

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

Využití imunohistochemie při průkazu krevních skupinových vlastností tkání v soudně lékařské praxi

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Hradec Králové, 2024

MVDr. Jitka Odvářková

Poděkování

Děkuji vedoucí bakalářské práce RNDr. Ivaně Němečkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování mé práce. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Janu Rejthárkovi z Oddělení soudního lékařství Pardubické nemocnice za odborné rady a poskytnuté materiály. Děkuji Mgr. Petru Joštovi, Ph.D. za podnětné nápady při psaní mé práce. Především děkuji své rodině za neutuchající podporu v průběhu celého studia.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal(a), jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Jitka Odvárková

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
1. ÚVOD	8
2. CÍL PRÁCE	9
3. ZÁKLADNÍ IMUNOHEMATOLOGICKÉ POJMY	10
3.1 ANTIGENY	10
3.2 PROTILÁTKY	10
3.3 REAKCE ANTIGEN – PROTILÁTKA	12
4. KREVNÍ SYSTÉM AB0	14
4.1 HISTORIE KREVNÍHO SYSTÉMU AB0	14
4.2 BIOCHEMICKÁ PODSTATA SYSTÉMU AB0	14
4.3 DĚDIČNOST	16
4.4 ZASTOUPENÍ KREVNÍCH SKUPIN V POPULACI.....	17
4.5 LOKALIZACE TKÁNÍ A BUNĚK EXPRIMUJÍCÍ ABH ANTIGENY.....	18
5. IMUNOHISTOCHEMIE	21
5.1 HISTORIE IMUNOHISTOCHEMIE	21
5.2 PRINCIP A POPIS METODY	21
5.2.1 <i>Protilátky v imunohistochemii</i>	22
5.2.2 <i>Metody průkazu</i>	22
5.2.2.1 Přímé metody průkazu.....	22
5.2.2.2 Nepřímé metody průkazu	22
5.3 IMUNOHISTOCHEMICKÝ PROTOKOL.....	24
5.3.1 <i>Odběr materiálu</i>	24
5.3.2 <i>Fixace tkání</i>	24
5.3.3 <i>Odvodnění, projasnění, prosycení a zalití vzorku</i>	25
5.3.4 <i>Krájení parafinového bločku</i>	25
5.3.5 <i>Zavodnění tkáně a odmaskování antigenu</i>	26
5.3.6 <i>Blokace endogenní aktivity pozadí</i>	27
5.3.7 <i>Blokace pozadí</i>	28
5.3.8 <i>Vazba protilátek</i>	28
5.3.9 <i>Vizualizace komplexu antigen – protilátka</i>	28
5.3.9.1 Imunofluorescenční metoda	28
5.3.9.2 Imunoenzymová metoda	29
5.3.10 <i>Dobarvení pozadí</i>	30
5.3.11 <i>Odvodnění, projasnění a montování řezů</i>	30
5.3.12 <i>Kontrola správnosti provedené metody</i>	30
6. VYUŽITÍ METODY V PRAXI	31
6.1 INKOMPATIBILNÍ DÁRCOVSTVÍ KRVE	32
6.1.1 <i>Potransfúzní reakce</i>	32

6.1.2	<i>Histologie ledviny</i>	33
6.1.3	<i>Imunohistochemický průkaz krevní skupiny v ledvině</i>	34
6.2	KOSTERNÍ A SRDEČNÍ SVAL	35
6.2.1	<i>Histologie kosterní a srdeční svaloviny</i>	35
6.2.2	<i>Imunohistochemický průkaz krevní skupiny ve svalovině</i>	36
6.3	PLACENTA	37
6.3.1	<i>Histologie placenty</i>	37
6.3.2	<i>Imunohistochemický průkaz krevní skupiny v placentě</i>	38
6.4	VLASY	39
6.4.1	<i>Histologie vlasu</i>	39
6.4.2	<i>Imunohistochemický průkaz krevní skupiny z vlasu</i>	40
6.5	SEKRETY	42
6.5.1	<i>Imunohistochemický průkaz krevních skupin v sekretech</i>	42
7.	DALŠÍ MOŽNOSTI URČENÍ KREVNÍ SKUPINY	43
7.1	SÉROLOGICKÉ METODY	43
7.1.1	<i>Skličková metoda</i>	43
7.1.2	<i>Zkumavková metoda</i>	44
7.1.3	<i>Absorpčně-inhibiční metoda (vysycovací metoda dle Therkelsena)</i>	45
7.1.4	<i>Absorpčně-eluční metoda (Nicholls Pereira)</i>	45
7.2	MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY	46
8.	ZÁVĚR	48
9.	POUŽITÉ ZKRATKY	49
10.	SEZNAM OBRÁZKŮ	50
11.	SEZNAM TABULEK	51
12.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	52

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra: Katedra biologických a lékařských věd

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor: MVDr. Jitka Odvářková

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Název práce: Využití imunohistochemie při průkazu krevních skupinových vlastností tkání v soudně lékařské praxi

Bakalářská práce popisuje imunohistochemii jako jednu z metod, kterou se v soudním lékařství dají prokázat krevní skupinové vlastnosti systému AB0 ve tkáních. Antigeny krevního skupinového systému AB0 nejsou přítomny pouze na povrchu erytrocytů, ale jsou exprimovány i v celé řadě tkání. Krevní skupina systému AB0 je geneticky determinovaný fenotyp, který je relativně stabilní a může poskytnout důležité informace o identitě zesnulé osoby, posouzení rodičovství či vyšetřování v souvislosti s trestnými činy.

V soudně lékařské praxi existují další způsoby určení krevních skupin založené na sérologické diagnostice či analýze DNA. Imunohistochemie má mezi těmito metodami své nesporné opodstatnění. Určení krevní skupiny v soudně lékařské praxi je specifické v rozmanitosti a stáří biologického materiálu, který podléhá posmrtným změnám a vnějším vlivům okolí.

Klíčová slova: imunohistochemie, soudní lékařství, krev, krevní skupiny

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department: Department of Biological and Medical Sciences

Study program: Laboratory diagnostics in healthcare

Author: MVDr. Jitka Odvárková

Supervisor: RNDr. Ivana Němečková, Ph.D.

Title of Thesis: Immunohistochemical detection of blood group characteristics of tissues in forensic medical practice

The bachelor's thesis describes immunohistochemistry as one of the methods used in forensic medicine to demonstrate the blood group properties of the ABO system in tissues. Antigens of the ABO blood group system are not only present on the surface of erythrocytes but are also expressed in a variety of tissues. The ABO blood group is a genetically determined phenotype that is relatively stable and can provide important information about the identity of a deceased person, parentage assessment, or investigation related to criminal activities.

In forensic medical practice, there are other methods of determining blood groups based on serological diagnostics or DNA analysis. Immunohistochemistry has its unquestionable justification among these methods. Determining the blood group in forensic medical practice is specific due to the diversity and age of the biological material, which undergoes postmortem changes and is subjected to external environmental influences.

Key words: Immunohistochemistry, forensic medicine, blood, blood groups

1. ÚVOD

Imunohistochemie je založena na detekci tkáňového antigenu pomocí specifických protilátek. V případě interakce antigen – protilátka dochází k vizualizaci prostřednictvím barevného produktu. Imunohistochemie má své nenahraditelné místo především při histopatologické diagnostice nádorů tkání. V soudně lékařské praxi je metoda využívána k diagnostice časných fází hypoxických a ischemických změn myokardu, difúzního axonálního poškození, náhlé smrti kojenců (SIDS), průkazu krevních skupinových vlastností nebo rhabdomyolýzy a s tím spojeného Crush syndromu.

Práce popisuje využití imunohistochemie při určení krevních skupinových vlastností v soudně lékařské praxi. Metoda je využívána pro průkaz krevních skupinových vlastností AB0 ve tkáních. Antigeny krevního skupinového systému AB0 jsou lokalizovány nejen na povrchu červených krvinek, ale jsou exprimovány ve velké části tkání a sekretů. V praxi je metoda využívána k identifikaci krevní skupiny u zemřelých v pokročilém stádiu rozkladu, u případů úmrtí s podezřením na inkompatibilní podání krevní transfúze či určení krevní skupiny matky a plodu z placenty. Popisovanou metodu jsem měla možnost si osobně vyzkoušet v průběhu studijní praxe na Oddělení soudního lékařství Pardubické nemocnice.

2. CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je poskytnout ucelený přehled o využití imunohistochemie v soudně lékařské praxi pro průkaz krevní skupiny AB0 ze tkání. Práce podrobně popisuje postup zpracování tkáně a také představuje další laboratorní metody využívané v soudně lékařské praxi k určení krevní skupiny.

3. ZÁKLADNÍ IMUNOHEMATOLOGICKÉ POJMY

3.1 *Antigeny*

Antigen je organická molekula schopná vyvolat imunitní odpověď v organismu. Ten reaguje tvorbou protilátky a její vazbou na antigen (Fábryová 2012). Pro vyvolání imunitní odpovědi je nutné, aby byl antigen dostatečně velký. Nekompletní antigen (hapten) je schopný specificky reagovat s již vytvořenými protilátkami, ale není schopen indukovat jejich tvorbu. Každý antigen má jednu či více specifických oblastí nazývaných epitopy či antigenní determinanty, se kterými protilátka reaguje (Fábryová 2012). Antigenní determinanta je utvářena za sebou jdoucími 5 – 8 aminokyselinami nebo monosacharidovými jednotkami (Jílek 2019).

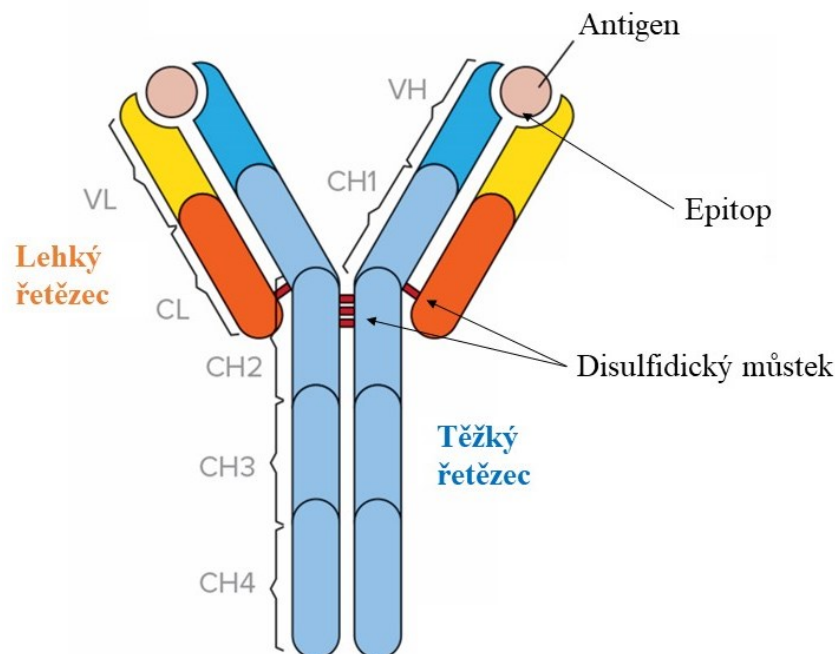
3.2 *Protilátky*

Protilátky (imunoglobuliny) jsou specifické glykoproteiny, které vznikají jako odpověď organismu na imunogen. Mají schopnost reagovat s antigenem, váží se na jeho specifický epitop na základě vzájemné komplementarity („zámek a klíč“) v místě variabilní domény (Penka a Tesařová 2012).

Imunoglobuliny jsou složeny ze dvou lehkých (L) a dvou těžkých (H) řetězců, navzájem spojených disulfidickými vazbami (**Obrázek 1**). U lehkých řetězců rozlišujeme κ (kappa) nebo λ (lambda). Na lehkých i těžkých řetězcích popisujeme fragmenty vázající antigen (*Fab*) a krystalizovaný fragment (*Fc*). Uprostřed je pantová část, která je značně flexibilní a umožňuje v malém rozsahu pohyb *Fab* částí. (Penka a Tesařová 2012).

Na molekule protilátky můžeme rozlišit konstantní a variabilní doménu. Konstantní doména vytváří pro protilátku typický tvar Y. Variabilní doména nasedá na konstantní doménu. Je zodpovědná za specifický účinek protilátky, protože funguje jako vazebné místo pro epitop antigenu. Na molekule protilátky jsou vytvořeny dvě vazebná místa pro vazbu antigenu (Kittnar 2020).

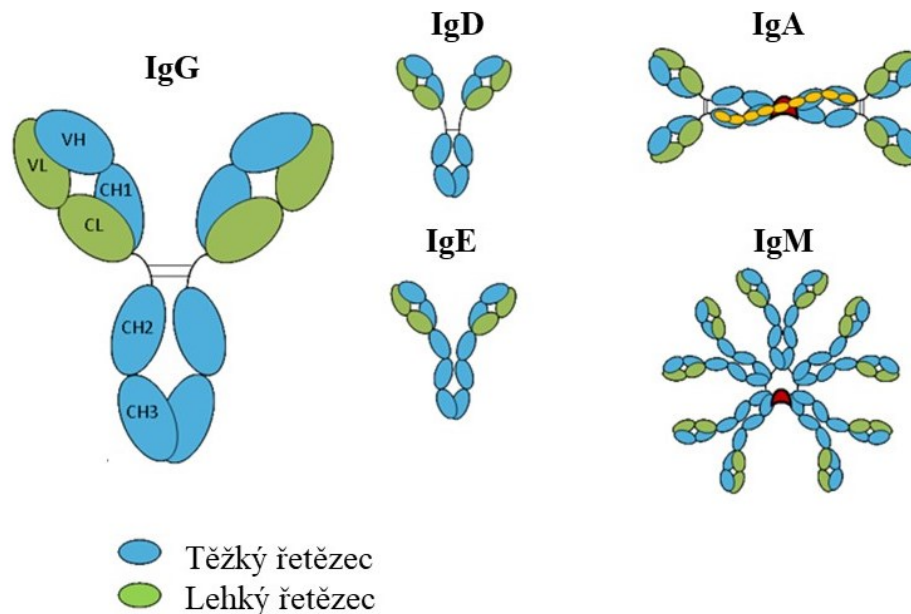
Imunoglobuliny jsou děleny dle tříd H-řetězců v konstantní oblasti do pěti imunoglobulinových izotopů IgG (γ řetězce), IgM (μ řetězce), IgA (α řetězce), IgD (δ řetězce) a IgE (ϵ řetězce) (**Obrázek 2**). V imunohematologii hrají významnou roli IgG a IgM protilátky (Penka a Tesařová 2012).



