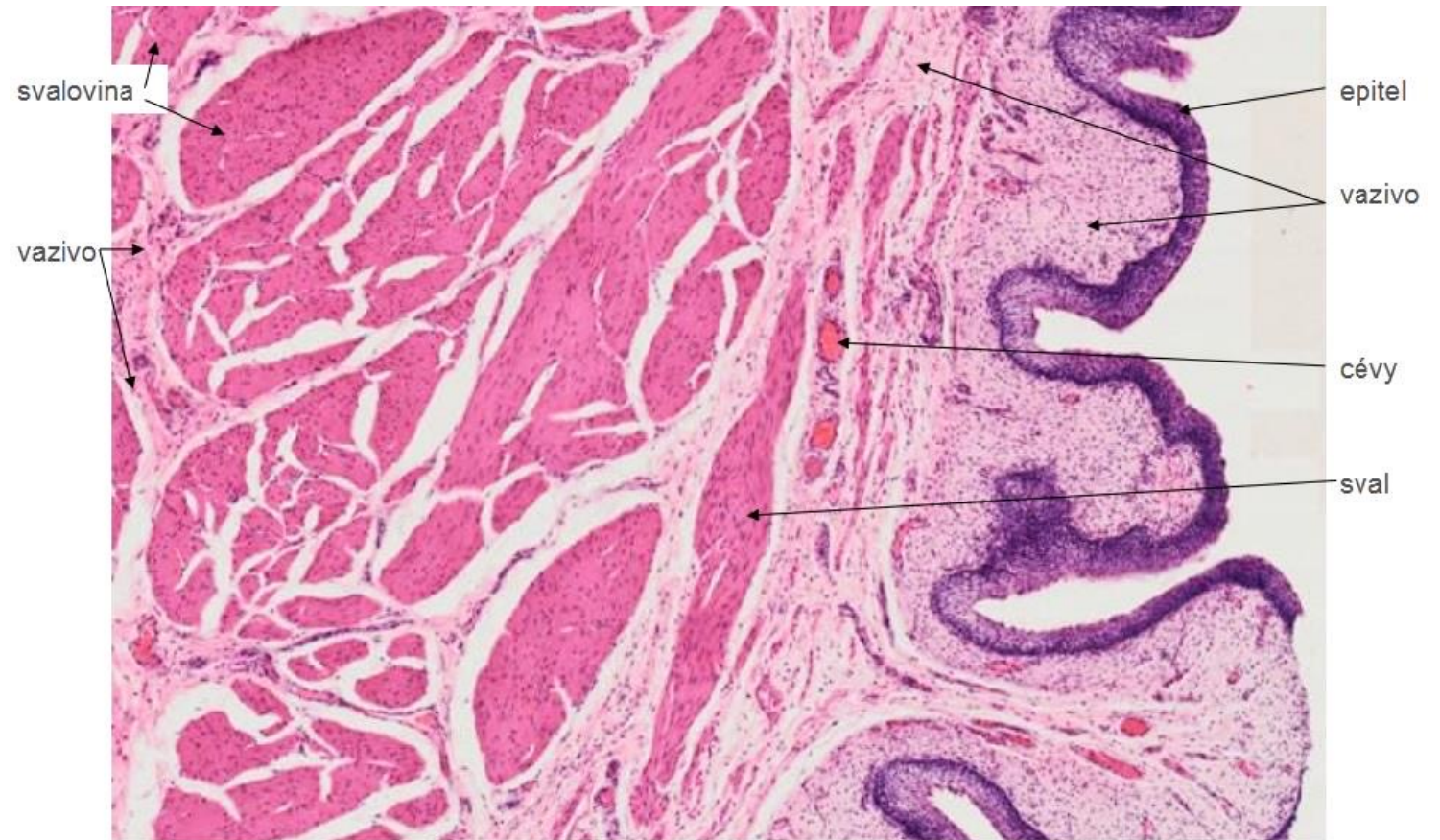
svalstvo červeně fialově

erythrocyty oranžově

chrupavka modře



HE, močový měchýř



Weigert van Gieson

Barvicí metoda, která nám umožňuje barevně **odlišit kolagenní vazivo od svalové tkáně.**

K barvení jader se používá železitý hematoxylin (*jádra*),
dobarvujeme kyselým fuchsinem (*kolagenní vlákna*)
kyselinou pikrovou (*cytoplasma buněk a svalovina*).

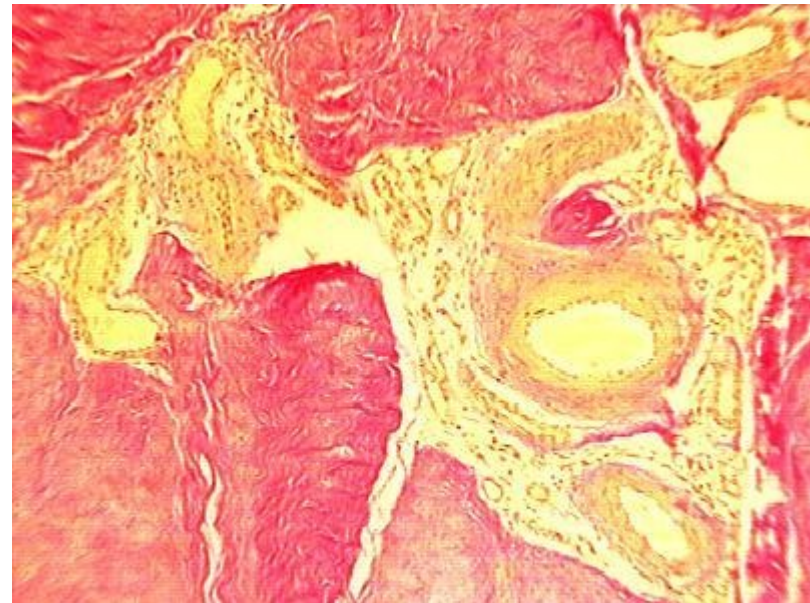
výsledek:

jádra modročerně až černohnědě

kolagenní vlákna třešňově červeně

svaly žlutě

erytrocyty žlutě



Massonovy trichromy

K odlišení kolagenního vaziva od hladké svaloviny.

Žlutý Massonův trichrom:

Barviva: Harrisův hematoxylin, eozin, šafrán

Výsledek barvení:

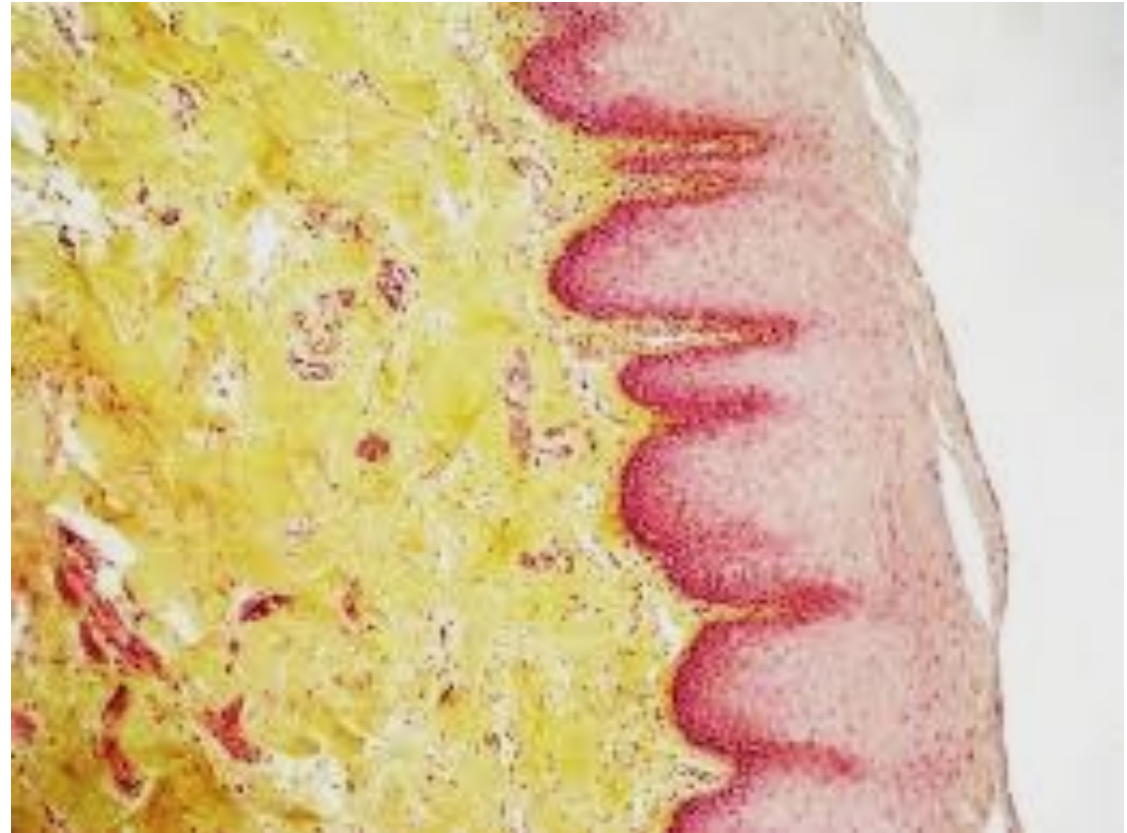
jádra tmavě modrá,

cytoplasma světle růžová,

kolagenní vlákna žlutá,

svalovina červená,

erytrocyty červené



Modrý Massonův trichrom

Barviva: hematoxylin (Weigertův)

kyselý fuchsin-ponceau,

anilínová modř

Výsledek barvení:

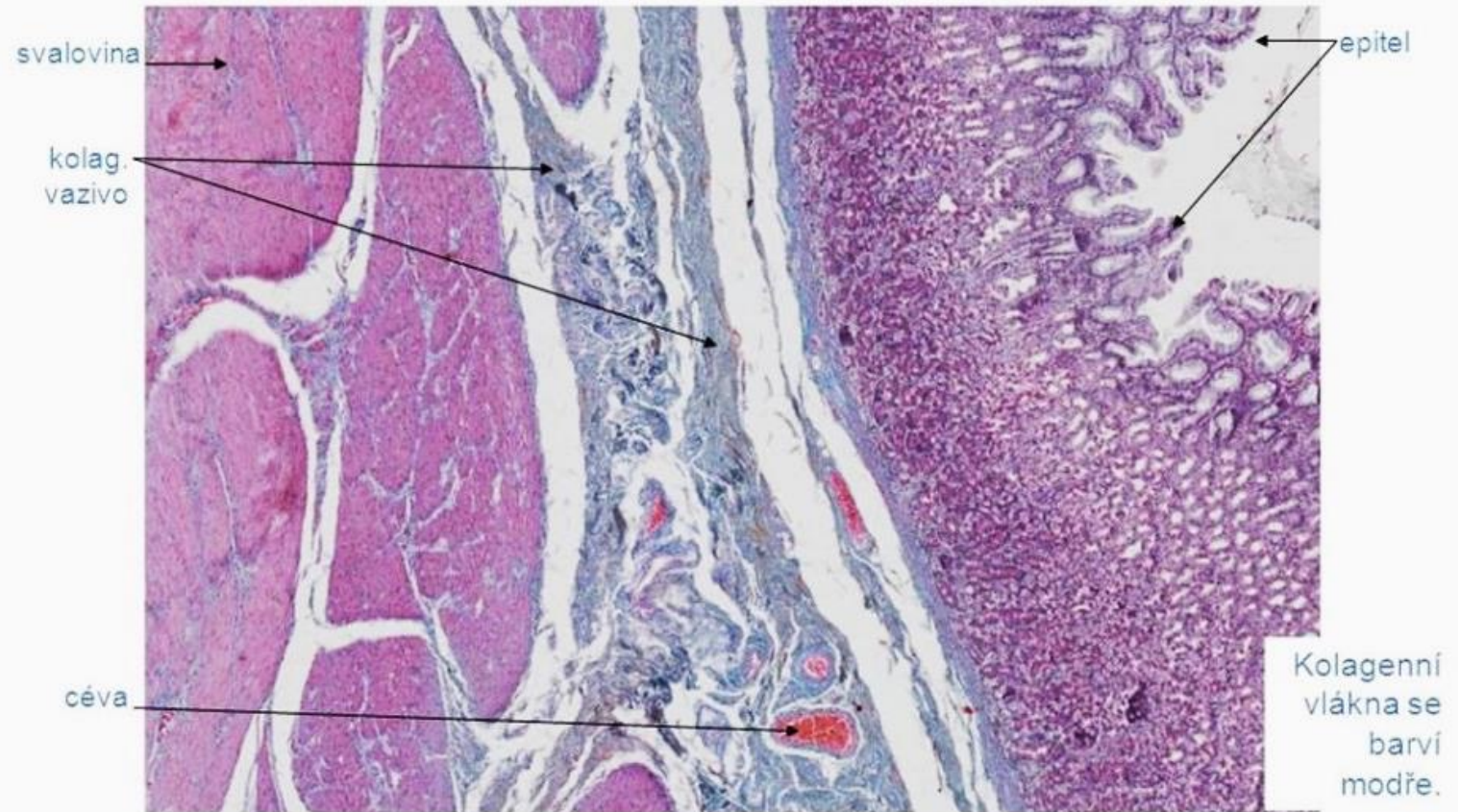
jádra tmavě hnědá

cytoplasma světle růžová

kolagenní vlákna modrá

svalovina červená

Massonův modrý trichrom, fundus žaludku



Zelený Massonův trichrom

Barviva: hematoxylin (Weigertův),

ponceau–kyselý fuchsin

světlá zeleň

oranž G

Výsledek barvení:

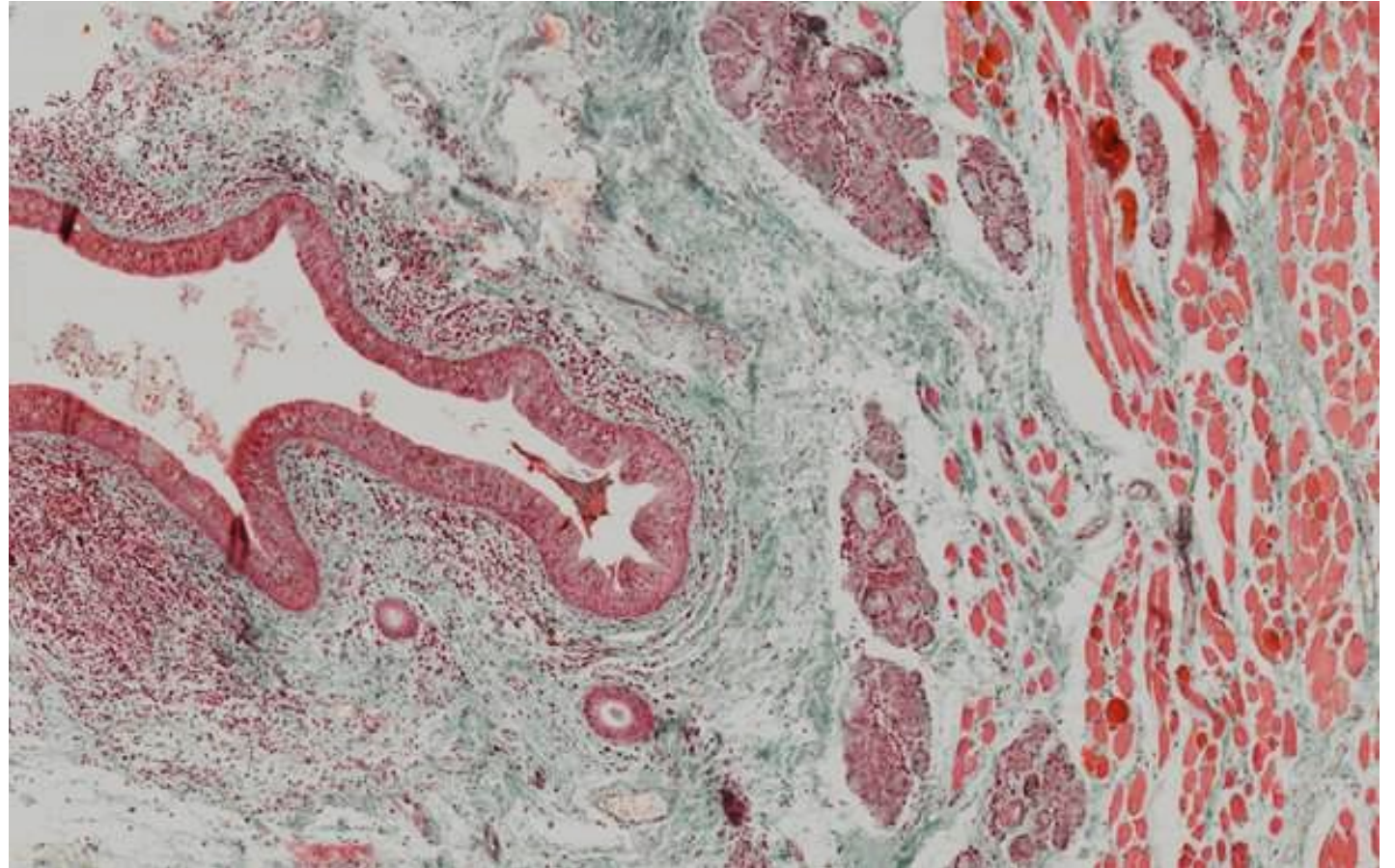
jádra tmavě hnědá

cytoplasma okrová

kolagenní vlákna zelená

svalovina červená

erytrocyty oranžové



Barvení -AZAN

je přehledné histologické barvení pro **zvýraznění vaziva**

barviva:

azokarmín

anilínová modř

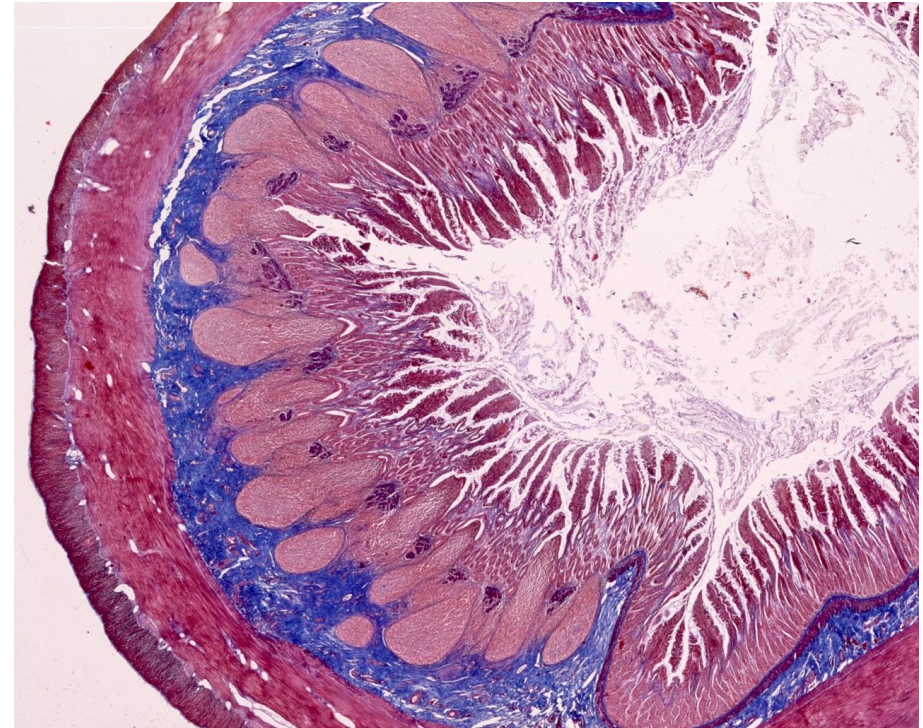
oranž G

Svalstvo – červené

Jádra tmavě červená

Ery oranžové

Kolagení vazivo - modré

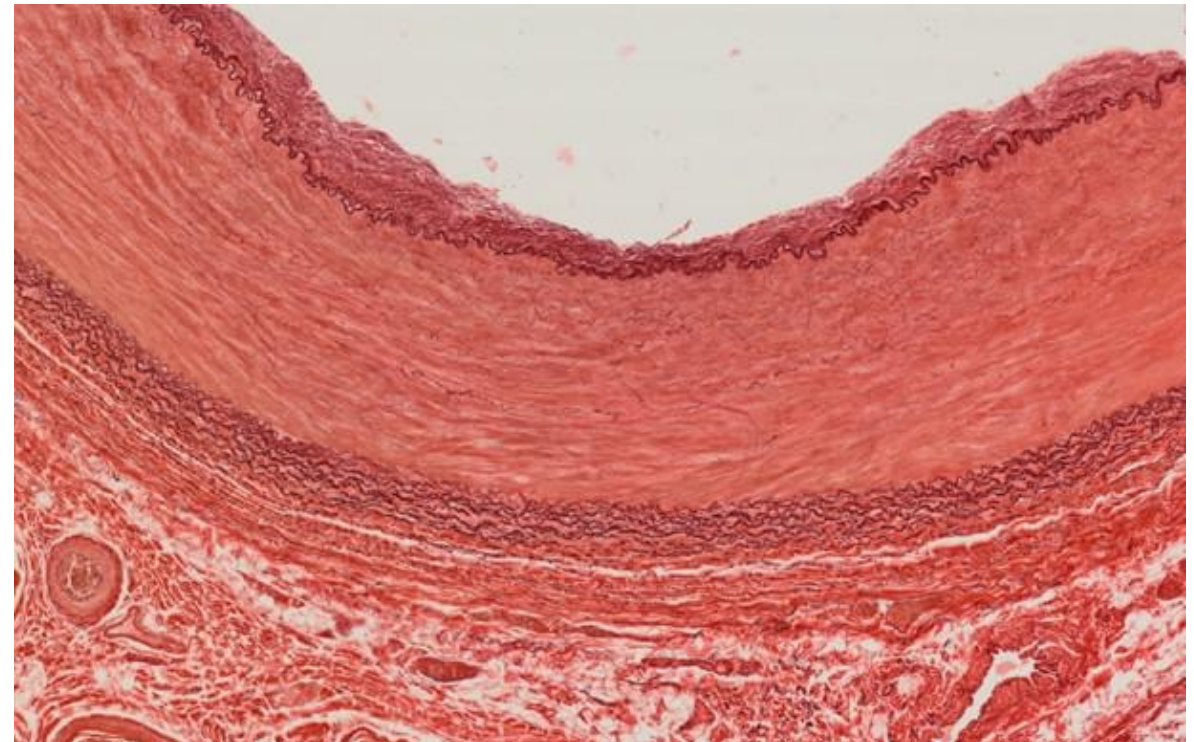
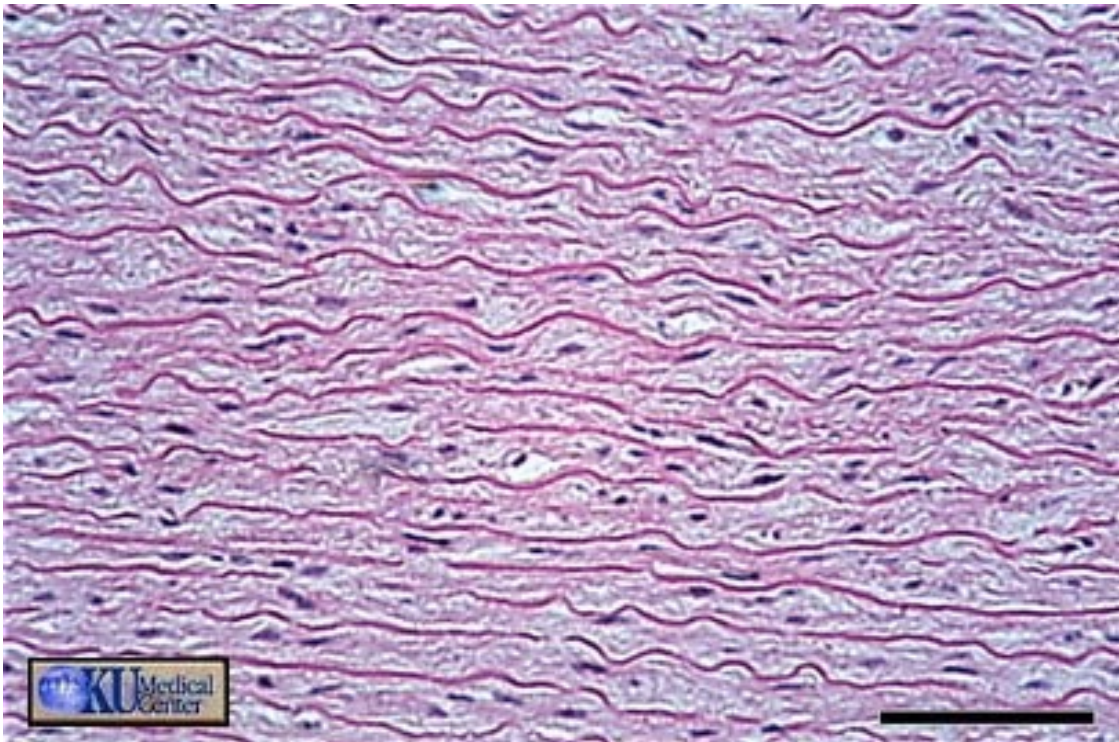


Peyerovy pláty ilea obarvené metodou AZAN

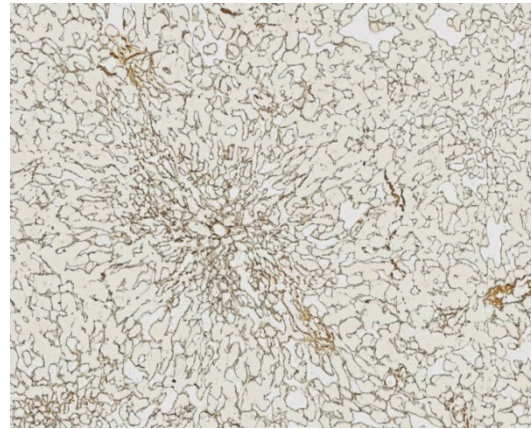
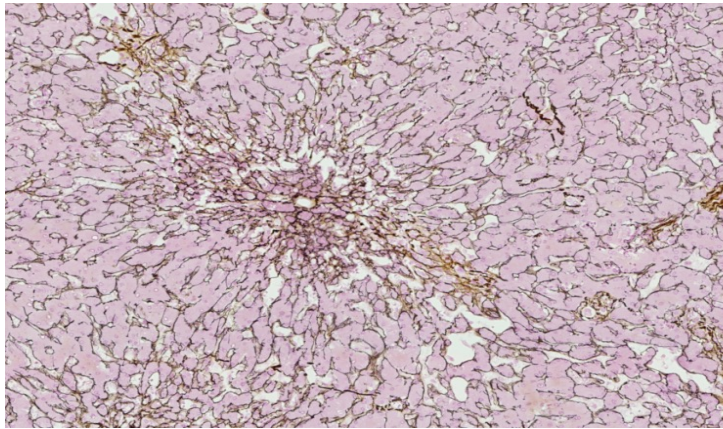
Průkaz elastických vláken

K barvení elastických vláken se používá

např. rezorcin-fuchsin, orcein, aldehydový fuchsin, často v kombinaci s přehledným barvením.

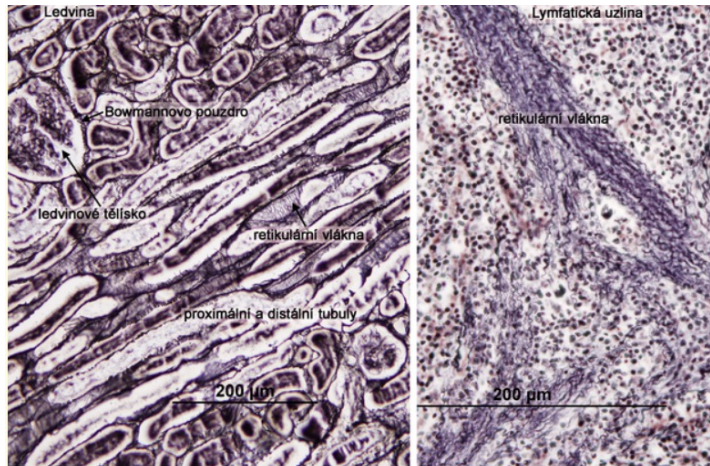


Impregnační metody



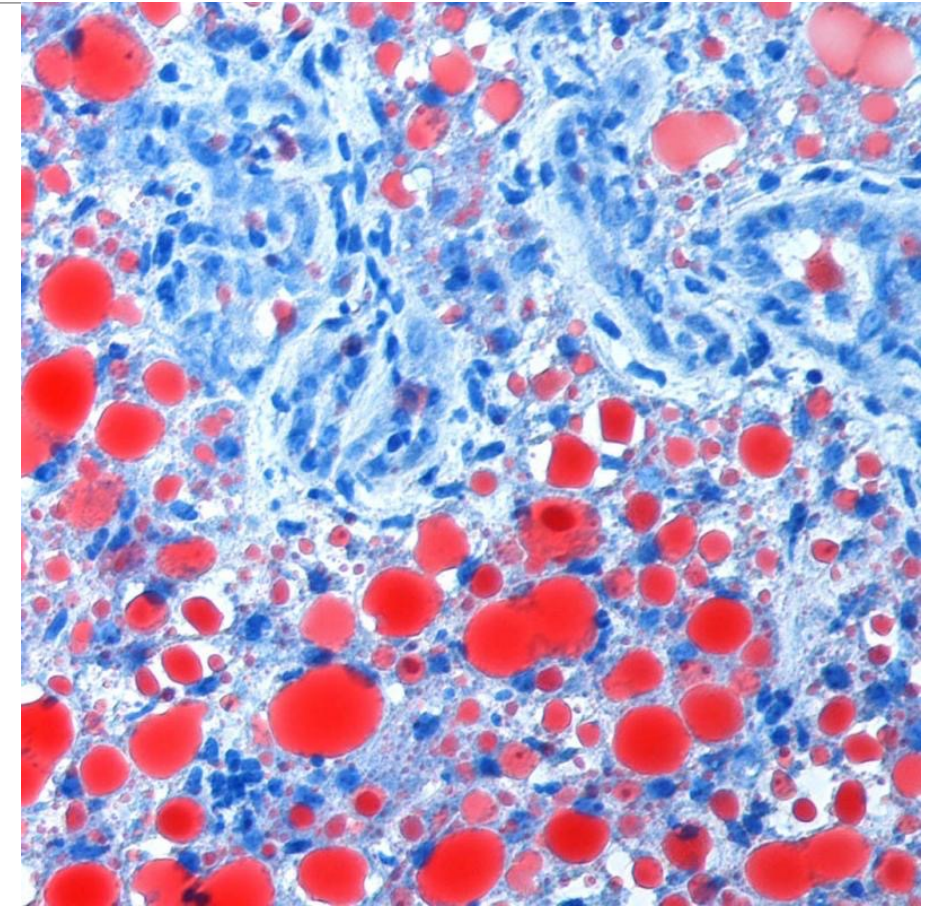
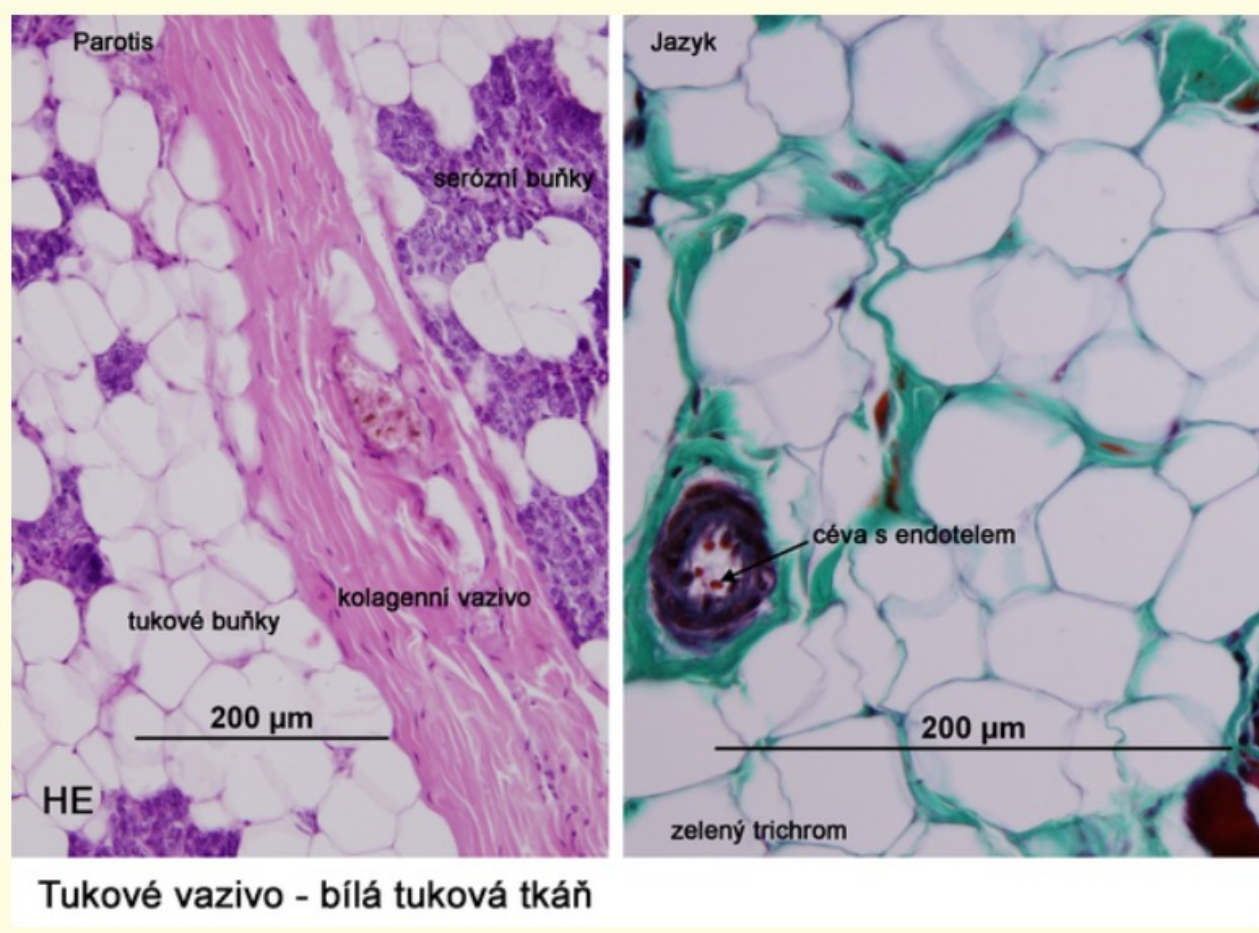
vysrážení solí těžkých kovů (nejčastěji stříbra) na některých buněčných, případně i mimobuněčných strukturách. Tmavá depozita kovu pak mikroskopicky vidíme v místě proběhlé redukční reakce.

Dle metody Gömöry se barví černě retikulínová kostra tkáně.



Retikulární vazivo - impregnační technika

Tukové vazivo



metoda	barviva	výsledek
HE	kamencový hematoxylin a eosin	hematoxylin – bazofilní struktury-modře (jádro, jaderko, ribozomy) eozin – acidofilní složky –ružově (cytoplasma, hemoglobin, svalovina, kolagenní vlákna)
cílené znázornění vazivových vláken		
kolagenní vlákna	anilinínová modř	kolagenní vlákna modrá
	pikrosiriová červeň	kolagen červeně polarizované světlo – kolagen I – červená až žlutá barva, kolagen III – zelená barva
elastická vlákna	orcein	červeno-hnědě
	aldehydový fuchsin	elastin- fialově
	resorcin-fuchsin	hnědo-fialově až modro-černě
retikulární vlákna	AgNO3	argyrofilní v. – černá, kollagenní vlákna I – hnědo-šedá
znázornění buněk i kolagenních vláken pojiv		
AZAN	azokarmín, oranž G, anilínová modř	jadra- červeně, cytoplasma-oranžová, kolagen-modrý, svalovina- červená
M. trichrom modrý	železitý hematoxylin, kyselý fuchsin, anilininová m.	jadra- hnědočerná, svalovina-červená, kolagen-modrý
M. trichrom zelený	železitý hematoxylin,světlá zeleň, oranž G	jadra- hnědočerná, svalovina-oranžová, kolagen zelený
Weigert van Gieson	železitý hematoxylin, pikrofuchsin	jadra- hnědočerná, kolagenní vazivo- červeně, sval a ery - žlutě

Histologická barviva a principy barvení

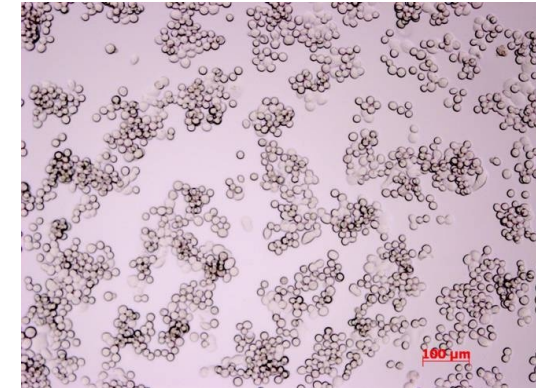
HISTOLOGICKÁ BARVIVA A PRINCIPY BARVENÍ

Neobarvené řezy – nerozlišíme jednotlivé struktury,
- mají stejný index lomu

Běžná světelná mikroskopie - založena na použití barvicích metod

Barviva jsou látky- absorbují světlo určitých vlnových délek

Různé součásti buněk a tkání váží různá barviva
– po obarvení se proto dají od sebe dobře odlišit



Barviva

Barvivo = látka, která absorbuje světlo určité vlnové délky.

Rozlišení jednotlivých struktur- afinitu k různým barvivům

Důvodem odlišné barvitelnosti = rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti (elektrostatické vazby)

Molekuly barviv

- vodíkové můstky
- intermolekulárních van der Waalsových sil
- iontovou či kovalentní chemickou vazbu

Color Index- C. I. 75290, C. I. 45380

Product Name	Code	Package
Hematoxylin 1-hydrate (C.I. 75290) for clinical diagnosis	251344.1604	5 g
	251344.1606	25 g
Carazzi's Hematoxylin solution for clinical diagnosis	255298.1610	500 ml
	255298.1212	2.5 L
	253949.1610	500 ml
Harris Hematoxylin solution for clinical diagnosis	253949.1611	1000 ml
	253949.1612	2.5 L
	256991.1610	500 ml
Harris Hematoxylin modified solution for clinical diagnosis	256991.1212	2.5 L
	254766.1610	500 ml
Mayer's Hematoxylin solution for clinical diagnosis	254766.1211	1000 ml
	253453.1210	500 ml
Weigert's Hematoxylin solution B for clinical diagnosis	253454.1210	500 ml

Other related stains

Product Name	Code	Package
Eosin for fast staining (Panoptic No. 2) for clinical diagnosis	253999.1210	500 ml
	253999.1212	2.5 L
Eosin Yellowish (C.I. 45380) for clinical diagnosis	251299.1606	25 g
Eosin Yellowish alcoholic solution 1% for clinical diagnosis	256879.1210	500 ml
	256879.1212	2.5 L
Eosin Yellowish hydroalcoholic solution 1% for clinical diagnosis	251301.1609	250 ml
	251301.1211	1000 ml

Histologická barviva

Zásaditá – bazická- jádrová: bazofilní struktury (jaderný chromatin, ribosomy)

hematoxylin, jádrová červeň, methylenová modř, toluidinová modř, thionin, krystalová violet

Kyselá –acidická-plasmatická: acidofilní struktury (cytoplasma, kolagenní vlákna)

eosin, světlá zeleň, anilinová modř, oranž G, ponceau, kyselý fuchsin

Neutrální barviva - směs kyselých a bazických barviv. pH 7.

Amfoterická barviva - obsahují ve své molekule aniontové a kationtové struktury. Jejich reakce závisí na pH.

Barviva podle původu:

Přírodní: hematoxylin, karmín, orcein, šafrán

Syntetická



Barvení podle způsobu aplikace

- Progresivní – tkáň se barví pod kontrolou zraku do určité intenzity zbarvení, pak se proces přerušuje
- Regresivní – tkáň se přebarví, přebytečné barvivo se z tkáně odstraní tzv. diferencováním.
- Sukcedánní – několik barviv po sobě, každé barvivo barví jinou část tkáně
- Simultánní – více barviv současně, každé barvivo barví jinou část tkáně
- Adjektivní - barvení prostřednictvím mořidla, které se váže na tkáň

Barvení podle výsledků barvení

Ortochromatické – složky tkáně vykazují stejnou barvu jako užitá barviva

Metachromatické – jednotlivé komponenty tkáně se obarví jedním barvivem v různých barevných tónech.

Např. barvení methylenovou nebo toluidinovou modří. Jaderný chromatin se barví modře (ortochromaticky), matrix chrupavky, granula žírných buněk a muciny se barví červenofialově (metachromaticky),

metachromatická barviva jsou např.: toluidinová modř, thionin, methylenová modř

Polychromatické – více barviv např. jaderné barvení (hematoxylin) a dvě dobarvení (Oranží G a EA polychromem)

Difúzní – barvicí roztok znázorní všechny složky tkáně ve stejném barevném tónu a ve stejné intenzitě

Výběrové – barvicí roztok obarví pouze jednu ze složek buněk či tkání nebo ji výrazně vyzvedá

Přehledné barvicí metody

Obarví jádra a cytoplasmu rozdílným barevným tónem a zároveň obarví i mezibuněčnou hmotu pojivové tkáně.

1. Hematoxylin – eosin
2. Massonovy trichomy
 - Podle zbarvení vaziva:
 - a) žlutý
 - b) zelený
 - c) modrý
3. Weigert van Gieson
4. AZAN

BARVICÍ METODA	JÁDRO	CYTO PLAZ.	VAZ.	SVALY	ERYT ROC YTY	BARVIVA
H-E						
ŽLUTÝ TRICHOM						šafrán
MODRÝ TRICHOM						hematoxylin, anilínová modř, kyselý fuchsin
ZELENÝ TRICHOM						hematoxylin, kyselý fuchsin, světlá zeleň, oranž G
AZAN (HEIDENHAIN)						<u>azokarmín</u> , oranž G, anilínová modř
WEIGERT VAN GIESON						železitý hematoxylin, <u>pikrofuchsin</u>

Selektivní metody

- v preparátu vyselektuje a označí pouze některé struktury
- přehled o přítomnosti retikulárních či elastických vláken
- přítomnost kyselých mukopolysacharidů nebo glykogenu
- skupiny speciálních barviv



Přehled barviv a struktur, které se jimi obarvují

PAS – barví polysacharidy

Mucikarmín - barví hlen

Orcein - barví elastická vlákna červeno-hnědě

Alciánová modř – kyselé mukopolysacharidy do modra

Bestův karmín - k průkazu glykogenu v místě s vysokou koncentrací

Szpielmayerův hematoxylin - myelinové pochvy

Kongo červeň - k průkazu amyloidózy

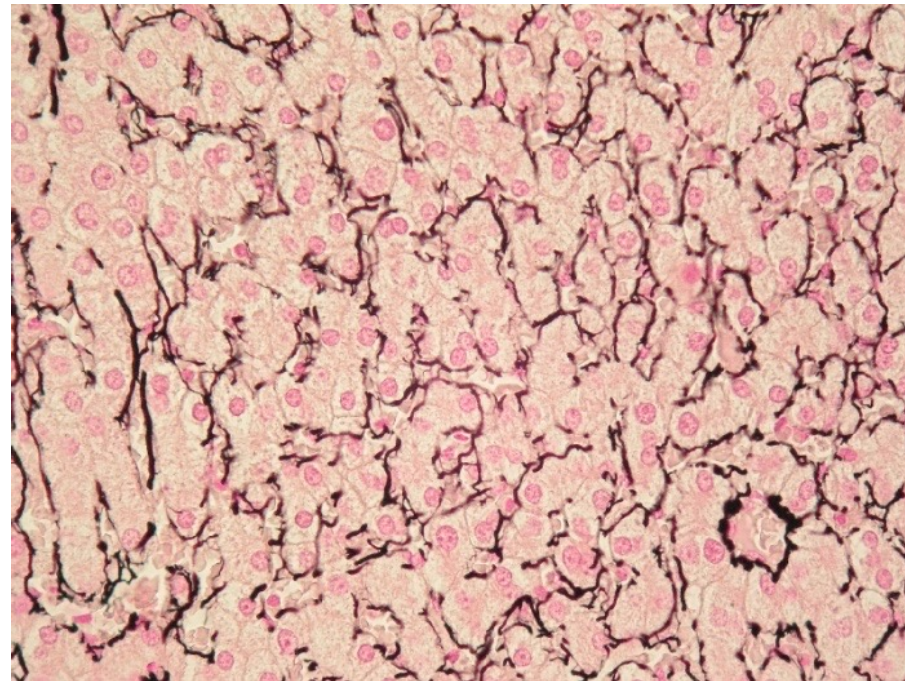
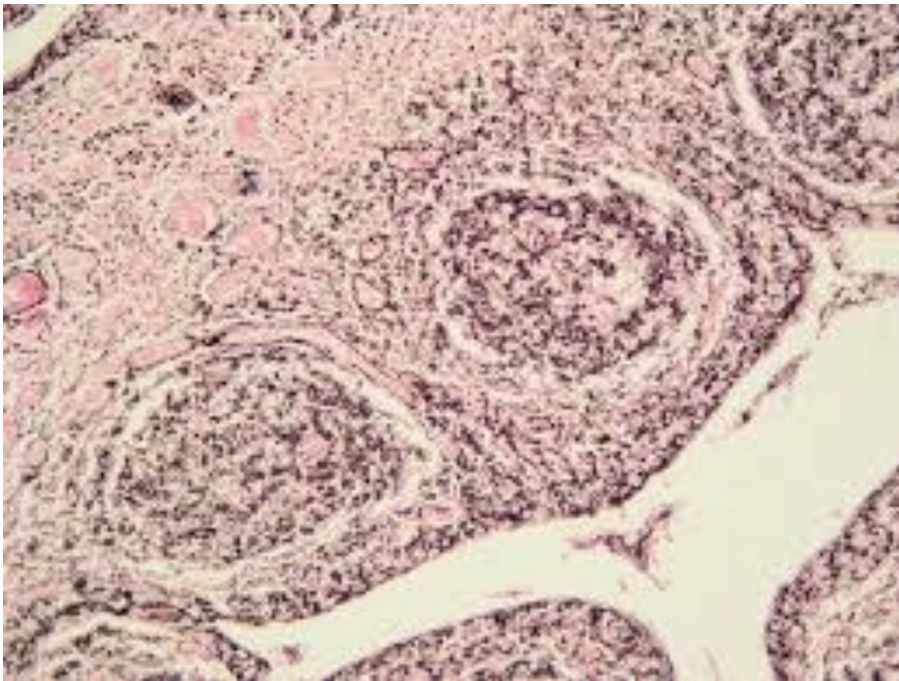
Olejová červeň - neutrální lipidy

Sudanová čerň - neutrální lipidy

Impregnační metody

vysrážení solí těžkých kovů na některých buněčných i mimobuněčných strukturách

Tmavá depozita kovu pak mikroskopicky vidíme v místě proběhlé redukční reakce.



Impregnační metody

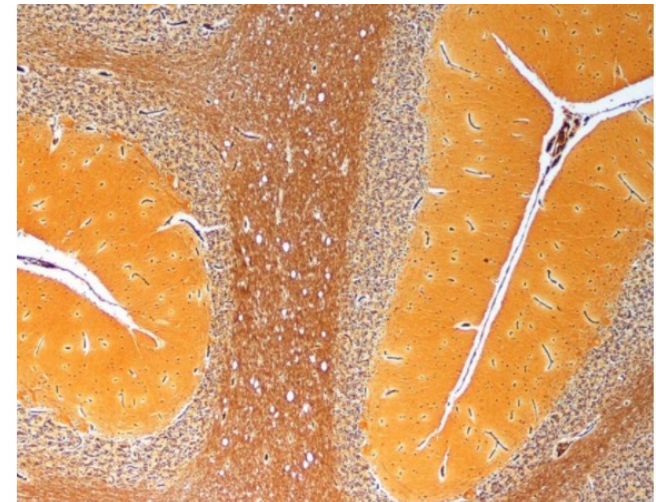
*Dle metody **Gömöry** se barví černě retikulinová kostra tkáně.*

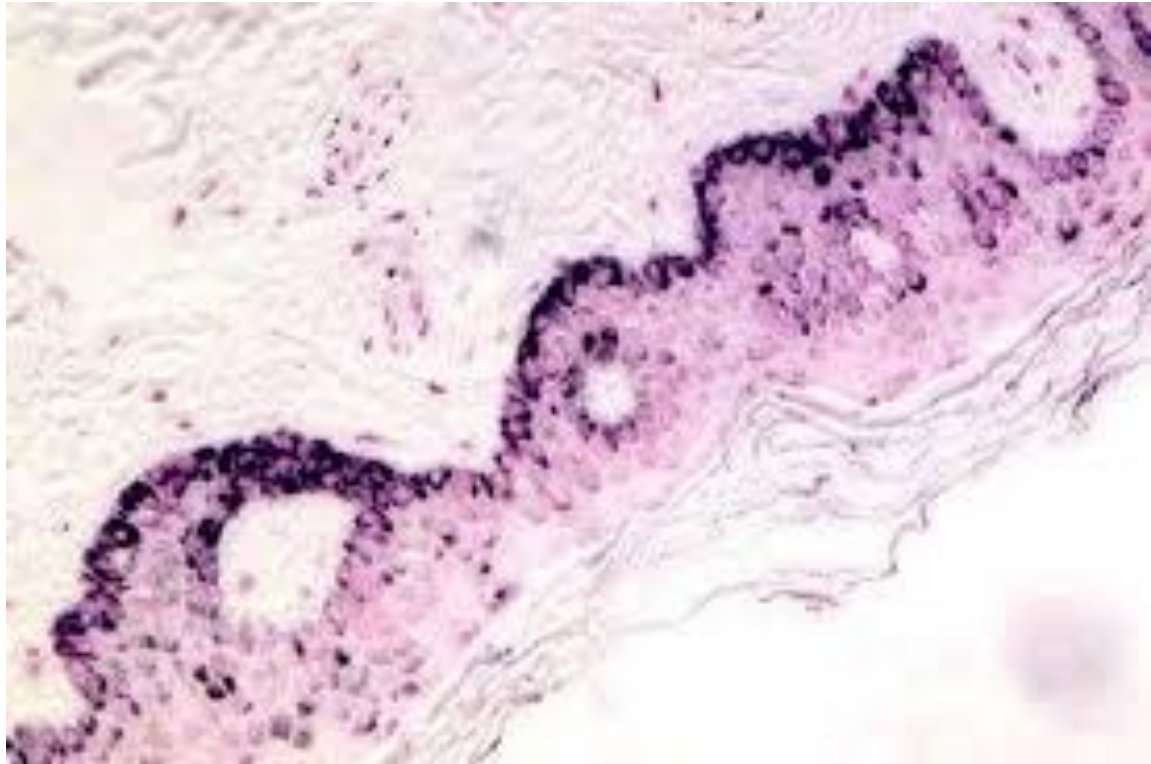
***Grocott** (prosycování řezů solemi stříbra, které se vyredukuje na plísních) plísně se barví černě.*

*barvení podle **von Kossy** se používá na depozita kalcia (dusičnan stříbrný + Ca + světlo černé sraženiny)*

*znázornění astrocytů **dle Hortegovy metody** -astrocyty se impregnují černě*

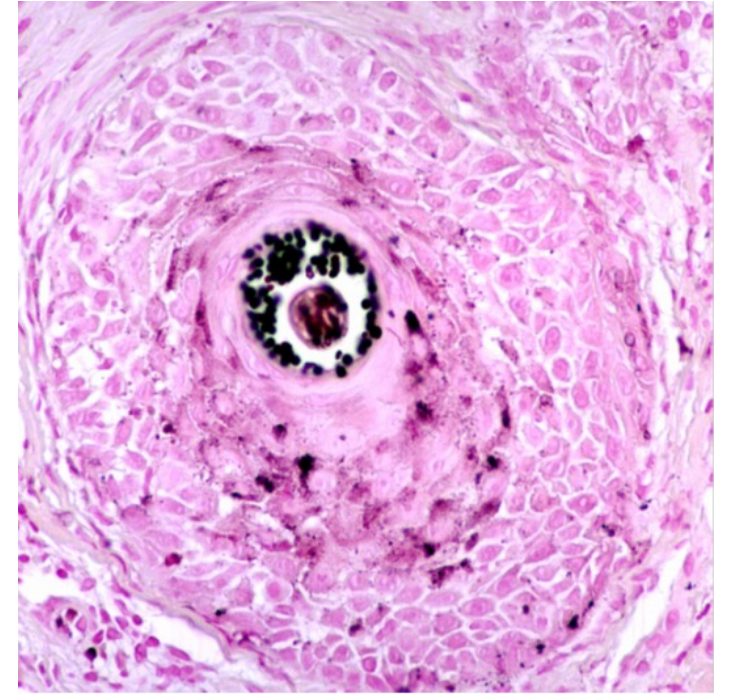
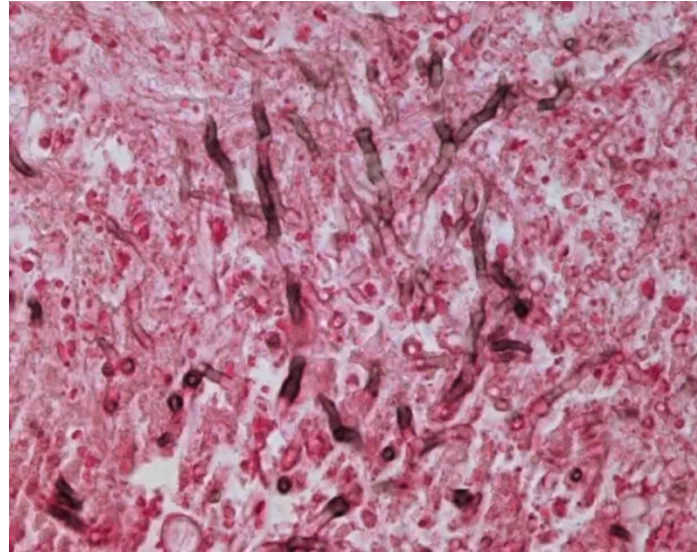
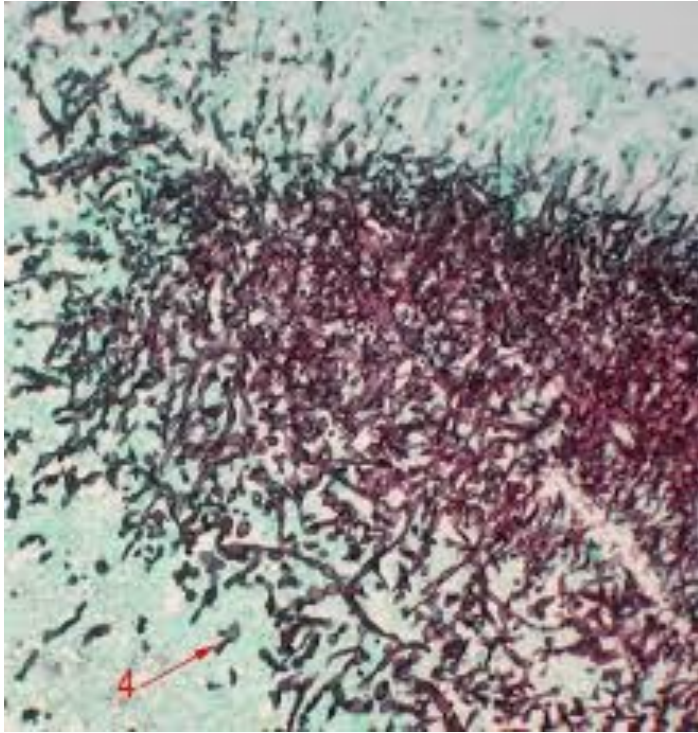
*nervové fibrily, nervová zakončení, neuroglie, astrocyty můžeme impregnačně prokázat dle **Bielschowského, Goldiho metodou a Bodianovou metodou.***



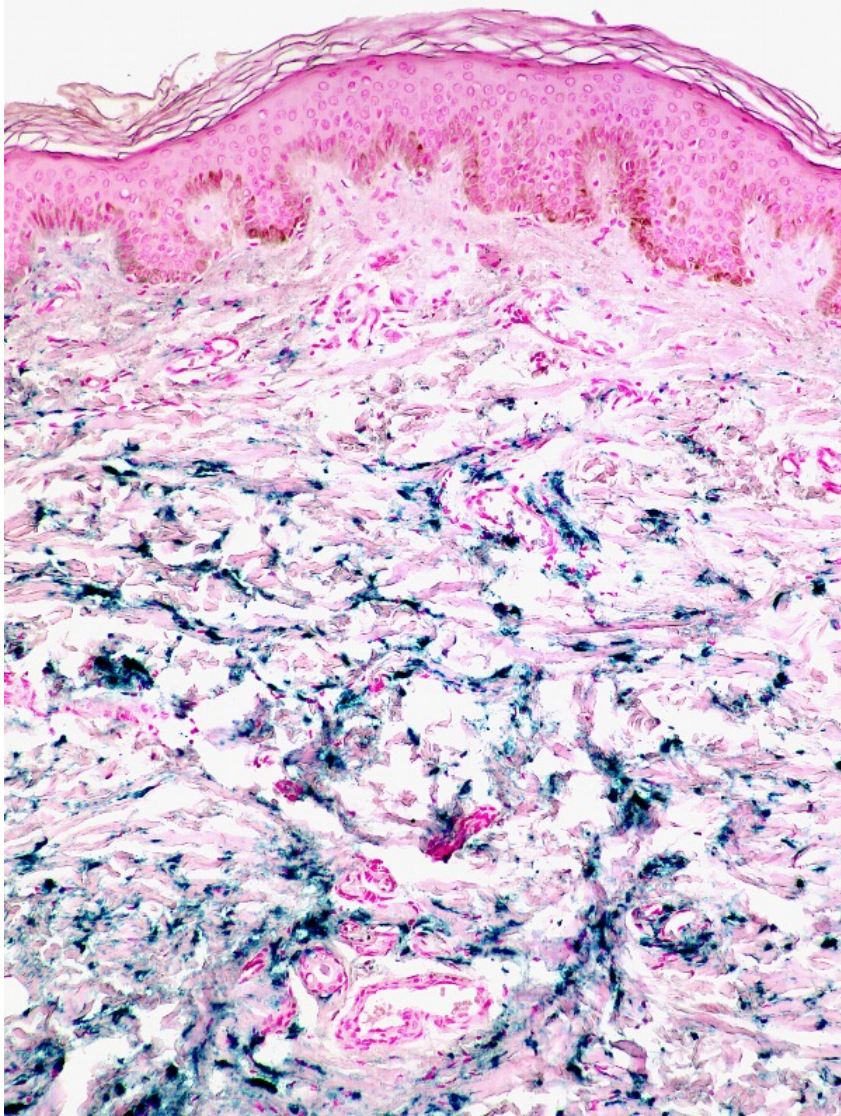


průkaz melaninu

založena na redukci stříbra nebo zlata různými látkami uloženými v cytoplasmě melanin a jiné argentafinní látky se barví černě



Grocott -průkaz plísni

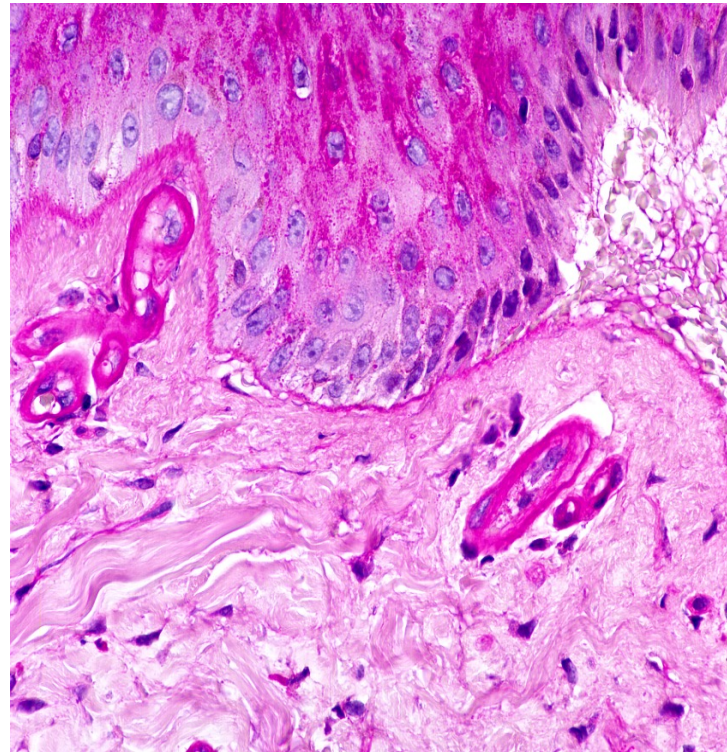
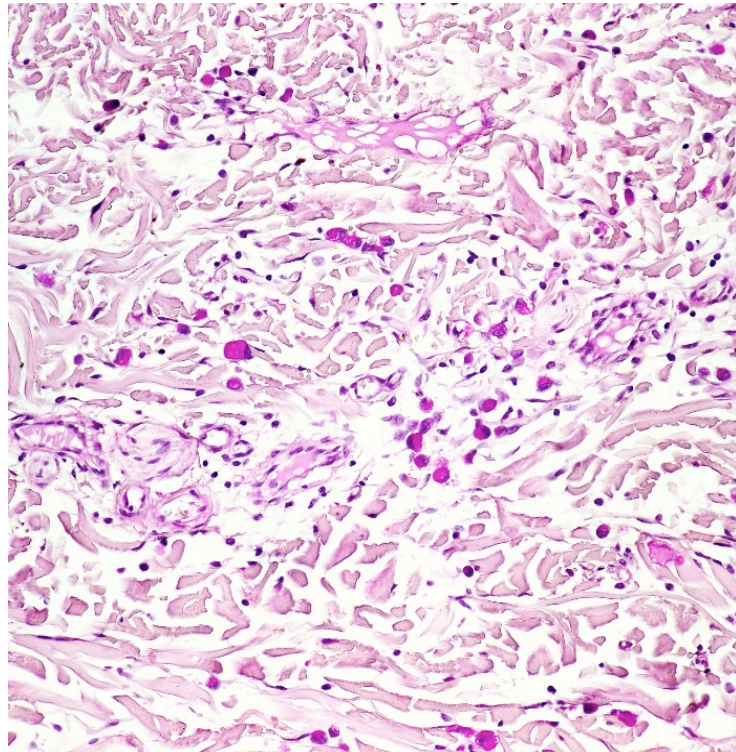


Hemosiderin, Perls

Tkáňové řezy -kyselina chlorovodíková - denaturují vazbu bílkovin na molekuly hemosiderinu

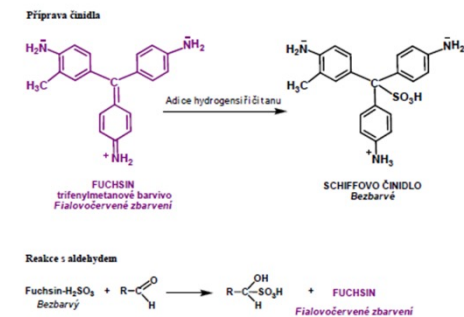
- uvolňování iontů železa (3+).
- ionty železa se kombinují s ferokyanidem draselným za vzniku ferokyanidu železitého
- modrým pigmentem

PAS reakce - využívá vzniku aldehydů při oxidaci polysacharidů kyselinou jodistou. Vznikající aldehydy reagují s Schiffovým reagens a vytváří komplex s fialově červeným zbarvením.



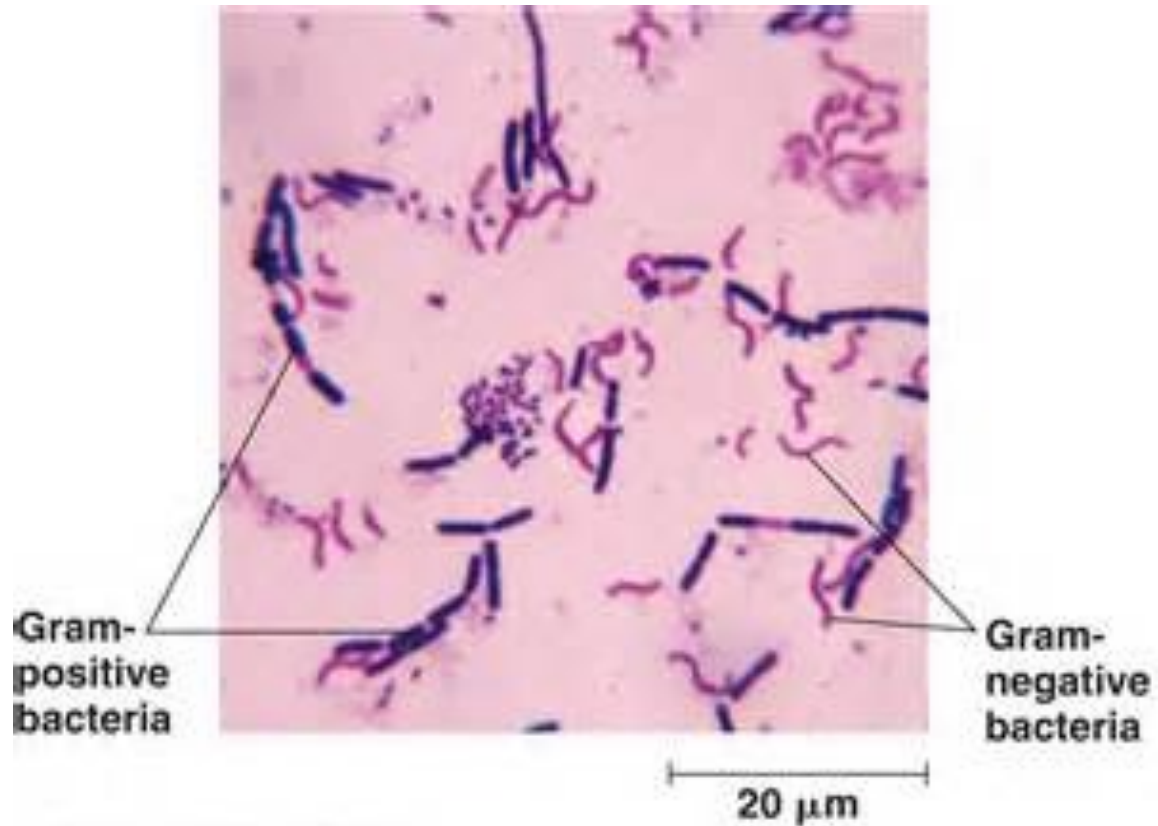
Schiffovo činidlo je vodný roztok fialovočerveného barviva fuchsinu, ke kterému se přidává hydrogensířičitan nebo sířičitan.

Pokud hotové Schiffovo činidlo přijde do kontaktu s aldehydovou skupinou, sířičitan se od fuchsinu oddělí a roztok se zbarví.

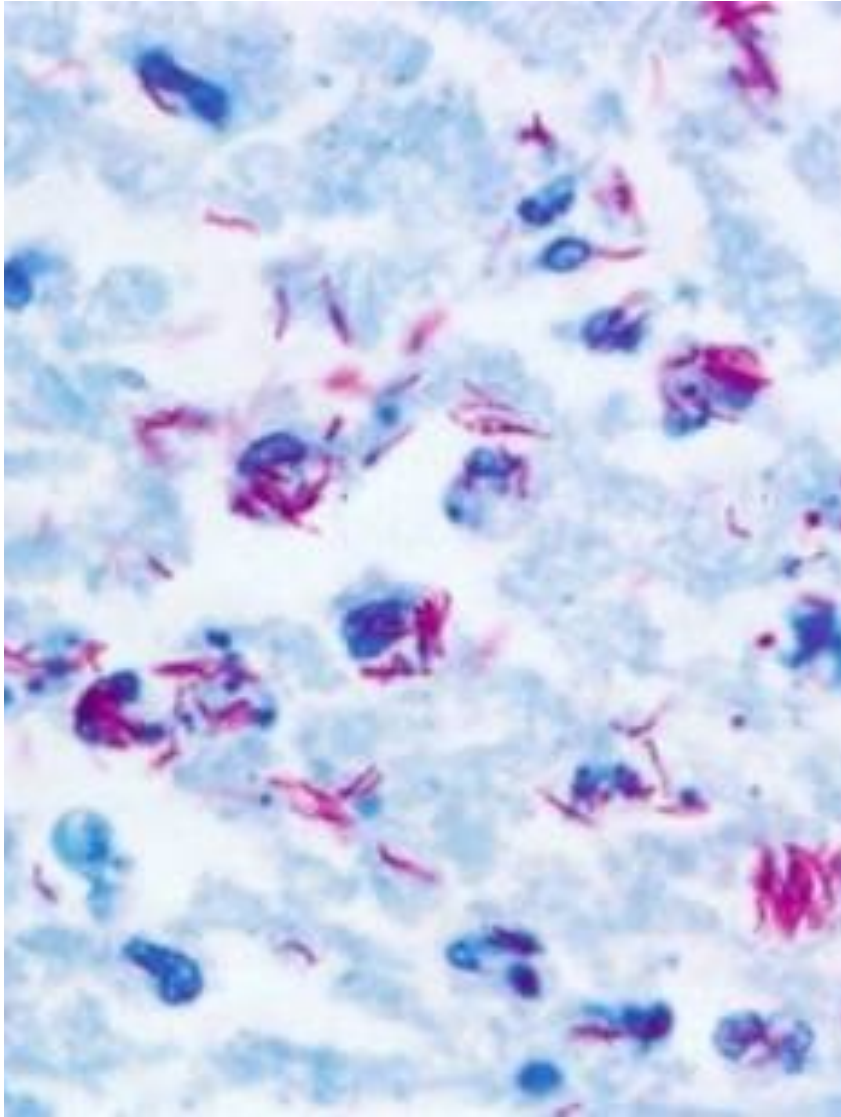


Barvení bakterií a fibrinu

Barvení podle Gramma v tkáňových řezech rozliší G+ a G- bakterie.



Pro průkaz fibrinu lze použít Gramovo barvení s diferenciací Anilínem.



barvení podle Ziehl-Neelsova

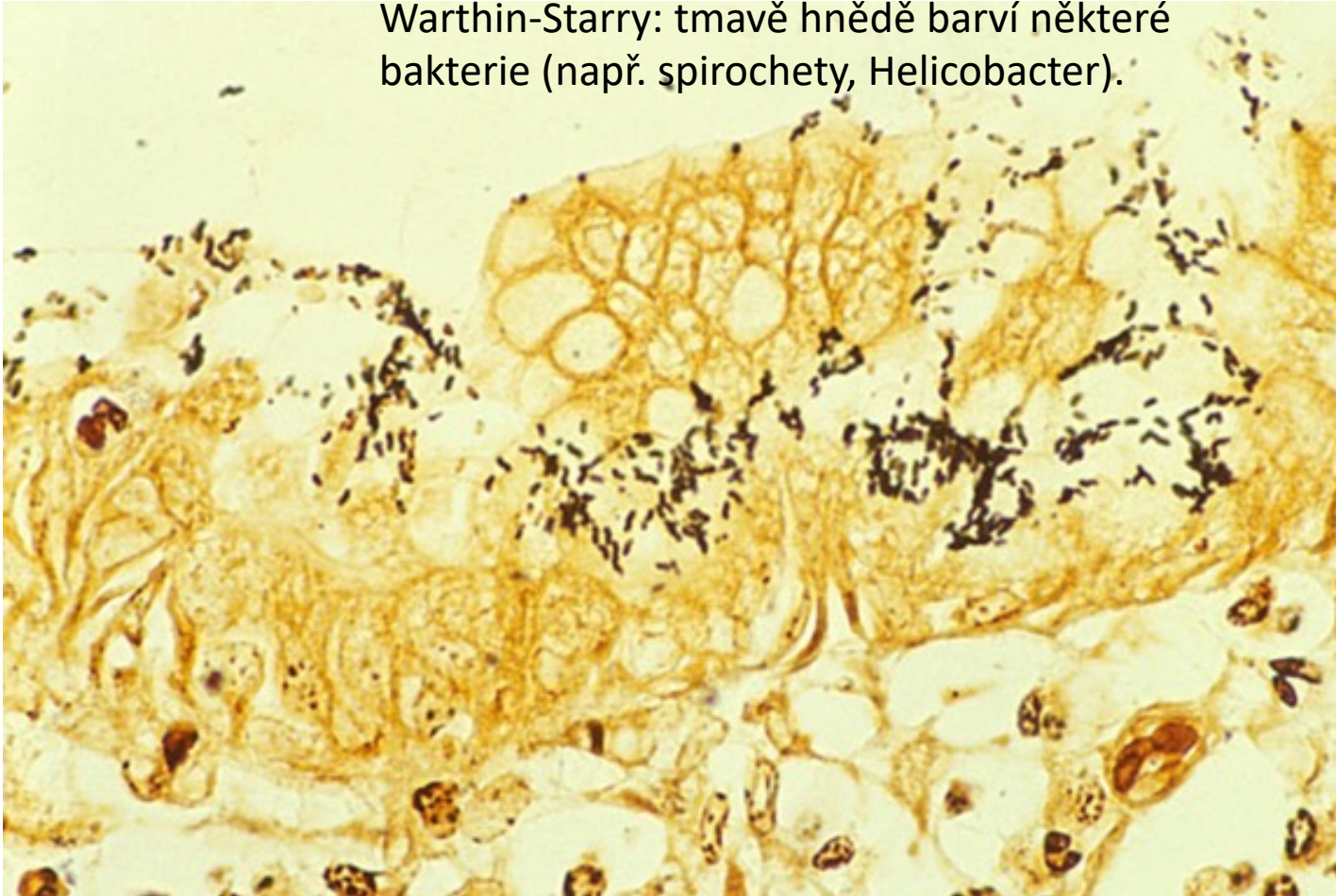
K průkazu acidorezistentních bakterií barvení podle Ziehl-Neelsova

(barví karmínově mykobakteria)

Mykobakteria - vysokým obsahem lipidů ve stěně

Barvení Warthin-Starry

Warthin-Starry: tmavě hnědě barví některé bakterie (např. spirochety, Helicobacter).