Obrázek 1: Základní struktura imunoglobulinu (zdroj: Šušolíková 2016, upraveno)
 (VL – variabilní část lehkého řetězce, CL – konstantní část lehkého řetězce,
 CH 1–4 – konstantní část těžkého řetězce, VH – variabilní část těžkého řetězce)

IgM protilátka je největší imunoglobulinová molekula uspořádaná do tvaru pentameru (pět imunoglobulinových jednotek). IgM protilátky jsou zodpovědné za primární imunitní odpověď organismu. Vazbou na komplement spustí jeho aktivaci, která vede k hemolýze. Protilátky neprocházejí placentární bariérou. Stejně jako IgG má schopnost vázat se na buňky pomocí *Fc* receptoru. Tyto protilátky snadno aglutinují (Penka a Tesařová 2012; Kittnar 2020).

IgG protilátky jsou monomerní imunoglobuliny. V krvi mají největší početní zastoupení. Mají schopnost procházet přes placentární bariéru do fetálního krevního oběhu. Jsou zodpovědné za sekundární imunitní odpověď v organismu. Mezi jejich funkce patří aktivace komplementu, který může způsobit hemolýzu erytrocytů. Obecně jsou ale IgG považovány za málo lytické, protože komplement je aktivován dvěma molekulami IgG, aby mohlo dojít k vazbě C1q složky komplementu na *Fc* fragment protilátky. Další funkcí IgG protilátek je schopnost vyvolat opsonizaci či aktivace NK – buněk (Penka a Tesařová 2012; Kittnar 2020).



Obrázek 2: Izotypy imunoglobulinů - tvar jednotlivých izotypů včetně počtu lehkých a těžkých řetězců (zdroj: Ferrari a Patrizio 2021, upraveno)

(VL – variabilní část lehkého řetězce, CL – konstantní část lehkého řetězce, CH 1–3 – konstantní část těžkého řetězce, VH – variabilní část těžkého řetězce)

3.3 Reakce antigen – protilátka

Vazba antigenu a protilátky je chemickou reakcí glykoproteinové molekuly protilátky (*Fab* zakončení monomerů IgG, pentamerů IgM a vzácně dimerů IgA) s epitopem antigenu (Řeháček a Masopust 2013). Protilátky se na antigen váží nekovalentně, tedy slabou reverzibilní vazbou. Síla vazby mezi epitopem antigenu a vazebným místem protilátky je nazývána afinita. Síla vazby antigenu s více epitopy a multivalentními protilátkami nazýváme avidita (Penka a Tesařová 2012).

Na vazbu má zásadní vliv teplota, iontová síla prostředí, pH, kvalitativní a kvantitativní vlastnosti antigenů a protilátek (Masopust a Písačka 2022).

Teplota: Teplotní optimum pro tvorbu vazby antigen-protilátka je 37 °C. Velké zvýšení teploty může mít za následek zvýšenou disociaci komplexu antigen – protilátka. Tohoto jevu se využívá například u absorpčně-eluční metody. Polární (vodíkové) vazby jsou exotermické a odolné za nízkých teplot. Nepochární molekuly vytváří hydrofobní vazbu dehydratací obvykle s proteinovým antigenem (Daniels a Bromilow 2007; Masopust a Písačka 2022).

Iontová síla prostředí: Úpravou iontové síly v prostředí můžeme urychlit interakci mezi antigenem a protilátkou. V hypertonickém prostředí dochází k pomalejší interakci antigen – protilátka. Jev je způsoben shlukováním iontů kolem antigenů a protilátek a neutralizací jejich opačně nabitých nábojů na molekulách. Použitím hypotonického roztoku reakci urychlíme (Daniels a Bromilow 2007; Masopust a Písačka 2022).

pH: Neoptimálnější pH pro vazbu antigenu s protilátkou je kolem 7. Erythrocyty mají při této hodnotě pH mírně negativní náboj, který dobře interaguje s pozitivním nábojem protilátek. Při nízkém pH dochází k disociaci vazby a výsledek reakce může být falešně negativní (Daniels a Bromilow 2007; Masopust a Písačka 2022).

Kvalitativní a kvantitativní vlastnosti antigenů a protilátek: Tvorba vazby je závislá na hustotě exprese antigenu na membráně erythrocytu a koncentraci protilátky. Vliv hraje i vzdálenost protilátky od antigenu a blokace povrchu erythrocytu jinými strukturami. Při rutinních vyšetřeních se používá obvykle nadbytek protilátky, optimálně 40:1 (plazma/sérum : erythrocyty) (Daniels a Bromilow 2007; Masopust a Písačka 2022).

4. KREVNÍ SYSTÉM AB0

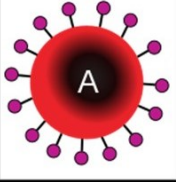
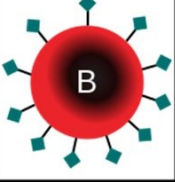
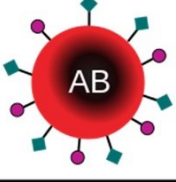
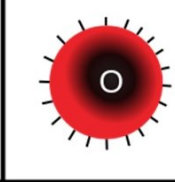
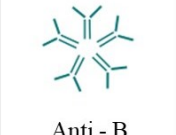

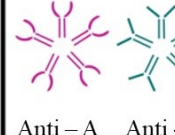
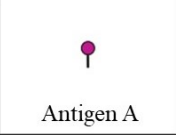


4.1 Historie krevního systému AB0

Základy pro dnešní moderní imunohematologii se datují do roku 1901, kdy rakouský lékař a biolog Karl Landsteiner zavedl systém tří krevních skupin A, B, C. Později byly tyto krevní skupiny upraveny na A, B a 0 (Penka a Tesařová 2012). Poprvé popsal přítomnost antigenů na membráně erytrocytů a protilátek v plazmě. Všiml si, že každý jedinec má v krvi protilátky, které neinteragují s antigeny vlastních erytrocytů. V opačném případě dochází k reakci antigen-protilátka, projevující se jako hemaglutinace (Chottová-Dvořáková a Mistrová 2018). V roce 1907 popsal český psychiatr Jan Jánský existenci čtyř krevních skupin, které později označil jako A, B, AB a 0. Roku 1924 vysvětlil J. Bernstein dědičnost krevních skupin v systému AB0 svým „modelem tří alel“, čímž položil základy dnešní imunogenetiky (Fábryová 2012; Dean 2005). V 50. a 60. letech 20. století byla popsána biochemická podstata a biosyntéza struktur AB0 antigenů. V 80. letech 20. století započal rozvoj prvních molekulárně genetických metod, díky kterým byly objeveny a popsány struktury většiny antigenů ostatních krevních skupinových systémů (Daniels 1999).

4.2 Biochemická podstata systému AB0

Označení krevních skupin se odvíjí od přítomnosti antigenu nazývaného aglutinogen na povrchu erytrocytů (**Obrázek 3**). Systém AB0 rozlišuje tři antigeny (A, B, H) tzv. **aglutinogeny**. Podle jejich výskytu na membráně erytrocytů popisujeme čtyři krevní skupiny – A, B, AB a 0 (Chottová-Dvořáková a Mistrová 2018). Jedinec s antigeny A na povrchu erytrocytů je nositelem krevní skupiny A, jedinec s antigeny B je nositel krevní skupiny B. Jedinec s antigeny A i B má krevní skupinu AB. Erytrocyty krevní skupiny 0 mají na svém povrchu antigen H, jež je ve své podstatě prekurzorem antigenů A a B (Kittnar 2020). Syntéza antigenů AB0 probíhá převážně na prekurzorech erytrocytů v hematopoetické tkáni. Pouze 1 % antigenů přichycených na erytrocyty pochází z plazmy (Penka a Tesařová 2012). V plazmě jsou přítomny dva druhy protilátek tzv. **aglutininy** anti-A nebo anti-B. Vzájemné vztahy mezi aglutinogenem a aglutininem popisuje Landsteinerovo pravidlo: „Je-li na membráně červené krvinky přítomen aglutinogen určitého typu, k němu korespondující aglutinin v plazmě chybí a dále

chybí- li na membráně červené krvinky některý z aglutinogenů, je k němu korespondující aglutinin v plazmě přítomen“ (Kittnar 2020).

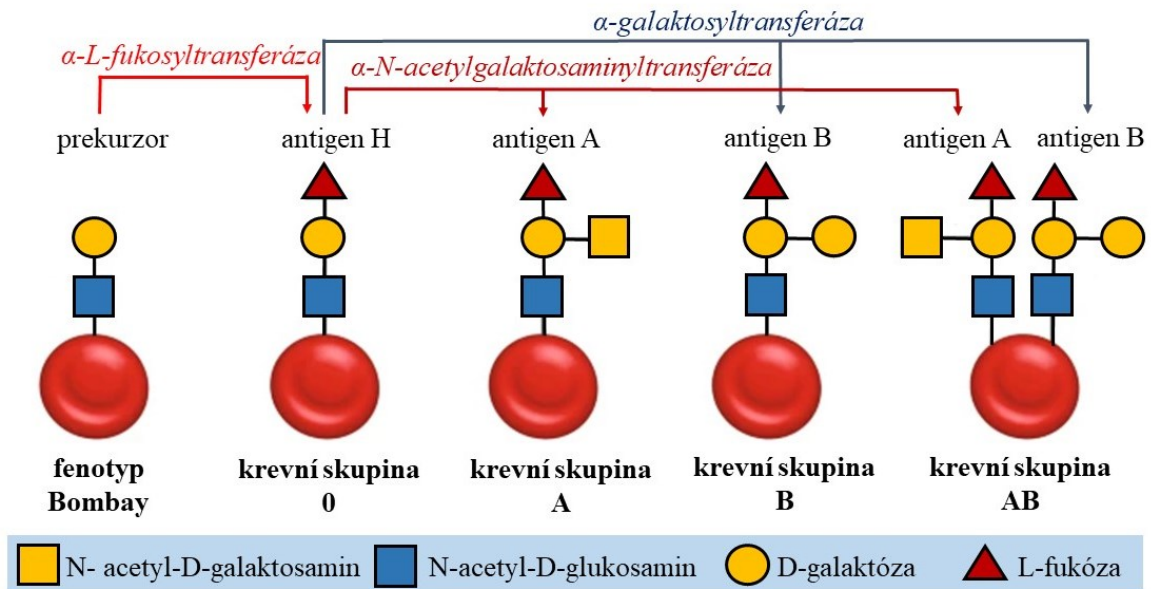
	Krevní skupina A	Krevní skupina B	Krevní skupina AB	Krevní skupina 0
Erytrocyt				
Protilátky (aglutininy) v plazmě	 Anti - B	 Anti - A	žádné	 Anti - A Anti - B
Antigeny (aglutinogeny) na povrchu erytrocytů	 Antigen A	 Antigen B	 Antigen A a B	žádné

Obrázek 3: Aglutinogeny a aglutininy u jednotlivých krevních skupin
(zdroj: Rashid et al. 2022, upraveno)

Antigeny AB0 systému jsou po biochemické stránce oligosacharidy, tvořené jednoduchými cukry D-glukóza, D-galaktóza, D-manóza, N-acetyl-D-glukosamin, N-acetyl-D-galaktosamin a L-fruktóza. Tyto oligosacharidy jsou navázány na strukturu glykoproteinů a glykolipidů na membráně erytrocytů (**Obrázek 4**). Jejich rozpustná forma se nachází i v sekretech (Penka a Tesařová 2012). Aglutinogen H je prekurzorová molekula pro aglutinogeny A a B. Od aglutinogenu H se aglutinogeny A a B odlišují pouze v posledním cukerném zbytku (Chottová-Dvořáková a Mistrová 2018). Krevní skupina 0 má na oligosacharidovém řetězci koncový cukr L-fukózu, krevní skupina A má L-fukózu a N-acetyl-D-galaktosamin, krevní skupina B má L-fukózu a D-galaktózu (Fábryová 2012).

Syntéza aglutinogenů A a B je podmíněna přítomností enzymů A-transferázy a B-transferázy. Enzym A-transferáza (α -N-acetylgalaktosaminyltransferáza) je produktem alely A a katalyzuje přenos N-acetyl-D-galaktosaminu z UDP-N-acetylgalaktosaminu (donor) na fukosylovaný galaktózový zbytek (akceptor). Obdobně B-transferáza (α -galaktosyltransferáza) je produktem alely B a katalyzuje přenos D-galaktózy z UDP-galaktózy (donor) na fukosylovaný galaktózový zbytek (akceptor). U krevní skupiny 0

není produkován žádný aktivní enzym, a proto zůstává fukosylovaný galaktózový zbytek nesubstituovaný (Daniels a Bromilow 2007).



Obrázek 4: Biochemie antigenních substancí AB0 na povrchu erytrocytu
(zdroj: Anso et al. 2023, upraveno)

4.3 Dědičnost

Substance tvořící systém AB0 jsou řízeny genem umístěným na 9. chromozomu. Samotný gen má tři alely, přičemž alely A a B jsou kodominantní, alela 0 je recesivní (Murray a Matouš 2012). V systému AB0 jsou známy 4 fenotypy – A, B, AB a 0 (**Tabulka 1**). Platí, že fenotyp A je výsledkem genotypu A/A nebo A/0, fenotyp B je výsledkem genotypu B/B nebo B/0, fenotyp AB je výsledkem fenotypu A/B a nakonec fenotyp 0 je výsledkem genotypu 0/0 (Fábryová 2012).

Antigeny A a B nejsou přímým výsledkem genu. Tři alely genu umístěné na 9. chromozomu podmiňují pouze tvorbu enzymů transferáz. Alela A produkuje A- transferázu, alela B produkuje B-transferázu. Enzymy zajistí připojení specifických cukerných složek k prekurzorové substanci (H-antigenu). Alela 0 je tichá, nepodmiňuje produkci transferázy, a proto se k prekurzorové substanci nepřipojují žádné cukerné složky (Penka a Tesařová 2012).

Tabulka 1: Dědičnost krevních skupin (zdroj: Okoduwa 2013, upraveno)

		Krevní skupina matky			
		A	B	0	AB
Krevní skupina otce	A	A, 0	A, B, 0, AB	A, 0	A, B, AB
	B	A, B, 0, AB	B, 0	B, 0	A, B, AB
	0	A, 0	B, 0	0	A, B
	AB	A, B, AB	A, B, AB	A, B	A, B, AB
		Krevní skupina dítěte			

Prekurzorová substance H je kódována genem *FUT1* na 19. chromozomu. Pracuje na stejném principu tvorby enzymu H-transferázy (α -L-fukosyltransferázy), která připojuje L-fukózu k D-galaktóze oligosacharidového řetězce, a tím vzniká prekurzorový antigen-H (**Obrázek 4**). Chybí-li gen *FUT1*, nesyntetizuje se H-transferáza a prekurzorový antigen-H není produkován. Monosacharidové konce antigenů A či B nemají možnost připojit se na antigen-H. Jedinci s absencí antigenů A, B či H na povrchu membrány erytrocytů jsou nazýváni jako fenotyp Bombay (Penka a Tesařová 2012).