Karmín

z těl hmyzu červce nopálového

z Peru

druhu opuncie, na kterých hmyz rodu
Dactylopius žije

pěstuje se v Mexiku, Guatemale, Chile, Bolívii
a dalších jihoamerických zemích

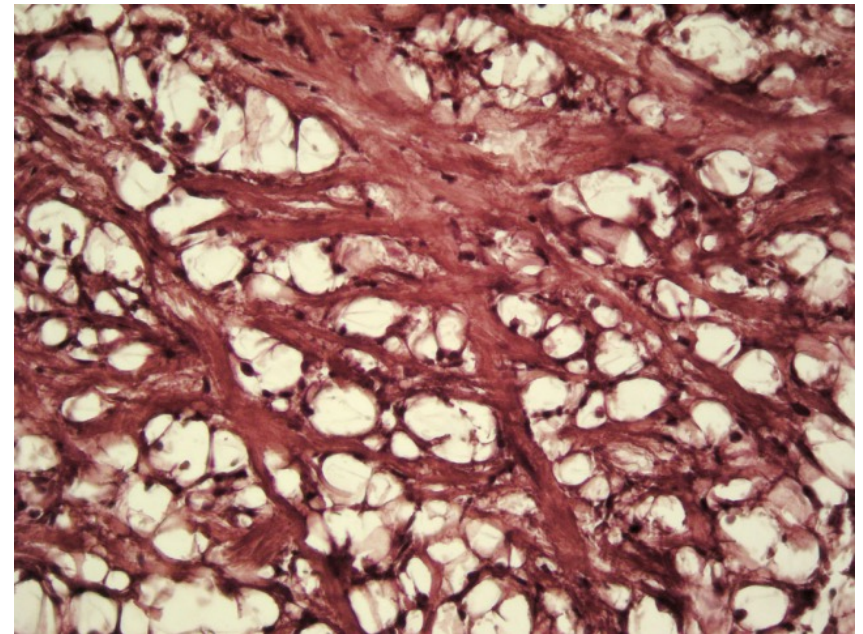
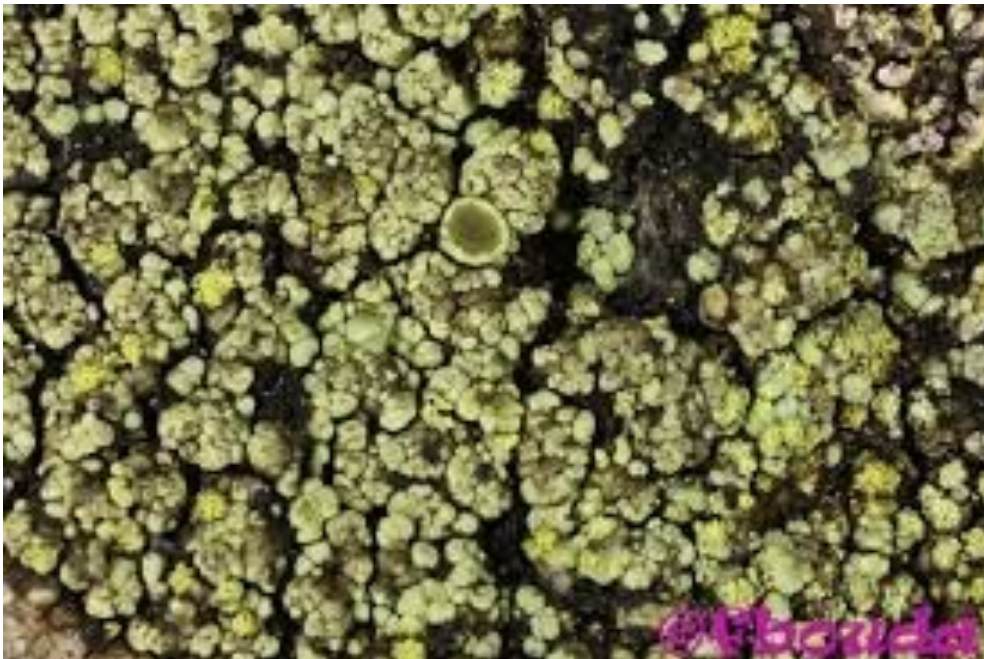
*barví červeně mimo jiné jádra a glykogen
(bazické barvivo). Roztok karmínu v kyselině
octové je acetokarmín.*

Brouček? (E120)



Orcein

fialové přírodní barvivo, které se vyskytuje v některých druzích lišejníků



Šafrán


extrakt z blizen šafránu

kyselé barvivo na kolagen

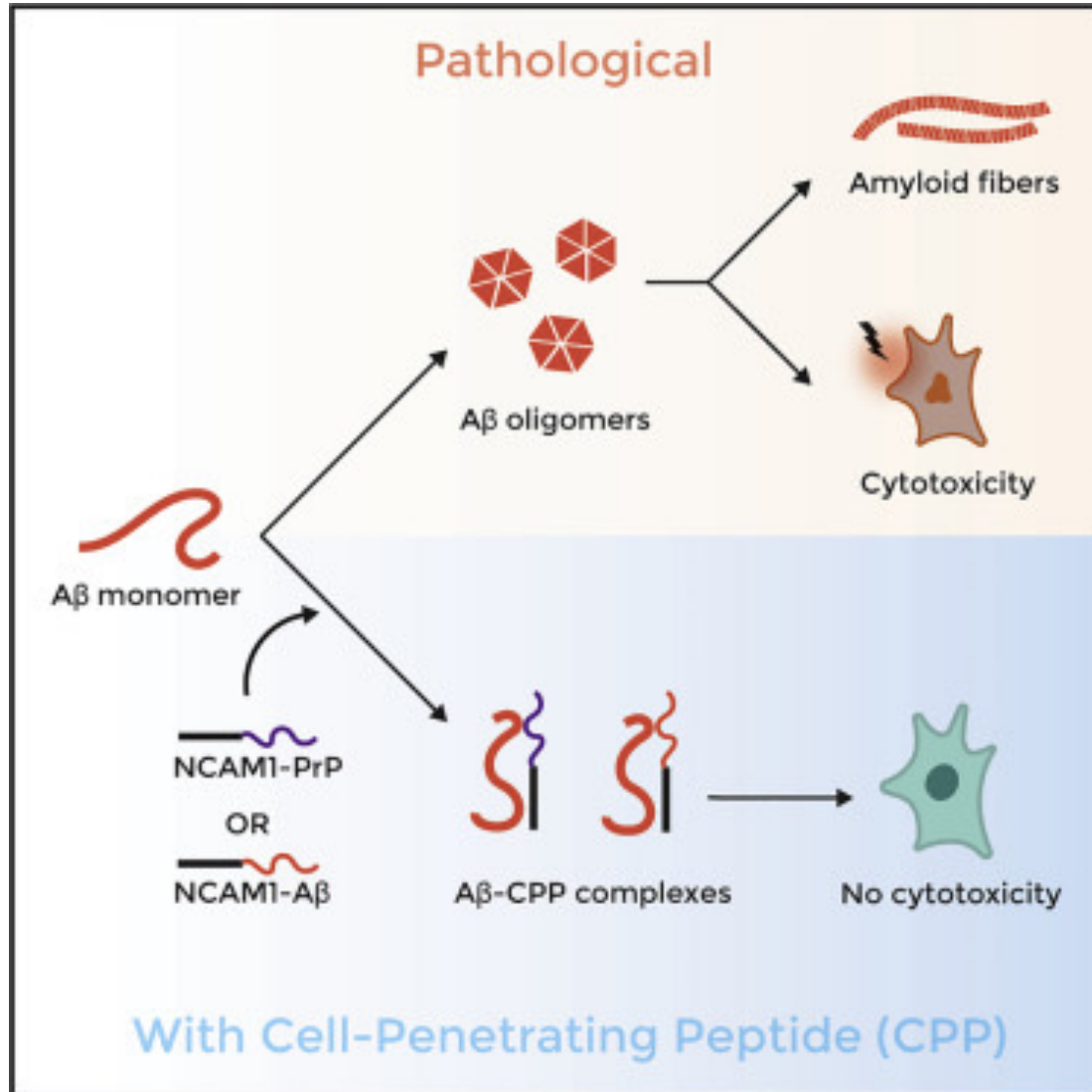


Amyloid

ZNÁZORNĚNÍ AMYLOIDU

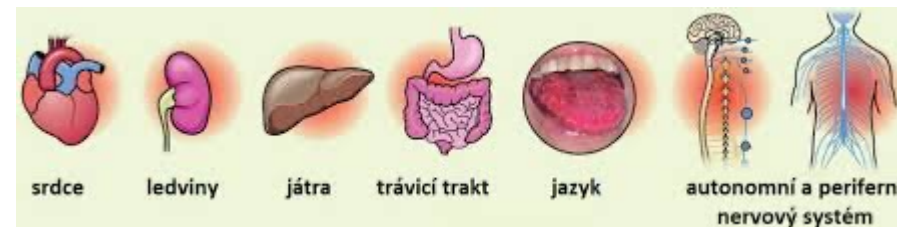
- je bílkovina – proteinové fibrily
- různé dle typy amyloidu
-  přeměna uspořádání proteinu z α -helixu na β -skládaný listu
- β listy proteinů, nebo proteinových fragmentů – se k sobě váží - tzv. amyloidová fibrila
- odolná vůči degradaci enzymy
- při chorobných stavech ukládá v mezibuněčném prostoru
- proteiny, ze kterých vzniká amyloid- fyz. vyskytují v těle
- prekurzory amyloidu - sérový amyloid A, -lehké řetězce imunoglobulinů.

Amyloidóza



- heterogenní skupina chorob
- porucha struktury proteinů
- z původně rozpustné formy proteinů – extracelulární proteinové agregáty – amyloid
- ke změně proteinu dochází v buňce - vláknitý materiál vyloučen do intersticia tkání
- minoritní nefibrilární složka – P komponenta (SAP), glykosaminoglykany, apolipoprotein E
 - = podpora ukládání fibril do ec. prostoru orgánů
- 20 proteinů – amyloid
- radioaktivně značený SAP-scintigrafie – monitoring nemoci

Diagnóza amyloidózy



bioptické vyšetření postiženého orgánu

systemová amyloidóza – náhodně odebraný vzorek – podkožního tuku či rektální sliznice

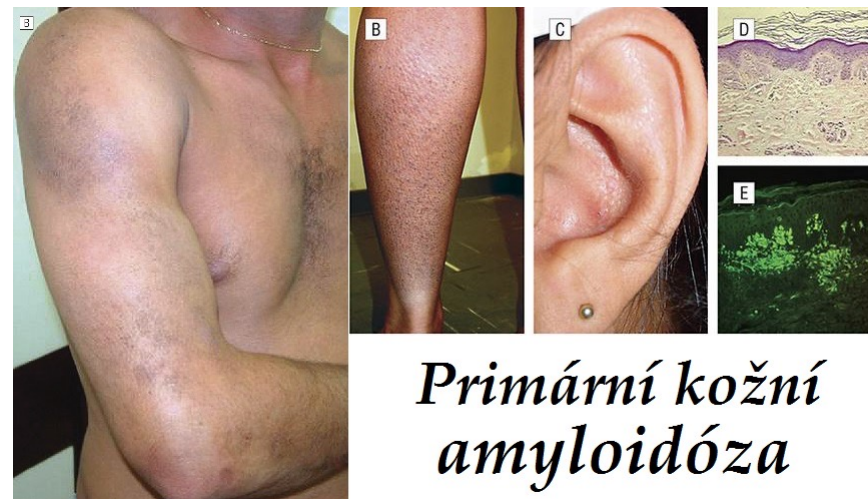
genetická analýza – mutace genu pro amyloidogenní protein – není 100%

sérum – monoklonální lehké řetězce imunoglobulínů – není 100%

diagnóza amyloidózy – první krok

identifikace proteinu

léčba – dle typu amyloidu



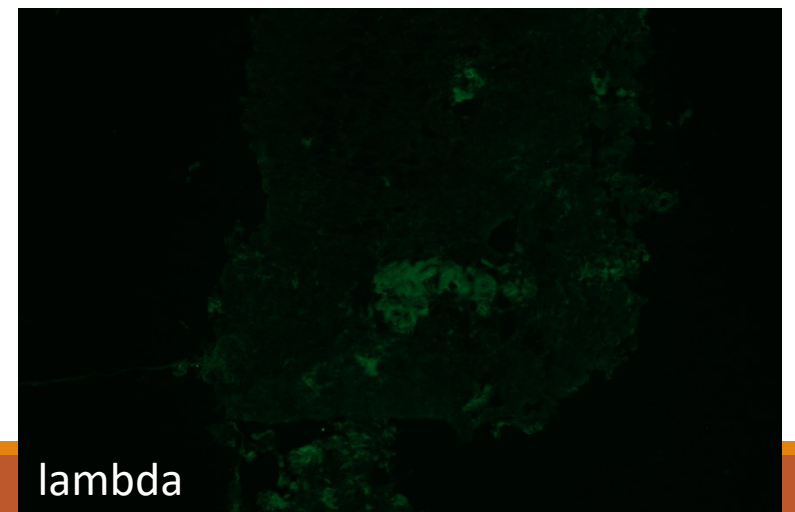
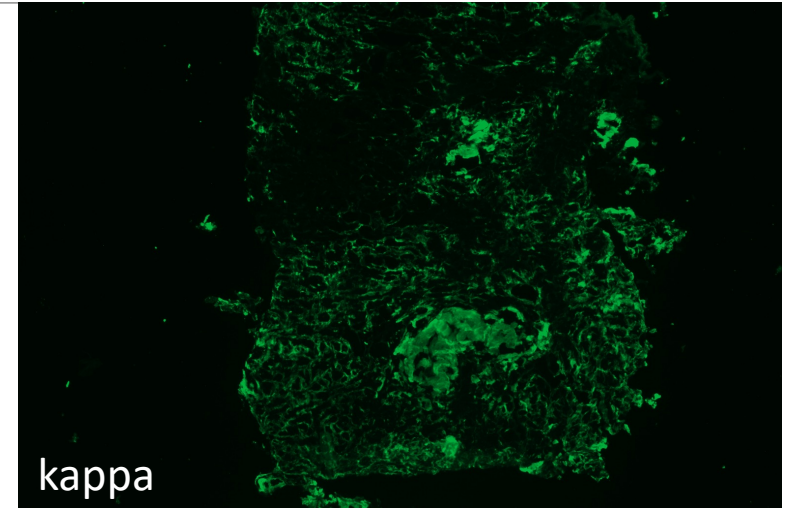
Typizace amyloidu

IHC – průkaz AA amyloidu - AA amyloidóza
průkaz kappa a lambda řetězců - AL amyloidóza

imunofluorescence – nefixovaná tkáň

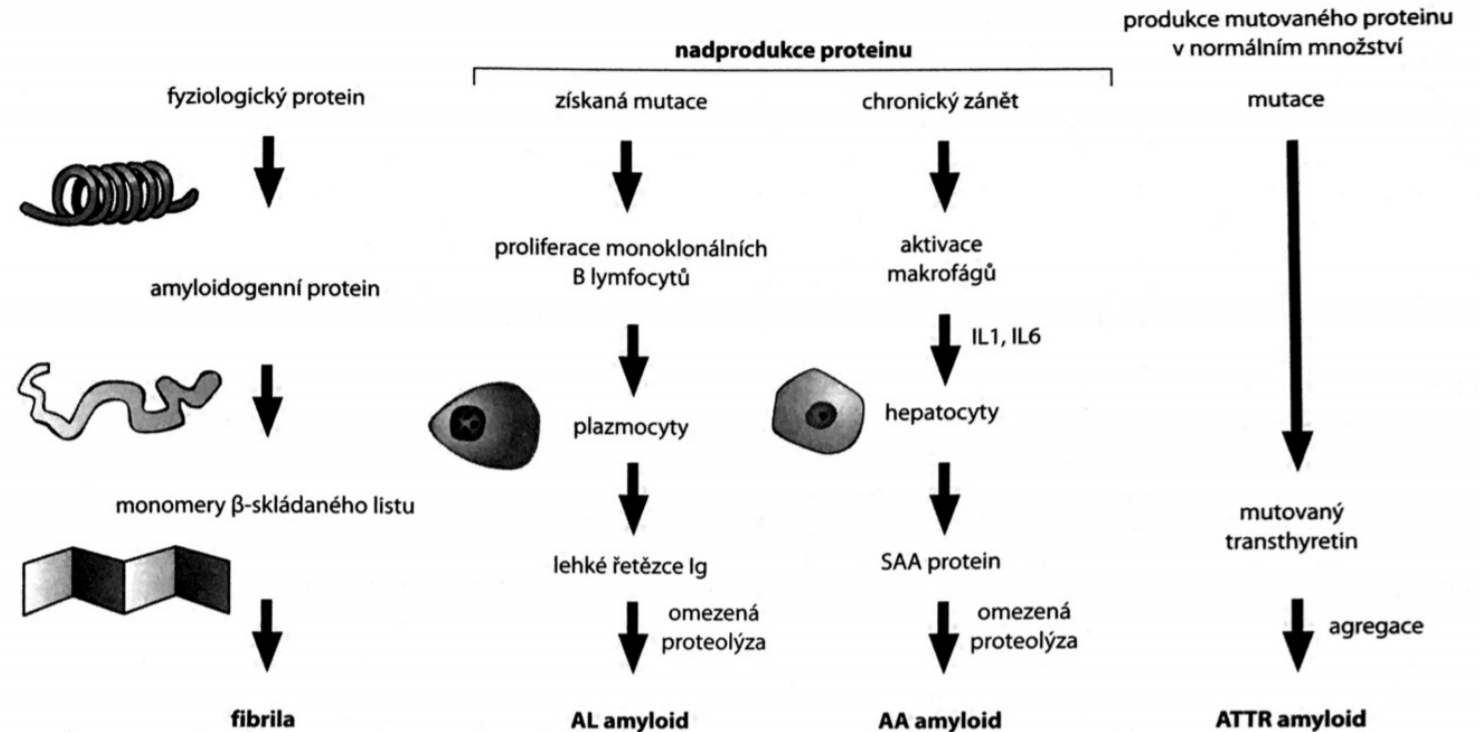
hmotnostní spektrometrie – limitovaná množstvím amyloidu

5% - bez typizace



Důsledky akumulace amyloidu

1. odolný vůči proteolýze
2. nerozpustný ve vodě
3. neimunogenní – nevyvolají zánět
4. toxický
5. celkové množství – i několik kg



Klasifikace amyloidózy

vrozené

získané

generalizované

lokalizované

dle chemického typu amyloidu

klinicko – patologické dělení

generalizované

AL amyloidóza – systémové, 5-10% produkce monoklonálních lehkých řetězců imunoglobulínu

- fibrilární komponenta - řetězce λ
- často spojena s mnohočetným myelomem
- nejčastější typ v Evropě a USA
- ledviny

AA amyloidóza- sérový amyloidový protein A (SAA) – játry syntetizovaný protein

- komplikací dlouhodobě probíhajících zánětlivých procesů – autoimunitní záněty
- revmatoidní artritida, Crohnova choroba, psoriáza
- ledviny, srdce, játra, GIST

Prognóza 1-3 roky

lokalizované

Amyloid v CNS - A β amyloidóza – Alzheimerova choroba

Endokrinní amyloid – medulární Ca štítné žlázy

- neuroendokrinní nádor z buněk Langerhansových ostrůvků

Senilní amyloidózy s dominantním postižením srdce

- 70. – 80. rok

- nemutovaný transthyretin (ATTR amyloidóza)

Amyloidóza dialyzovaných pacientů – fibrily z β 2 mikroglobulínů

Ložiskový amyloid – uzly v plicích, laryngu, mléčné žláze, močový trakt, jazyk

hereditární

Hereditární transthyretinová amyloidóza - germinální mutace genu pro *transthyretin*

- ATTR amyloid

- transthyretin syntetizován v játrech

 - transportní protein pro tyroxin a retinol

Familiární středomořská horečka – mutace v *MEFV* genu – koduje pyrin



- Araby, Turci, Armény

choroba	prekurzorový protein	upřesnění
AL amyloidóza	lehký řetězec imunoglobulinu	získaná mutace a nadprodukce
AH amyloidóza	těžký řetězec imunoglobulinu	nadprodukce při myelomu
Senilní systémová amyloidóza	transtyreтин	akumulace běžného typu transtyreтину
Familiární amyloidová polyneuropatie	transtyreтин	vrozená porucha
AA amyloidóza (sekundární a.)	SAA protein	nadprodukce SAA při zánětlivém onemocnění
A β ₂ M amyloidóza (a. dialyzovaných)	β ₂ -mikroglobulin	chronická dialýza
Lysozymová amyloidóza (ALyz)	lysozym	vrozená porucha
Apo AI amyloidóza (AApoI)	apolipoprotein AI	vrozená porucha
Apo AII amyloidóza (AApoII)	apolipoprotein AII	vrozená porucha
Apo AIV amyloidóza (AApoIV)	apolipoprotein AIV	vrozená porucha
Fibrinogenová amyloidóza (AFib)	α řetězec fibrinogenu	vrozená porucha
Finská hereditární amyloidóza (AGel)	gelsolin	vrozená porucha
Amyloidová angiopatie islandského typu (ACys)	Cystatin C	vrozená porucha
Familiární Britská demence (BriPP a.)	produkt genu BRI2	vrozená porucha, stop kodon
Získaná renální amyloidóza (ALECT2)	leukocytární chemotaktický faktor 2	získaná porucha
Amyloidóza aortální medie (AMed)	lacadherin	
Atriální amyloidóza (AANF)	atriální natriuretický faktor	někdy u pacientů s fibrilací
Amyloidóza asociovaná s medulárním karcinomem š.ž.	kalcitonin	omezen na nádor
spongiformní encefalopatie (AScr)	prion	získaná změna, omezeno na mozek
Amyloidóza Langerhansových ostrůvků	amyloidový polypeptid Langerhansových ostrůvků	lokalizace na Langerhansovy ostrůvky, někdy při DM 2. typu nebo v nesidiomu
Amyloidóza na bázi laktoferinu (ALac)	laktoferin	Familiární postižení rohovky
Alzheimerova nemoc	amyloid β prekurzorový protein	získaná porucha
Hereditární cerebrální angiopatie (A β)	amyloid β prekurzorový protein	vrozená porucha

Průkaz amyloidu

Konžská červeň = Kongo červeň

nebarví pouze amyloid, ale i jiné struktury

polarizované světlo – dva indexy lomu

- anomální barvy – od bílé, přes žlutou a modrou až k zelené

fluorescenční mikroskop – konžská červeň vykazuje autofluorescenci

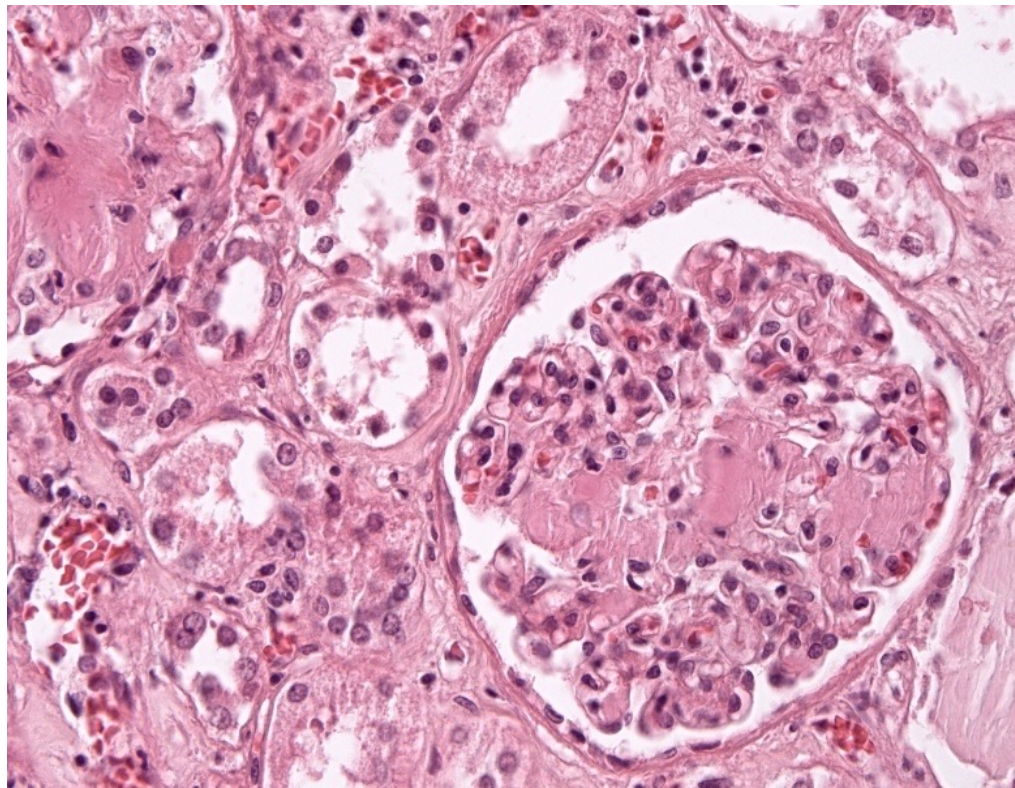
- citlivá metoda, identifikace malých depozit

- časná fáze



pozn. – Konžská červeň - textilní průmysl – v histopatologii 1884

- Vztah ke Kongu – syntetizace barvy = Berlín – konference o západní Africe



HE barvení

Amyloidóza ledvin. Amyloid se ve tkáni mikroskopicky projeví jako extracelulární depozita **homogenní eozinofilní hmoty**. Na snímku jsou patrna depozita amyloidu v kapilárních kličkách.

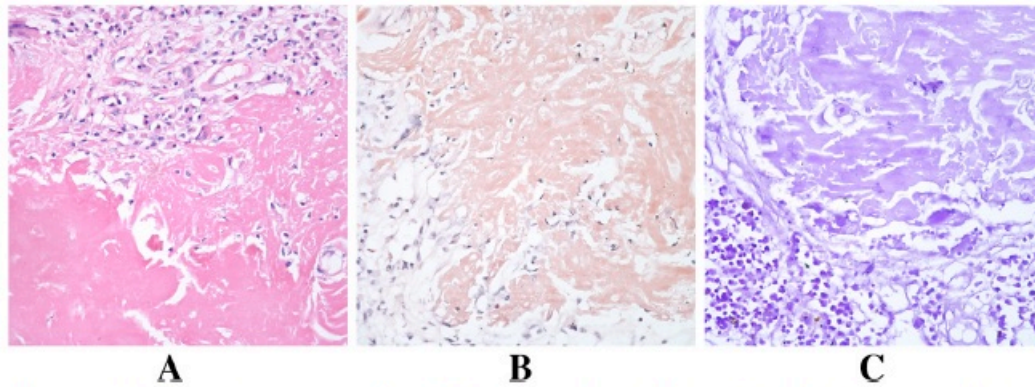
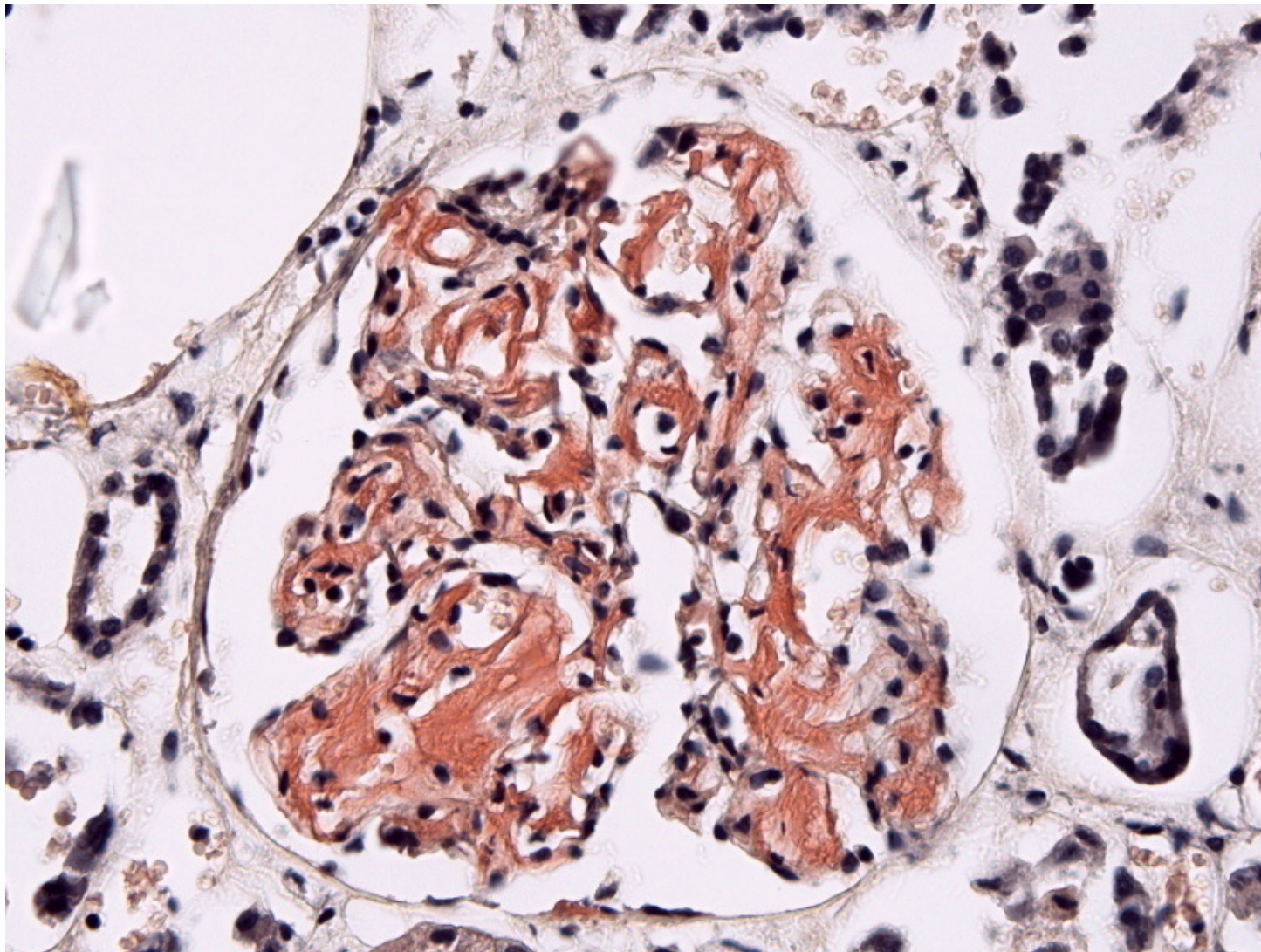


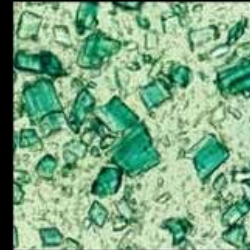
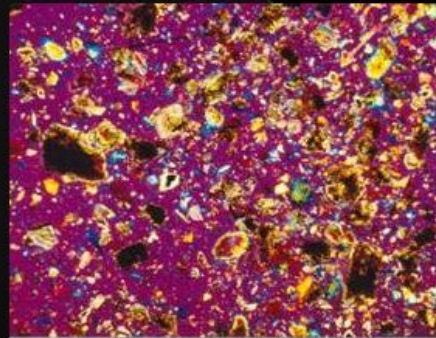
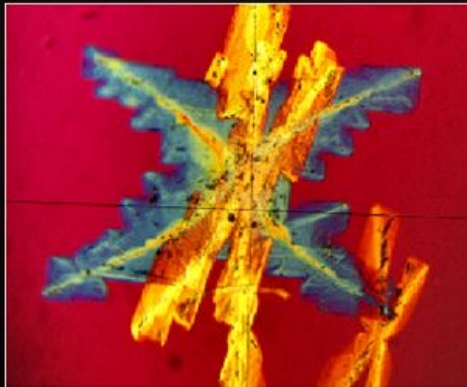
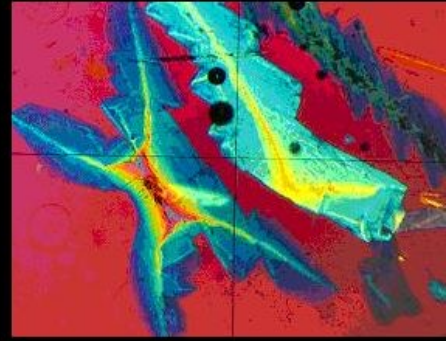
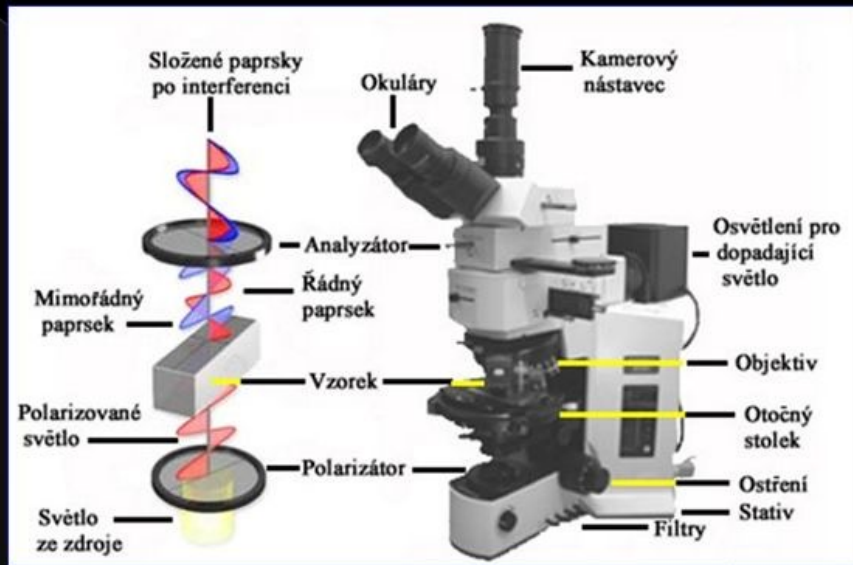
Figure 2 Histopathology ($\times 200$): A) routine hematoxylin and eosin stain of amyloid nodule; B, C) Congo red (pink) and methyl violet (purple) stains, positive for amyloid.

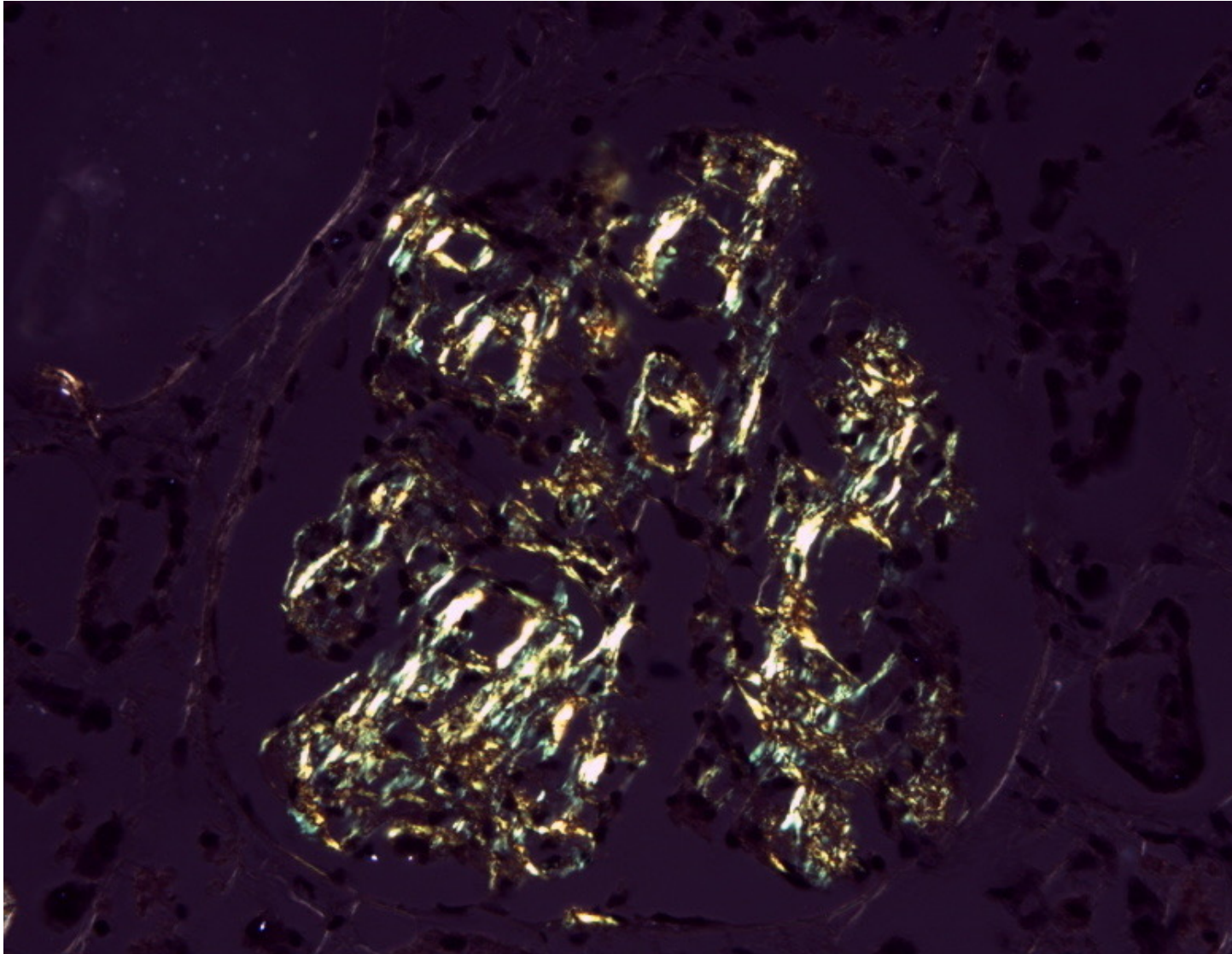


Kongo červeň

Amyloidóza ledvin. Amyloid se projeví jako extracelulární **depozita homogenní eozinofilní hmoty**, která jsou oranžově červená v barvení konžskou červení. Na snímku jsou patrna depozita amyloidu v kapilárních kličkách.