4.4 Zastoupení krevních skupin v populaci

Četnost různých krevních skupin v populaci je ovlivněna regionálně i rasově. Celosvětově je nejrozšířenější krevní skupinou A a 0 (Fábryová 2012; Penka a Tesařová 2012). Velmi rozdílné zastoupení bývá mezi jednotlivými etniky (**Tabulka 2**). Obecně platí, že oproti Evropanům mají Asiaté a Afričané v populaci výrazně větší zastoupení krevní skupiny B. Rozdíly v zastoupení krevních skupin jsou dány evolučně. Dle úvahy je alela B nejmladší ze všech alel (Panczak a Otová 2013).

Tabulka 2: Procentuální zastoupení krevních skupin u různých etnik (zdroj: Fábryová 2012; Penka a Tesařová 2012)

	Krevní skupina A	Krevní skupina B	Krevní skupina AB	Krevní skupina 0
Asiaté	28 %	26 %	6 %	40 %
Afroameričané	26 %	20 %	4 %	50 %
Latinoameričané	31 %	10 %	2 %	57 %
Kavkazané	41 %	11 %	3 %	45 %
Středoevropané	48 %	9 %	4 %	39 %

4.5 Lokalizace tkání a buněk exprimující ABH antigeny

Antigeny krevních skupin byly zpočátku identifikovány jako povrchové antigeny erytrocytů. Brzy se ukázalo, že jsou široce distribuovány napříč nejrůznějšími tkáněmi (**Tabulka 3**). Odborně byly tyto antigeny nazvány jako „histo-blood group antigens“, tedy antigeny krevní skupiny umístěné na jiných buňkách než erythrocytech (Ravn a Dabelsteen 2000). Epitely a jejich sekrety jsou hlavním zdrojem antigenů krevních skupin. Epitel ekto-, mezo- a endodermálního původu exprimuje ABH antigeny. Neuroektoderm může exprimovat jen malé množství prekursorů antigenů krevních skupin. Buňky pojivové tkáně nevytváří žádné výše zmíněné antigenní struktury (**Tabulka 4**) (Ravn a Dabelsteen 2000).

Antigeny AB0 systému lze prokázat u plodu ve 3. – 4. týdnu intrauterinního vývoje (Štefan 2012). Szulman uvádí, že již v 5. týdnu po oplození jsou v embryu lokalizovány první antigeny AB0, a to nejen na erythrocytech, ale i na endotelu a buňkách epitelu prakticky všech orgánů nebo orgánových základů, např. krevní ostrůvky žloutkového vaku, epitel primitivní trávicí trubice a její deriváty, mezonefros, dlaždicový epitel kůže (Szulman 1987).

Tabulka 3: Přehledová tabulka tkání a buněk tkání exprimujících ABH antigen
(zdroj: Ito a Hirota 1992)

Orgánová soustava	Orgán	Buňky exprimující antigen ABH
Dýchací soustava	Hrtan	Dlaždicový epitel a mukózní buňky
	Průdušnice, průdušky	Povrchový epitel, pohárkové buňky, mukózní buňky
Trávicí soustava	Dutina ústní	Dlaždicové buňky, mukózní buňky labiálních žláz, jazyk
	Slinné žlázy	Mukózní a serózní buňky
	Jícen	Dlaždicový epitel
	Žaludek	Povrchový epitel, pylorické žlázy, parietální buňky, hlavní buňky
	Tenké střevo	Pohárkové buňky, Brunnerovy žlázy
	Tlusté střevo	Pohárkové buňky
	Játra	Kupfferovy buňky
	Slinivka břišní	Exokrinní aciny, dukty
	Žlučník	Cylindrický epitel
Vylučovací soustava	Ledviny	Sběrné kanálky
	Močový měchýř	Urotel
Pohlavní soustava	Prostata	Jednoduché tubuloalveolární žlázy
	Varlata	Spermatogonie a epitel eferentního ductu
	Nadvarle	Cylindrický epitel
	Semenotvorné kanálky	Cylindrický epitel
	Vejcovody	Cylindrický epitel
	Děloha	Endometrium, cylindrický epitel
	Pochva	Dlaždicový epitel a mukózní buňky
Kožní soustava	Kůže	Potní žlázy, mléčná žláza
	Vlasy	Dřeň
Cévní soustava	Cévy	Endotelové buňky
Endokrinní soustava	Hypofýza	Pars intermedia, koloid
Lymfatická soustava	Brzlík	Hasallova tělíska, epitelové buňky
Nervová soustava	Zadní míšní kořen	Senzitivní neurony

Tabulka 4: Přehledová tabulka tkání a buněk tkání, které neexprimují ABH antigen
(zdroj: Ito a Hirota 1992)

Orgánová soustava	Orgán	Buňky, které neexprimují antigen ABH
Endokrinní soustava	Hypofýza	<i>Pars anterior, lobus posterior</i>
	Nadledviny	Kůra, dřeň
	Štítná žláza	Folikuly, folikulární buňky
	Slinivka břišní	Langerhansovy ostrůvky
Trávicí soustava	Játra	Hepatocyty
	Tračník	
Kosterní soustava	Kost	
	Chrupavka	
Svalová soustava	Sval	Buňky hladké svaloviny, buňky příčně pruhované svaloviny
	Svalová povázka	
	Šlacha	
Pohlavní soustava	Vaječníky	
	Varlata	

5. IMUNOHISTOCHEMIE

5.1 *Historie imunohistochemie*

Základy imunohistochemie položil ve 40. letech 20. století Albert Hewett Coons, když prokázal přítomnost bakterií rodu *Pneumococcus* v infikovaných myších játrech za použití protilátky značené fluorescenčním barvivem (Packer 2021; Suvarna et al. 2019). Roku 1954 spolu s Thomasem Huckle Wellerem popsali metodu nepřímé imunofluorescence pro diagnostiku průšnic (Packer 2021). Aplikovali sérum infikovaného pacienta na buněčnou kulturu infikovanou průšnicemi (Packer 2021). V roce 1958 použil Mark H. Kaplan dvoustupňovou nepřímou imunofluorescenční techniku k amplifikaci signálu barvení a vizualizaci antigenů dříve nerozlišitelných ve tkáňovém pozadí (Packer 2021). Paul Kazuo Nakane a Gordon Barry Pierce zavedli roku 1966 používání křenové peroxidázy konjugované s protilátkou v kombinaci s chromogenem diaminobenzidinem. Ostatní detaily tkáně vizualizovali kontrastním barvením hematoxylinem (Suvarna et al. 2019). V osmdesátých letech 20. století se využitím monoklonálních protilátek zvýšila citlivost metody. Rozvoj nepřímých imunoperoxidázových metod nebo avidin (streptavidin)-biotin metody urychlil studium tkáňové distribuce sacharidových struktur (Ito a Hirota 1992; Suvarna et al. 2019).

První antigeny krevních skupin systému ABO ve tkáních byly prokázány roku 1957 L. E. Grynem na preparátech žaludeční a duodenální sliznice. Použil protilátky značené fluoresceinem. Roku 1959 pak společně s Ericem Johnem Holborowem popsali distribuci antigenu A v různých lidských tkáních. Aron E. Szulman rovněž zkoumal histologickou distribuci antigenů krevních skupin. K lokalizaci antigenů v různých lidských tkáních použil fluoresceinem značené protilátky anti A, B, H. Roku 1964 zavedl Kent do praxe použití metody ve formalínu fixovaných tkáních zalitých do parafínu, což značně zlehčilo zpracování vzorku oproti tehdy využívané metodě mražení řezů čerstvé tkáně (Ito a Hirota 1992).

5.2 *Princip a popis metody*

Imunohistochemie je metoda založená na identifikaci buněčných nebo tkáňových antigenů pomocí vazby antigen – protilátka, následně je tento komplex vizualizován (Jirkovská 2006).

5.2.1 Protilátky v imunohistochemii

Protilátky jsou získávány imunizací zvířete specifickou molekulou (imunogenem). Organismus zvířete reaguje produkcí protilátek namířených proti aplikovanému antigenu. Vytvořená protilátka se izoluje z krevního séra zvířete. Existují dvě kategorie protilátek: monoklonální a polyklonální (Jirkovská 2006).

Monoklonální protilátky se *in vitro* získávají izolací klonů B-lymfocytů. Vzhledem ke krátké životnosti B-lymfocytů je používána hybridomová metoda, kdy fúzí s myelomovou buněčnou linií vzniká hybridom. Hybridní buňka produkuje stejně jako původní B-lymfocyt požadované monoklonální protilátky, avšak při výrazně delší životnosti (Hořejší et al. 2017). Výhodou monoklonálních protilátek je jejich vysoká specifita vůči konkrétnímu epitopu antigenu (Beránek a Tichý 2013).

Polyklonální protilátky jsou produktem mnoha klonů B-lymfocytů, mohou proto rozeznávat více epitopů. Polyklonální protilátky mají oproti monoklonálním protilátkám nižší specifitu. Navázáním polyklonální protilátky na podobné epitopy více antigenů dochází ke zkřížené reakci (Jirkovská 2006).

5.2.2 Metody průkazu

V imunohistochemii existuje několik metod průkazu využívaných k detekci tkáňových antigenů. Výběr vhodné metody závisí na charakteristice vyšetřované tkáně. Rozlišujeme přímé a nepřímé metody průkazu (**Obrázek 5**) (Suvarna et al. 2019).

5.2.2.1 Přímé metody průkazu

Přímá metoda je jednovrstevná – aplikuje se primární protilátka s navázanou vizualizační značkou. Značená protilátka reaguje přímo s antigenem ve tkáni. Technika je rychlá a snadná, ale neposkytuje dostatečnou citlivost (Suvarna et al. 2019). V soudně lékařské praxi se příliš nevyužívá, neboť při použití na parafinových řezech je málo citlivá (Toupalík 2001).

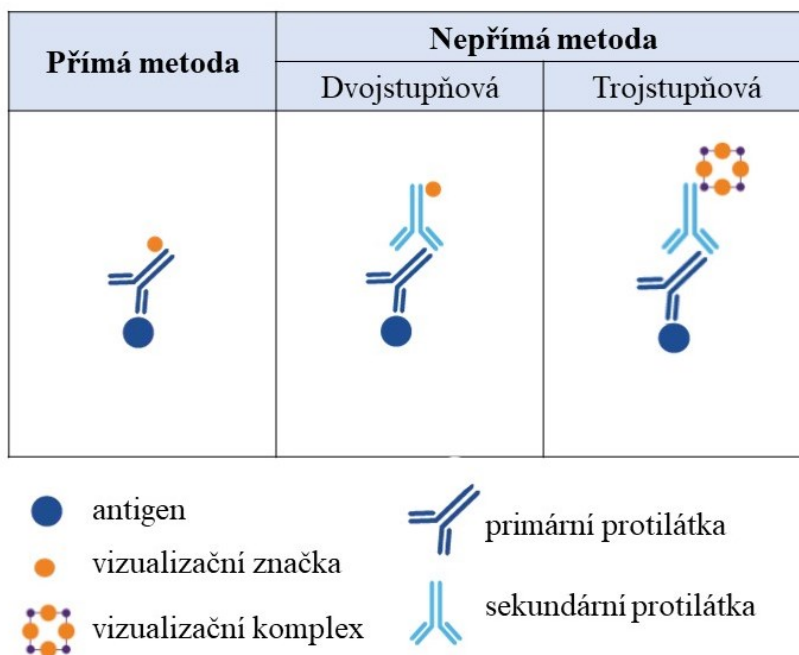
5.2.2.2 Nepřímé metody průkazu

Nepřímá metoda je ve srovnání s přímou metodou citlivější, avšak časově náročnější. Protilátky a detekční systém se spolu naváží ve více krocích. Hledaný antigen není detekován přímo primární protilátkou, ale nepřímo značenou sekundární protilátkou

nebo přidáním značeného komplexu. Rozlišujeme metodu nepřímou dvojestupňovou a metodu nepřímou trojestupňovou (Jirkovská 2006).

Nepřímá dvojestupňová metoda je založena na dvou krocích. Neznačená primární protilátka se naváže na detekovaný antigen. V dalším kroku se na *Fc*-fragment primární protilátky naváže značená sekundární protilátka a dochází k vizualizaci. Vazba většího množství sekundárních protilátek na neznačené primární protilátky amplifikuje signál (Čížková 2018).

Nepřímá trojestupňová metoda má své využití ve vzorcích obsahující nízké množství detekovaného antigenu, neboť vícekrokové uspořádání výrazně amplifikuje signál. Při prvním kroku se naváže neznačená protilátka na antigen ve vzorku. Na primární protilátku se naváže v nadbytku přidaná sekundární protilátka. Ve třetím kroku se naváže značený komplex a dochází k vizualizaci. Mezi nepřímé trojestupňové metody patří metoda alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza (APAAP), metoda peroxidáza-anti-peroxidázový komplex (PAP) nebo metoda avidin-biotin komplex (ABC) (Čížková 2018).



Obrázek 5: Základní metody imunohistochemie
(zdroj: Novusbio, upraveno)

5.3 Imunohistochemický protokol

Základním funkčním principem při zpracování tkáně k imunohistochemickému vyšetření je zachování struktury a přístupnosti vazebného místa (epitopu) antigenu pro vazbu protilátky (Jirkovská 2006).

5.3.1 Odběr materiálu

V soudním lékařství jsou nejčastěji odebírány vzorky nekroptické tkáně při pitvě zemřelého. Materiál pro stanovení krevní skupiny ze tkáně bývá v naprosté většině případů v pokročilém stádiu posmrtných změn vykazující známky hniloby nebo adipocere. Obvykle je k odběru zvolena co nejvíce zachovalá tkáň, např. nejméně poškozený sval (Toupalík 2001).

5.3.2 Fixace tkání

Fixace tkání slouží k zastavení autolytických procesů a další degradaci tkáně enzymy či mikroorganismy. Rozlišujeme chemické a fyzikální metody fixace (Čížková 2018).

Chemické metody fixace jsou v principu založeny na blokaci enzymu denaturací jeho proteinové struktury (Jirkovská 2006). Odebraný materiál je vložen do tzv. fixačního činidla, které musí mít schopnost dobře proniknout do fixované tkáně. K chemické fixaci jsou využívány nejrůznější látky – aldehydy (formaldehyd), kyselina pikrová, sloučeniny těžkých kovů (chlorid rtuťnatý, oxid osmičelý), organické kyseliny (kyselina octová, kyselina trichloroctová), koncentrované alkoholy (methanol, ethanol) a aceton. Nejběžněji využívané fixační činidlo je formaldehyd, triviálně nazýván jako formol. Formaldehyd je plyn, jeho rozpuštěním ve vodě vzniká vodný roztok formaldehydu o koncentraci 37 – 40 % (v laboratořích nazýván jako 100% formol). Uschovává se ve tmavých lahvích s malým množstvím uhličitanu vápenatého na dně nádoby. Pro fixaci se využívá roztok formolu o koncentraci 10 – 25 %, tedy 4 – 10% roztok formaldehydu (Jirkovská 2006; Čížková 2018).

Fyzikální metody fixace nejsou tak často využívány. Principem fyzikálních metod fixace je ovlivnění transportních mechanismů vody v buňce, neboť enzymaticky katalyzované reakce probíhají ve vodném prostředí (Jirkovská 2006). K fyzikální fixaci

je používána nízká teplota (fixace suchým ledem, tekutým dusíkem nebo vysoušení mrazem) či vysoká teplota často spojená s mikrovlnným zářením (Čížková 2018).

5.3.3 Odvodnění, projasnění, prosycení a zalití vzorku

Odvodněním se nahrazuje voda obsažená ve tkáni za odvodňovací médium. Nejčastěji se k odvodnění používá vzestupná koncentrační řada vodných roztoků ethanolu (70 %, 80 % a 96 %). V následujícím kroku je vzorek projasněn médiem, které je mísitelné s alkoholem i se zalévacím médiem. Obvykle jsou k projasnění používána běžná organická rozpouštědla (benzen, toluen, xylen). Organické rozpouštědlo nahradí ve tkáni ethanol a v dalším kroku tak umožní průnik zalévacího média do tkáně (Jirkovská 2006).

Projasněné vzorky se vkládají do tekutého parafínu v termostatu. Dochází k odpaření projasňujícího média a tkáň se prosytí parafínem. Poté se provede zalití tkáně do parafínového bločku, kterým dodáme materiálu pevnost při následném krájení. Zalévací médium musí dokonale prostoupit vzorek tkáně a ztuhnout natolik, aby bylo možné nakrájet tenké řezy. Nejběžnějším zalévacím médiem je parafín, který je levný a dobře se s ním pracuje. Vzorky projasněné tkáně jsou vkládány do zalévacích komůrek a zalitý parafínem o teplotě 52 – 58 °C (Jirkovská 2006; Mescher 2018).

V laboratořích jsou tyto kroky automatizovány pomocí odvodňovacích a zalévacích automatů. Odvodňovací automaty jsou zpravidla koncipovány jako karusel s pohyblivým košem, který je postupně vkládán do jednotlivých lázní po zvolený časový interval. Karusel obsahuje vzestupnou alkoholovou řadu, projasňovací médium a tekutý parafín k prosycení. Zalévací automaty obsahují nádobu pro vytemperovaný tekutý parafín. Tkáň vložená do zalévací komůrky je zalita parafínem a odložena na chladicí desku, aby parafín rychleji ztuhl (Jirkovská 2006).

5.3.4 Krájení parafínového bločku

Ke krájení parafínového bločku slouží tzv. mikrotomy. Přístroj obsahuje ocelovou žiletku, která při pohybu seřezává velmi tenkou horní vrstvu parafínového bločku upevněného do stojanu mikrotomu (Jirkovská 2006). Optimální tloušťka řezu je 5 μm (Beranová a Tonar 2002). Řez je po ukrojení napínán na vodní hladině – může být umístěn na podložní sklo a zakápnut kapkou vody nebo je položen na vodní hladinu v nádobě a následně přetažen na podložní sklo. Po slití přebytečné vody je podložní sklo

s vyrovnaným řezem položeno na vyhřívanou ploténku a usušeno. Pokud je vzorek zmrazen, ke krájení se využívá kryostat, což je v principu mikrotom v mrazícím boxu (Jirkovská 2006).

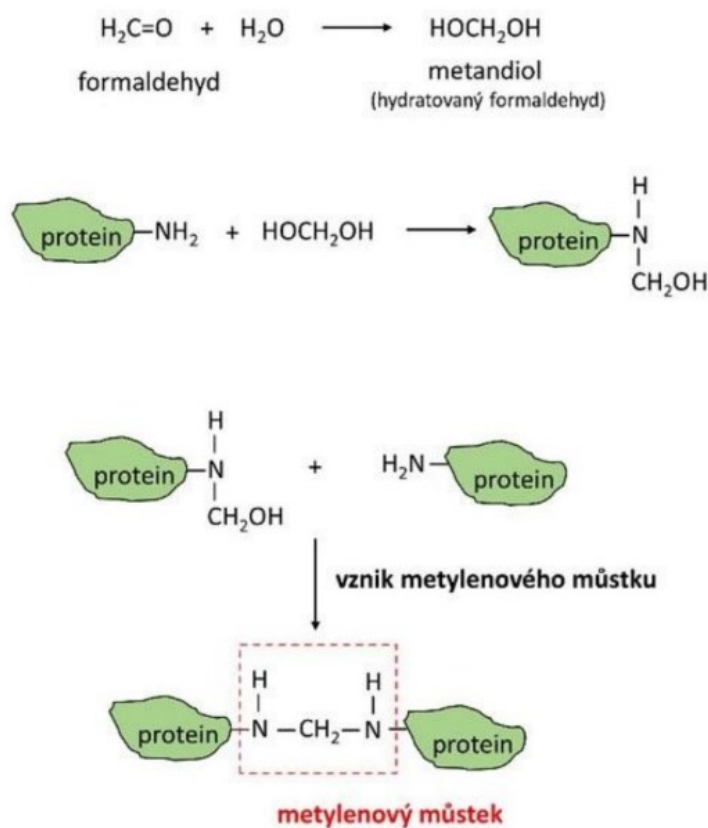
Řezy mohou být napínány na běžná podložní skla nebo na podložní skla se speciální adhezivní vrstvou. Adhezivní vrstva může být ze směsi želatiny a bílku, tato kombinace však není vhodná pro imunohistochemické vyšetření. Naopak pro imunohistochemii je vhodné využít silanizovaná skla – komerčně vyráběná podložní skla s adhezivní vrstvou poly-L-lysinu a 3-aminopropyltriethoxysilanu (APES). Použitím podložních skel s adhezivní vrstvou snížíme riziko deformace, roztržení nebo odplavání řezů při dalším zpracování (Jirkovská 2006).

5.3.5 Zavodnění tkáně a odmaskování antigenu

Před dalším zpracováním řezy zbavíme parafínu za použití v roztoku xylenu. Následuje zavodnění tkáně v sestupné alkoholové řadě (96 %, 80 % a 70 %). Tkáň se pozvolna hydratuje a je připravena na další kroky probíhající v hydrofilním prostředí (Beranová a Tonar 2002).

Při fixaci formalínem (aldehydy) a zalévání parafínem dochází ke zřetězování bílkovin, které mohou ve vzorku překrývat antigenní struktury, a tím bránit vazbě antigen-protilátka. Zřetězování je způsobené tvorbou methylenových můstků mezi proteiny. Při fixaci reaguje formaldehyd s vodou za vzniku methylen glykolu, který následně reaguje s nenabitými proteiny za tvorby hydroxymethylových skupin. Proteiny reagují se hydroxymethylovými skupinami a výsledkem je vznik methylenových můstků (-CH₂-) mezi proteiny (**Obrázek 6**). Makroskopicky se tento sled reakcí jeví jako ztuhnutí vzorku ve fixační tekutině (Čížková 2018).

Antigeny jsou zpřístupňovány pro protilátky tzv. antigen retrieval metodami. K odmaskování antigenu se využívají metody trávení proteolytickými enzymy (trypsin, pepsin), ozáření v mikrovlnné troubě, ohřev v tlakovém hrnci, volní lázni či parní ohřev (Jirkovská 2006; Suvarna et al. 2019; Beranová a Tonar 2002).



Obrázek 6: Zřetězování bílkovin při fixaci tkáně formaldehydem – vznik methylenových můstků mezi bílkovinami
(zdroj: Čížková 2018, převzato)

5.3.6 Blokace endogenní aktivity pozadí

Tkáň obsahuje endogenní enzymy, které mohou být podobné enzymům používaným při značení protilátek. Endogenní enzymy ve vzorku mohou reagovat se substrátem a v konečném důsledku ovlivnit interpretaci vzorku (Suvarna et al. 2019). V imunohistochemii se používá k enzymatickému značení křenová peroxidáza a alkalická fosfatáza. Buňky polymorfonukleárů a další myeloidní buňky mají výraznou endogenní peroxidázovou aktivitu. K blokování endogenních peroxidáz se využívá nejčastěji kombinace 1 – 3 % peroxid vodíku v methanolu (Suvarna et al. 2019; Jirkovská 2006; Toupalík 2001). Aktivita endogenní alkalické fosfatázy je obvykle blokována přidáním levamizolu, který selektivně inhibuje některé typy alkalické fosfatázy (vyjma intestinální nebo placentární alkalické fosfatázy). Jako inhibitor endogenní alkalické fosfatázy se využívá také ledová kyselina octová, která inhibuje všechny typy alkalických fosfatáz (Suvarna et al. 2019).

5.3.7 Blokace pozadí

Falešně pozitivní výsledek mohou zapříčinit nespecifické reakce pozadí. Příčiny nespecifické reakce prostředí jsou rozmanité, např. endogenní avidin-biotinová aktivita, kontaminace vzorku cizorodými látkami, zkřížená reaktivita protilátky s podobným epitopem, pohlcení antigenních struktur fagocyty, difúze antigenních struktur tkáně do okolí či vazba protilátky na pojivové struktury. Tyto nespecifické reakce prostředí lze blokovat saturací tkáně bílkovinami ze séra nebo odtučněného mléka. Tkáňový řez je vysycen neškodnými proteiny (Beranová a Tonar 2002; Čížková 2018).

5.3.8 Vazba protilátek

Tkáňové antigeny reagují s přidanou primární protilátkou. Dle zvolené imunohistochemické metody může následovat reakce sekundární protilátky. Protilátka se váže na preparátu v místech, kde je prezentován hledaný tkáňový antigen. Chromogen umístěný na značené protilátce vizualizuje vzniklý komplex antigen – protilátka (Beranová a Tonar 2002).

5.3.9 Vizualizace komplexu antigen – protilátka

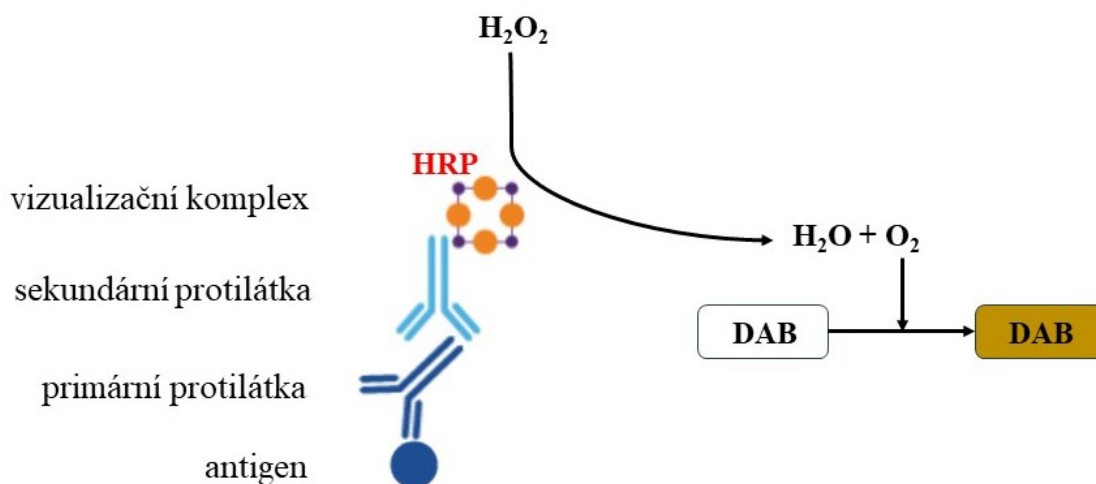
Vazba antigen – protilátka probíhá ve tkáni bez viditelné reakce. K vizualizaci komplexu se využívají tzv. chromogeny u imunoenzymové metody a fluorochromy u imunofluorescenční metody (Beranová a Tonar 2002).

5.3.9.1 Imunofluorescenční metoda

Fluorescenční značky (fluorochromy) jsou barviva vykazující fluorescenci. Fungují na principu absorpce ultrafialového nebo viditelného záření. Absorpcí záření dochází k excitaci molekuly a při návratu do základního stavu je uvolněna energie v podobě elektromagnetického záření o určité vlnové délce pozorované pod fluorescenčním mikroskopem (Suvarna et al. 2019). Nejběžněji používanými fluorochromy jsou fluorescein-izothiokyanát (FITC), tetramethyl-rhodamin-izothiokyanát (TRITC), 1-dimethyl-aminonafalen-5-sulfonylchlorid (DANSYL), texaská červeň, deriváty rhodaminu B, fykoerytrin, barvivo Alexa Fluor (Jirkovská 2006; Beranová a Tonar 2002).

5.3.9.2 Imunoenzymová metoda

Princip metody spočívá v reakci enzymu s chromogenem za přítomnosti substrátu. Reakcí vzniká konečný barevný produkt reakce, který lze detekovat ve světelném mikroskopu. Nejpoužívanějšími enzymy jsou křenová peroxidáza a alkalická fosfatáza. Křenová peroxidáza (HRP, horseradish peroxidase) je používána v kombinaci s chromogenem DAB (3,3 – diaminobenzidin tetrahydrochlorid) a substrátem peroxidem vodíku (**Obrázek 7**). Za přítomnosti křenové peroxidázy dochází ke štěpení peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Původně rozpustný chromogen DAB je oxidován v předchozí reakci vzniklým kyslíkem, polymerizuje a vytváří hnědou nerozpustnou sraženinu, která vizualizuje místo výskytu hledaného antigenu (Suvarna et al. 2019; Jirkovská 2006).