Polarizované světlo

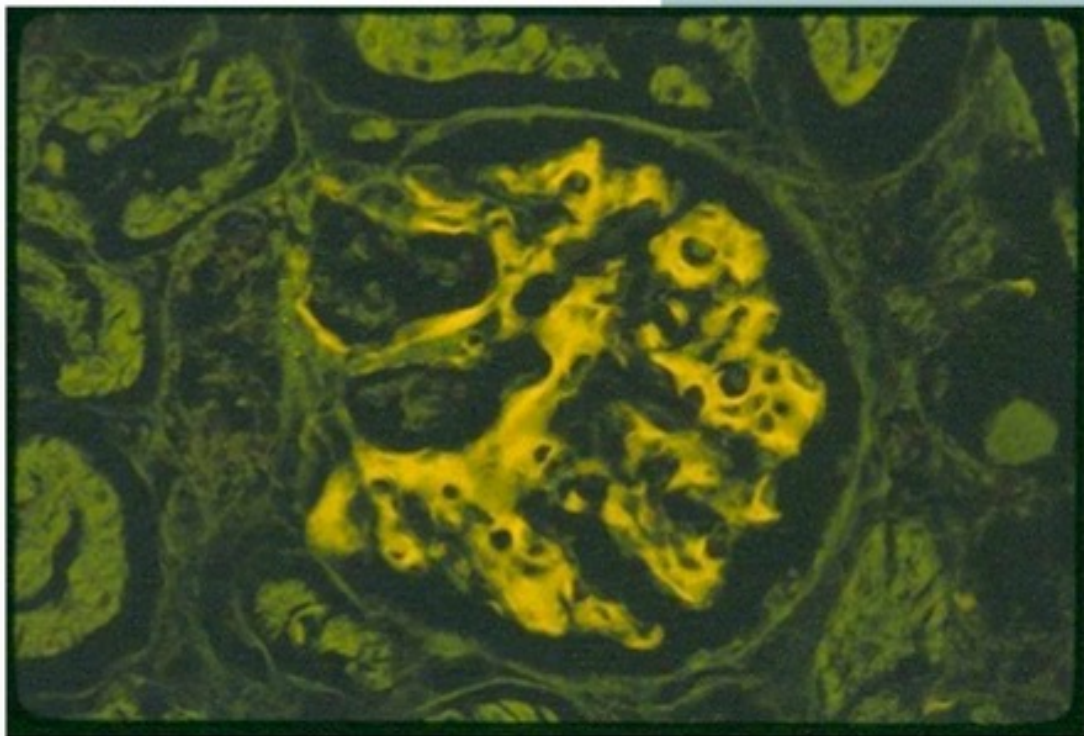




Kongo červeň

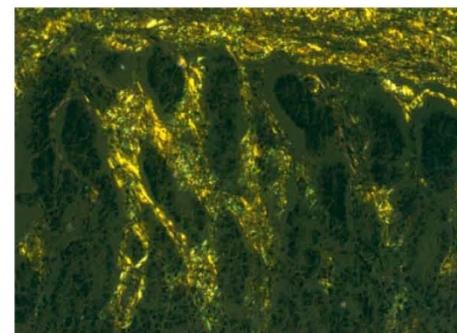
Amyloidóza ledvin

V polarizovaném světle má navázaná konžská červeň dva indexy lomu. Proto v **polarizovaném světle** depozita amyloidu vykazují anomální barvy od bílé, přes žlutou a modrou až k zelené.

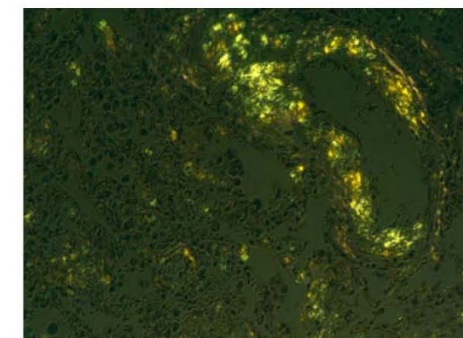


Amyloid stained with TFT in Kidney.
Hit with 490 (blue) excitor wavelength. Amyloid
fluorescing yellow

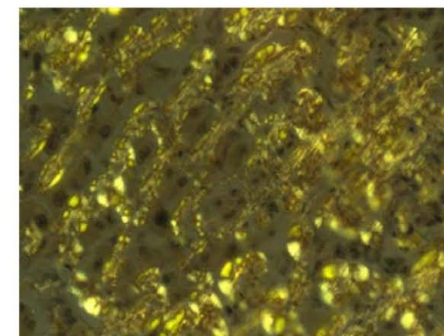
Obr. 4
Deposita amyloidu v barvení Kongo červení. Indukce dichroismu



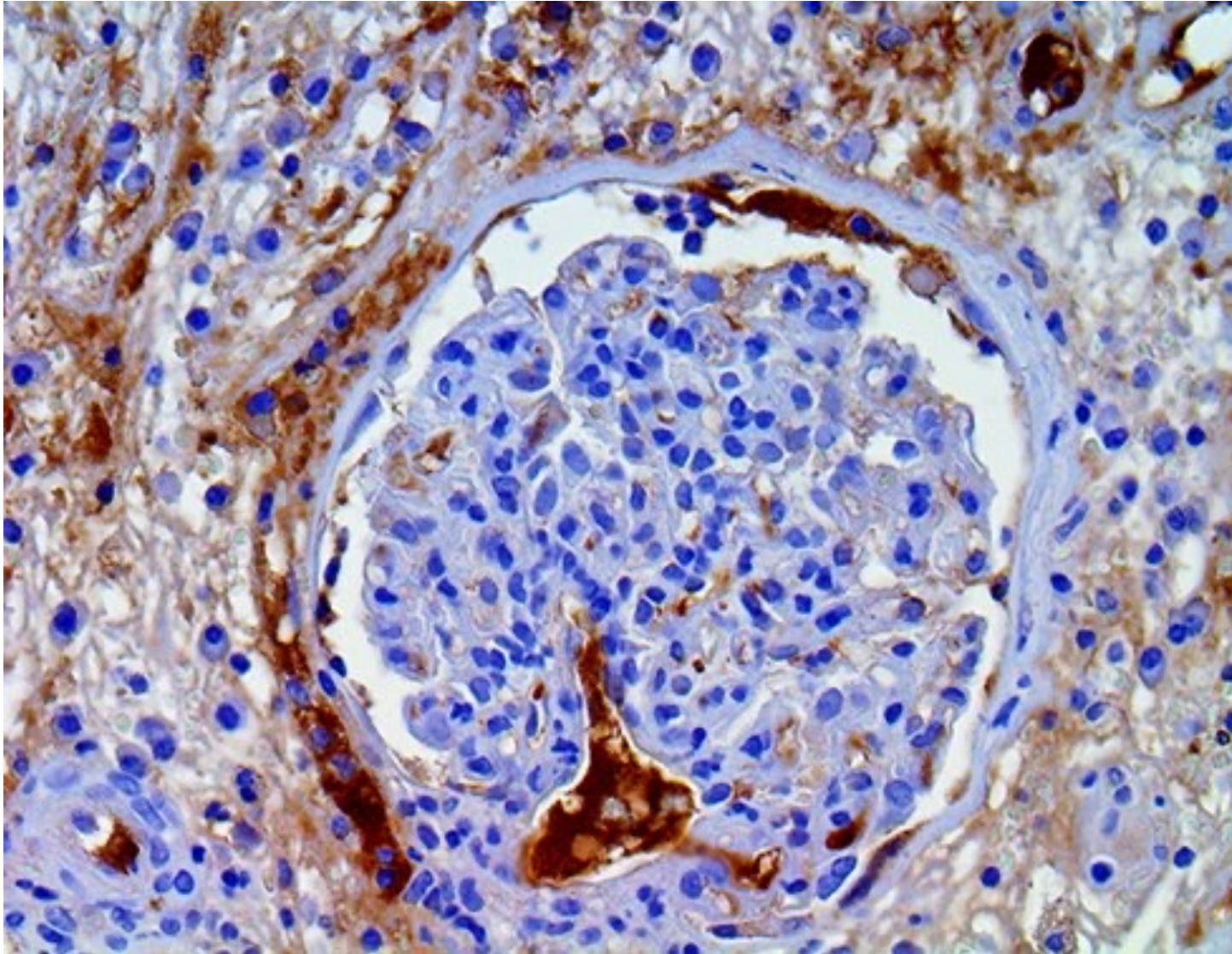
amyloid v kůře nadledvin



amyloid infiltrující plicní arterii



amyloid infiltrující lalůček jater



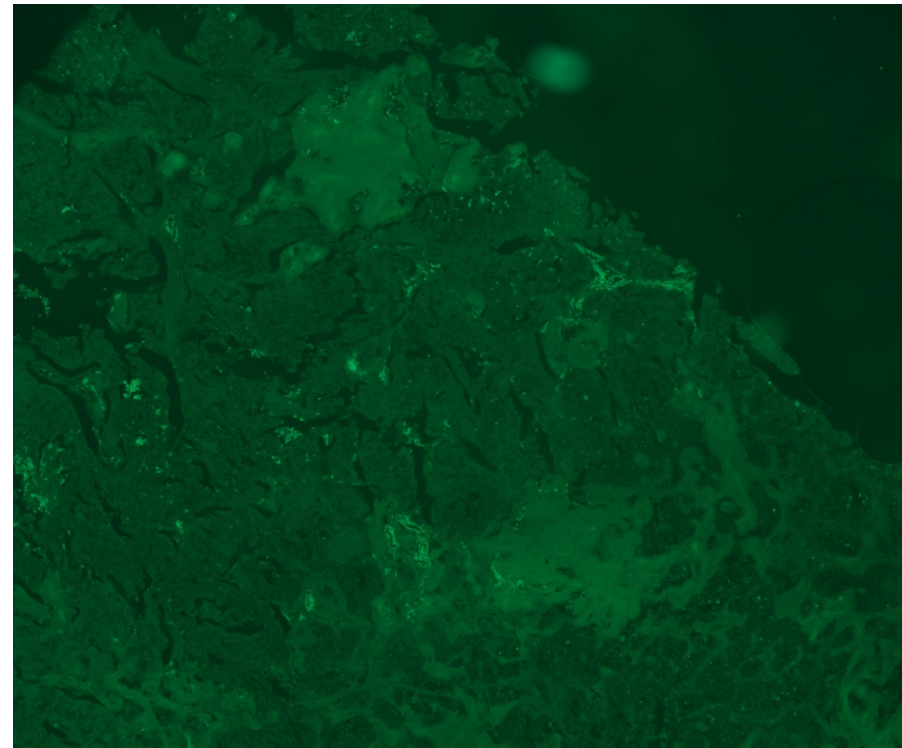
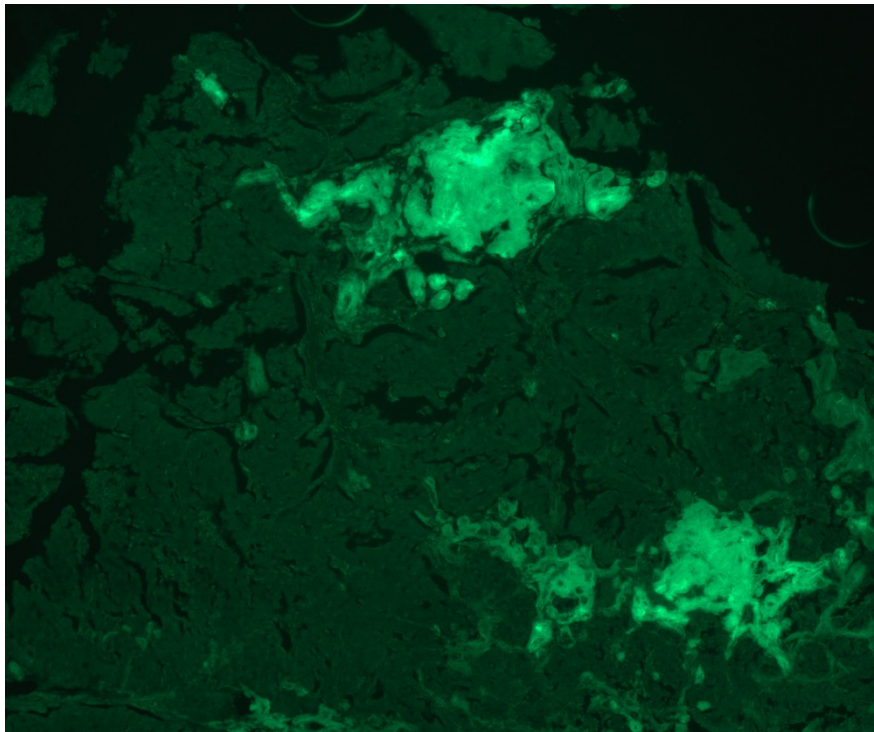
IHC -SAA

Protilátky proti amyloidu A

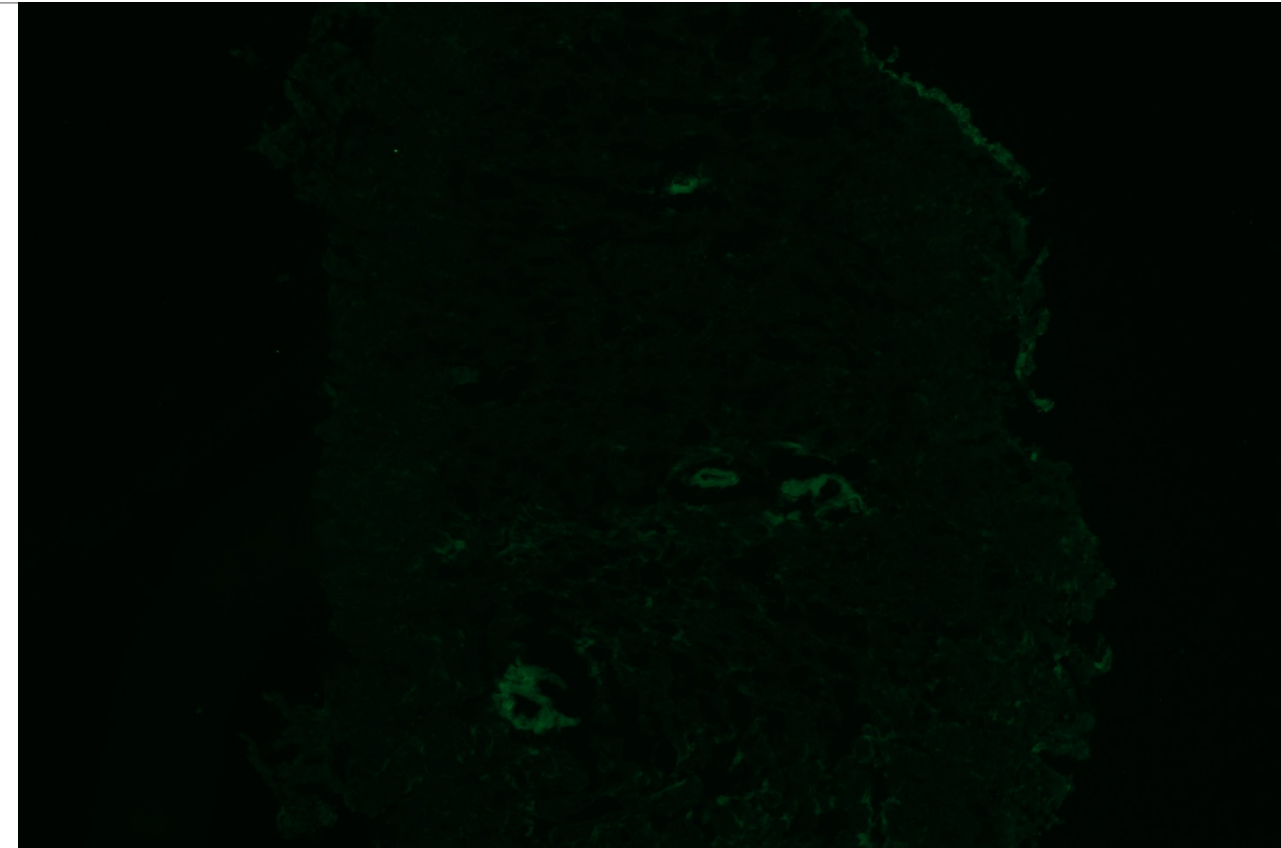
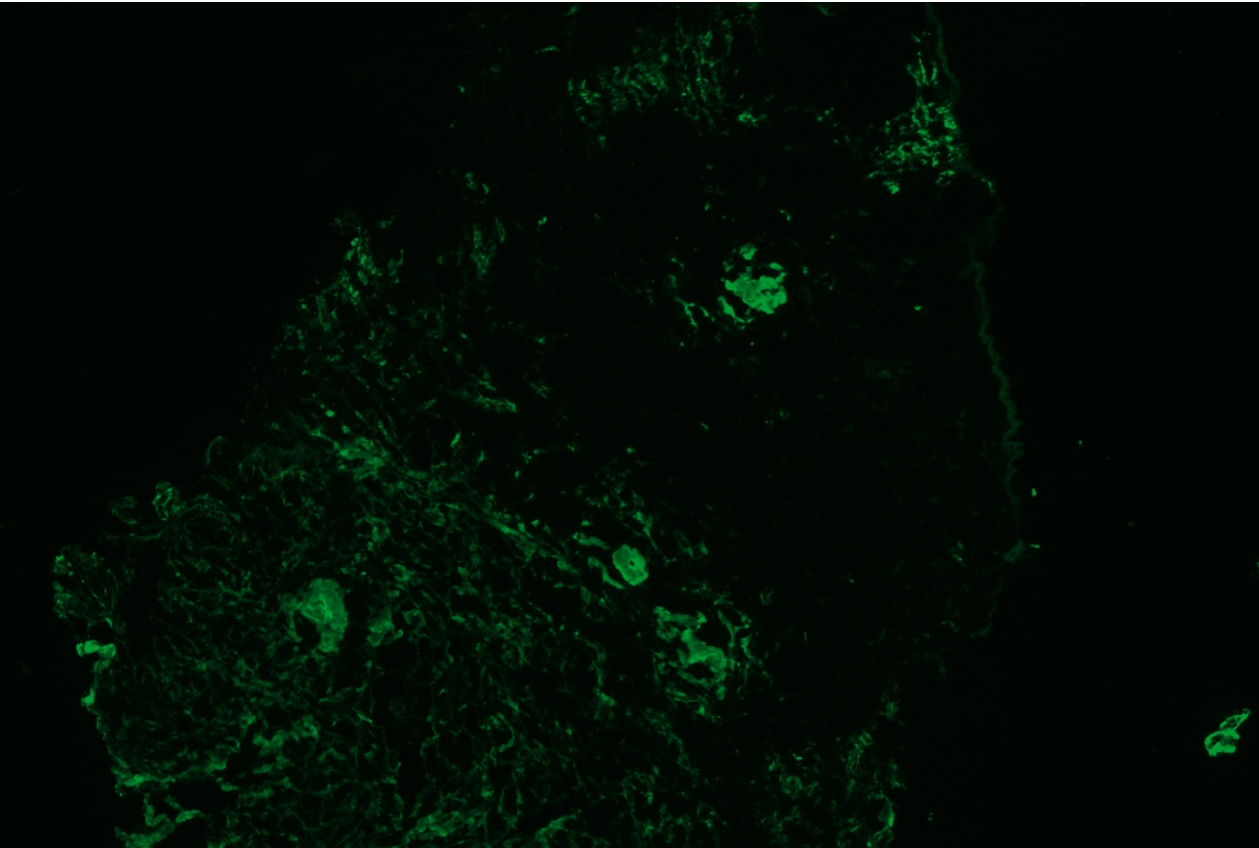
Thioflavin T

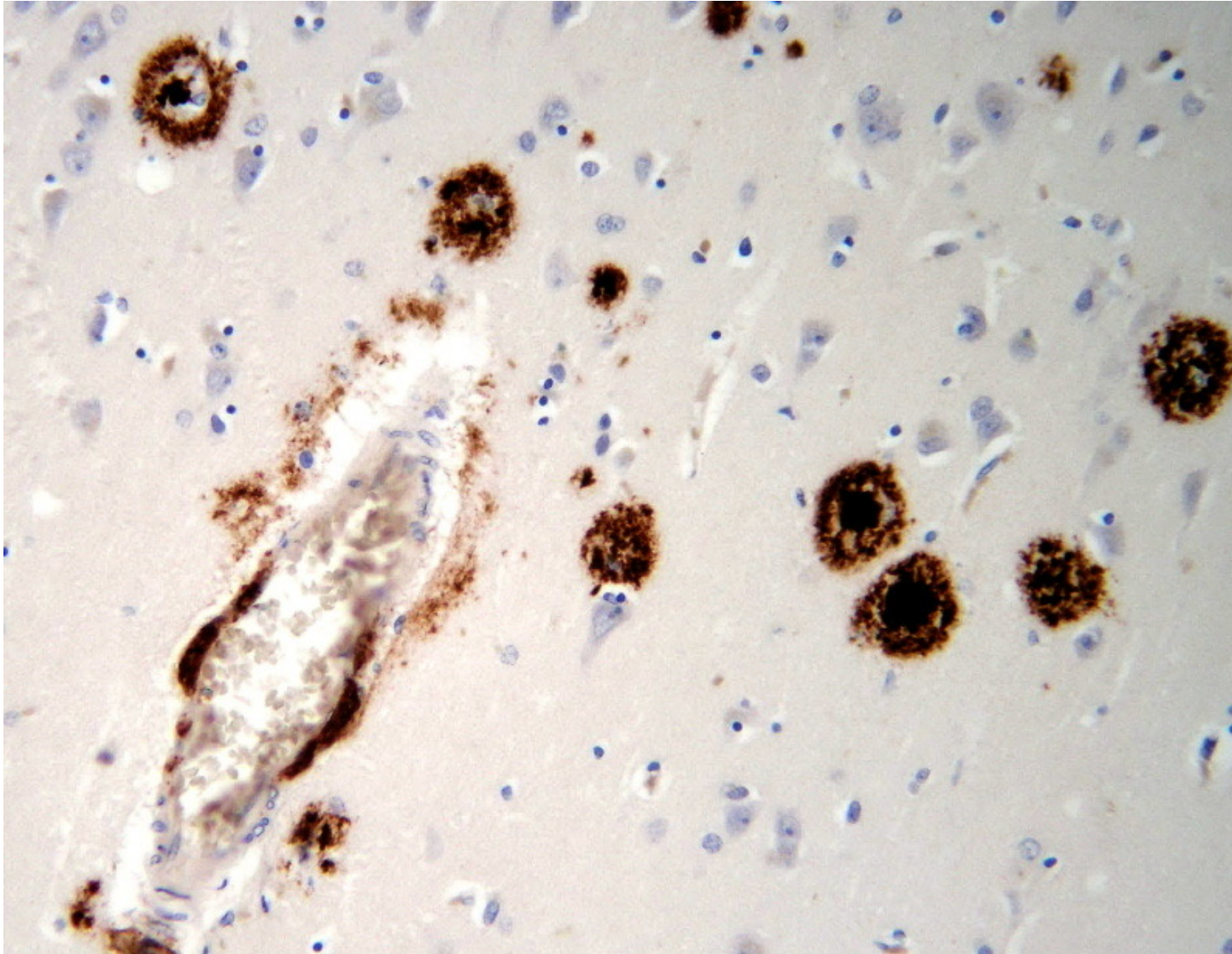
fluorescenční **pro buňky propustná** amyloidová benzothiazolová sůl

optimální koncentrace



IHC fluorescence



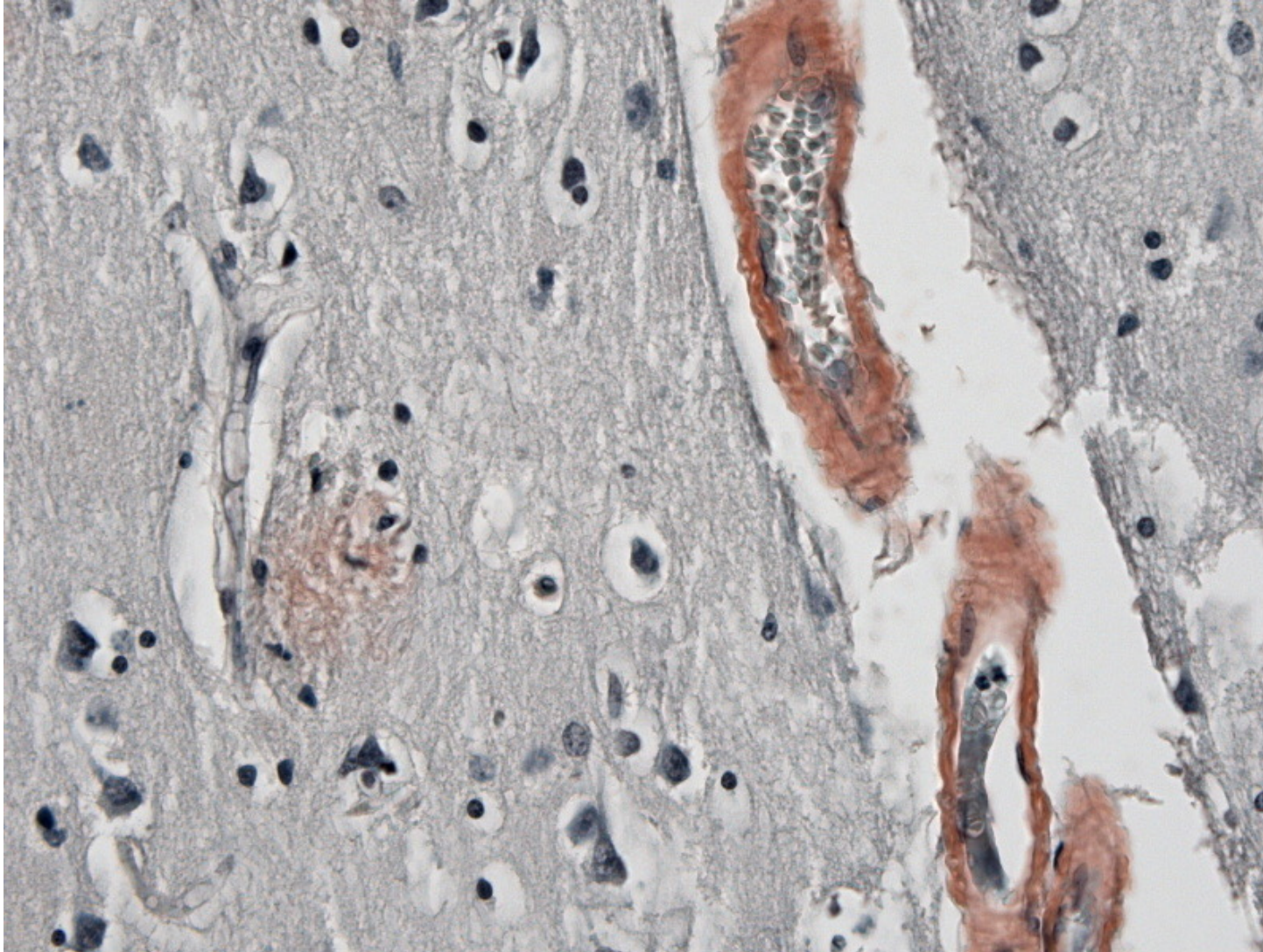


IHC – A β amyloid

Alzheimerova choroba.

Přítomnost depozit A-beta amyloidu ve stěnách mozkových a meningeálních cév.

Imunohistochemický průkaz A-beta amyloidu ve tkáni - pozitivní jsou jádra neuritických plak a cévní stěna.



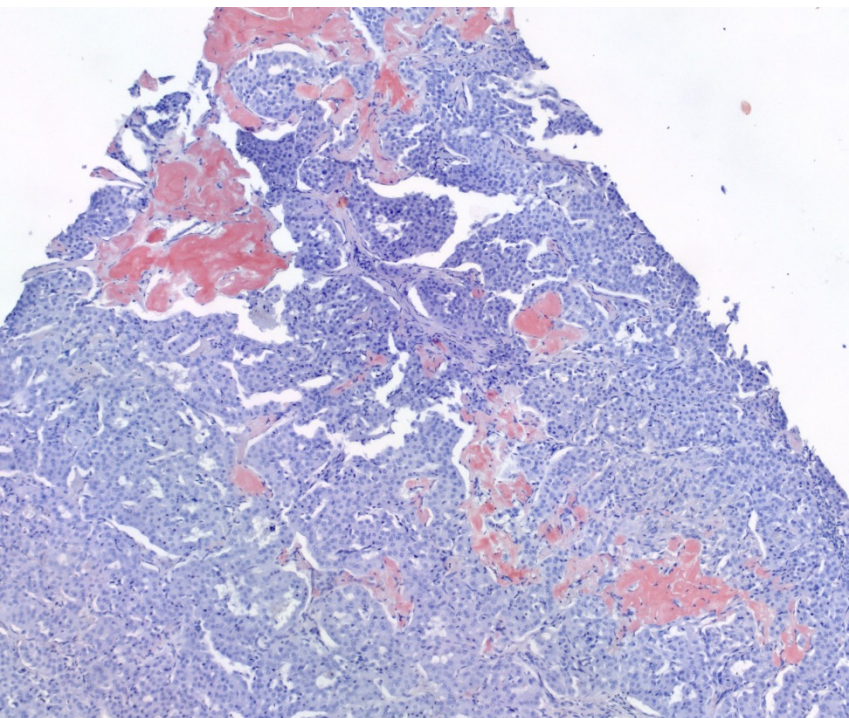
Kongo červeň

Alzheimerova choroba.

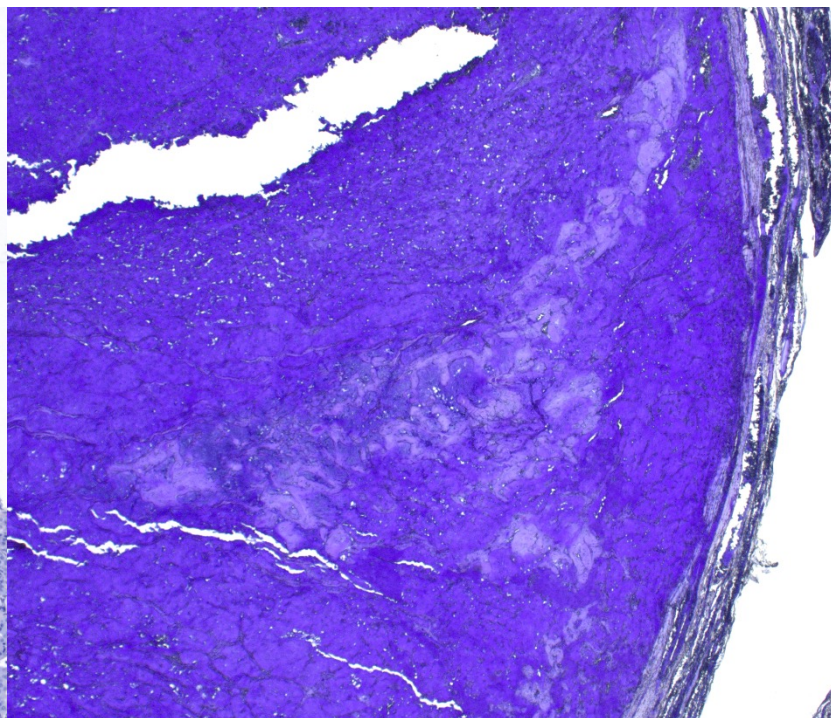
Přítomnost depozit A-beta amyloidu ve stěnách mozkových a meningeálních cév.

Sférická depozita v parenchymu - to je jádrem neuritického plaku.

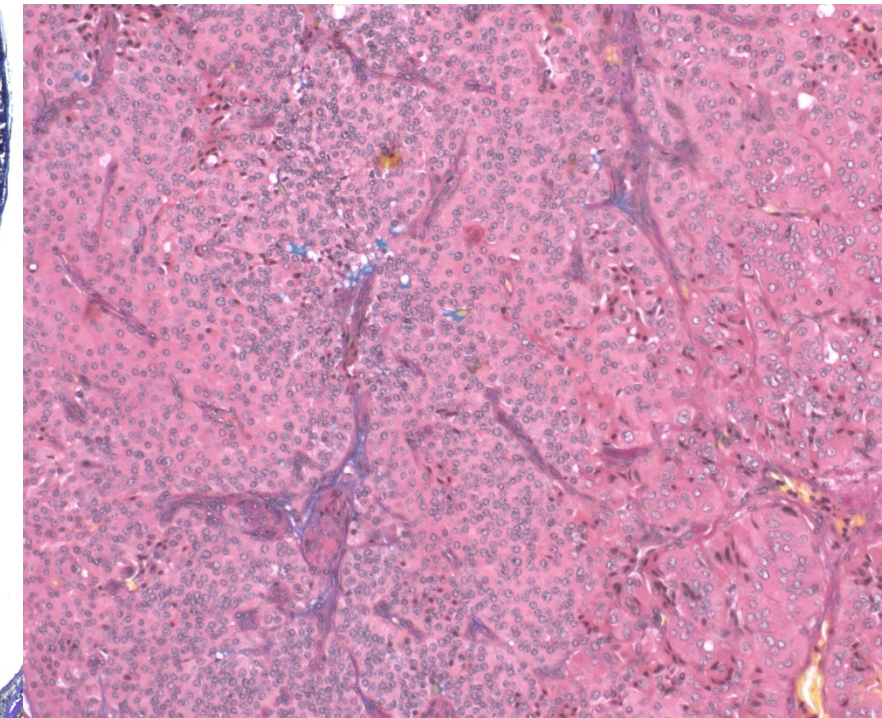
Další barvicí metody



Kongo červen

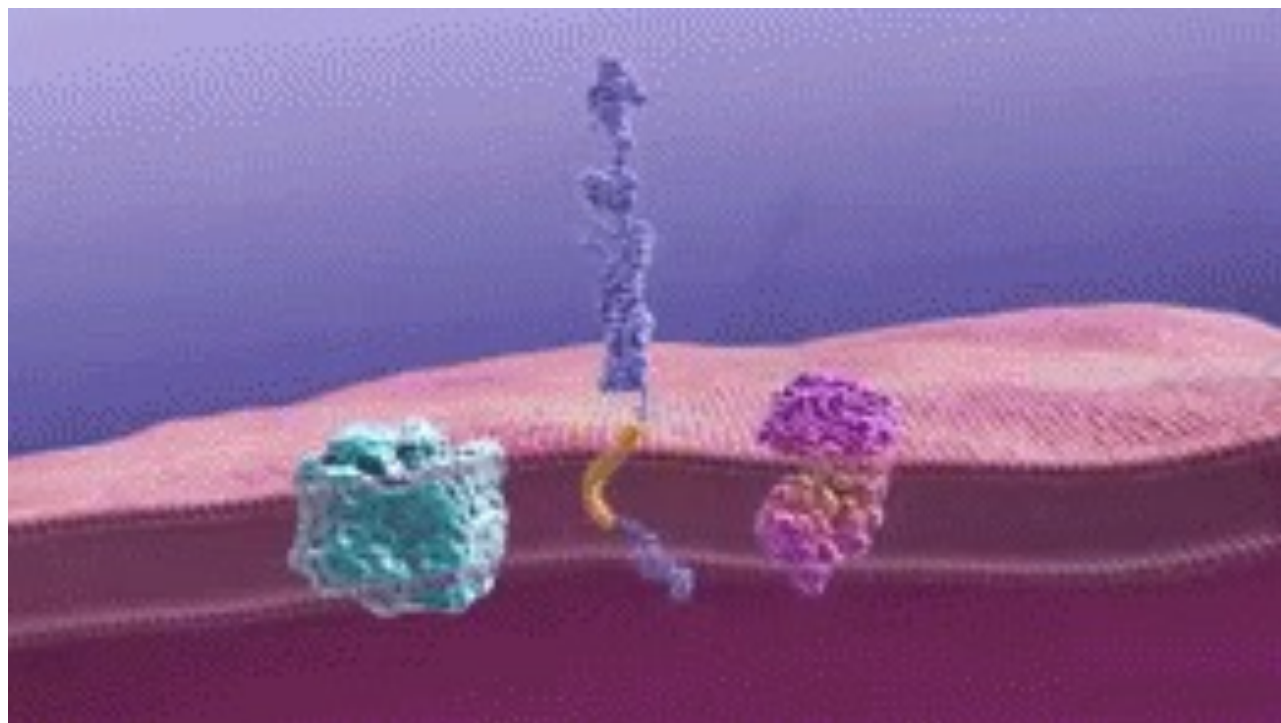
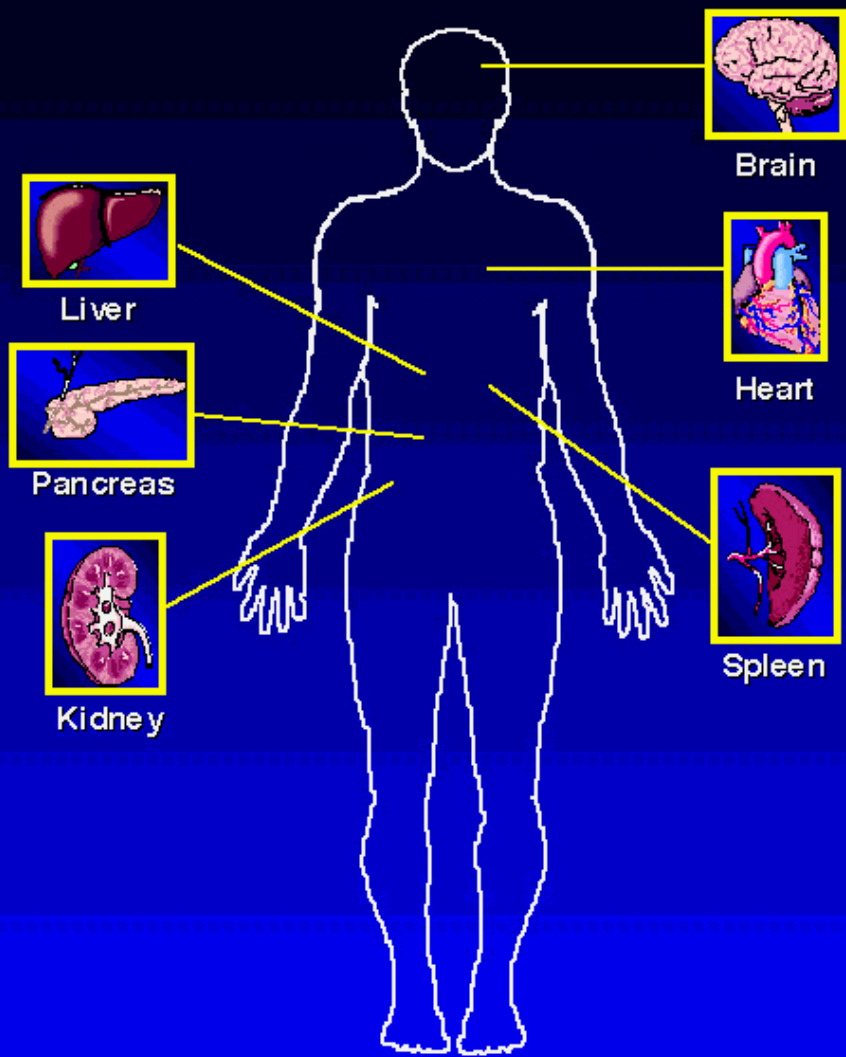