Obrázek 7: Vizualizace chromogenu DAB při imunohistochemické reakci
(zdroj: Čížková 2018; upraveno)

(HRP – křenová peroxidáza; DAB - 3,3 – diaminobenzidin tetrahydrochlorid)

Alkalická fosfatáza je využívanou alternativou ke křenové peroxidáze. Principem reakce je odstranění fosfátových skupin z makromolekul (Mescher 2018). Metoda se nazývá alkalická fosfatáza anti-alkalická fosfatáza (APAAP) a využívá se především u vzorků, kde je předpokládána velmi vysoká aktivita endogenních peroxidáz (Suvarna et al. 2019).

5.3.10 Dobarvení pozadí

Pro zlepšení orientace v preparátu je žádoucí dobarvit jeho tkáňové struktury. Dobarvení preparátu umožní hodnocení jak imunohistochemie, tak i morfologických detailů preparátu. Buněčná jádra jsou vizualizována hematoxylinem po dobu 30 sekund (Suvarna et al. 2019; Beranová a Tonar 2002). Pokud jsou použita imunofluorescenční metoda vizualizace, jádra se dobarvují 4,6-diamidin-2-fenylindolem (DAPI) a propidium jodidem (Čížková 2018).

5.3.11 Odvodnění, projasnění a montování řezů

Po dobarvení tkáňových struktur je preparát odvodněn ve vzestupné alkoholové řadě (70 %, 80 % a 96 %), vložen do acetonu, roztoku acetonu a xylenu a na závěru do roztoku xylenu (Beranová a Tonar 2002).

Ve finální fázi je na projasněné řezy umístěno krycí sklo, přilepené pomocí montovacího média. Montovací médium je kapalina mající stejný nebo podobný index lomu jako sklo. Jeho aplikací dochází k vyrovnání indexu lomu mezi preparátem a objektivem, zvyšuje tak množství světla procházející do objektivu. Rozlišujeme montovací média rozpustná ve vodě (na bázi glycerinu, želatiny či syntetické pryskyřice) a nerozpustná ve vodě (kanadský balzám, syntetické pryskyřice). Tento krok je v laboratořích často automatizován pomocí montovacího přístroje. (Jirkovská 2006).

5.3.12 Kontrola správnosti provedené metody

Součástí každého imunohistochemického barvení by měla být pozitivní a negativní kontrola sloužící k ověření správnosti postupu zpracování vzorku. Pro pozitivní kontrolu jsou využívány tkáně, kde byl při předchozím zpracování přítomen hledaný antigen. Naopak pro negativní kontrolu se využívá tkáň, kde s jistotou víme, že se hledaný antigen nenachází. Preparáty s pozitivní a negativní kontrolou prochází s vyšetřovaným vzorkem všemi kroky imunohistochemického barvení společně (Čížková 2018).

6. VYUŽITÍ METODY V PRAXI

Určení krevní skupiny pomocí imunohistochemie je využíváno v případech, kdy u zemřelého došlo k výrazným posmrtným změnám a nelze vyšetření provést z krve z důvodu hniloby nebo nepřítomnosti vzorku krve. Jako předběžná se tato metoda používá v případě identifikace části lidských ostatků před samotnou analýzou DNA. Ve srovnání s metodami sérologickými, obvykle vysycovací metodou dle Therkelsena a adsorpčně-elučním testem, je metoda jednoznačně lepší volbou v případě pokročilého rozkladu tkáně (Toupalík 2001).

Imunohistochemie má v některých případech své opodstatnění a nespornou výhodu. Ač jsou krevní skupinové vlastnosti AB0 stabilní i po velmi dlouhou dobu, enzymy některých mikroorganismů mohou narušit jejich strukturu (Štefan 2012). Narušení a rozpad antigenní struktury substance A, B či H vede k tzv. sérologické inaktivitě. Protilátky anti-A, anti-B či anti-H nedostatečně reagují s poškozenými antigeny A, B či H a dochází k falešně negativní reakci. V praxi může dojít i k falešně pozitivní reakci, a to při rozpadu původní substance a průkazu pouze její části nebo přítomnosti nově vzniklé látky vytvoření enzymatickou aktivitou hnilobné či jiné bakteriální flóry (Toupalík 2001). Bakterie *Bacillus cereus* a *Clostridium maebashi* produkují enzym α -D-galaktosidázu, který mění antigenní strukturu skupiny B na antigenní strukturu krevní skupiny 0. Enzym N-acetylgalaktominidáza produkováný bakterií *Clostridium tertium* transformuje antigenní strukturu krevní skupiny A na antigenní strukturu krevní skupiny 0. Antigenní struktury A a B narušuje bakterie *Clostridium perfringens*, protože způsobuje panaglutinaci krvinek, při které je enzymaticky pomocí neuraminidázy narušena celistvost erytrocytární membrány. Z takto poškozené membrány se uvolní kyselina sialová, čímž dojde k aktivaci latentních T-aglutinogenů. Další změny skupinových krevních vlastností byly popsány také u bakterie *Cunninghamella elegance*, plísní *Penicillium simplicissimum* a *Aspergillus niger* (Štefan 2012). Při sérologické diagnostice nelze topicky lokalizovat falešnou pozitivitu způsobenou bakteriální flórou. Tento problém je odstraněn právě imunohistochemickou metodou, kdy dochází k přímému zbarvení buněk nesoucích hledané antigeny (Toupalík 2001).

Obecně platí, že síla projevu aglutinogenu je v průběhu života jedince proměnlivá. Největší síly dosahují aglutinogeny v 18. – 20. roku života (Štefan 2012). U pacientů s akutní myeloidní leukémií dochází k zeslabování antigenu A často dříve, než dojde

k propuknutí samotné nemoci. U pacientů s krevní skupinou A trpící bakteriální infekcí spojenou s onemocněním střev, byla popsána tvorba získaného antigenu B. Bakteriální enzymy přeměňují N-acetyl-D-galaktosamin antigenu A na galaktosamin. Strukturálně je galaktosamin podobný galaktóze, která je typická pro krevní skupinu B. Galaktosamin reaguje s anti-B protilátkami a pacient tak vykazuje falešnou antigenní příslušnost ke krevní skupině AB. Krevní skupina může být také změněna po masivní nestejnokupinové transfúzi nebo nestejnokupinové transplantaci kostní dřeně. Za laboratorních podmínek lze změnit krevní skupinu odstraněním terminálního monosacharidu specifickým enzymem exoglykosidázou (Řeháček a Masopust 2013).

Aglutinogeny jsou citlivé na vysoké teploty. Aglutinogen A je inaktivován při 200 °C do 5 minut. Aglutinogen B je inaktivován při stejné teplotě již při 3 minutách. Aktivita aglutinogenu H je narušena při teplotě 190 °C po dobu 10 minut (Štefan 2012).

6.1 Inkompatibilní dárcovství krve

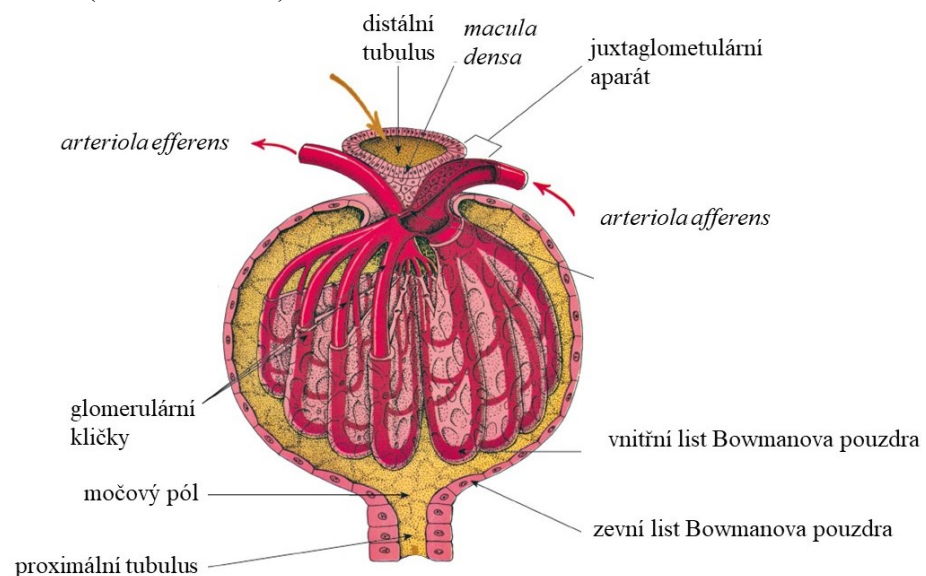
6.1.1 Potransfúzní reakce

Potransfúzní reakce mají mnoho příčin a v konečném důsledku různé stupně závažnosti. Dělí se na hemolytické (imunologická etiologie) a nehemolytické (infekční etiologie a ostatní příčiny). Dle průběhu popisuje včasné reakce (anafylaktické, generalizované) manifestující se do 24 hodin po podání transfúzního přípravku a pozdní reakce projevující se později než 24 hodin po podání transfúzního přípravku (Fábryová 2012). Podáním AB0-inkompatibilní krve dochází k **akutní hemolytické reakci**, při níž vzniká intravaskulární hemolýza a rozvíjí se život ohrožující stav manifestovaný šokem, diseminovanou intravaskulární koagulací (DIC) a renálním selháním (Řeháček a Masopust 2013). Příčinou akutní hemolytické reakce je rozvoj prudké intravaskulární hemolýzy – protilátky v krvi pacienta se okamžitě vážou na transfundované erythrocyty, které hemolyzují. Aktivují se makrofágy. Masivně se uvolňuje tumor nekrotizující faktor (TNF), který poškozuje tkáň. K rozvoji šokového stavu přispívají vyplavené cytokiny IL-1, IL-6 a IL-8. Uvolněný histamin a histaminu podobné látky dilatují cévy, zvyšují jejich permeabilitu a dochází k úniku tekutiny z cév do tkáň. Erythrocyty se shlukují a zneprůchodňují především cévy plic a ledvin. V těžkých případech je aktivována intravaskulární koagulace, avšak po spotřebě trombocytů a koagulačních faktorů dochází ke krvácení. První klinické příznaky akutní hemolytické reakce se dostaví již po podání

několika mililitrů inkompatibilní krve, výjimečně po aplikaci celého transfúzního přípravku. U pacienta pozorujeme třes, pocit svírání na hrudi, dušnost, nevolnost, zvracení, cyanózu, studený pot či první náznaky zvýšené krvácivosti. Následuje ztráta vědomí, selhání krevního oběhu a smrt. Počet úmrtí se pohybuje v rozmezí 1/100 000 – 200 000 transfuzí (Fábryová 2012).

6.1.2 Histologie ledviny

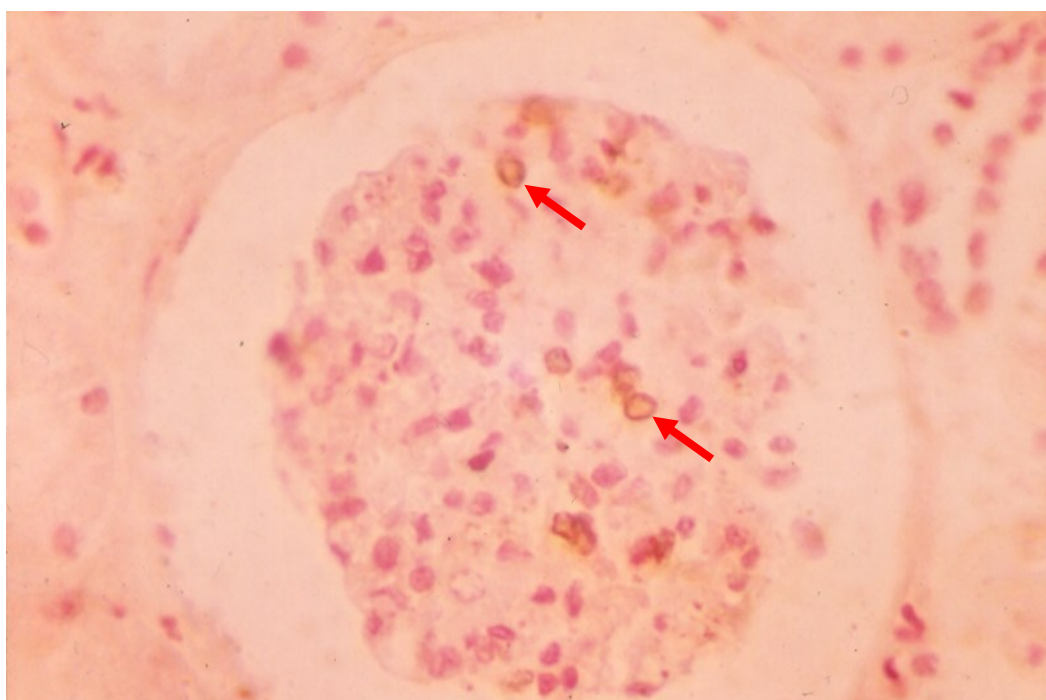
Ledvina je rozdělena na kůru (*cortex*) a dřeň (*medulla*). Základní stavební a funkční jednotkou ledvin je nefron. Nefron je složen z renálního tělíska (*corpusculum renale*), proximálního stočeného kanálku, tenkého a tlustého raménka Henleovy kličky a distálního stočeného kanálku. Renální tělísko (200 μm) je tvořeno klubíčkem fenestrovaných kapilár uložených v Bowmanovu pouzdru (**Obrázek 8**). Mezi vnější a vnitřní vrstvou Bowmanova pouzdra je močový prostor. Renální tělísko má cévní pól (vstup *arteriola afferens* a výstup *arteriola efferens*) a močový pól, ze kterého vychází proximální stočený kanálek. Pro proximální stočený kanálek je charakteristický jednovrstevný kubický až cylindrický epitel, který vytváří na apikálním konci epitelu kartáčový lem. Na proximální stočený kanálek navazuje Henleova klička, sestávající z tlustého sestupného raménka, tenkého sestupného raménka, tenkého vzestupného raménka a tlustého vzestupného raménka. Epitelu Henleovy kličky chybí kartáčový lem. Posledním segmentem nefronu je distální stočený kanálek vystlaný jednovrstevným kubickým epitelem (Mescher 2018)



Obrázek 8: Stavba renálního tělíska
(zdroj: Hanzlová a Hemza 2013, upraveno)

6.1.3 Imunohistochemický průkaz krevní skupiny v ledvině

Imunohistochemie je metoda, která je využívána v soudně lékařské praxi k potvrzení či vyvrácení transfúze inkompatibilní krve. Běžné vyšetření krve neposkytuje žádný důkaz, neboť rozpadlé inkompatibilní erythrocyty dárce jsou vychytávány v orgánech retikuloendotelového systému (RES). Sérologicky pomocí absorpčně-eluční metody lze prokázat přítomnost fragmentů inkompatibilních erythrocytů ve skvrně zaschlé krve. Nejvhodnější tkáň pro průkaz inkompatibilních erythrocytů pomocí imunohistochemie jsou ledviny, respektive kličky glomerulů (**Obrázek 9**) (Toupalík 2001).



Obrázek 9: Pozitivní reakce inkompatibilních erythrocytů dárce, nepřímá imunoperoxidázová metoda, DAB

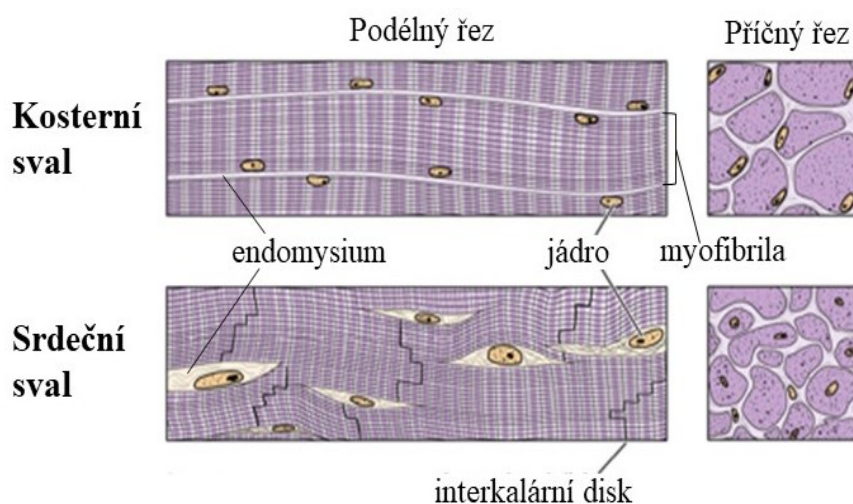
(autoři: Toupalík P., Baláž P., Rejthárek J. – Oddělení soudního lékařství Pardubické nemocnice, Nemocnice Pardubického kraje, a.s.), histologický preparát glomerulu ledviny zemřelého, zvětšení 40x, pozitivní reakce – erythrocyty s odlišnou krevní skupinovou substancí v glomerulu (označeno šipkami)

6.2 Kosterní a srdeční sval

6.2.1 Histologie kosterní a srdeční svaloviny

Kosterní svalovina se skládá ze svazků dlouhých mnohojaderných příčně žíhaných vláken. Sarkoplazma svalového vlákna obsahuje longitudinálně uspořádané myofibrily – dlouhá filamenta cylindrického tvaru. Protáhlá jádra jsou umístěna na periferii pod plazmatickou membránou – sarkolemou. Na podélném řezu je viditelné příčné pruhování, na příčném řezu pozorujeme svazky myofibril oddělené sarkoplazmou (**Obrázek 10**). Na povrchu svalu je pouzdro tvořené hustým neuspořádaným kolagenním vazivem nazývané epimysium. Svazky jednotlivých vláken jsou obaleny perimysiem. Mezi svazky probíhá cévní zásobenění a nervová vlákna. Pružná vrstva uvnitř svazku je nazývaná endomysium a tvoří ji retikulární vlákna a fibroblasty (Mescher 2018).

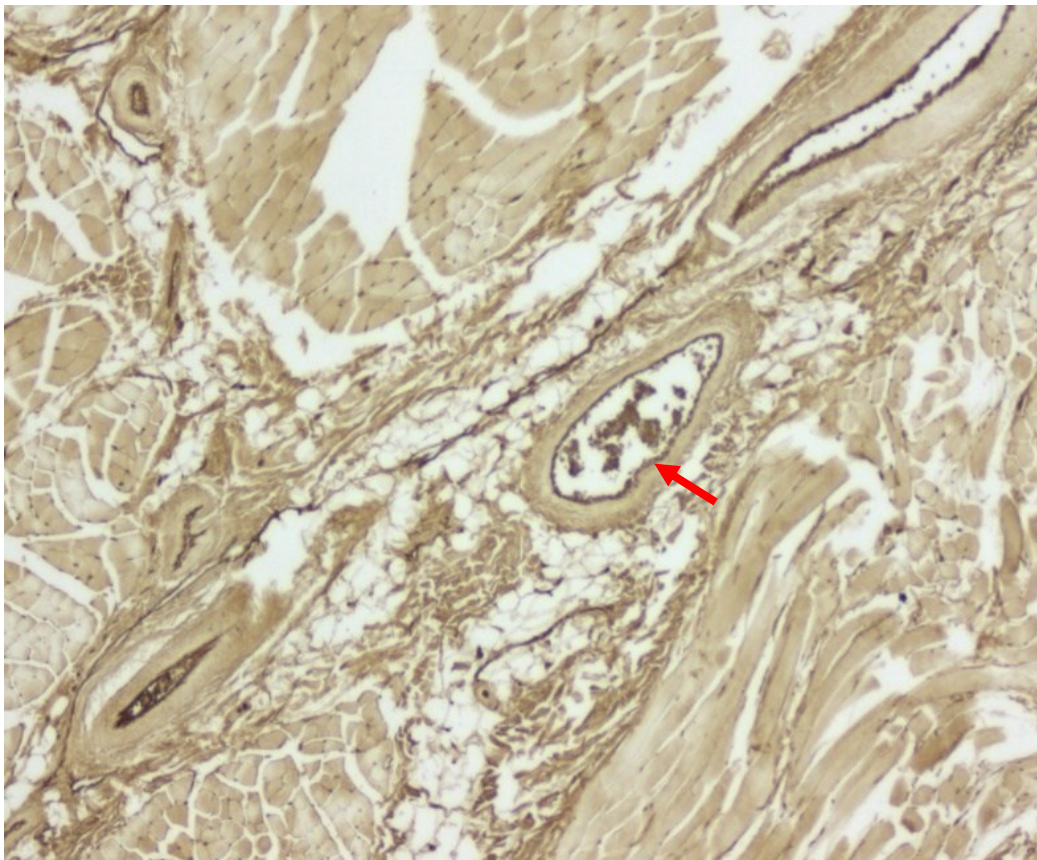
Srdeční svalovina (myokard) je tvořena kardiomyocyty, které jsou vzájemně propojeny svými výběžky. Nevytváří vlákna, větví se a vzájemně spojují v místech nazývaných interkalární disky (**Obrázek 10**). Kardiomyocyt obsahuje velké množství mitochondrií a sít'ovitě uspořádaných aktin-myozinových myofilament. Jádro buňky je uloženo centrálně (Mescher 2018).



Obrázek 10: Stavba kosterního srdečního svalu, příčný a podélný řez
(zdroj: Jirkovská 2013, upraveno)

6.2.2 Imunohistochemický průkaz krevní skupiny ve svalovině

Krevní skupinové vlastnosti lze prokazovat v kosterním svalu či myokardu (**Obrázek 11**). Při odběru vzorku je vybrán co nejméně poškozený kosterní sval, obvykle z končetiny zemřelého. Vzhledem k autolýze tkáně odebíráme několik vzorků svalu z různých míst. K pozitivní reakci dochází především na endoteliích cévního zásobení svaloviny, neboť mají větší odolnost proti autolytickým procesům (Toupalík 2001).

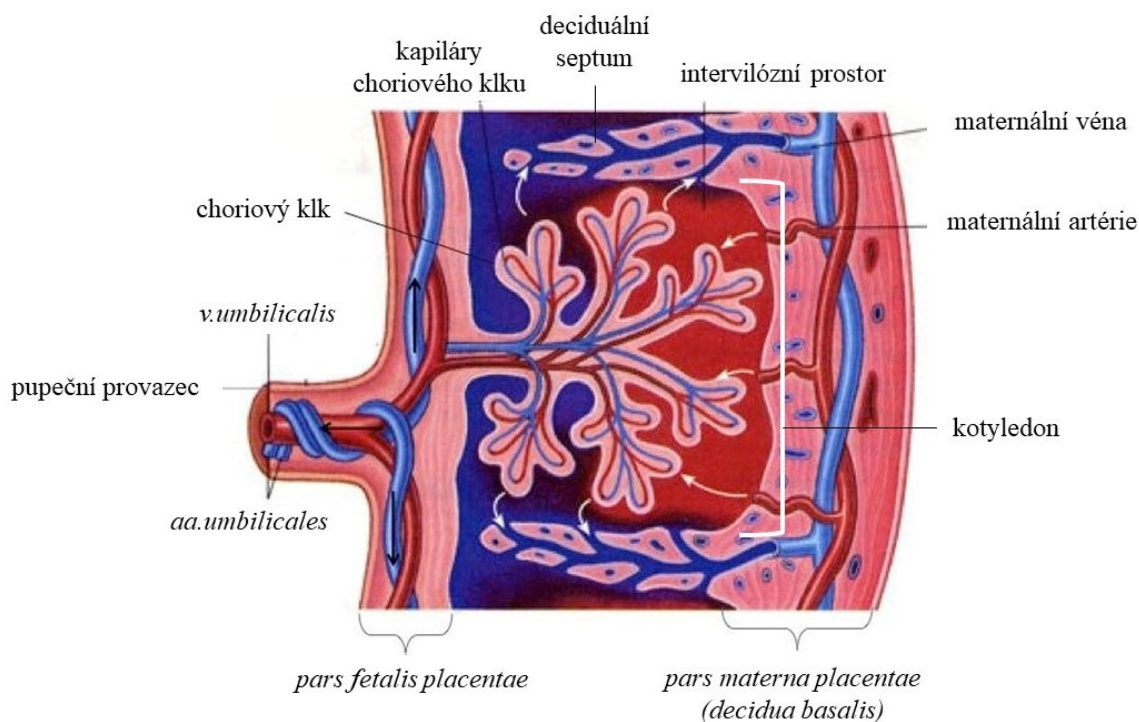


Obrázek 11: Průkaz krevní skupinové substance B v kosterním svalu nepřímá imunoperoxidázová metoda, DAB
(autoři: Rejthárek J., Toupalík P., Častulová P. – Oddělení soudního lékařství Pardubické nemocnice, Nemocnice Pardubického kraje, a.s.)
histologický preparát kosterního svalu, zvětšení 40x
pozitivní reakce endotelu cévy (označeno šipkou)

6.3 Placenta

6.3.1 Histologie placenty

Lidská placenta je dočasný orgán mezi matkou a plodem (**Obrázek 12**). Rozlišujeme část fetální (*pars fetalis placentae*; *chorion*) a část mateřskou, tedy derivát děložní sliznice (*pars materna placentae*; *decidua basalis*). Od *decidua basalis* odstupují deciduální septa, která přechází až do intervilózního prostoru. Mateřská část je septy rozdělena na jednotlivé kotyledony. Fetální část placenty tvoří choriovou plotnu, ze které vybíhají choriové klky. Kmenové klky, které vždy po jednom vytváří centrum kotyledonu, se dále rozvětvují na zralé intermediální klky a zakončeny jsou jako terminální klky. Uvnitř klků vedou cévy, které v průběhu ztrácejí *tunica adventicia* a v terminálních částech klků jsou tvořeny jen kapilárami. Povrch vnořených choriových klků do deciduálních lakun je omýván krví, čímž dochází k výměně látek mezi matkou a plodem (Vajner et al. 2018; Mescher 2018).



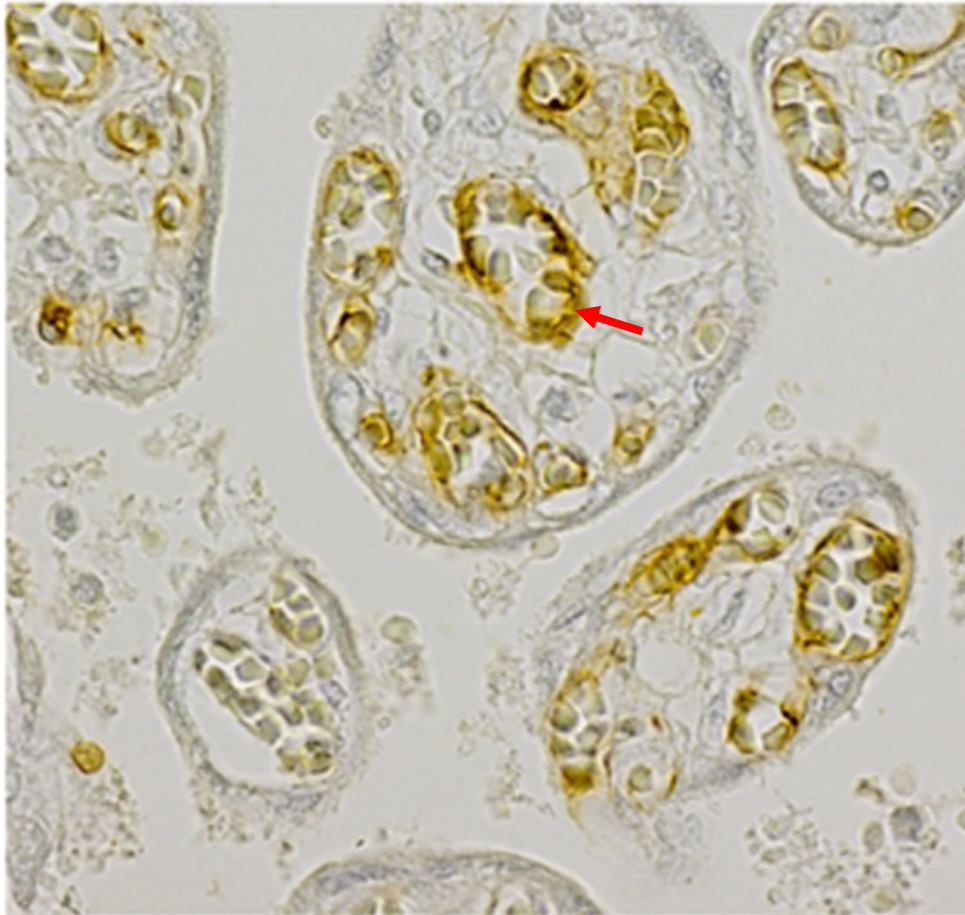
Obrázek 12: Stavba placenty (zdroj: Lofthouse 2014, upraveno)

6.3.2 Imunohistochemický průkaz krevní skupiny v placentě

Imunohistochemii lze využít v soudně lékařské praxi při určení krevní skupiny matky a dítěte z placenty. Uspořádání placenty nedovoluje využít klasických sérologických metod, neboť není zcela zaručeno rozlišení mateřské a plodové části placenty. Výsledkem sérologické metody by byl směsný vzorek skupinových vlastností matky a plodu. Použitím imunohistochemie můžeme topicky zobrazit antigenní struktury krevních skupinových substancí v mateřské a plodové části placenty, především v endoteliích kapilár. V plodové části je nejspolehlivějším místem reakce kapilární endotelie choriových klků (Toupalík 2001). Naproti tomu endotel cév decidua a intervilózní prostor patří do cévního systému matky, tudíž zde nalezené antigenní struktury charakterizují krevní skupinu matky (Pedal et al. 1985).