Methyl violet



Alciánová modř

Organs Affected by Amyloid



Imunohistochemie – metody průkazu

vyšetření exprese makromolekul

princip – vazba primární protilátky na epitop antigenu

- vizualizace pomocí detekčních systémů

hodnocení – lokalizace positivity ve tkáni

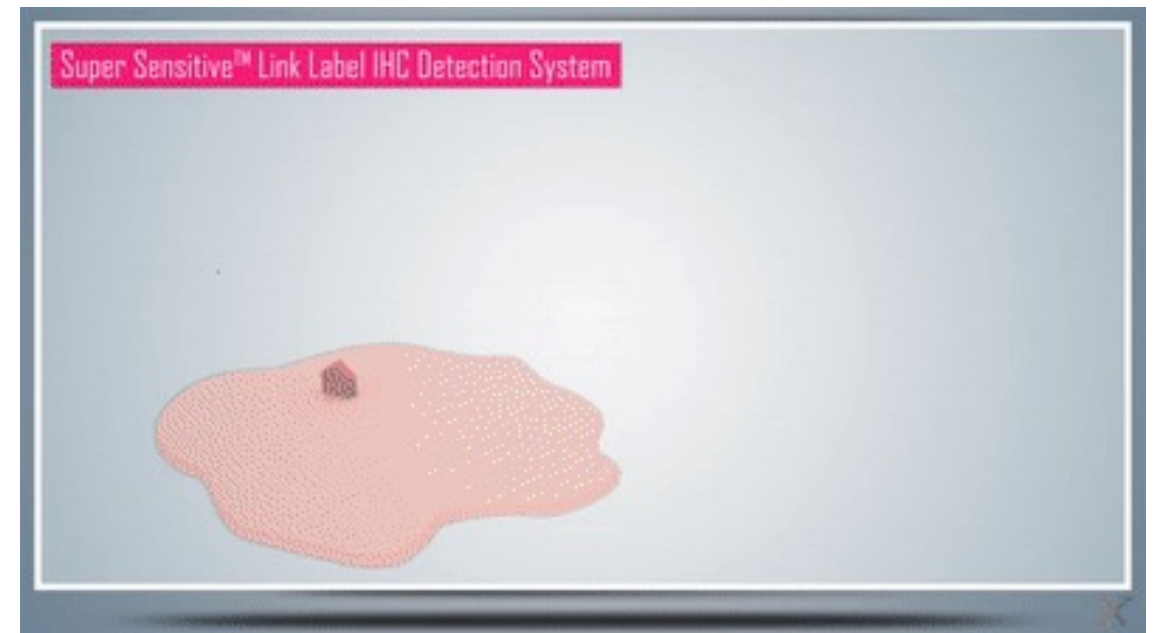
- intenzita reakce

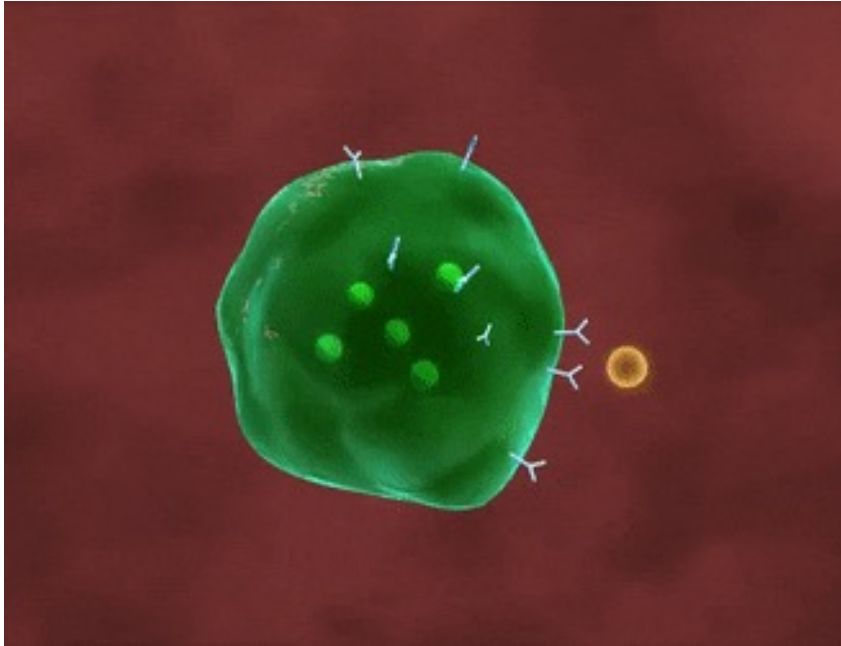
- % pozitivní buněčné populace

důvod- stanovení diagnózy

- určení prognózy vývoje onemocnění

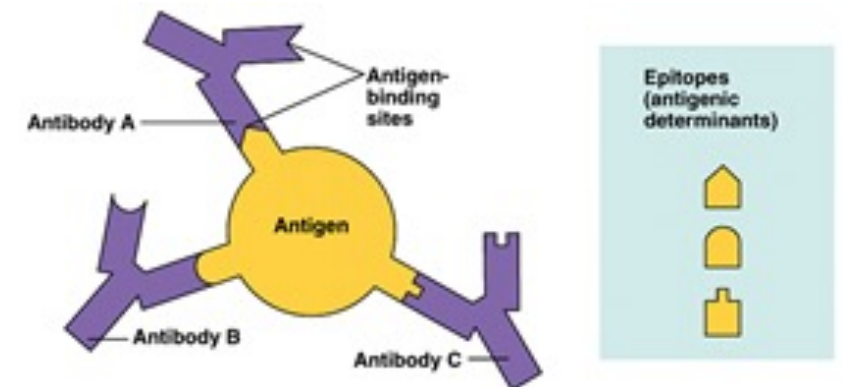
- indikace nemocných pro cílenou terapii





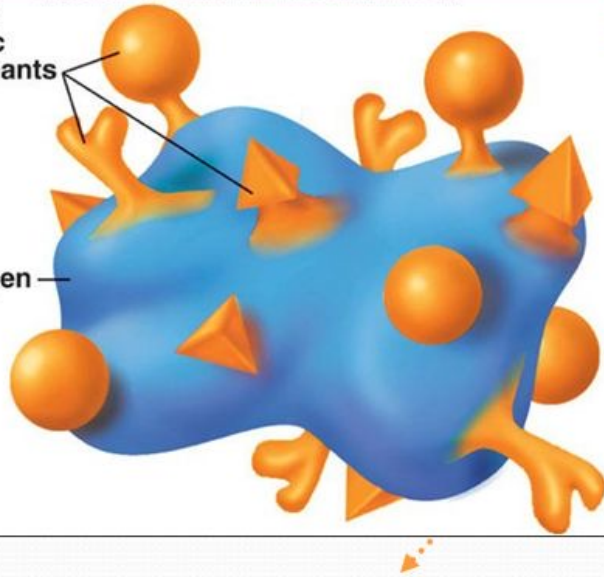
Antigeny

- běžná součást tkání a buněk
- intermediální filamenta
- transmembránové proteiny
- transkripční faktory
- cizorodé látky - HP, CMV,



Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.
Different antigenic determinants

Antigen



Rozdělení Epitopů

Sekvenční determinanty

určuje posloupnost (sekvence) základních subjednotek biopolyméru (aminokyselin, monosacharidů, nukleodidů). Přitom subjednotky mohou být v různé náhodné konformaci.

Konformační determinanty

tvorí jen jedna možná konformace určité části molekuly antigenu (polypeptidového nebo polysacharidového řetězce). Jsou typické pro nativní antigeny. Denaturací proteinových antigenů se mění prostorová struktura a tím i specifita konformačních antigenů. Specifita sekvenčních antigenů se denaturací nemění.

Epitopy

konkrétní oblast antigenu

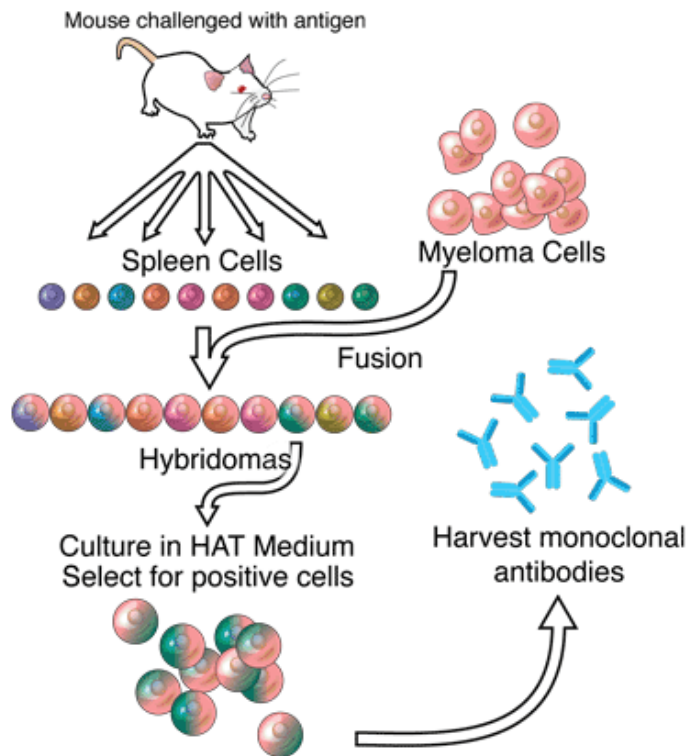
váží protilátky

každá proteinová molekula obsahuje několik epitopů, tzn. několik míst, kam se váží protilátky.

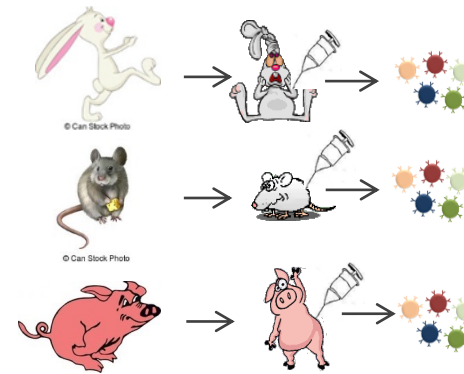
počet epitopů-souvisí s velikostí daného proteinu

Protilátky

Monoklonální



Polyklonální



- získané opakovanou imunizací zvířat
- silné, obvykle vysoké ředění



specifita / senzitivita



Analytická specifita

- schopnost testu detekovat antigen bez rušení
- žádné falešně pozitivní výsledky

Analytická senzitivita

- schopnost testu detekovat velmi malé množství antigenu
- žádné falešně negativní výsledky

rozdíl

MONOKLONÁLNÍ

specifická protilátka reagující s jedním epitopem antigenu

nízká zkřížená reaktivita (cross- reaktivita)

nepatrný šum na pozadí

identické šarže

POLYKLONÁLNÍ

protilátky reagující s různými epitopy antigenu

zvýšená pravděpodobnost zkřížené reaktivity s podobnými antigeny (cross- reaktivita)

zvýšená pravděpodobnost šumu v pozadí

různé šarže



Komerčně vyráběné protilátky

výrobce zaručuje: diagnostickou využitelnost ověřenou a schválenou

Evropa: CE (z francouzského „Conformité Européenne“)

- výrobek prošel postupem potvrzování shody
- vyhovuje požadavkům evropských směrnic

USA: FDA (z anglického „Food and Drug Administration“)

- vládní agentura zodpovědná za kontrolu a regulaci potravin, léčiv, lékařských přístrojů

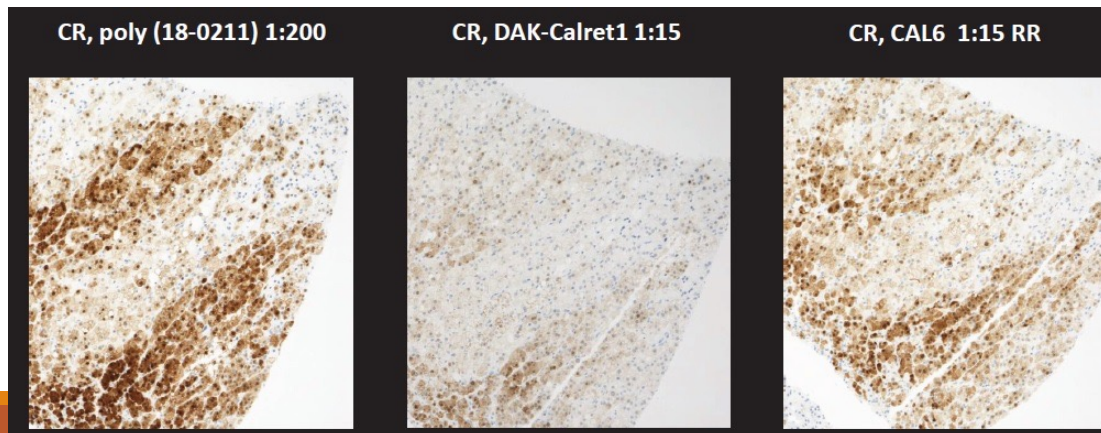


IVD (In vitro diagnostika)- musí vyhovovat relevantním požadavkům uvedeným v nařízení vlády č. 56/2015 Sb. IVD musí absolvovat odpovídající způsob posouzení shody, na základě něhož je vydáno ES prohlášení o shodě a každý výrobek opatřen označením CE. Institut pro testování a certifikaci je členem TEAM-NB a signatářem etického kodexu Code of Conduct.

Je monoklonální protilátka vždy lepší?

Table 1. Abs and assessment marks for CGA, run 31

Concentrated Abs	N	Vendor	Optimal	Good	Borderl.	Poor	Suff. ¹	Suff. OPS ²
mAb clone LK2H10	13	NeoMarkers	5	13	6	0	75 %	91 %
	5	BioGenex						
	2	Chemicon/Millipore						
	2	Leica/Novocastra						
	1	EuroProxima						
	1	Zytomed						
mAb clones LK2H10 + PHE5	8	NeoMarkers	3	5	3	0	73 %	80 %
	3	Biocare						
mAb clone DAK-A3	16	Dako	0	2	12	2	13 %	-
mAb clone 5H7	4	Leica/Novocastra	0	2	0	2	-	-
rmAb clone SP12	3	Spring Bioscience	0	0	5	1	0%	-
	1	DSC						
	1	Master Diagnostica						
	1	NeoMarkers						
pAb A0430	53	Dako	36	15	2	0	96 %	100 %
pAb 18-0054	2	Zymed	0	1	1	0	-	-
pAb RB-9003-P	1	NeoMarkers	0	0	1	0	-	-



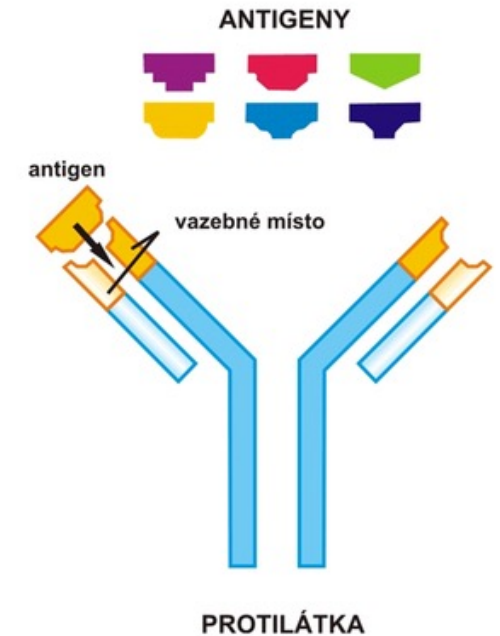
NordiQC assessment scheme 2017

Module	Winter	Spring	Autum
General	Run 49 CD5 CK-1/MW MLA MLH1 NKX3.1 PSA	Run 50 CD23 CK19 ERG MSH2 S100 SMH	Run 51 ALK AMACR CD117 CD30 PAX8
Breast	Run B23 ER HER2 IHC		Run B24 ER HER2 IHC PR
HER2	Run H11 HER2 ISH		Run H12 HER2 ISH
Companion	Run C1 PD-L1		Run C2 PD-L1

Dates	Winter	Spring	Autum
Protocol submission opens	1 Dec 2016	1 Mar	1 Aug
Protocol submission closes	3 Jan	20 Mar	4 Sep
Shipping of slides	14 Jan	29 Mar	13 Sep
Deadline for slide return	13 Feb	1 May	11 Oct
Assessment General	28 Feb - 2 Mar	16 May - 18 May	24 Oct - 27 Oct

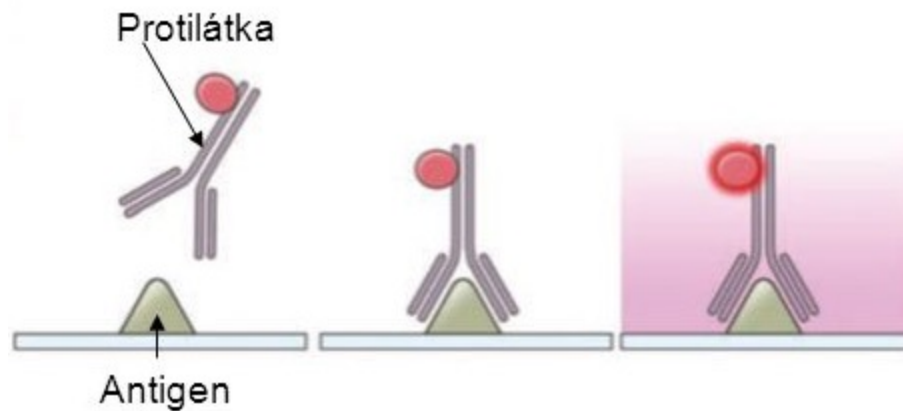
Metody IHC

- **Přímá**
primární Ab značená přímo (enzymem, fluorochromem..)
nutná dostatečná koncentrace antigenu ve tkáni
- **Nepřímá dvojstupňová**
neznačená primární protilátka a značená sekundární
- **Nepřímá třístupňová**
signál zesílen vazbou streptavidin-biotin nebo avidin-biotin



Metody IHC

- **Přímá**
primární Ab značená přímo (enzymem, fluorochromem..)
nutná dostatečná koncentrace antigenu ve tkáni

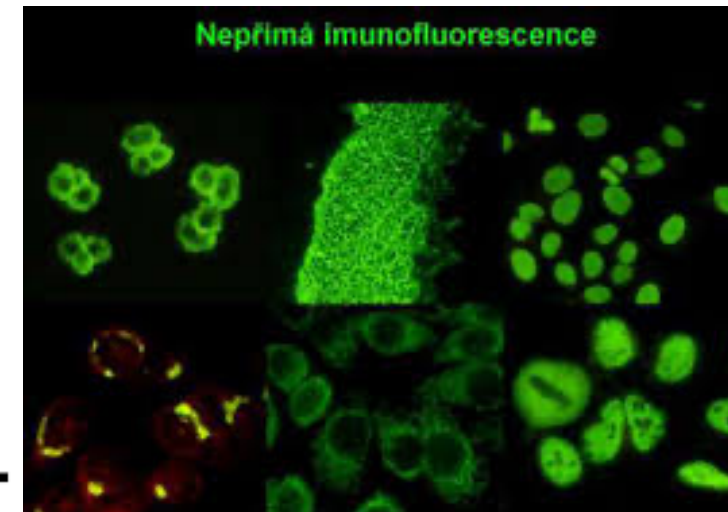
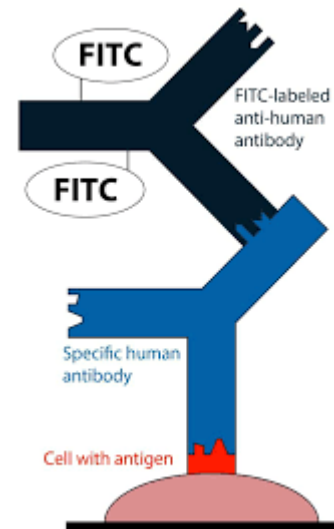
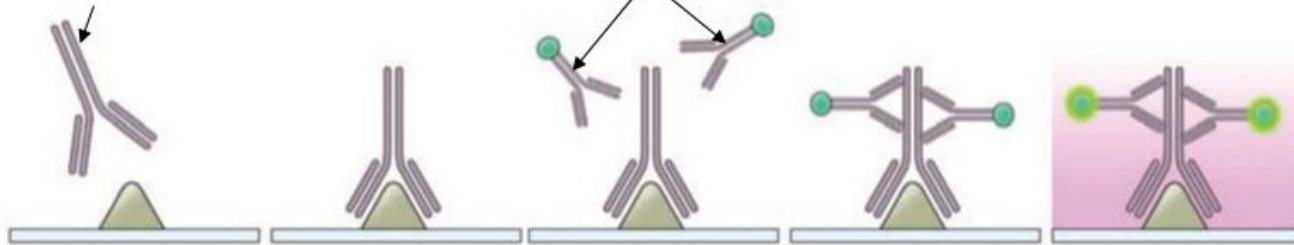


Metody IHC

- Nepřímá dvojstupňová
neznačená primární protilátka a značená sekundární

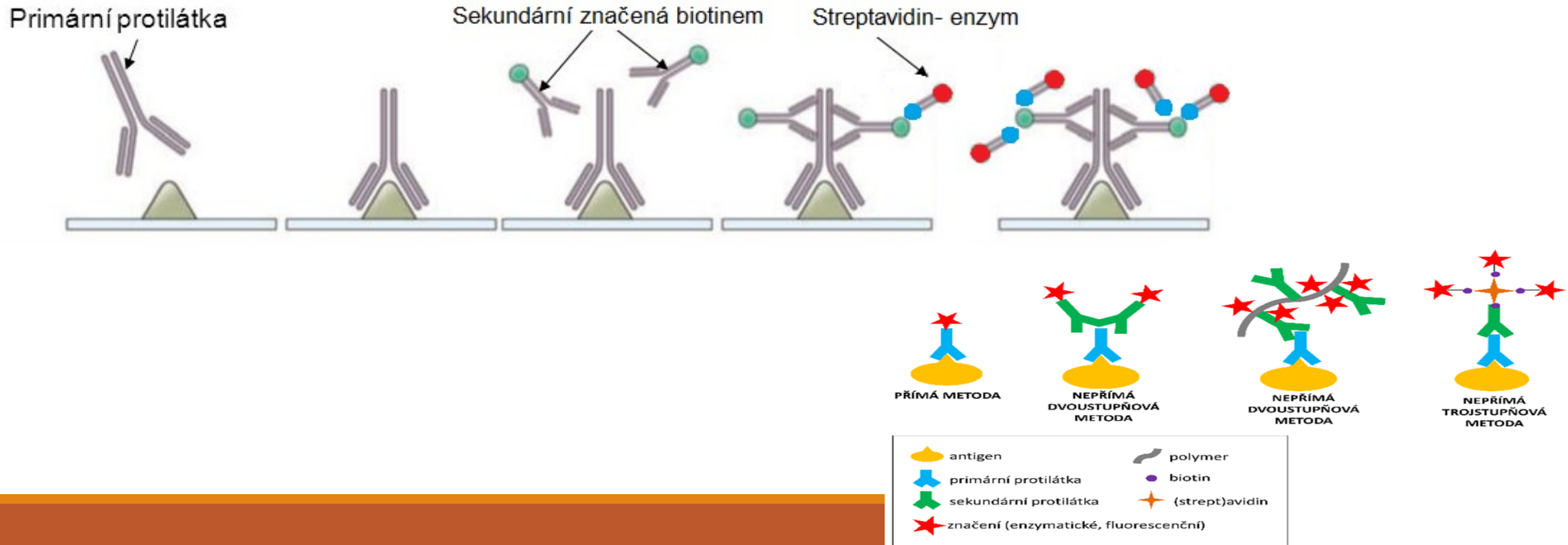
Primární protilátka

Sekundární značená protilátka

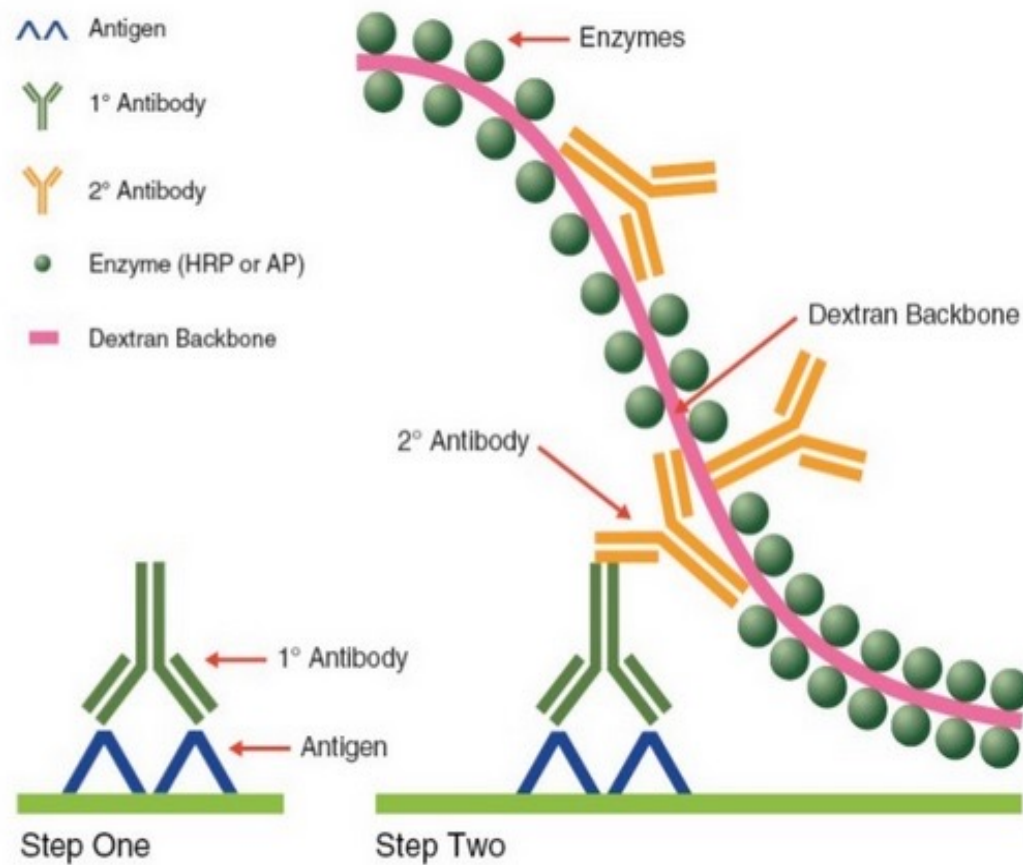


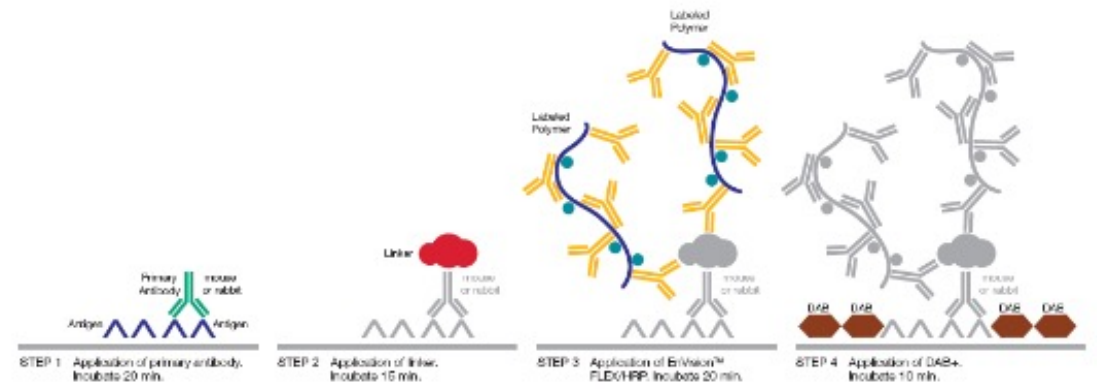
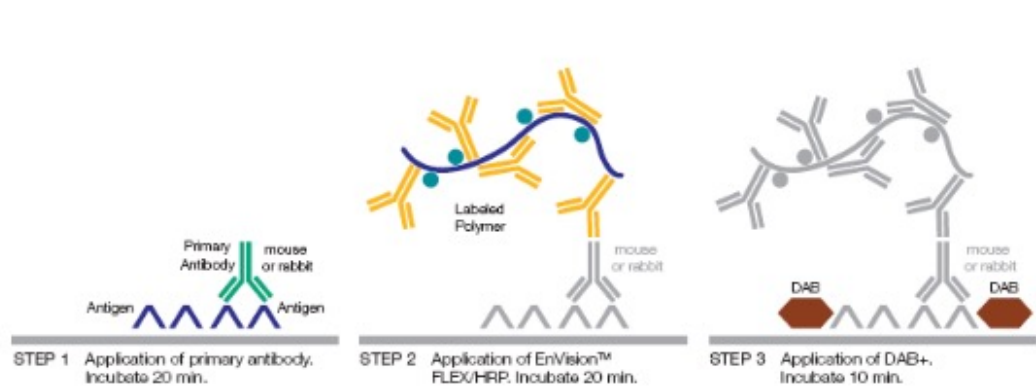
Metody IHC

- Nepřímá třístupňová
signál zesílen vazbou streptavidin-biotin nebo avidin-biotin



Nepřímá IHC metoda





Chromogeny

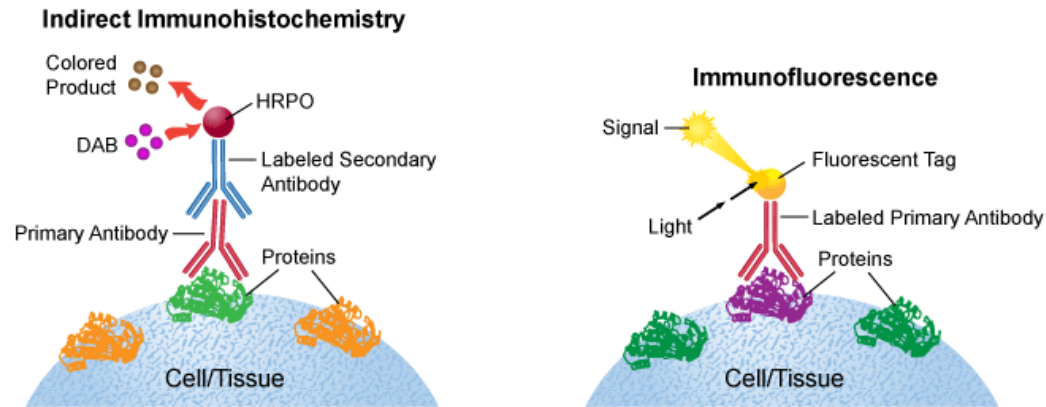


Diagram 1: Illustration of Indirect Immunohistochemistry and Immunofluorescence methods.

Navázanou primární protilátku nevidím

Proto se používají k vizualizaci

- * fluorescenční značky
- * enzymy a následné použití chromogenu

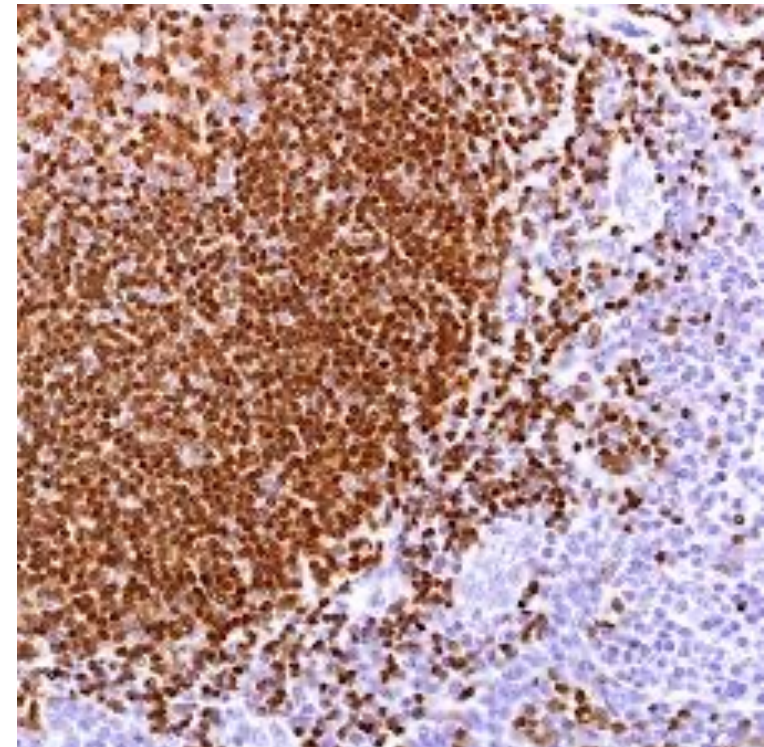
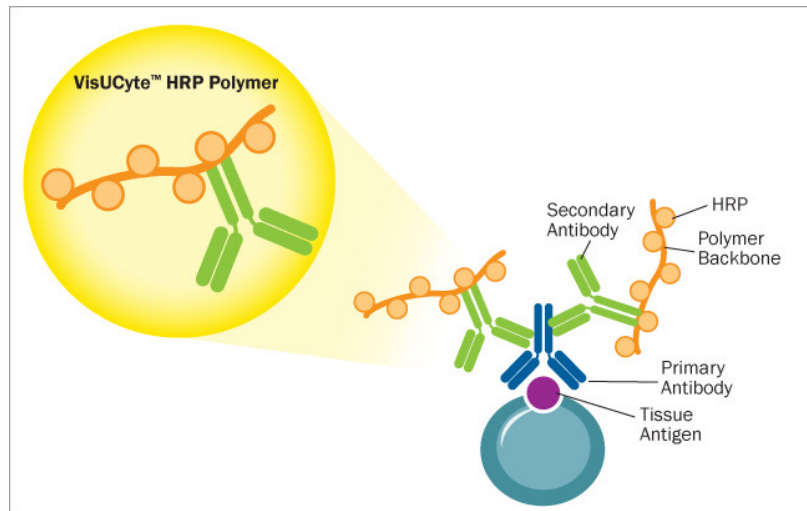
Chromogeny: DAB 3,3'-diaminobenzidine
AEC 3-amino-9-ethylcarbazole
NBT p-nitroblue tetrazolium chloride

Chromogeny

enzymy a následné použití chromogenu

křenová peroxidáza - HRP

Chromogeny: DAB 3,3'-diaminobenzidine

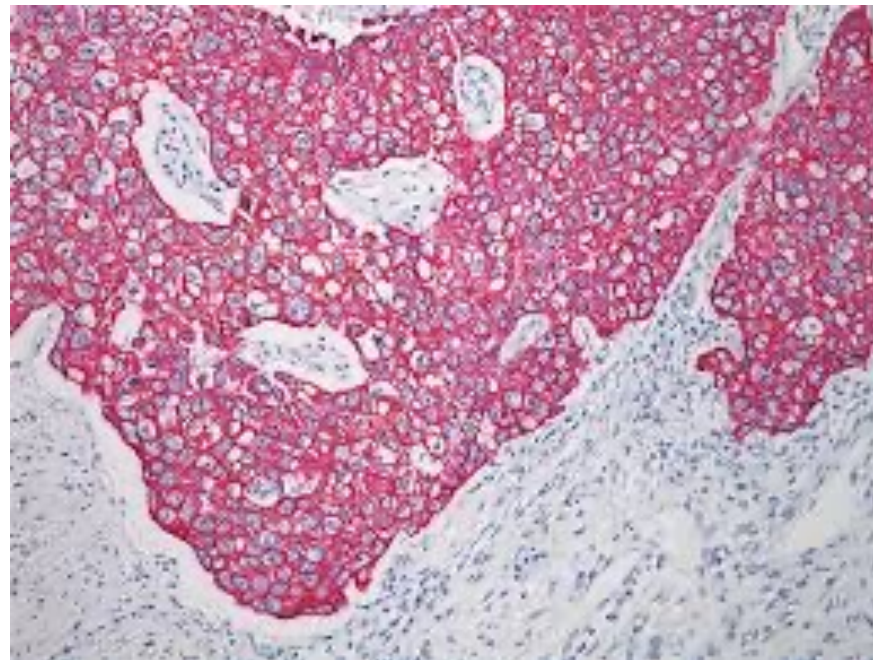


Chromogeny

enzymy a následné použití chromogenu

peroxidáza

Chromogeny: **AEC 3-amino-9-ethylcarbazole**

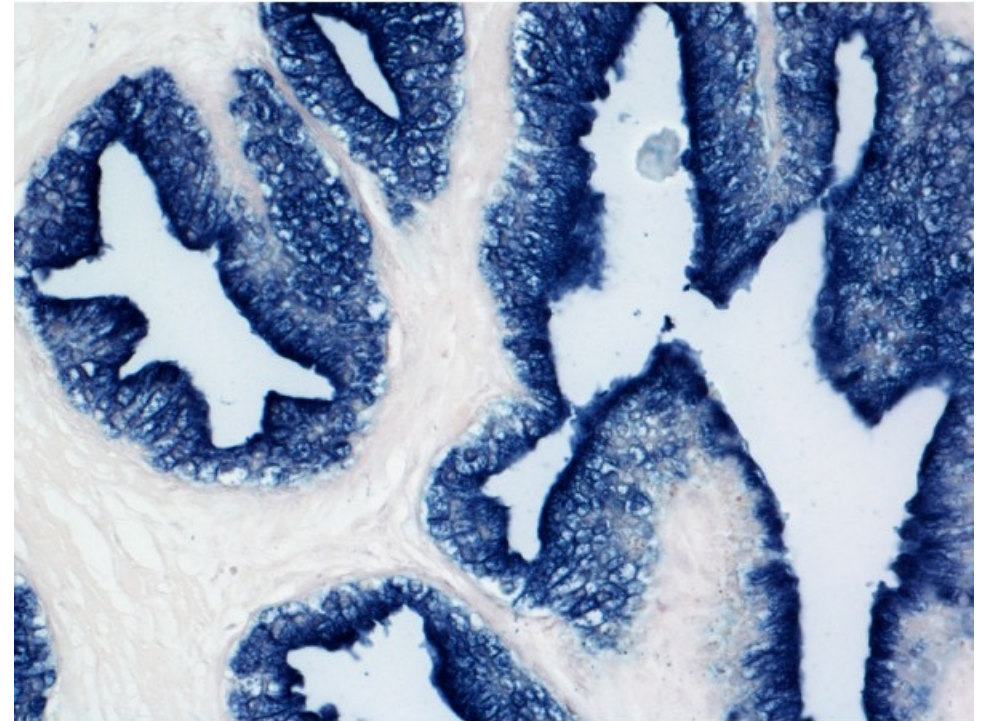


Chromogeny

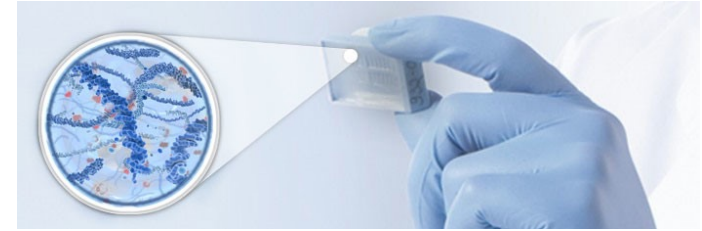
enzymy a následné použití chromogenu

AP

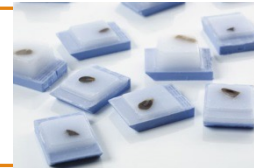
Chromogeny: NBT p-nitroblue tetrazolium chloride



Materiál



FFPE - parafinové řezy



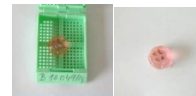
otisky



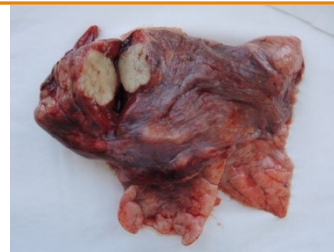
cytospiny



cytobloky



nativní materiál



Podložní skla

povrch skla pro elektrostatickou vazbu vzorků tkání a cytologických preparátů

nevyžadují speciální úpravu povrchu

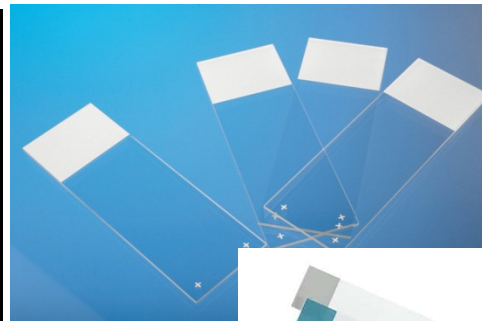
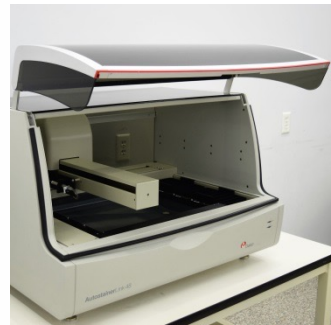
garantovaná čistota bez Rnáz

vysoká přilnavost redukuje ztrátu tkání

omezení barvení pozadí

Nutné dodržet skla pro daný IHC systém

Podložní skla





Tloušťka řezu

IHC- P

1 až 3 μm

IHC- Frozen

2 až 6 μm



Výběr testovací tkáně

Low expresor (nastavuje senzitivitu)

High expresor (máme správnou Ab)

Negativní kontrola (nastavuje specifitu)

Rutina:

Multiblok 1 – tonsila, appendix
Multiblok 2 – jícen, játra
Multiblok 3 – prostata, placenta, čípek
Multiblok 4 – plíce, ledvina, kůže, žaludek
Multiblok 5 – thymus, štítná žláza, vejcovod
Multiblok 6 - nádorová tkáň s různou expresí HER2



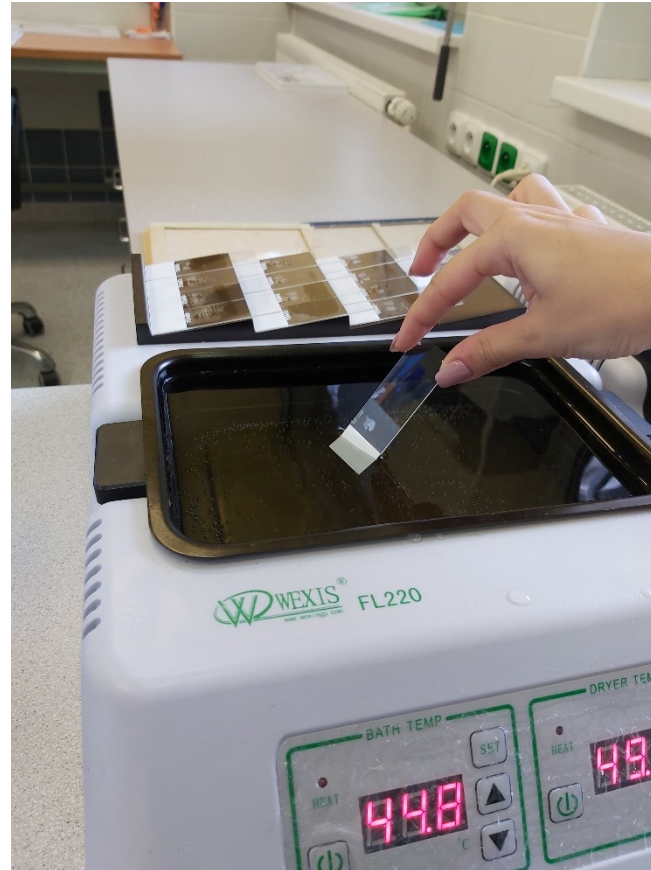
1	α1-antichymotr.	ton
1	α1-antitrypsin	ton,ját
	α1-fetoprotein	emb.ca
1	aktin	app,ját
1	SMA	app
1	ALK	app
5	ATRX	vejco
3	AR	pros
1	Bcl-2	ton
1	Bcl-6	ton
1	β-catenin	app
3	β-HCG	plac
5	CA-125	vejco
5	Calcitonin	tkáň s Cal
1	Calretinin	app
1	CD 1a	ton
1	CD 3	ton
1	CD 4	ton,ját
1	CD 5	ton
1	CD 7	ton
1	CD 8	ton
1	CD 10	ton
1	CD 15	ton
1	CD 19	ton
1	CD 20	ton
1	CD 21	ton
1	CD 22	ton
1	CD 23	ton
1	CD 30	ton
1	CD 31	ton
1	CD 34	app,ját
1	CD 43	ton
1	CD 45 (LCA)	ton
1	CD 45RO	ton
1	CD 56	ton
1	CD 57	ton
1	CD 68	ton
1	CD 79a	ton
2	CD 99	jíc,ton
1	CD 117 (c-kit)	app

2	CK AE1/3 (CK-PAN)	jíc,ját
2	CK5/6	jíc
4	CK 7	led
1	CK 8	app,ját
2	CK 14	jíc
1	CK 8/18	app,ját
	CK 17	kůže
1	CK 18	app,ját
2	CK 19	jíc,app
1	CK 20	app
2	CK HMW	jíc
2	c-MYC	jíc
	CMV	tkáň s CMV
4	Collagen IV	led
1	Cyklin D1	ton
1	Desmin	app
	EBV	kost.dřeň
2	E-cadherin	ját
	EGFR	kůž,ton
1	EMA	ton
3	ER	číp
1	FVIII	app,ton
3	FXIIIa	plac
	FLI-1	Ewin.sar.
	Galectin-3	ton
4	Gastrin	žal
4	GATA3	led
1	GFAP	app
1	Glykoforin A	ton
3	Glypican-3	plac
1	Granzym	ton
2	GS	ját
	H3 K27M	poz. mutace
1	HBME-1	app,ton
2	HCL	ját
	HE-4	nadvarle
2	Hepatocyty	ját
6	Her2/neu	prsa
	HMB-45 (MSA)	angiomyol.
4	HNF1β	led

1	IgA	ton
1	IgG4	ton
1	IgG	ton
1	IgM	ton
3	Inhibin	plac
1	INI-1	ton
1	Kappa	ton
1	Ki-67	ton
	L1CAM	VK nerv
1	Lambda	ton
	Laminin	kůže
	Langerin	kůže
1	Lysozym	app,ton
	Mammaglobin	kůže
	Melan A	nadledvina
2	Mitochondrie	ját
1	MLH1	ton
1	MSH2	ton
1	MSH6	ton
1	MUM-1	ton
1	Myeloperoxidáza	ton
	MyoD1	rabdomyos.
4	Napsin A	led
	NeuN	mozek
1	NF	app
1	NSE	app
	oct 3/4	seminom
	olig 2	mozek
1	p16	ton
3	p40	plac
1	p53	ton
3	p57	plac
1	p63	ton
	PARK7/DJ1	pří.tělisko
1	PAX-5	ton
5	PAX8	vejco
1	PDL-1	ton
1	Perforin	ton
3	PLAP	plac

3	PSAP	pros
	ROS1	hepato ca
1	S-100	app
	SOX 10	tl.střevo, (kůže)
	SOX 11	ton,MCL
1	Synaptofysin	app
	Trimethyl H3	tl. střevo
5	TdT	thym
5	Thyroglobulin	štítl.žl
4	TRAP	plíc,ját
4	TTF-1	plíce
1	Vimentin	ton
4	WT-1 (pozWT)	tuba (led)

Preparáty - kontrolní tkáň



Preparáty – vyšetřovaná tkáň



Postup IHC vyšetření

Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) tissue





Postup IHC vyšetření

Demaskování antigenních epitopů

- fixovaný materiál
- zesíťování aldehydovou fixací
- proteolytické trávení
- tepelně indukované odhalení epitopu HIER
 - ° EDTA pufr (pH 9)
 - ° citrátový pufr (pH 6)



HIER retrieval

pH 6/98°C/20 - 40 min

pH 9/98°C/20 - 40min

pH 6/121°C/4 min

pH 9/121°C/1 min

- pH 6/ 98-100°C /20 - 40 min
- pH 9/ 98-100°C /20 - 40min

- pH 6/121 - 124°C/4 min
- pH 9/121- 124°C/1 min

Čím vyšší pH pufru, tím účinnější je demaskování a kratší potřebný čas vaření

Různé antigeny vyžadují různé způsoby odhalení antigenu



Blokování endogenní enzymatické aktivity

blokace potenciální endogenní aktivity enzymu

endogenní peroxidázová aktivita – fyziologicky přítomna v mnoha bb

po fixaci – funkční

falešně pozitivní výsledek

blokace:

nadbytkem substrátu pro příslušný enzym

např. peroxid vodíku pro peroxidázu

lavamizol pro AP

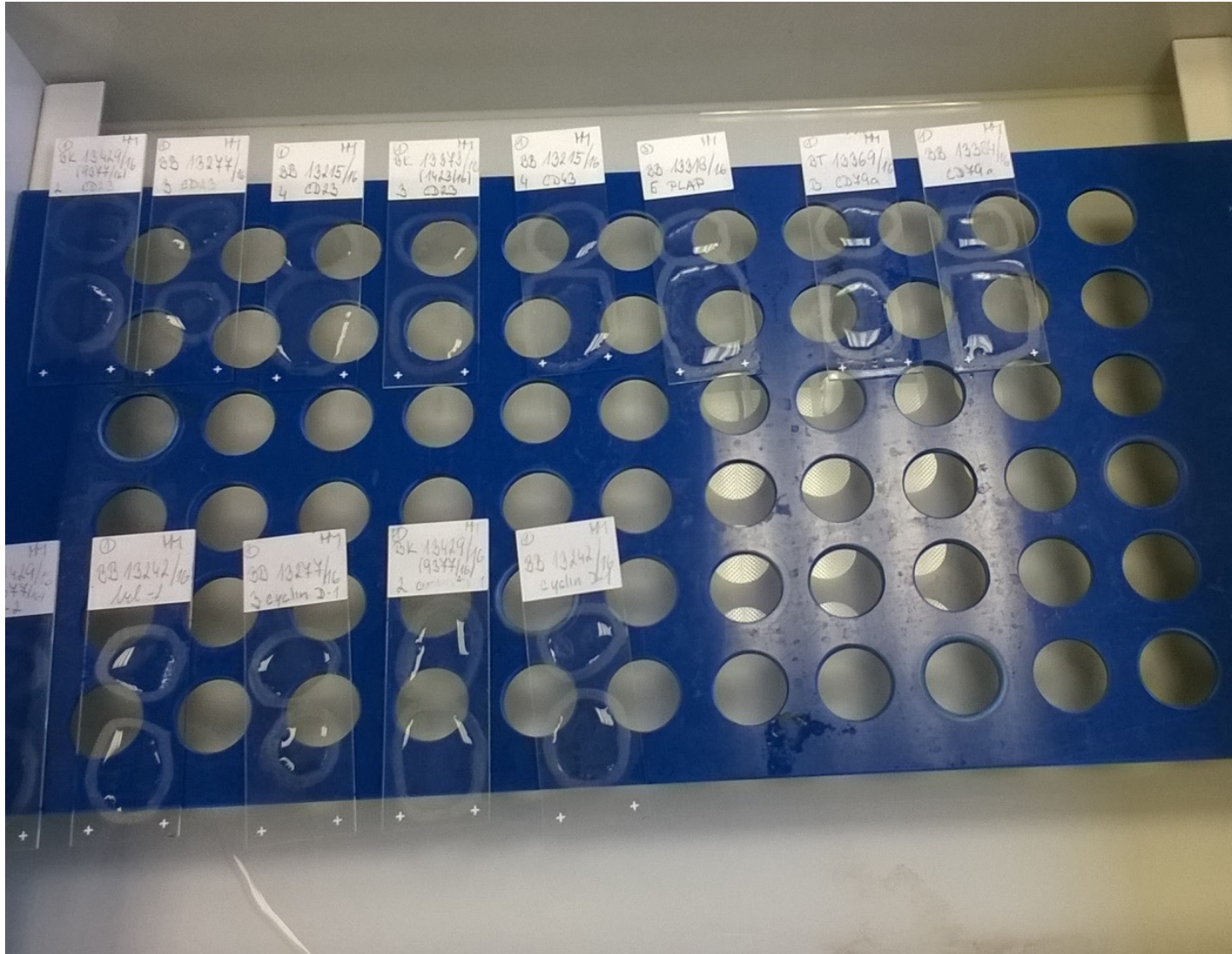
Primární protilátka - RTU vs. koncentrát

Ready To Use
se rovnou kapou na skla
s tkáňovými řezy



Koncentráty se ředí diluentem
Nejlepší ředění se
stanovuje empiricky – závisí na typu odhalení
epitopu,
použitém polymeru...





Inkubace s primární protilátkou

správná koncentrace protilátky

vhodné prostředí – teplota,

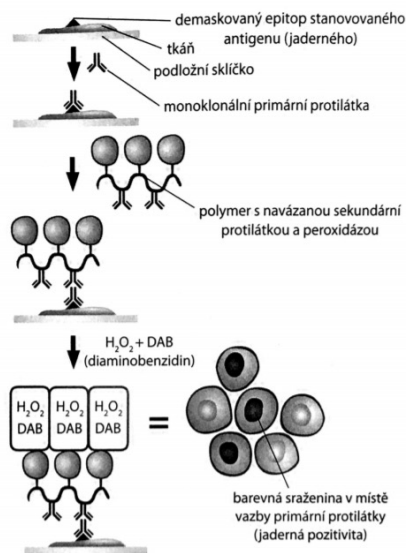
pH a iontová síla pufru ve kterém je Ab
naředěna

vlhkost inkubačního prostředí

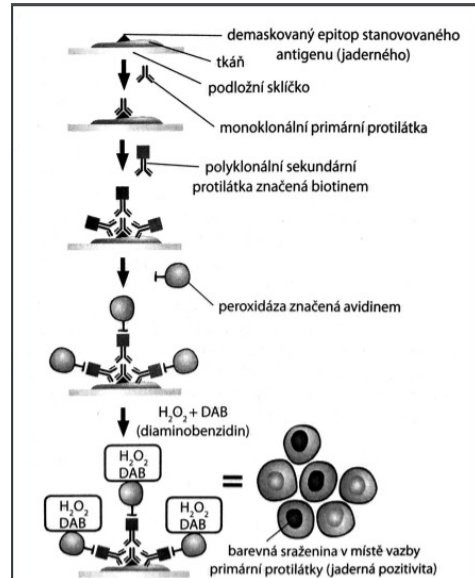
doba inkubace

rce antigen-protilátka – slabé vazebné
interakce – správné prostředí po celou
dobu

Detekce vazby primární protilátky



Obr. 50-3. Polymerní detekční systémy v imunohistochemii. Schéma detekce vazby monoklonální primární protilátky na stanovovaný protein (antigen) pomocí polymerního systému: polymer s navázanou sekundární protilátkou a peroxidázou; substrát H_2O_2 a kosubstrát diaminobenzidín (DAB). Jako příklad je uvedeno stanovení exprese jaderné molekuly. Ve výsledku je v místě exprese proteinu (vazby primární protilátky) přítomna barevná sraženina.



Obr. 50-2. Vícekrokové detekční systémy v imunohistochemii. Schéma detekce vazby monoklonální primární protilátky na stanovovaný protein (antigen) pomocí systému: polyklonální sekundární protilátka označená biotinem; komplex avidin-peroxidáza; substrát H_2O_2 a kosubstrát diaminobenzidín (DAB). Jako příklad je uvedeno stanovení exprese jaderné molekuly. Ve výsledku je v místě exprese proteinu (vazby primární protilátky) přítomna barevná sraženina.

Jednokrokové detekční systémy:

sekundární protilátky

– polyklonální

- váží se na více epitopů primární Ab, která je pro něj Ag

- vyráběny proti myším a králičím Ig

- polymery – sekundární Ab a molekuly enzymu

Vícekrokové detekční systémy:

sekundární Ab označeny – biotinem

- následuje enzym ozn. avidinem (streptavidin)

- biotin-avidinový můstek

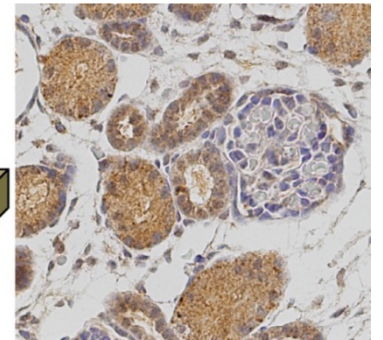
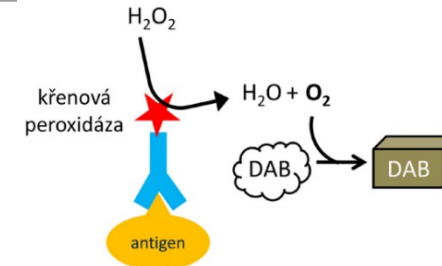
Aplikace substrátu a kosubstrátu

substrát (H₂O₂)

kosubstrát (DAB)

Inkubační roztok s H₂O₂ (substrát) + chromogen (DAB)

Peroxidáza (HRP) katalyzuje rozštěpení H₂O₂ na vodu a kyslík. DAB je oxidován a následně polymerizuje na hnědou sraženinu v místě, kde byla navázána protilátka



Různé kombinace enzym-substrát-kosubstrát využívané pro imunohistochemii.

ENZYM	SUBSTRÁT	KOSUBSTRÁT	ZBARVENÍ SRAŽENINY
peroxidáza	peroxid vodíku	DAB (3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid)	hnědá
		AEC (3-amino-9-ethylkarbazol)	červená
alkalická fosfatáza	naftol AS-MX fosfát	Fast red TR	červená
	BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát toluidinová sůl)	NBT (nitro-blue tetrazolium chlorid)	modrá

Dobarvení jader, montování

Dobarvení jader hematoxylinem (Mayerův, Harrisonův, Gillův)

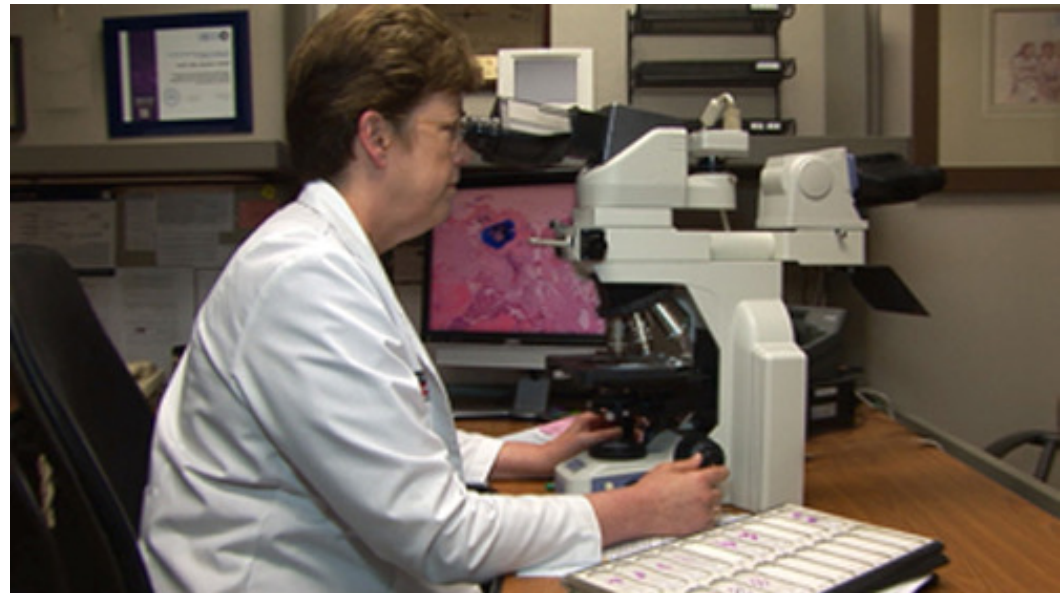
Odvodnění řadou alkoholu

Projasnění xylenem

Montování do média



Hodnocení preparátu

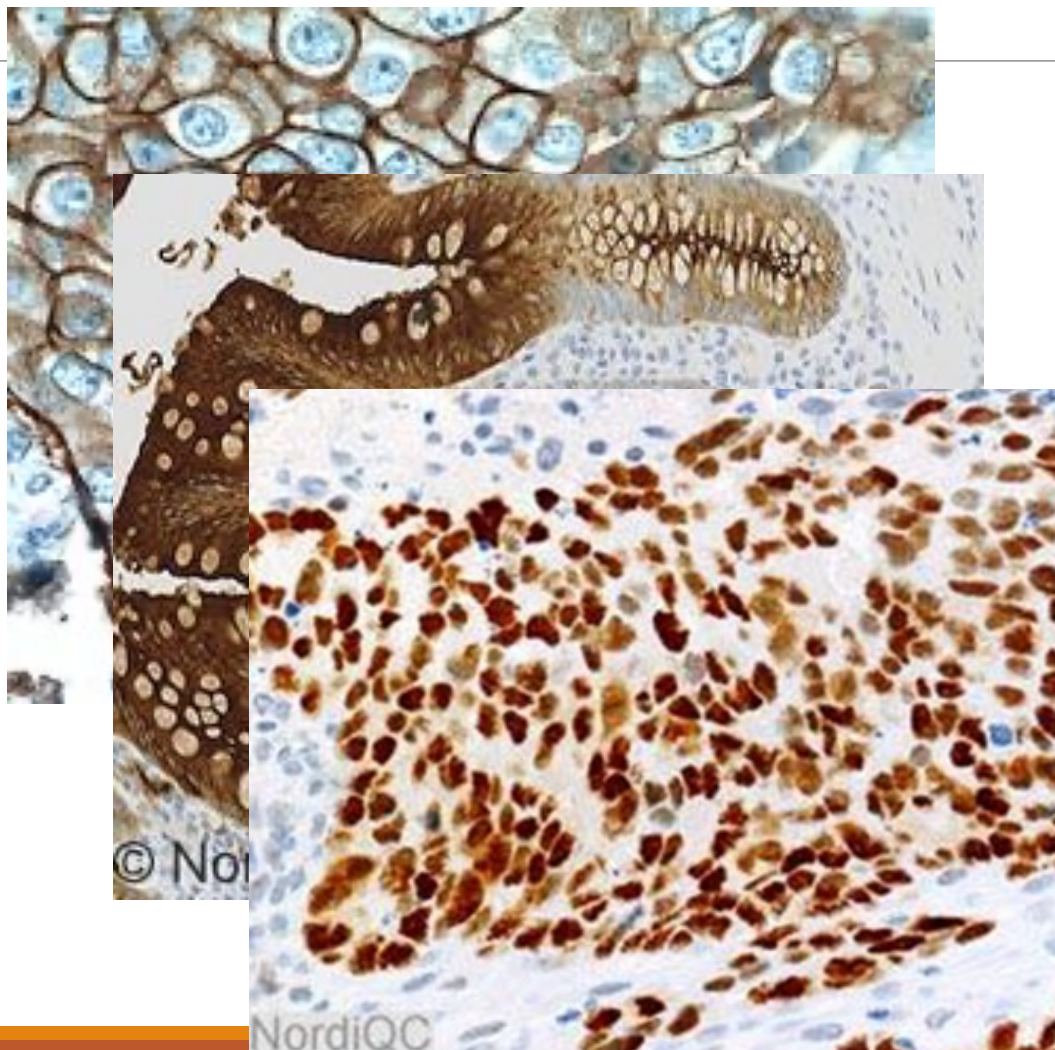


Výsledek IHC

Detekce membránového proteinu

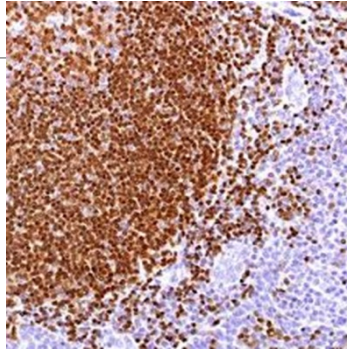
Detekce cytoplazmatického proteinu

Detekce jaderného proteinu

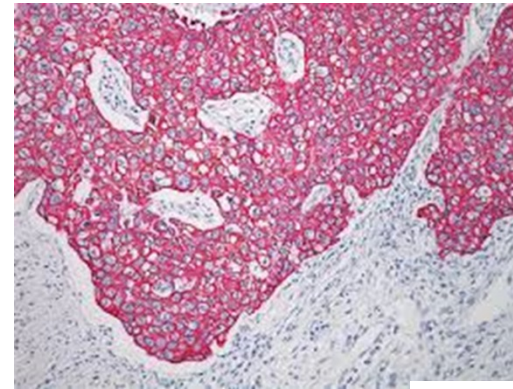


Chromogen

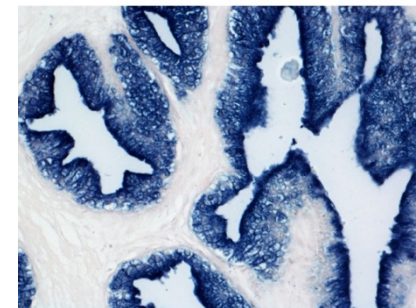
DAB 3,3'-DIAMINOBENZIDINE



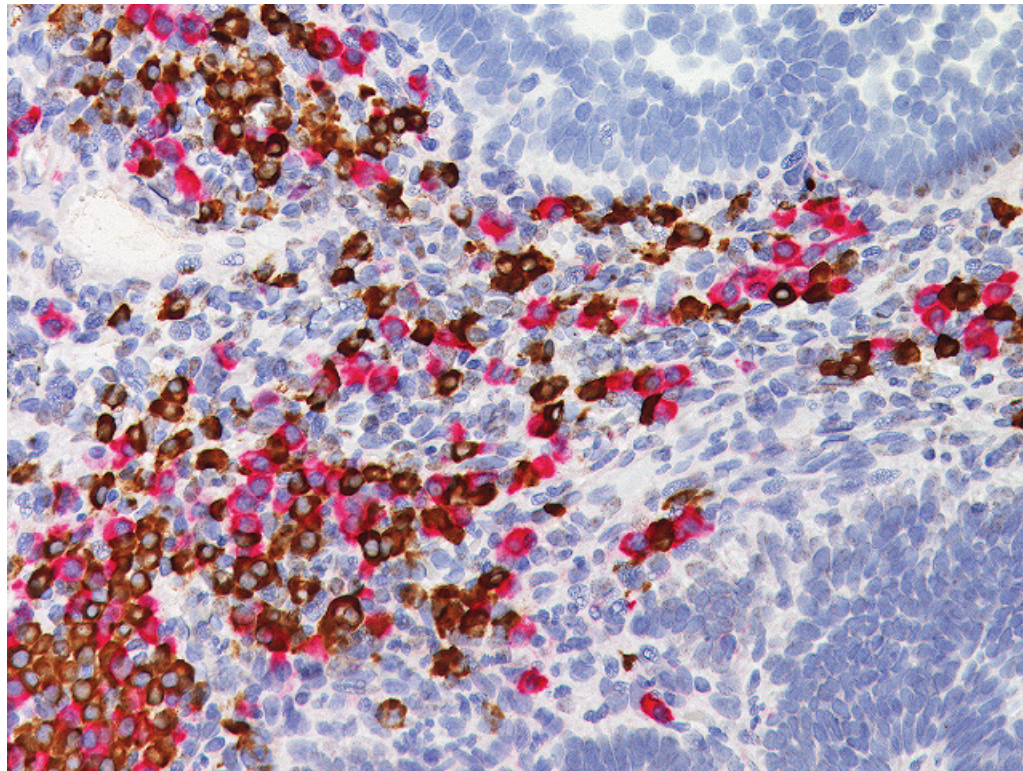
AEC 3-AMINO-9-ETHYLCARBAZOLE
POZOR NA ALKOHOL A XYLEN!



NBT p-nitroblue tetrazolium chloride
Pozor na alkohol a xylen!



Dual IHC



- malé množství tkáně
- přehlednost

Spíše pro automat:

chromogranin/synaptofyzin

AFP + Ki67

CD3 + CD20

ER + E-cadherin

TTF1 + CK7

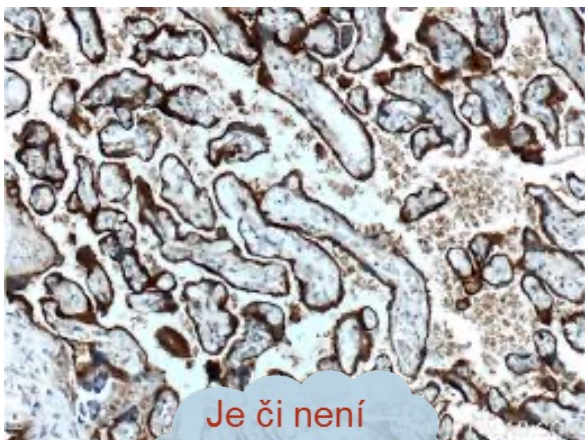
TTF1 + Napsin A

Automatizace



VÝZNAM
IMUNOHISTOCHEMIE
U DIAGNOSTIKY TKÁNÍ
A BUNĚK,
PREDIKTIVNÍ
MARKERY

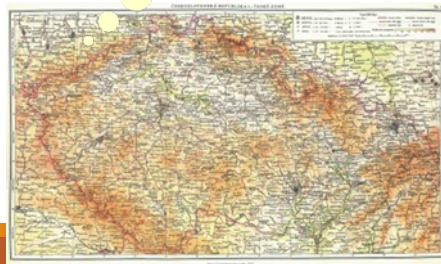
Význam **IMUNOHISTOCHEMIE** u diagnostiky tkání a buněk, prediktivní markery



Je či není
v tkáni určitý
protein ?



Je na
obvyklém
místě ?



Je v obvyklém
množství ?