Nejčastěji se používá nepřímá imunoperoxidázová metoda za použití křenuvé peroxidázy a DAB nebo nepřímá třístupňová metoda za pomoci biotin-streptavidinového systému značeného alkalickou fosfatázou s Fast red chromogenem (Toupalík 2001; Pedal et al. 1985). Pedal a kol. ve své studii uvádí, že antigenní struktury mateřské a fetální placentární části vykazují různou intenzitu značení. Mateřské erythrocyty a endotelie decidua vždy vykazovaly jasné a silné značení odpovídajícími protilátkami. Fetální erythrocyty krevních skupin A, B a AB reagovaly s odpovídajícími protilátkami vždy méně intenzivně ve srovnání s mateřskými erythrocyty. Oproti tomu vilózní endotelie fétu vykazovaly výraznou intenzitu značení (Pedal et al. 1985).

Uno a kol. popisují využití imunohistochemie při určení krevní skupiny fétu a matky z nálezu více jak 50 let starého plodu vč. placenty uschovaného v nádobě s roztokem formalínu. Pomocí imunohistochemie byl detekován antigen B v endoteliích *pars fetalis* (**Obrázek 13**). Antigen B byl potvrzen také v myokardu a glomerulech ledvin plodu. Erythrocyty v intervilózním prostoru placenty vykazovaly pozitivní reakci pro antigen A, velmi slabou reakci pro antigen B. Matka tak mohla být nositelkou krevní skupiny A či AB, plod byl nositelem krevní skupiny B (Uno et al. 2016).

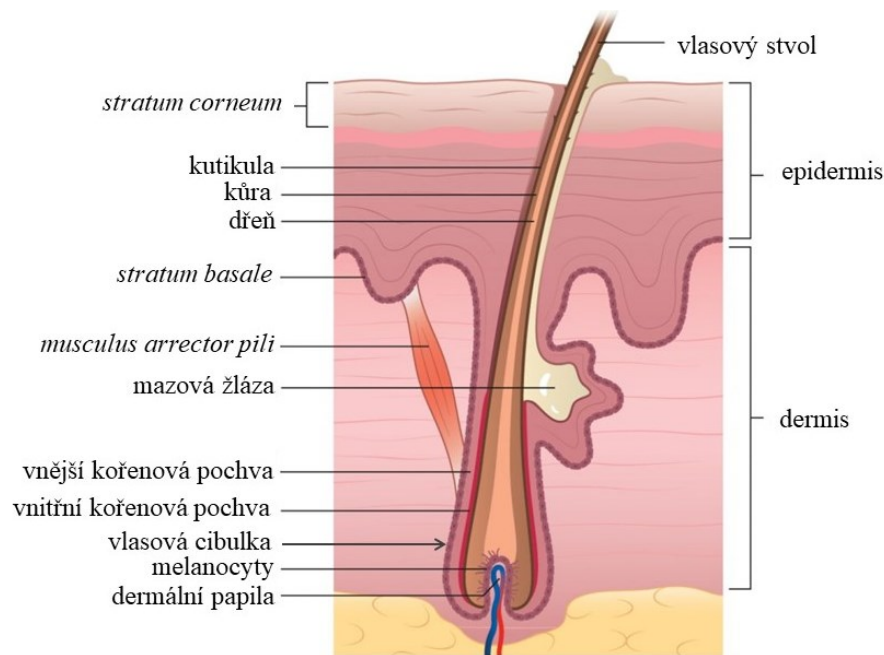


Obrázek 13: Pozitivní reakce endotelií cév pars fetalis placenty
(zdroj: Uno et al. 2016), pozitivní reakce označena šipkou

6.4 Vlasy

6.4.1 Histologie vlasu

Vlasy a chlupy jsou struktury tvořené keratinem, vyrůstající z vlasových folikulů. Lidské tělo je vlasy a chlupy pokryto téměř na všech místech, vyjma kůže dlaní, plosek nohou, *glans penis*, *clitoris* a *labia minora*. Barva, tloušťka, tvar a kvalita vlasů závisí na věku, genetické predispozici a místě, kde se na těle nachází. Růstový proces probíhá asynchronně, avšak cyklicky ve třech fázích. První anagenní fáze je typická mitotickou aktivitou a růstem. Ve druhém katagenní fázi dochází k zastavení růstu a regresi vlasové cibulky. Poslední telogenní fáze je obdobím klidu, během něhož vlas může vypadnout (Mescher 2018).



Obrázek 14: Stavba vlasu (zdroj: Lawton 2020, upraveno)

Vlas je složen z části vyrůstající nad povrchem – vlasový stvol (*scapus pili*) a části zanořené do kůže – kořen vlasu (*radix pili*). Kořen vlasu je na konci rozšířen ve vlasovou cibulku (*bulbus pili*), která objímá četně vaskularizovanou dermální papilu, která vyživuje vlasový folikul (**Obrázek 14**). Zevní buňky vlasové cibulky vybíhají v epitelové kořenové pochvy mající dvě vrstvy. Vnitřní kořenová pochva obklopuje dolní úsek, zevní kořenová pochva se nachází nad vnitřní pochvou a vybíhá do epidermis, kde navazuje na *stratum basale* a *stratum spinosum*. Dermální papila je pokryta keratinocyty pocházející ze *stratum basale epidermis*. Keratinocyty slouží jako matrix pro rostoucí kořen vlasu (*radix pili*). Uvnitř silných vlasů je dřeň tvořená velkými vakuolizovanými a mírně keratinizovanými buňkami. Dřeň vlasu je obalena kůrou ze silně keratinizovaných hustě upořádaných buněk. Na vnějším povrchu vlasu popisujeme kutikulu tvořenou keratinizovanými buňkami (Mescher 2018).

6.4.2 Imunohistochemický průkaz krevní skupiny z vlasu

Při posmrtných změnách dochází v průběhu 2–3 týdnů k odpadávání vlasů. Za 2–3 měsíce od úmrtí dochází k vymizení tělních tekutin. V půdě je proces hniloby a tlení po deseti letech ukončen skeletizací, kdy jsou zachovány jen kosti a vlasy (Štefan 2012). Právě vlasy jsou tkání mnohem odolnější vůči posmrtným změnám oproti myokardu či kosternímu svalu. Kromě imunohistochemického vyšetření lze použít i

sérologické vyšetření pomocí absorpčně-eluční metody. Sérologická diagnostika ale naráží na limity v podobě nedostatku trichologického materiálu a vnějších vlivů (chemická úprava vlasů, enzymatická aktivita bakteriální mikroflóry) (Toupalík 2001).



Obrázek 15: Imunohistochemické stanovení krevní skupiny z vlasu, nepřímá imunoperoxidázová metoda, DAB
(autoři: Toupalík P., Baláž P., Rejthárek J. – Oddělení soudního lékařství Pardubické nemocnice, Nemocnice Pardubického kraje, a.s.)
histologický preparát – šikmý řez vlasem, zvětšení 40x,
pozitivní reakce ve dřeni vlasu označena šipkou

Přítomnost krevních skupinových substancí se imunohistochemicky prokazuje ze dřene vlasu (**Obrázek 15**). Při zahájení zpracování tkáně je nutno povrch vlasu důkladně očistit od nečistot promytím v teplé vodě, následně odmastit a fixovat v methanolu (5 min.) a na závěr promýt fyziologickým roztokem. Vlas může být zpracován vcelku zalitím do parafinového bločku, nebo může být rozdrcen v třecí misce. Důležité je rozrušit povrch vlasu řezem či rozdrcením tak, aby se v dalších krocích umožnil přístup přidávaným protilátkám k antigenům ve dřeni vlasu. Následuje aplikace zvolené imunohistochemické metody – nepřímá trojstupňová metoda, např. APAAP metoda, ABC metoda nebo PAP metoda. Dle zvolené metody se pozitivní reakce jeví ve dřeni jako hnědé (chromogen DAB) nebo červené zbarvení (chromogen Fast Red). Při

negativní reakci nedochází k barevné změně. Při hodnocení reakce je nutno počítat s výskytem černě zbarvené vzduchových bublin a vlasového pigmentu (Toupalík 2001).

6.5 Sekrety

Antigeny A, B, a H se nenacházejí jen na erytrocytech, ale mohou se také vyskytovat v tělních tekutinách ve formě glykoproteinů. Nejčastěji v sekretech gastrointestinálního, urogenitálního a respiračního traktu, v plazmě, mateřském mléce, potu, slzách a amniotické tekutině (Masopust a Písačka 2022).

Sekretorství do tělních tekutin je podmíněno geneticky sekrečním genem *Se*, který se nachází na 19. chromozomu, který kóduje enzym fukosyltransferázu. V erytrocytech není tento enzym aktivní. Sekretorství je podmíněno genotypem *SeSe* či *Sese* (Murray a Matouš 2012). Přibližně u 80 % populace se vyskytuje dominantní alela *Se* a tito jedinci jsou vylučovateli antigenů H a A nebo B do tělních tekutin (**Tabulka 5**). V populaci se vyskytují také aberantní sekretoři, kteří vylučují pouze antigen H. Zbýlých 20 % populace jsou recesivní homozygoti *sese* a k sekretorství u nich nedochází (Panczak a Otová 2013). Substance AB0 systému na povrchu erytrocytů nejsou nijak ovlivněny genem *Se*, tito recesivní homozygoti *sese* mají substance AB0 na membráně erytrocytů zachovány (Murray a Matouš 2012).

Tabulka 5: Přítomnost solubilního antigenu ve vztahu ke krevním skupinám (zdroj: Masopust a Písačka 2022)

Sekretorství	Krevní skupina	Přítomnost solubilního antigenu
Sekretor	A	A, H
	B	B, H
	AB	A, B, málo H
	0	významné množství H
Non – sekretor	A, B, AB nebo 0	žádná

6.5.1 Imunohistochemický průkaz krevních skupin v sekretech

Imunohistochemická metoda je vhodná pro určení krevní skupiny u vylučovatele. Krevní skupinová substance se prokazuje ve tkáních, respektive v mucinózních žlázách průdušnice či podjazykové slinné žlázy (Toupalík 2001).

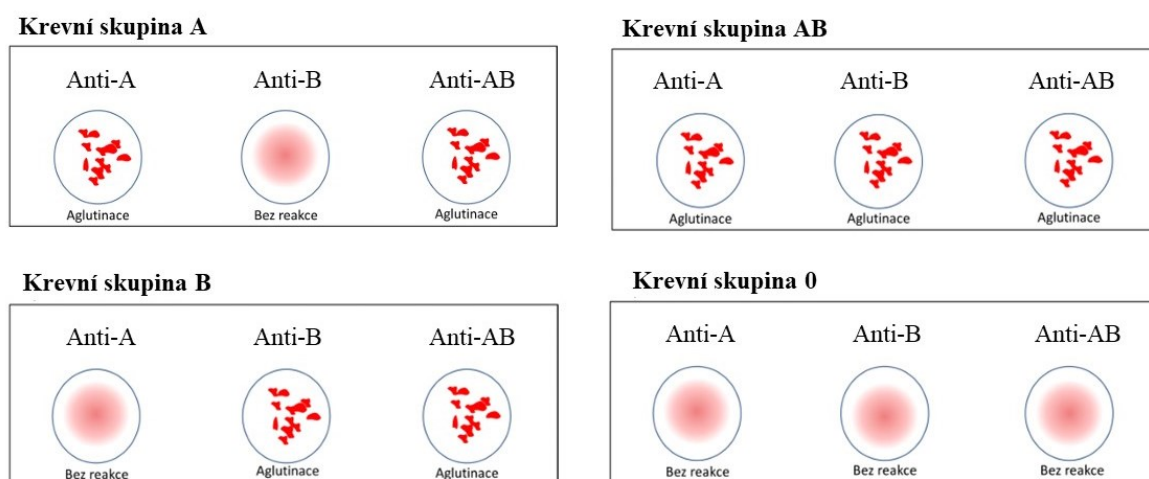
7. DALŠÍ MOŽNOSTI URČENÍ KREVNÍ SKUPINY

7.1 Sérologické metody

Principem sérologických metod je hemaglutinace, tedy shlukování erytrocytů za přítomnosti specifických protilátek proti antigenům na povrchu erytrocytu. Jedná se o metody často jednoduché a ekonomicky nenáročné, hodnocené vizuálně. Základními podmínkami hemaglutinace jsou vazba protilátky na antigen erytrocytu a spojení dvou erytrocytů navzájem pomocí protilátkové vazby (Řeháček a Masopust 2013).