Princip

Stanovujeme:

Proteiny – včetně glykoproteinů, lipoproteinů, nukleoproteinů, či jiné makromolekuly (glykolipidy, polysacharidy)

Specificky označit a zviditelnit

reakce **antigen (stanovený protein) – protilátka**

vazba – vizualizace  enzym - substrát  barevná sraženina v místě stanovovaného proteinu

Využití IHC v patologii

stanovení diagnózy - odhalit typ tkáně, ze které nádor vychází, určit přesný typ nádoru, určit proliferační aktivitu

určení prognózy

vývoje onemocnění

indikaci k cílené specifické terapii – ERBB2, ALK, PD-L1, ROS1

Hodnocení výsledků

Lokalizace positivity ve tkáni-buňce

exprese v **jádrech** buněk – např. Ki-67 (stanovení proliferační aktivity nádoru)

MyoD1 transkripční faktor (dg rhabdomyosarkomu)

receptory pro estrogen (indikace k hormonální terapii u ca prsu)

exprese v **cytoplasmě**- **intermediární filamenta** desmin (dg nádoru mezenchymálního původu)

vimentin (odlišení pojivových bb. od ostatních typů tkání)

cytokeratiny (dg epiteliálních nádorů)

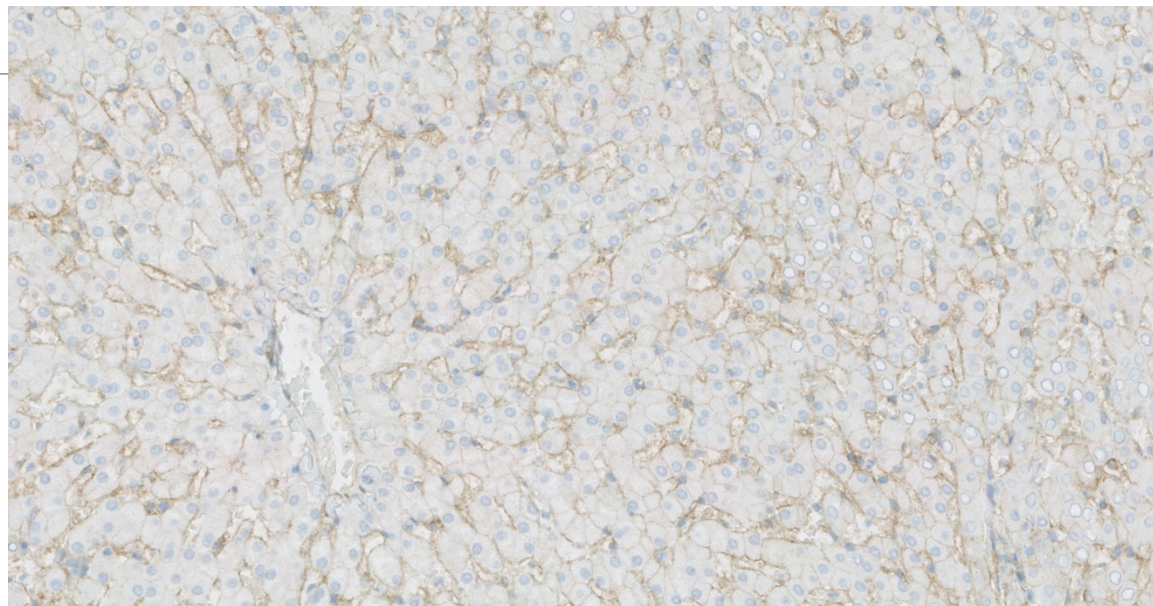
exprese v **organelách** – perforin v cytotoxických granulech

exprese na **buněčné membráně** – CD 20 – dg B-lymfomu

HER-2

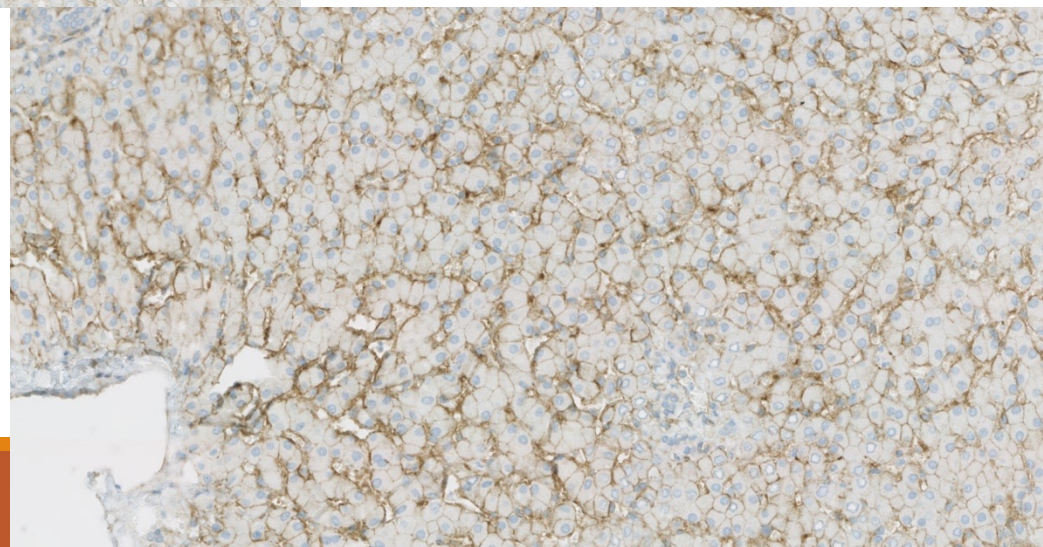
exprese v **extracelulárním prostoru** – kolagen IV v bazálních membránách glomerulů ledvin

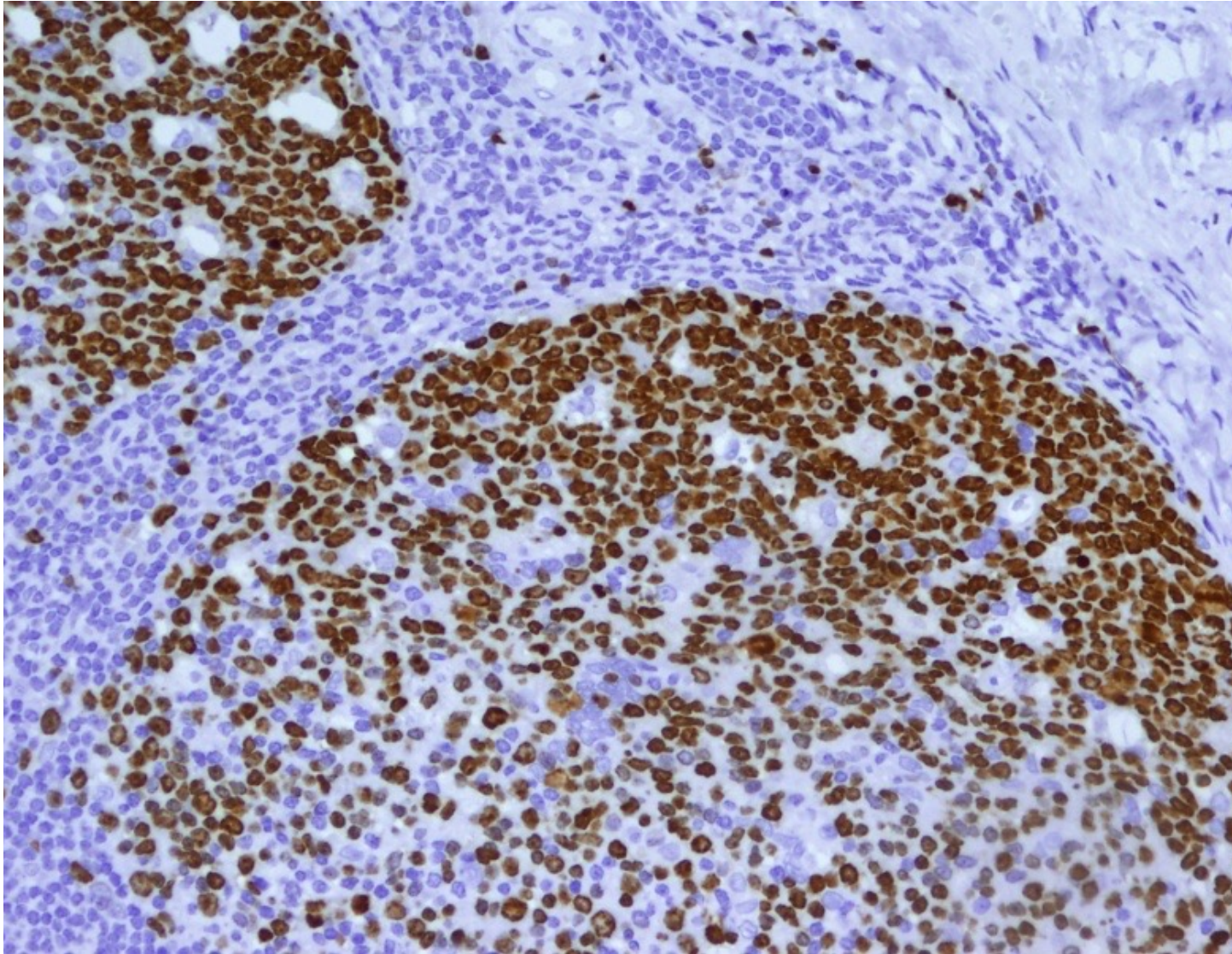
Intenzita reakce



semikvantitativní hodnocení
0, 1+, 2+, 3+

CD 99

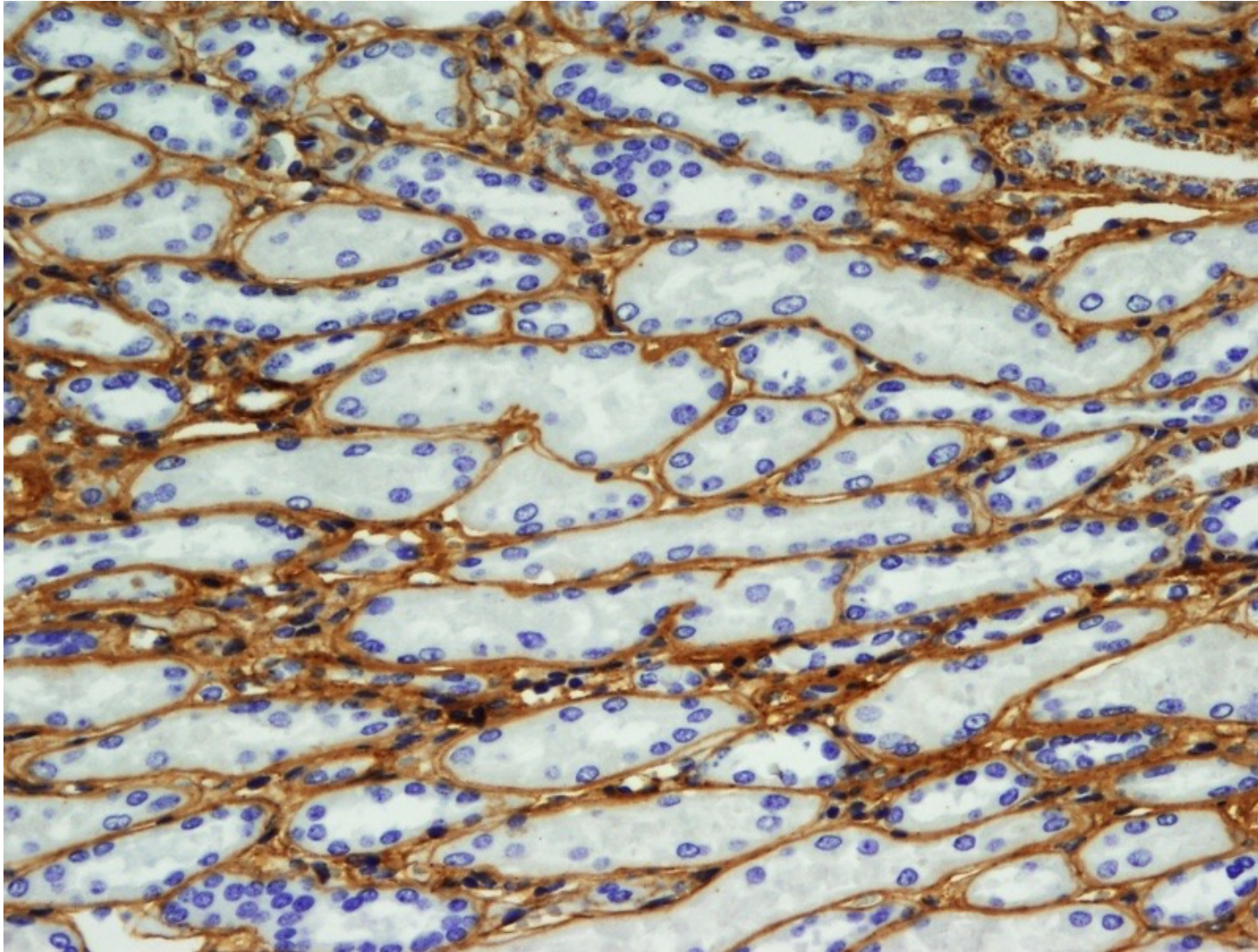




Ki 67 -tonzila

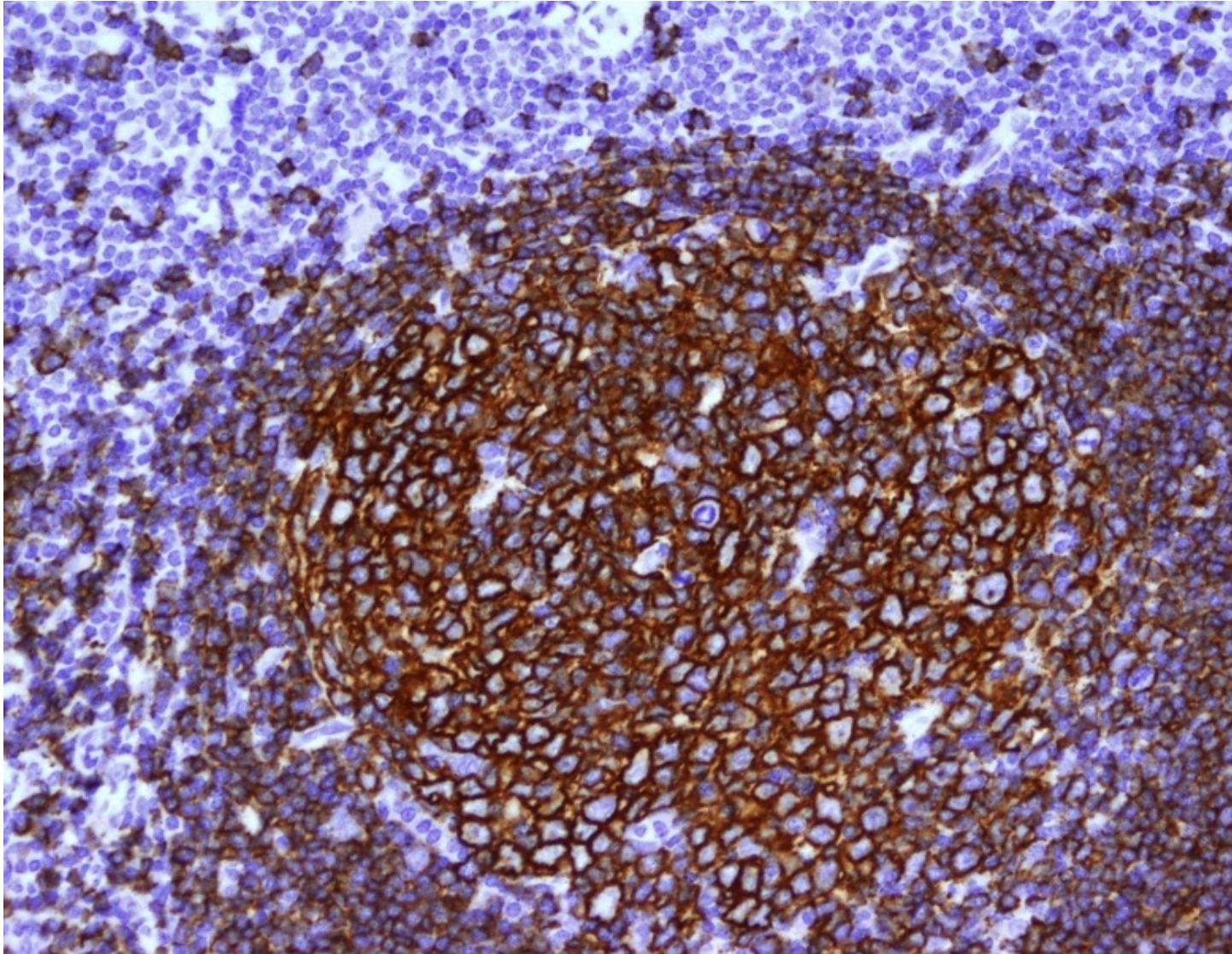
Název proteinu je odvozen od města **Kiel**, kde jej identifikovali pomocí monoklonální protilátky číslo **67** odkazuje na umístění původního klonu protilátky v 96 jamkové destičce





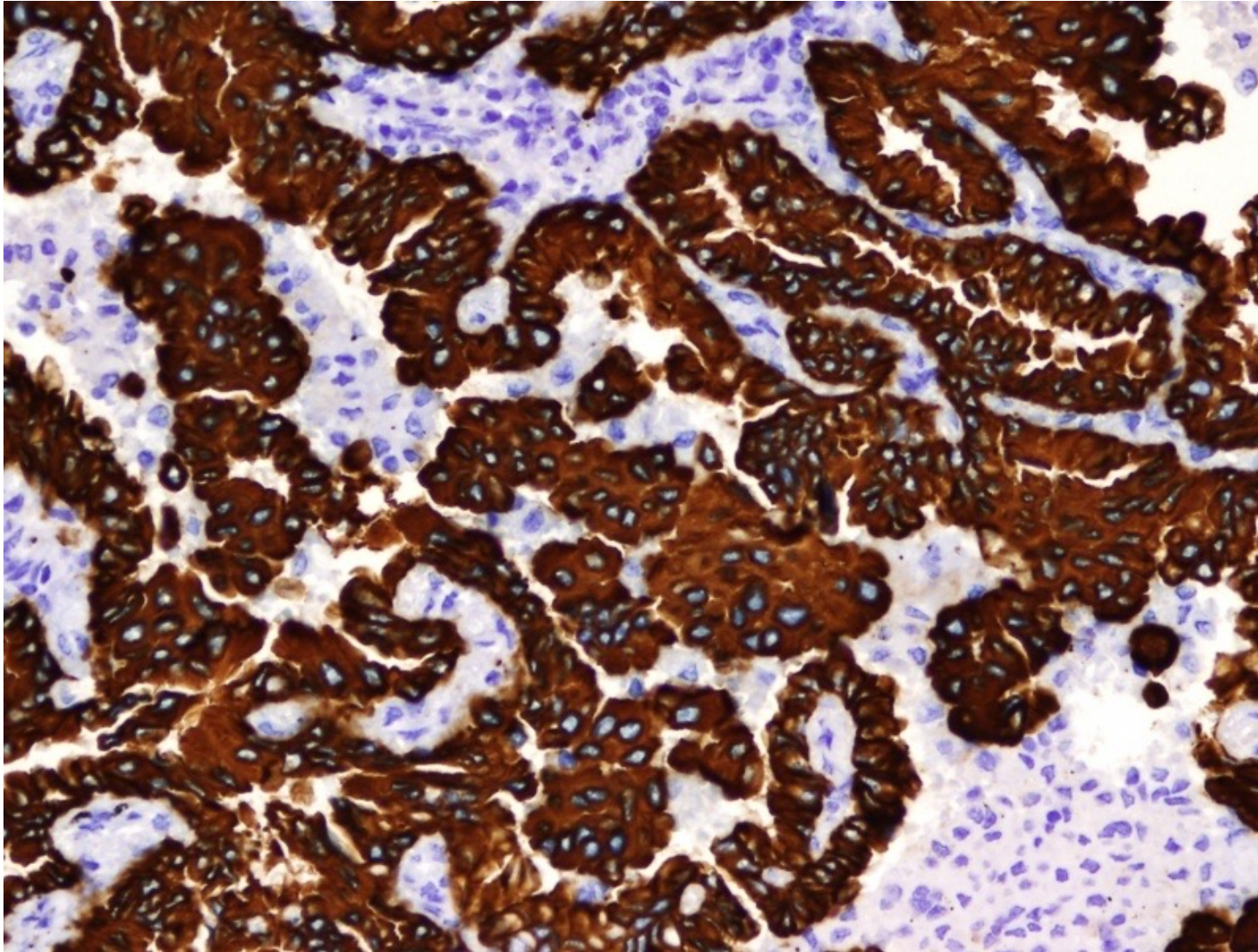
Kollagen IV

kolagen IV v bazálních
membránách glomerulů ledvin



CD 20

CD20 u buněk zárodečných center a buněk folikulárního pláště tonzily



CK AE1/3

Silná cytoplazmatická exprese
cytokeratinů nádorových buněk
karcinomu plic

AE1 detekuje vysokomolekulární
cytokeratiny 10, 14, 15 a 16 a
nízkomolekulární cytokeratin 19.

AE3 detekuje vysokomolekulární
cytokeratiny 1, 2, 3, 4, 5 a 6 a
nízkomolekulární cytokeratiny 7 a 8

Nereaguje na cytokeratiny 17 a 18

intenzita reakce - %

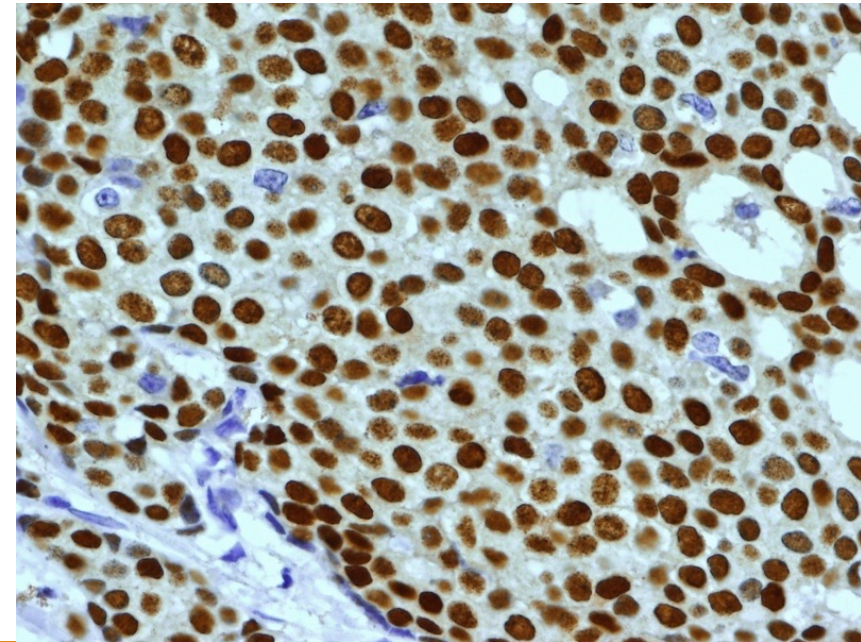
procentuální zastoupení nádorové populace exprimující stanovovaný antigen

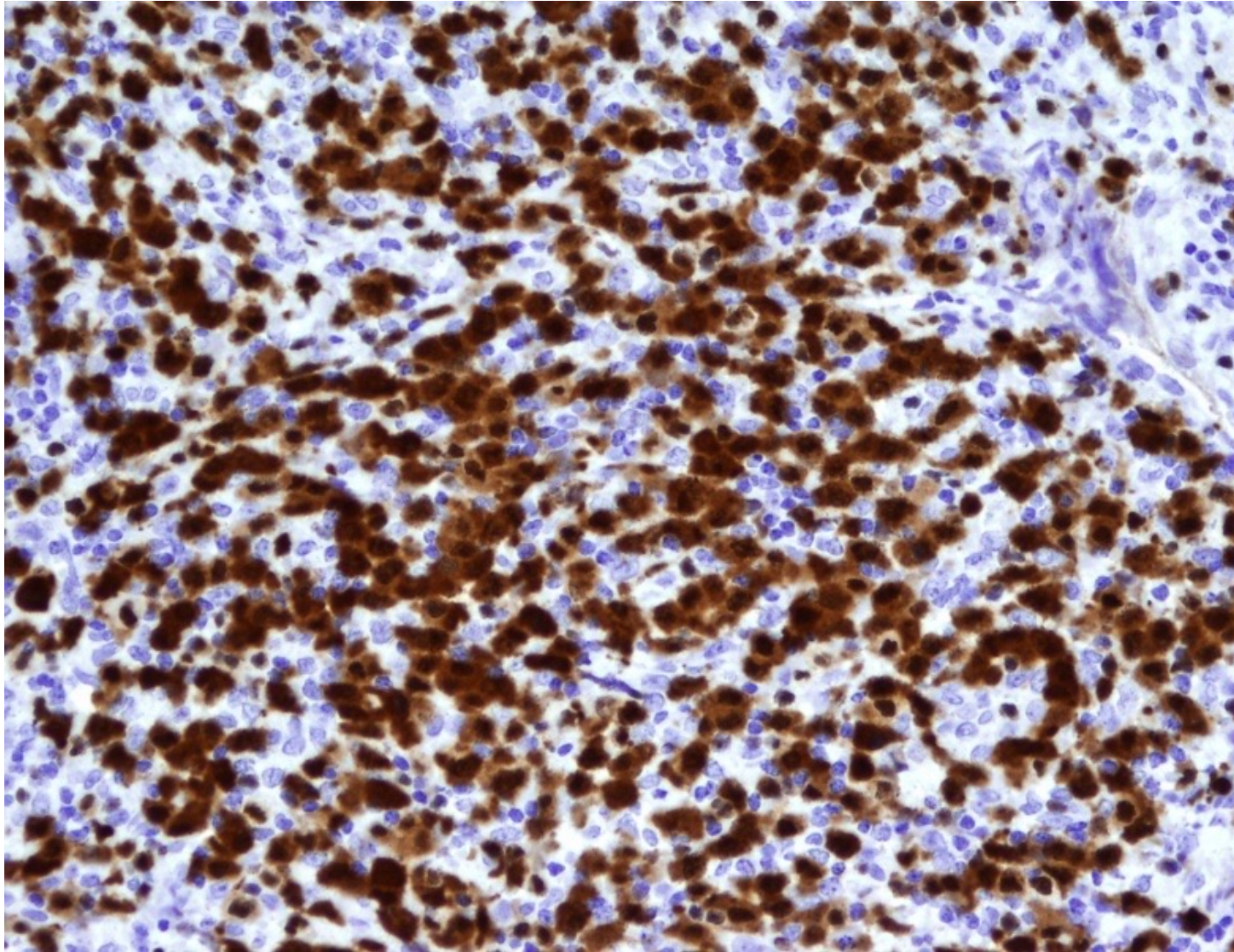
např.:

receptory pro estrogen u nemocných s karcinomem mléčné žlázy

proliferační marker - Ki67

exprese MYC proteinu (diagnostika lymfomů)

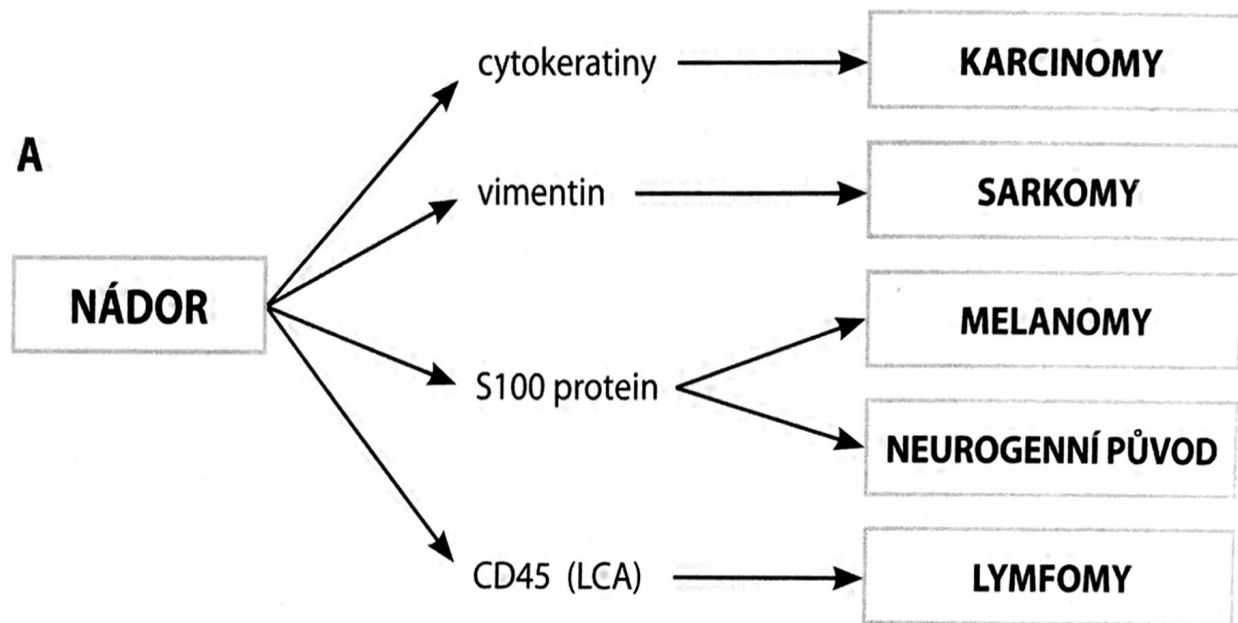




abnormální -
lokalizovaná pozitivita

hodnocení abnormální lokalizace
pozitivity. Silná jaderná a
cytoplasmatická pozitivita ALK
proteinu buněk velkobuněčného
anaplastického lymfomu

Diagnostické využití



indikace IHC vyšetření – v několika vlnách

typizujeme např. nádorový proces – primární či metastatický
karcinom nebo sarkom

např. určíme zda jde o lymfom – CD 45

B lymfom – CD 20, CD 79,

T–lymfom – CD 3

konkrétní lymfom – B lymfom

exprese bcl2 a CD 10 (folikulární lymfom)

cyclin D1 a SOX 11 (lymfom z buněk pláště)

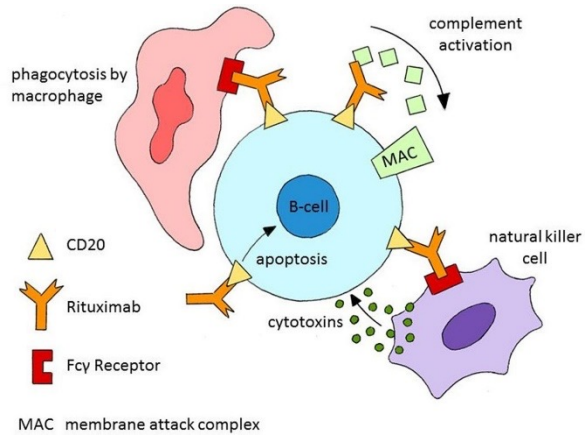
Prognostické využití

Stupeň proliferace – Ki67 – exprimován v celém průběhu buněčného cyklu

detekce mikrometastáz – spádové uzliny

příznivý prognostický znak – velkobuněčný anaplastický lymfom – exprese molekuly ALK





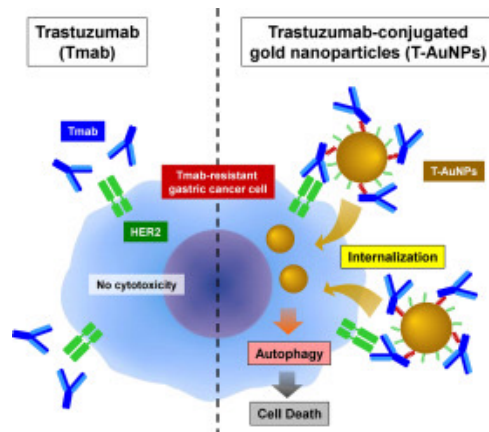
Indikace k cílené terapii onkologicky nemocných

exprese hormonálních receptorů (estrogen, progesteron) – terapie tamoxifenem

exprese CD20 u B lymfomu – terapie protilátkou anti-CD20 rituximab

exprese ERBB2 – mléčná žláza , žaludek
terapie protilátkou Trastuzumab

léčba – nízkomulárními inhibitory nebo monoklonálními protilátkami

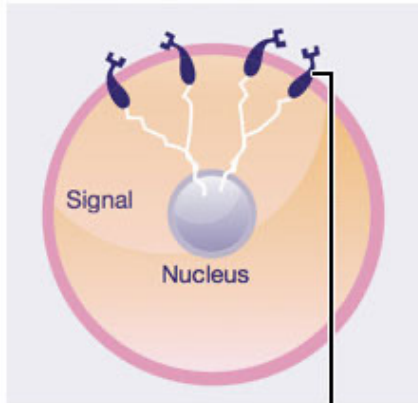


Prediktivní markery

Her2

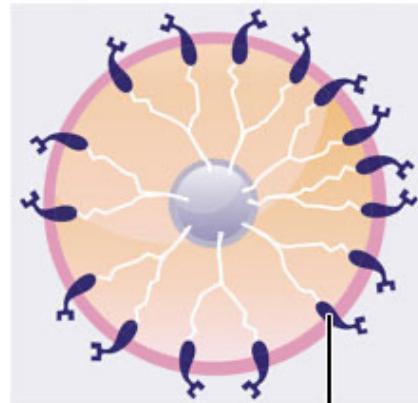
= receptor 2 pro lidský epidermální růstový faktor
transmembránový receptor, který váže růstové signály z okolí buňky

Normal breast cancer cell



Normal amount of HER2 receptors send signals telling cells to grow and divide.¹

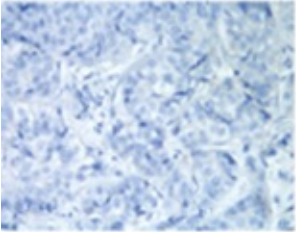
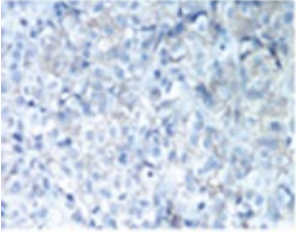
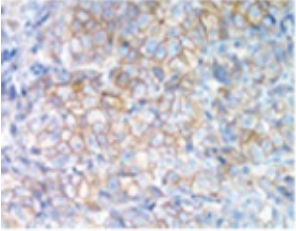
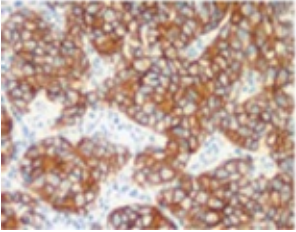
Abnormal HER2+ breast cancer cell



Too many HER2 receptors send more signals, causing cells to grow too quickly.¹

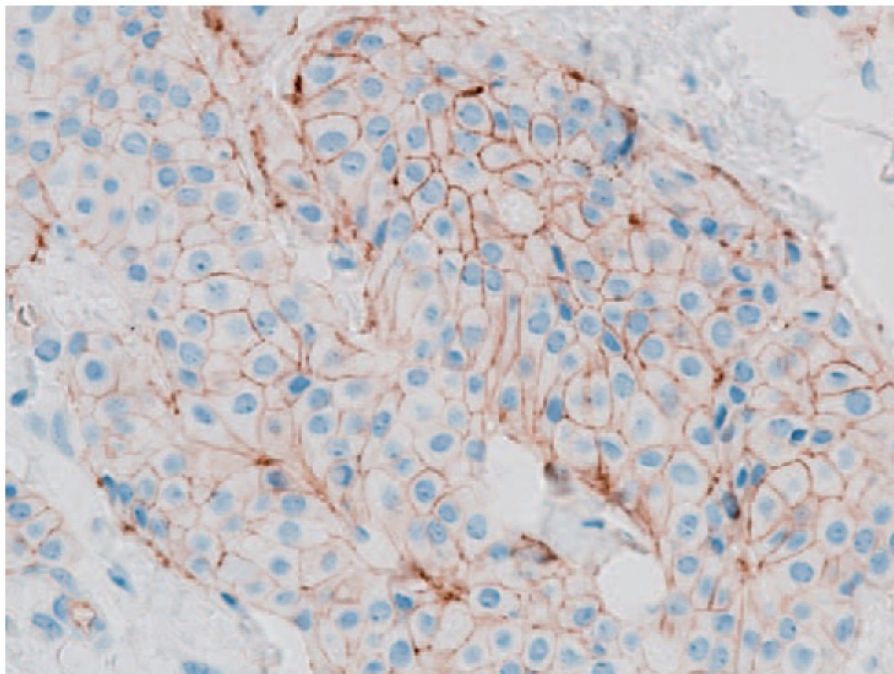
Význam u karcinomu prsu,
karcinomu žaludku.

Stanovení exprese proteinu Her2
(a následná analýza genu *ERBB2*)

Score	Staining pattern	Assessment
	0 No staining is observed or staining is observed in <10% of tumour cells	Negative
	1+ A faint/barely perceptible membrane staining is detected in >10% of the tumour cells; the cells are only stained in part of their membrane	Negative
	2+ A weak or moderate complete membrane staining is observed in >10% of the tumour cells	Equivocal*
	3+ A strong complete membrane staining is observed in >10% of the tumour cells	Positive

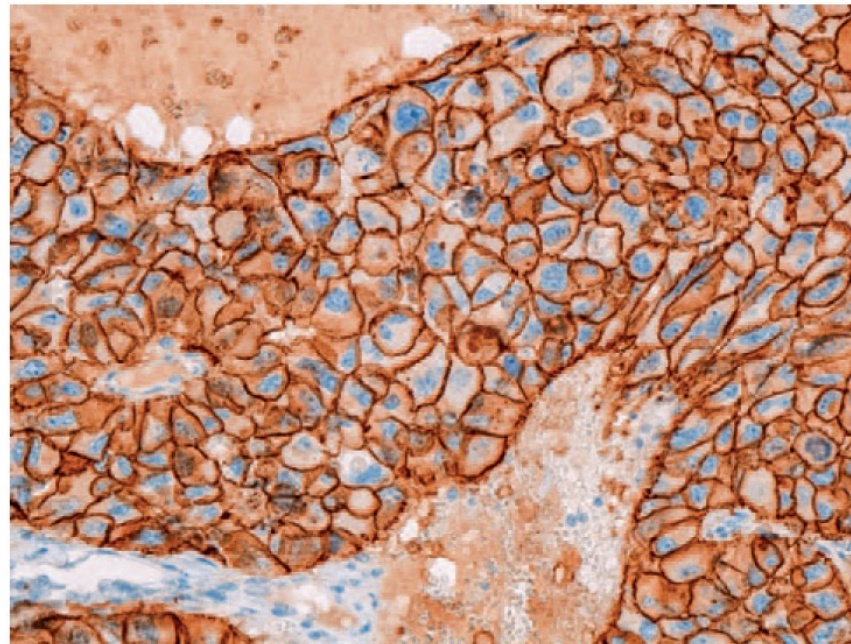
HER2

HER2 imunohistochemické skóre 2+ - detail slabé kompletní membránové pozitivity.



2+ ověřit ISH

HER2 imunohistochemické skóre 3+ - silná kompletní membránová pozitivita prakticky všech nádorových buněk.

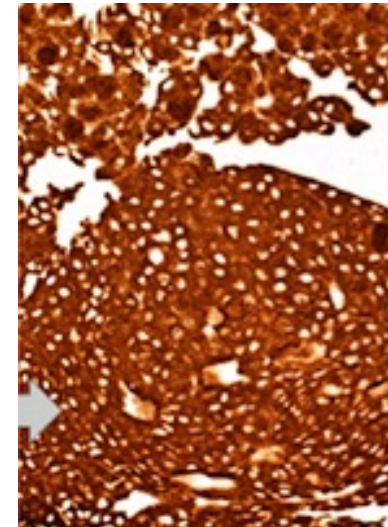


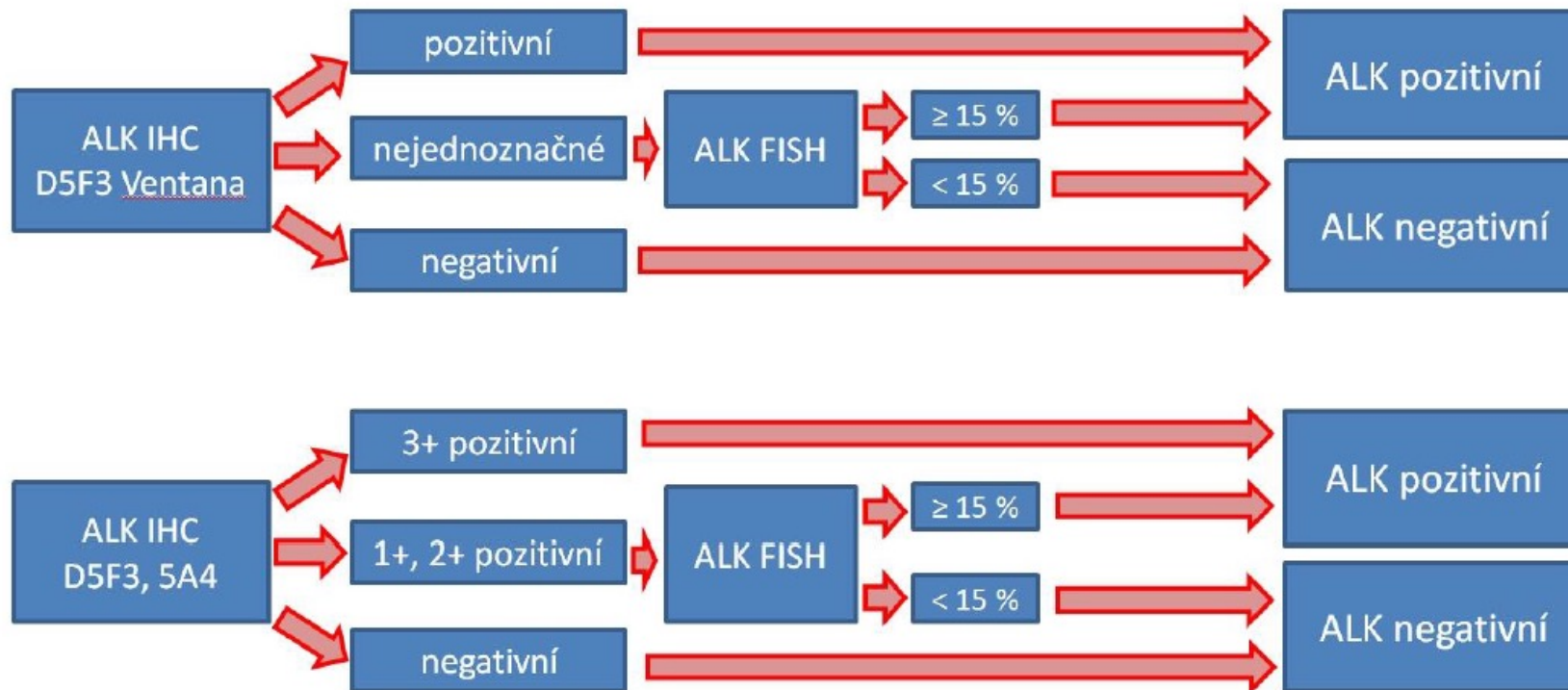
ALK

ALK patří mezi inzulinové receptory
protein má význam při neuronální buněčné diferenciaci a regeneraci, formování
synapsí..

V maligním procesu může dojít ke zlomu v genu ALK a fúzi s jiným partnerem →
zvýšená exprese proteinu

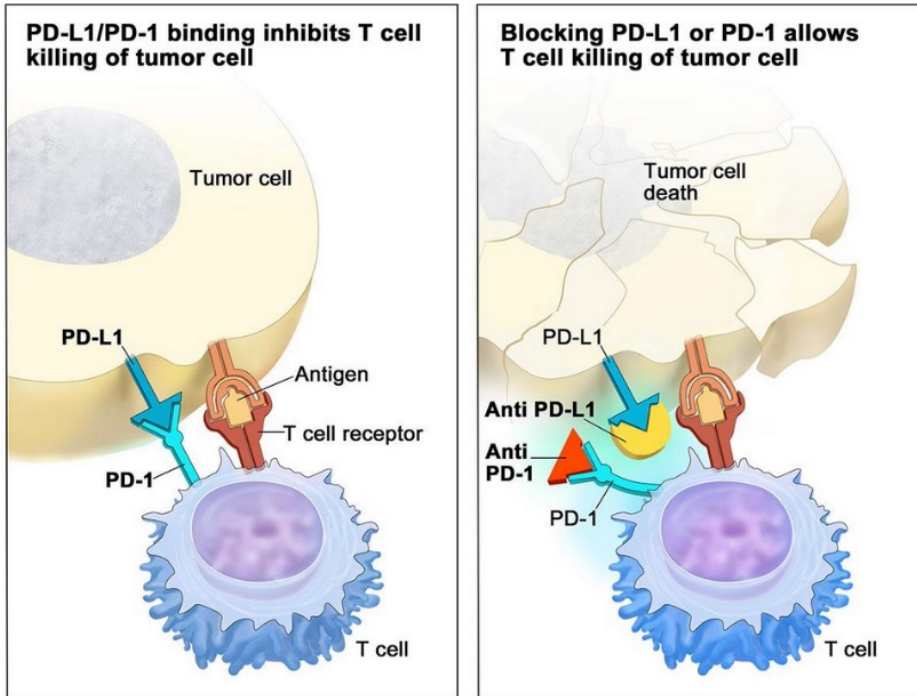
Aberantní exprese proteinu ALK se vyšetřuje
u nemocných s nemalobuněčným
adenokarcinomem plic





V případě pozitivního IHC (a potvrzené aberace genu ALK) → léčba **crizotinibem**

PD-L1 (CD279)



správná fce imunitního systému = souhra mezi inhibičními a stimulačními mechanismy

Inhibiční mechanismy = nepostradatelná složkou imunitního systému

PD-L1 je ligand, který se váže k PD-1 receptoru

PD-L1 hraje roli v inhibici aktivace a proliferace T buněk

Nádorové buňky však mohou inhibiční mechanismy zneužít k úniku před imunitní reakcí a tím podpořit vznik a rozvoj nádorového onemocnění.

Blokádou PD-1/CD279 dochází k utlumení inhibičního signálu –obnovena činnost imunitního systému

Hodnocení PD –L1

Tumor proportion score = procento nádorových buněk s intenzitou $\geq 1+$ ku celkovému počtu viabilních nádorových buněk

TPS < 1% není exprese PD-L1

TPS 1-49% PD-L1 pozitivní

TPS > 50% PD-L1 silně pozitivní

Negative	Low/weak	Medium	High/strong
0-1%	1-5%	5-10%	$\geq 10\%$
0-1%	1-50%		$\geq 50\%$
0-1%	1-5%	5-50%	$\geq 50\%$
0-1%	1-25%		$\geq 25\%$

Hodnocení PD-L1

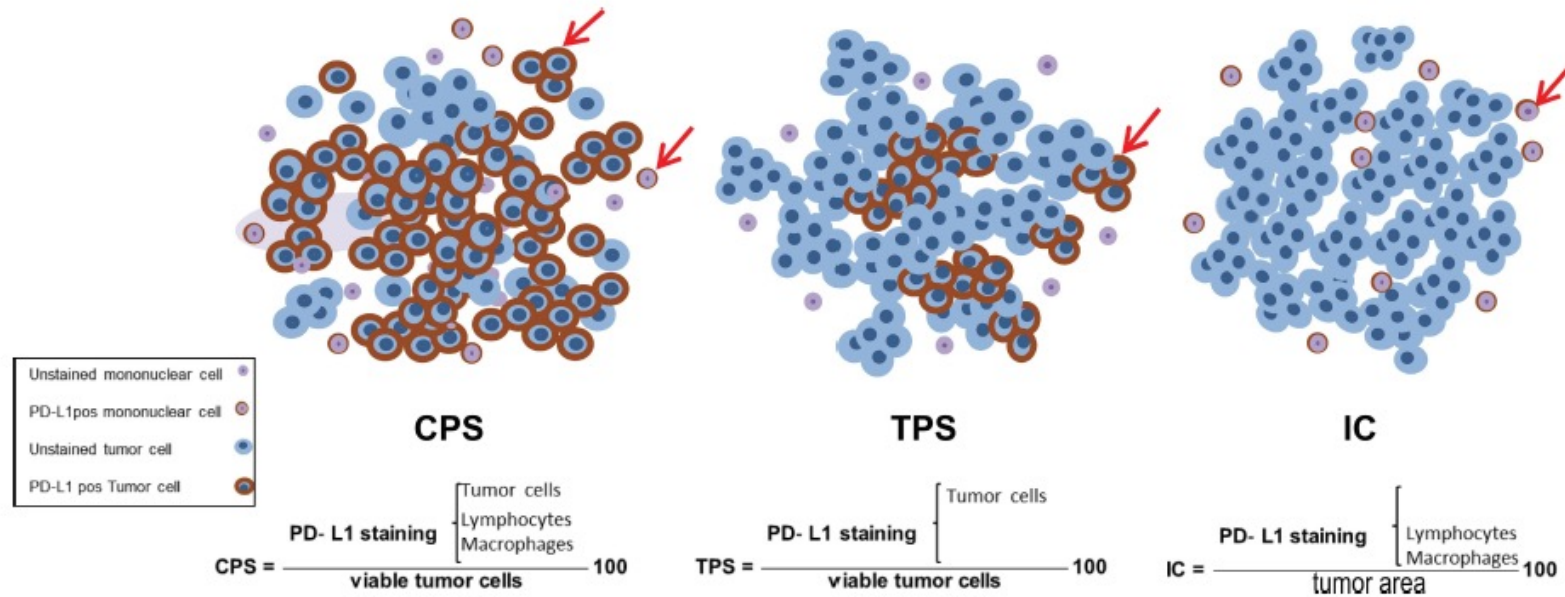


Figure 1 Combined positive score (CPS) of PD-L1 expression defined by (total number of stained tumor cells and immune cells divided by number of all viable tumor cells) $\times 100$; tumor proportion score (TPS) of PD-L1 expression defined by percentage of stained tumor cells; immune cell (IC) PD-L1 expression defined by percentage of stained immune cells. Arrows indicate PD-L1-positive cells accounted for in each scoring criterion's calculations to describe PD-L1 expression. Reprinted from Sajjadi E, Venetis K, Scatena C, Fusco N. Biomarkers for precision immunotherapy in the metastatic setting: hope or reality? *Ecanermedicalscience*. 2020;14. Creative Commons.⁷

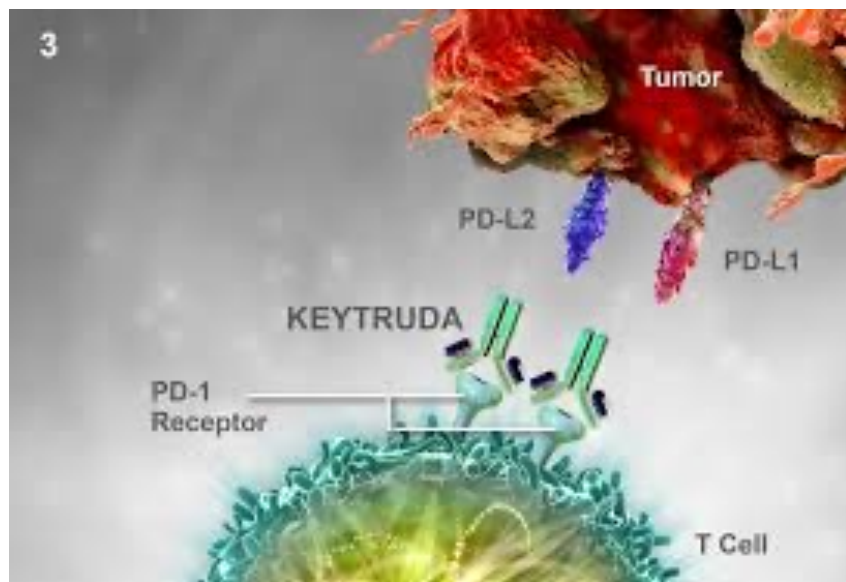
PD-L1

Table 1. Key Anti-PD-L1 Antibodies in Oncology⁴⁻⁸

Anti-PD-L1 Antibody	Company	Cancer Type	PD-L1 Diagnostic Test
Nivolumab	Bristol-Myers Squibb	<ul style="list-style-type: none"> • NSCLC • Melanoma • RCC • Hodgkin lymphoma • HNSCC • UC • Microsatellite instability-high or mismatch repair-deficient CRC • HCC 	PD-L1 IHC 28-8 pharmDx assay
Pembrolizumab	Merck & Co, Inc	<ul style="list-style-type: none"> • Melanoma • NSCLC • HNSCC • Classical Hodgkin lymphoma • UC • MMR (any histology) • Gastric 	PD-L1 IHC 22C3 pharmDx kit
Atezolizumab	Genentech/Roche	<ul style="list-style-type: none"> • NSCLC • UC 	Ventana PD-L1 (SP142) assay
Durvalumab	AstraZeneca	<ul style="list-style-type: none"> • UC • Stage III NSCLC 	Ventana PD-L1 (SP263) assay
Avelumab	EMD Serono/Pfizer	<ul style="list-style-type: none"> • MCC • UC 	NA

CRC indicates colorectal cancer; HCC, hepatocellular carcinoma; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; IHC, immunohistochemistry; MCC, Merkel-cell carcinoma; MMR, mismatch repair deficiency; NA, not applicable; NSCLC, non-small-cell lung cancer; PD-L1, programmed-cell death ligand-1; RCC, renal-cell carcinoma; UC, urothelial carcinoma.

Léčba - protilátky blokující receptor PD-1/PD-L1



Keytruda (pembrolizumab)

melanom, rakovina kůže

nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC), typ rakoviny plic

klasický Hodgkinův lymfom, rakovina bílých krvinek

rakovina močového měchýře a močový trakt

rakovina postihující hlavu a krk známá jako karcinom skvamózních buněk hlavy a krku (HNSCC)

Využití ve specifických indikacích

Léčba - protilátky blokující receptor PD-1/PD-L1

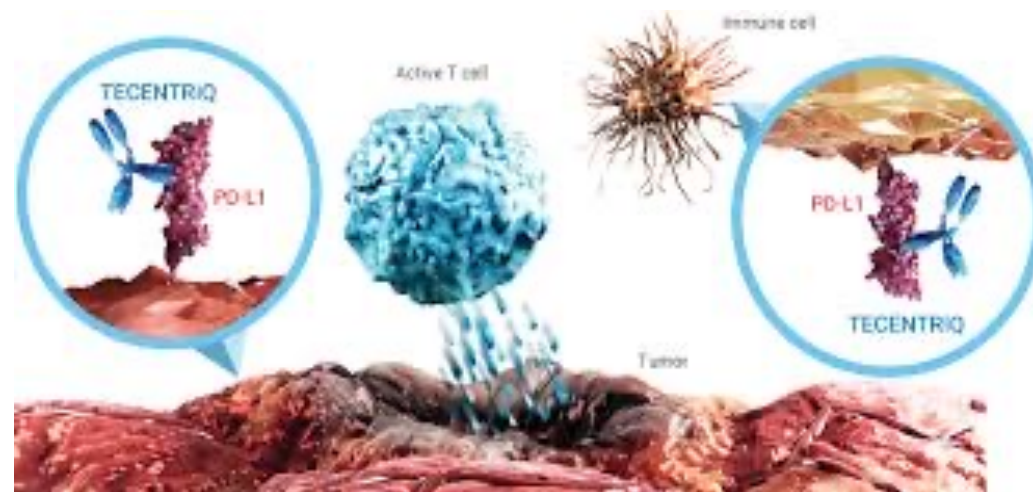
Tecentriq (atezolizumab)

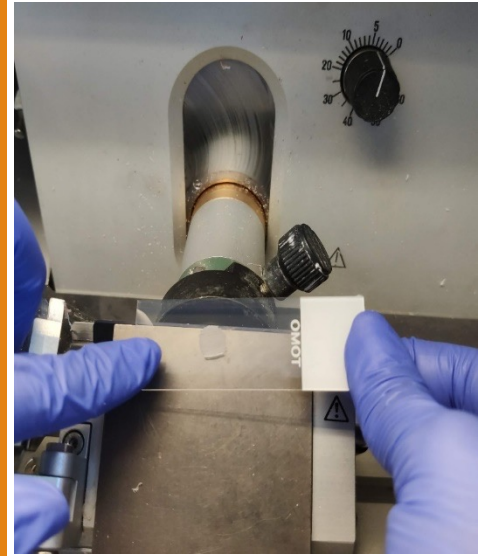
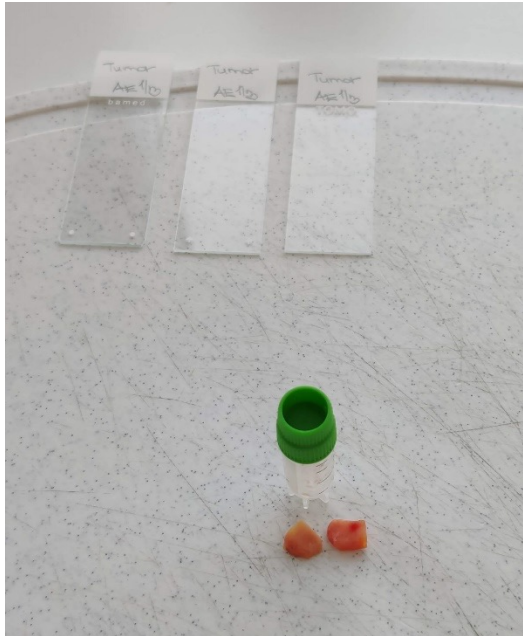
Tecentriq je lék proti rakovině pro léčbu urotheliálního karcinomu (rakovina močového měchýře a močového systému) a typu rakoviny plic nazývaného nemalobuněčný karcinom plic.

Přípravek Tecentriq se používá, pokud jsou tyto rakoviny pokročilé nebo se rozšířily do jiných částí těla.

U urotheliálního karcinomu je léčivý přípravek určen pro pacienty, kteří před zahájením chemoterapie s platinou vyzkoušeli léčbu cisplatinou nebo jsou pro ni neakceptováni.

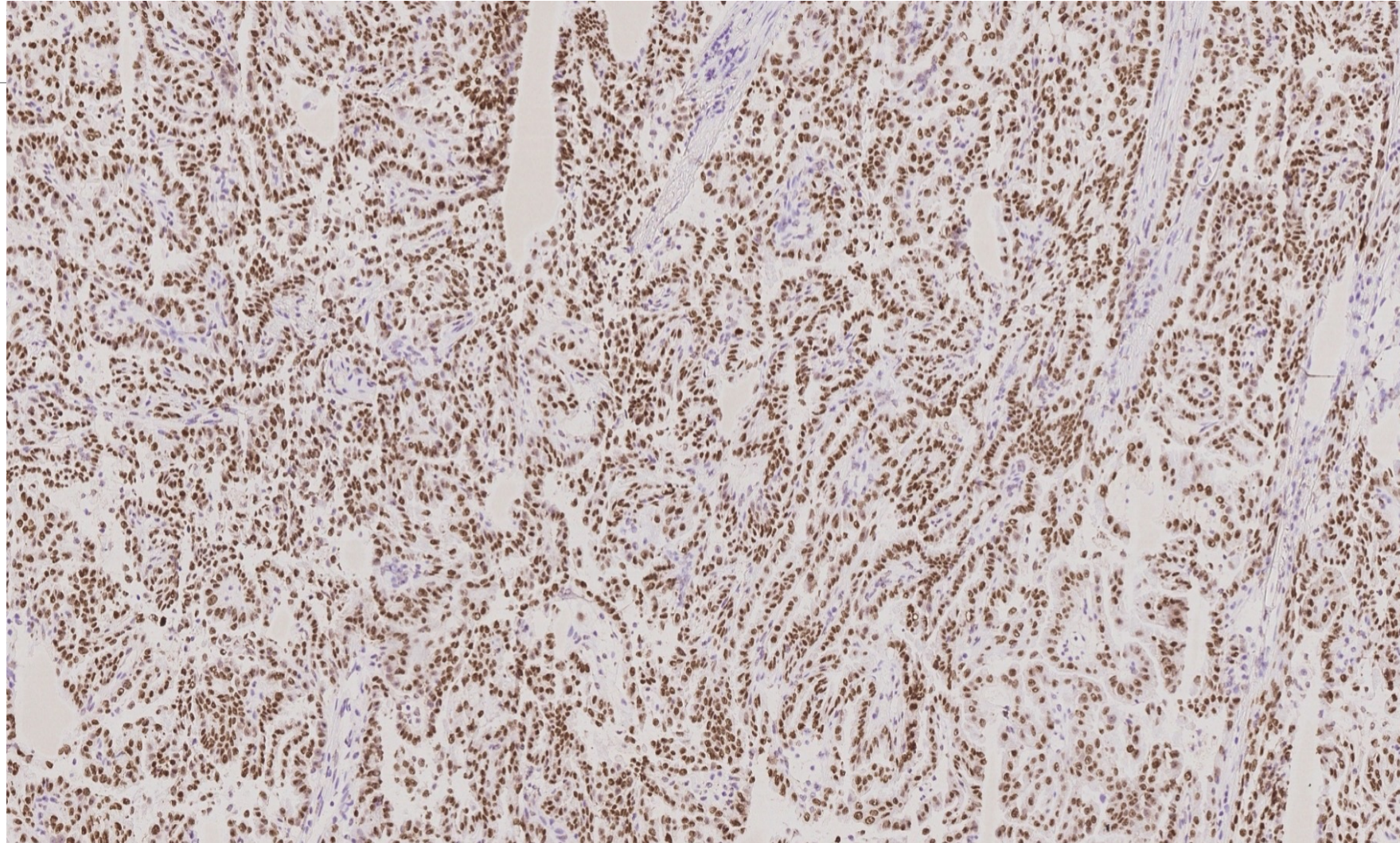
Pacienti s nemalobuněčným karcinomem plic by měli mít nejprve chemoterapii a pacienti s určitými genetickými mutacemi (změnami), kteří reagují na cílené léčby, by měli mít tuto léčbu před podáním přípravku Tecentriq.



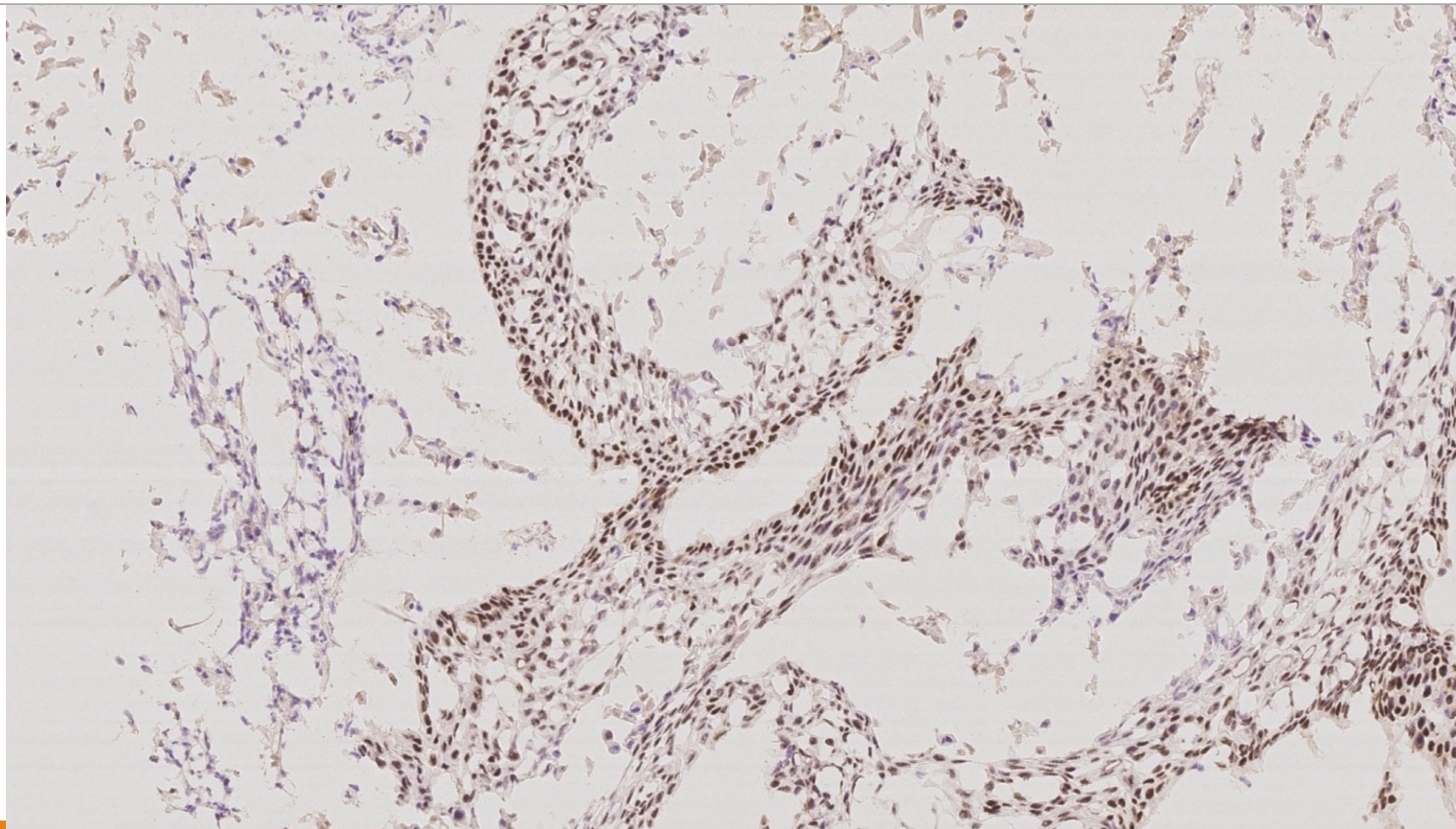


Kryo - IHC

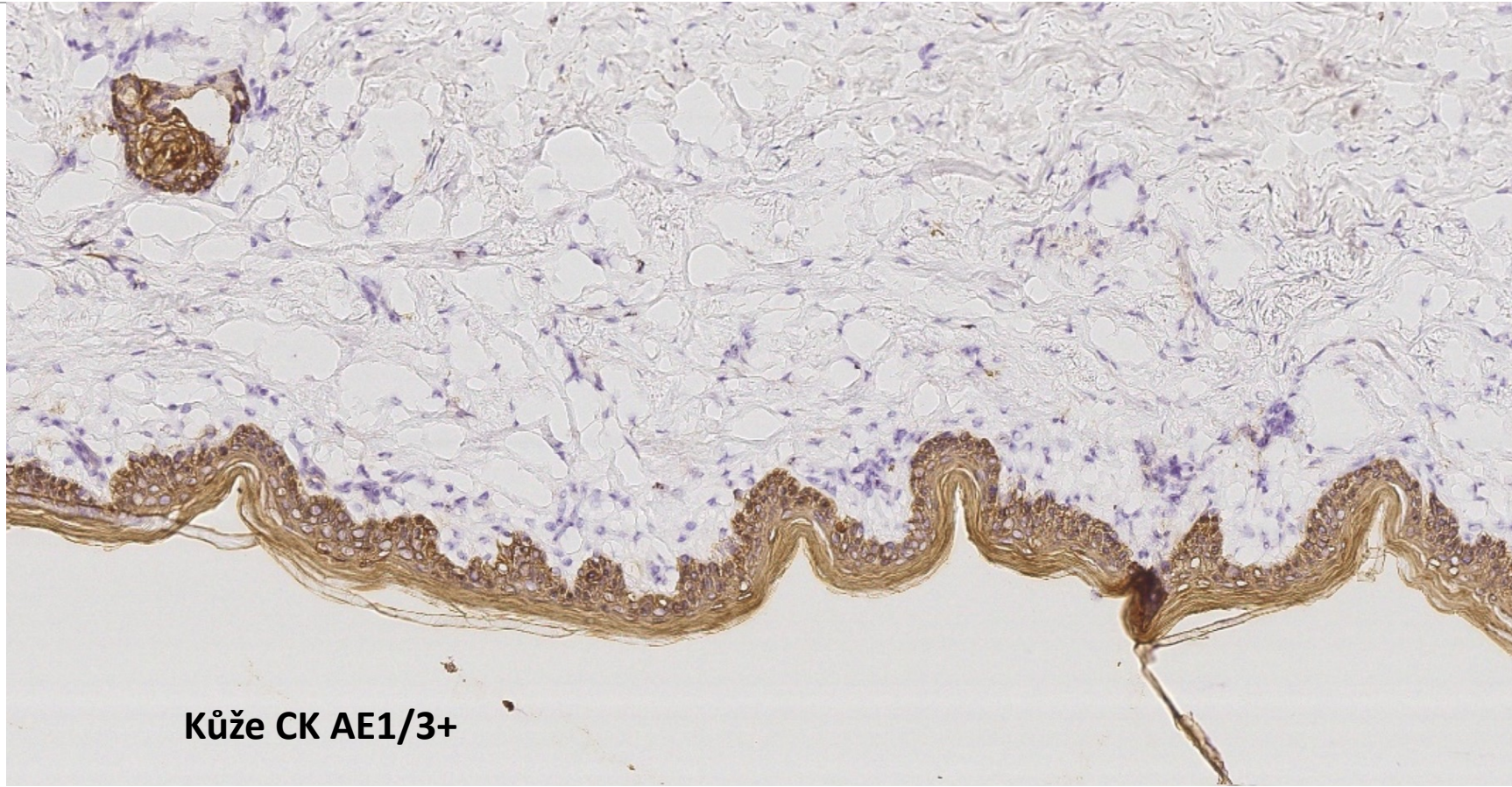
Adenokarcinom TTF-1+



Skvamózní karcinom p63+

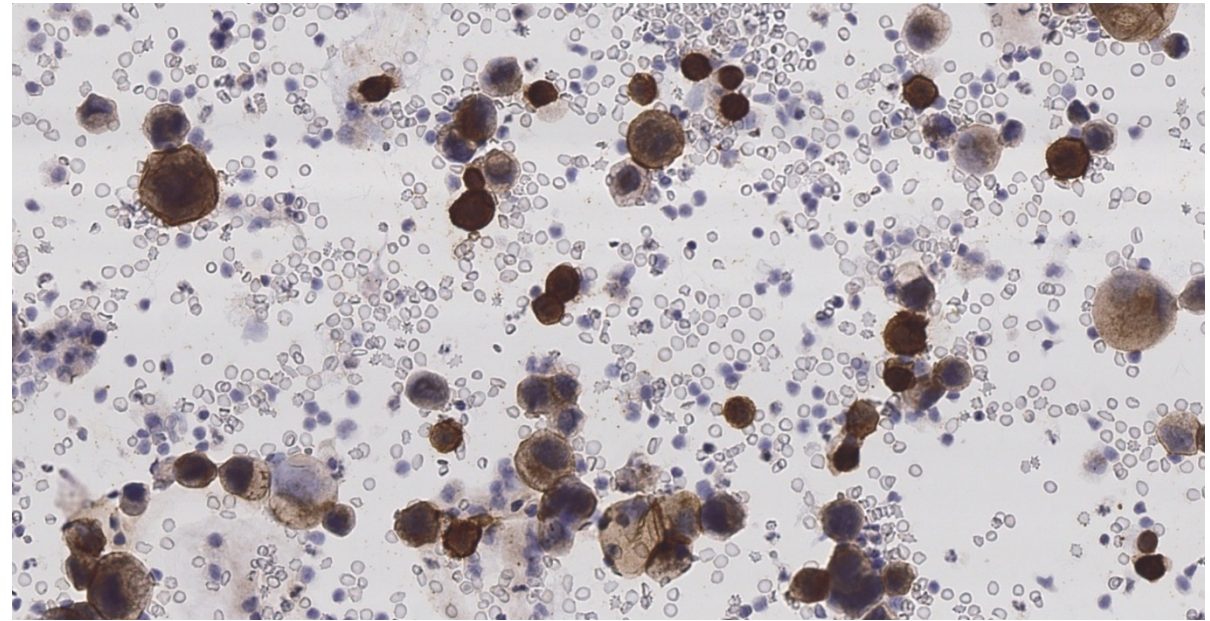
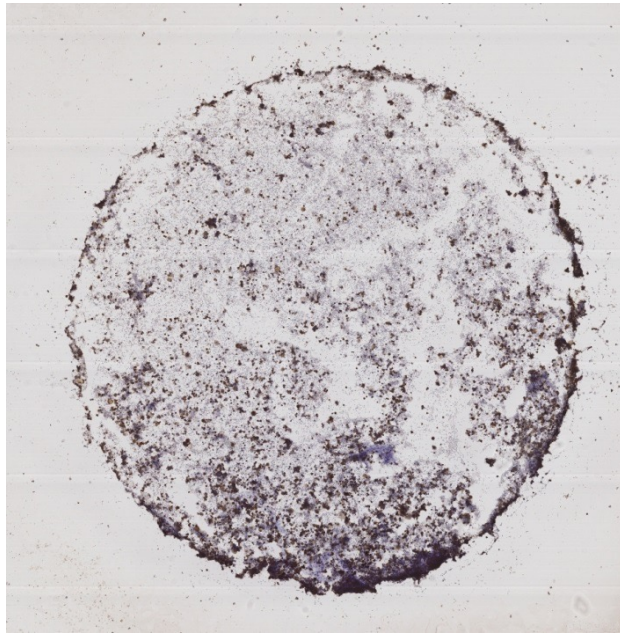


CK AE 1/3

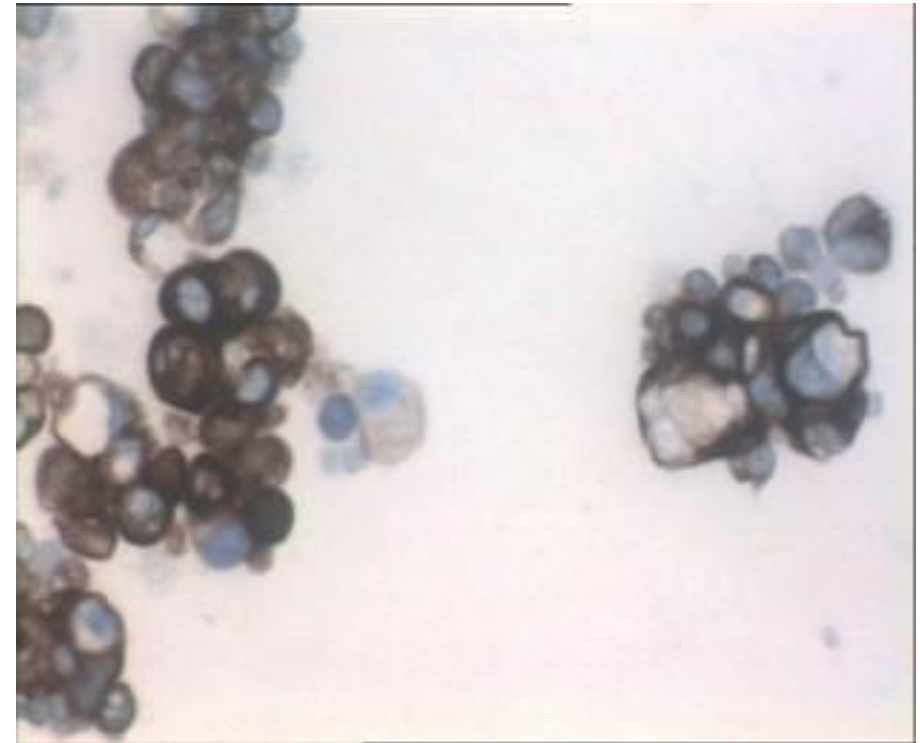
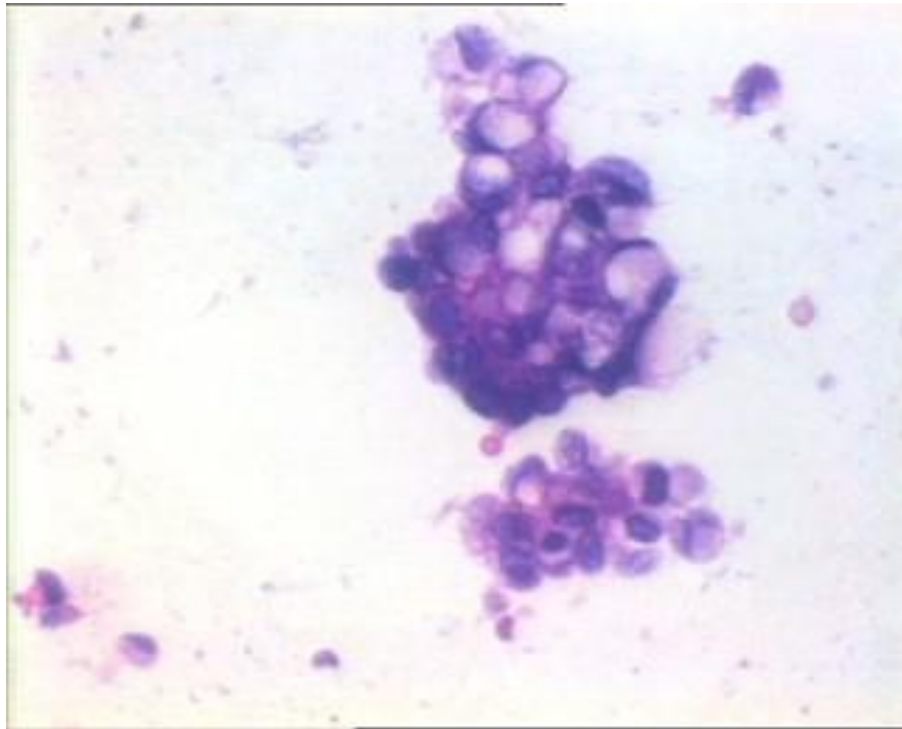


Kůže CK AE1/3+

Cytospin CA125



Cytoblok barvení: HE, IHC



Závěr

speciální laboratorní metoda

detekce jednotlivých tkáňových antigenů pomocí specifických primárních protilátek.

vazba znázorněna barevným produktem

účel diagnostickým (vyhledávání a znázorňování antigenů specifických pro určité typy buněk a tkání)

prognostickým

indikace k cílené léčbě