7.1.1 Sklíčková metoda

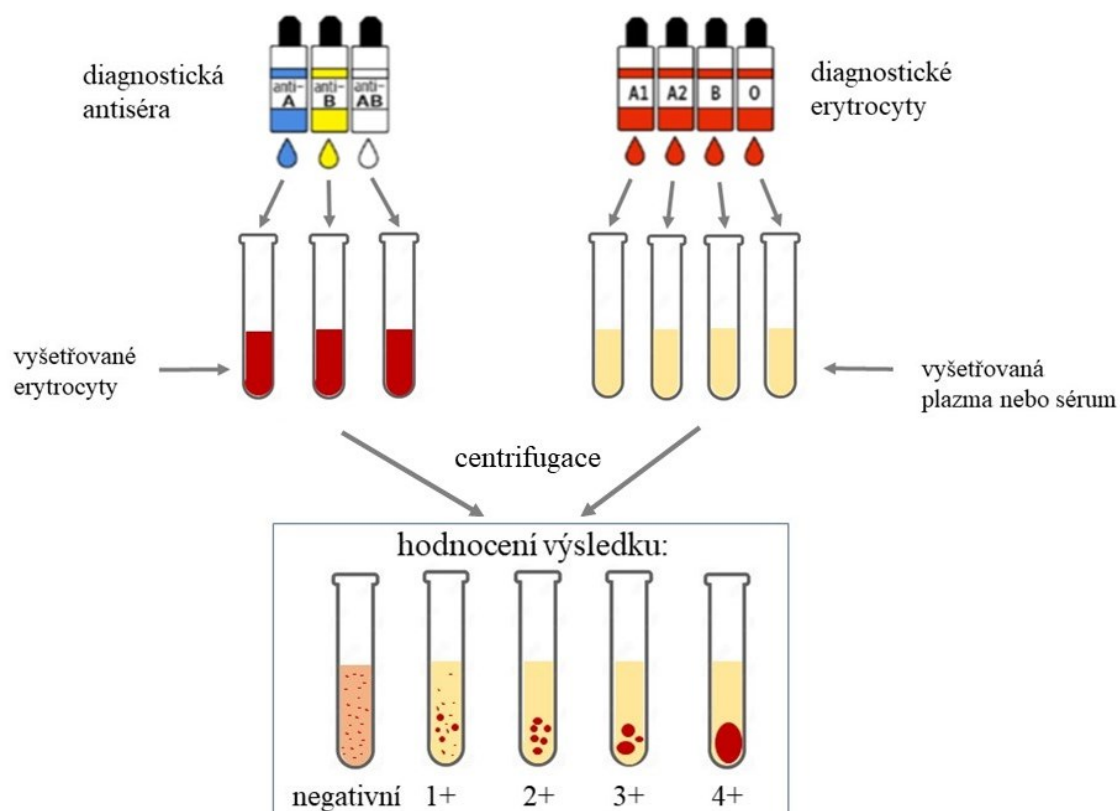
Sklička metoda je jednoduchá a rychlá orientační metoda. Malé množství antiséra je smícháno s kapkou krve neznámé krevní skupiny (**Obrázek 16**). Při pozitivní reakci dochází k aglutinaci erytrocytů u odpovídajícího antiséra (Pilin 2022). Vyšetření je prováděno na podložním sklíčku, případně na porcelánové aglutinační destičce (Fábryová 2012). Doporučuje se použít diagnostické sérum v nadbytku oproti krvi. (Masopust a Písačka 2022). Citlivost této metody je nízká a lze ji snadno ovlivnit. Slabě exprimované nebo nestandardní antigeny nemusí být dostatečně detekovány. Nízké titry anti-A nebo anti-B často vedou k falešně negativním výsledkům (Li a Guo 2022).



Obrázek 16: Výsledky sklíčkového testu u jednotlivých krevních skupin
(zdroj: Svačinová 2020, upraveno)

7.1.2 Zkumavková metoda

Zkumavková metoda je vůči sklíčkové metodě citlivější a rychlejší. Využívá se pro přímou i nepřímou aglutinaci, stanovení protilátek i antigenů. Nyní je metoda využívána především pro určení skupiny AB0 a antigenů pomocí IgM protilátek, případně stanovení titru protilátek. Plná krev se centrifugací rozdělí na erythrocyty a plazmu či sérum. Vyšetřované erythrocyty smísíme s diagnostickými antiséry, vyšetřovanou plazmu nebo sérum smísíme s diagnostickými erythrocyty. Zkumavky odstředíme a hodnotíme vzniklou reakci (**Obrázek 17**). V současné době jsou zkumavky nahrazovány mikrotitračními destičkami nebo metodou sloupcové aglutinace (Masopust a Písačka 2022).

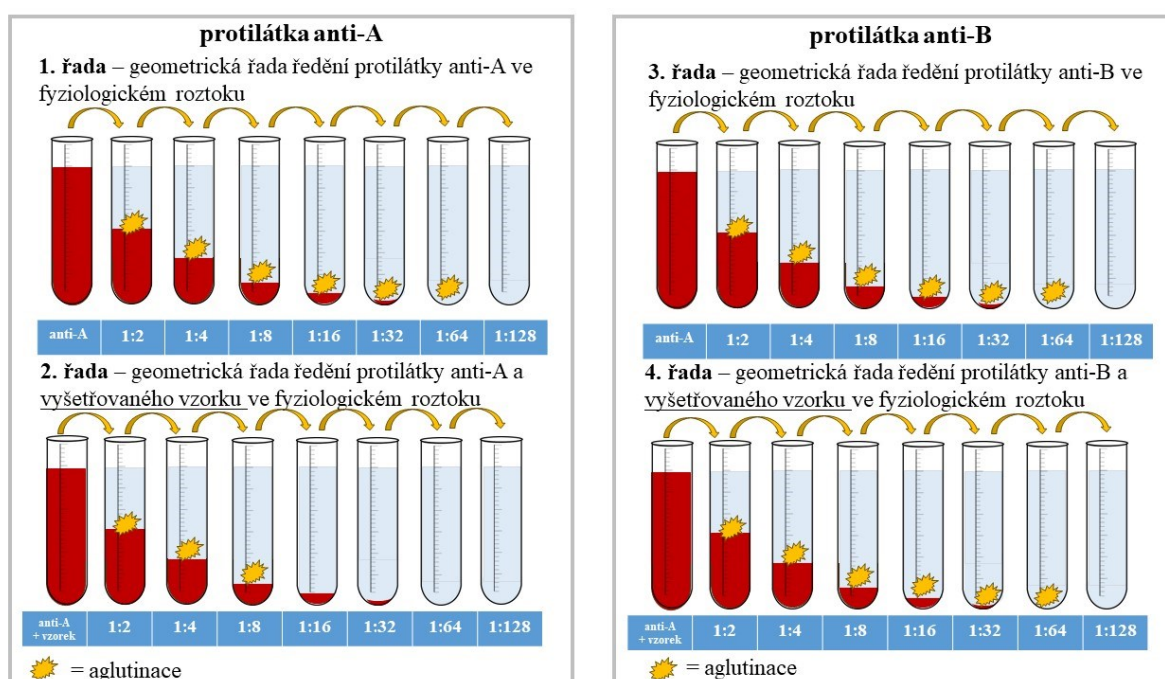


Obrázek 17: Zkumavkový test (zdroj: Masopust a Písačka 2022, upraveno)

- (1+) mnoho malých shluků, volné erythrocyty, jemná granulace
- (2+) malé a střední shluky, velmi málo nebo žádné volné erythrocyty
- (3+) několik velkých shluků erythrocytů
- (4+) jeden viditelný shluk bez volných erythrocytů

7.1.3 Absorpčně-inhibiční metoda (vysycovací metoda dle Therkelsena)

Metoda je prováděna ve zkumavkách nebo v mikrotitračních destičkách uspořádaných do řad. Míra vysycení protilátek je hodnocena předem stanoveným titrem diagnostických erytrocytů. Titr je stanoven jako nejvyšší hodnota ředění, při které došlo k viditelné reakci (aglutinaci). Pokud skvrna obsahuje hledaný antigen, daná protilátka pro hledaný antigen se na ni naváže, tím se inhibuje (vysytí). Nedojde k aglutinaci, což se projeví poklesem titru protilátek (**Obrázek 18**). Jako pozitivní je považován alespoň trojnásobný pokles titru protilátek (Hejna a Zátopková 2013; Pilin a Bauer 2021).



Obrázek 18: Schéma postupu při absorpčně-inhibiční metodě

(zdroj: Pilin a Bauer 2021, upraveno)

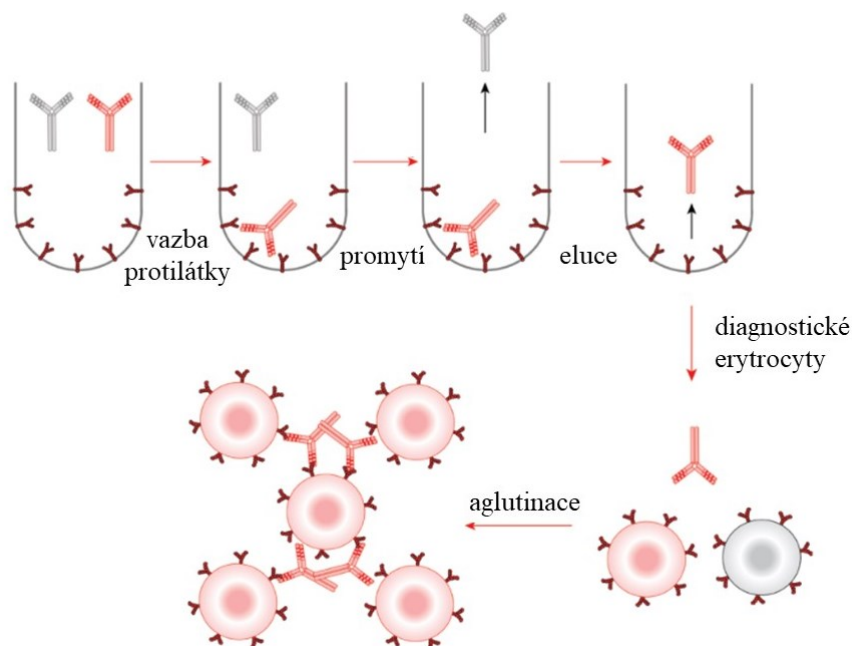
pozitivní výsledek u protilátky anti-A (1. a 2.řada)

negativní výsledek u protilátky anti-B (3. a 4.řada)

7.1.4 Absorpčně-eluční metoda (Nicholls Pereira)

Metoda se vysoce citlivá a lze ji využít k vyšetření krevních skvrn (**Obrázek 19**). Před zahájením samotné analýzy se skvrna rozdělí na dvě části. V první absorpční fázi se na skvrnu nanese protilátky anti-A, anti-B, anti-H a nechá se inkubovat. Přebytké nenavázané protilátky se odstraní promytím v chladném fyziologickém roztoku. Navázané protilátky se ve druhé fázi elují při vyšších teplotách (56 °C). Po přidání

diagnostických erytrocytů dochází k pozitivní reakci – aglutinaci (Pilin a Bauer 2021; Hejna a Zátoková 2013; Li 2015).



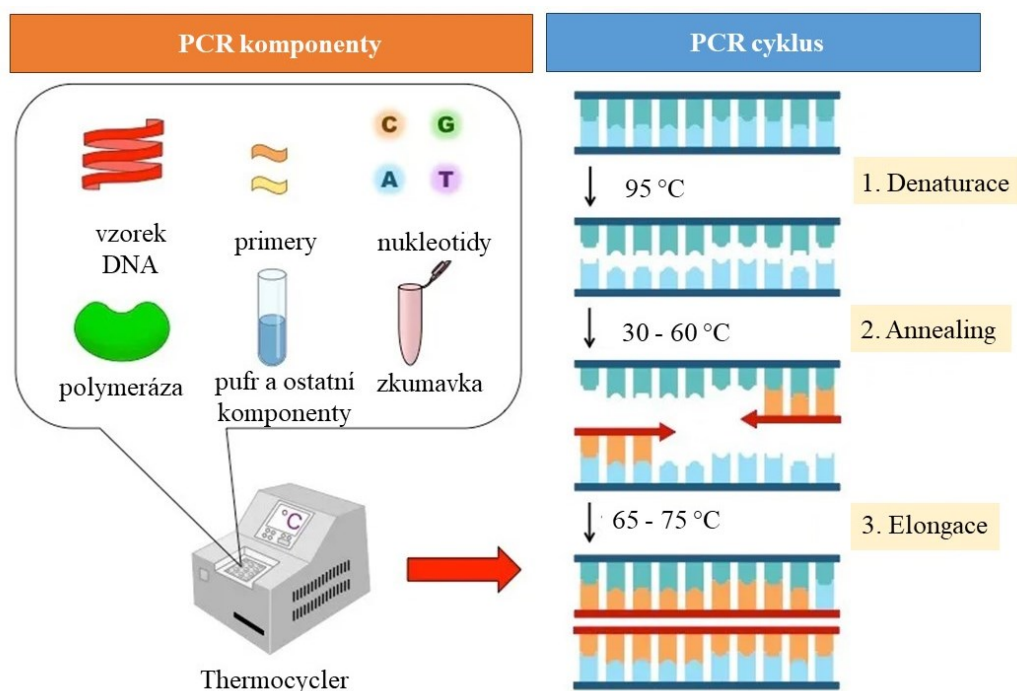
Obrázek 19: Schéma jednotlivých kroků absorpčně-eluční metody
(zdroj: Li 2015, upraveno)

7.2 Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické metody jsou vysoce citlivé, spolehlivé a lze je využít pro identifikaci velmi malého množství vzorku (Otová a Mihalová 2021).

Polymerázová řetězová reakce (PCR – polymerase chain reaction) byla vyvinuta v roce 1984 americkým biochemikem Kary Mullisem, který za tento objev získal Nobelovu cenu (Joshi a Deshpande 2011). PCR je metoda využívající principu zmnožení specifických sekvencí DNA. Jedná se o automatizovaný proces probíhající na tzv. thermocycleru (**Obrázek 20**). Přístroj opakuje cyklicky tři kroky – denaturace DNA, hybridizace (annealing) a tvorbu komplementárního vlákna (elongace). Při denaturaci DNA (95 °C) dochází k rozrušení vodíkových můstků dvouvláknové DNA (dsDNA) a rozvolnění dvoušroubovice na dvě vlákna (ssDNA). V následujícím kroku (při 30–65 °C) dochází k hybridizaci se specifickými místy DNA. V závěrečném kroku (při 65–75 °C) vzniká komplementární vlákno DNA (Panczak a Otová 2013).

K provedení metody je zapotřebí dodat do reakční směsi všechny potřebné komponenty zahrnující DNA templát (vzorek), primery, nukleotidy (adenin, thymin, cytosin, guanin), hořečnaté kationty, reakční pufr, soli s monovalentními kationty, termostabilní polymerázu (*Taq* polymeráza), látky snižující teplotu tání řetězců, vodu, minerální olej a látky snižující riziko kontaminace. Při jedné reakci proběhne 30–40 reakčních cyklů, přičemž množství vzniklých sekvencí exponenciálně roste. Efektivita procesu záleží na struktuře templátové DNA a obou primerů, složení reakční směsi, teplotě v průběhu cyklu a na vlastnostech použité polymerázy (Beránek 2016).



Obrázek 20: Polymerázová řetězová reakce – komponenty a schéma cyklu
(zdroj: faCellitate 2023, upraveno)

8. ZÁVĚR

Imunohistochemické určení krevní skupiny AB0 je užitečná metoda používaná v soudně lékařské praxi zejména v případech, kdy klasické sérologické metody selhávají z důvodu dekompozice tkání nebo absence vzorku krve. Mezi její přednosti patří topické zobrazení detekovaného antigenu v různých tkáních a sekretech. Používá se v případech identifikace krevní skupiny AB0 systému u tkání v pokročilém dekompozičním procesu, při podezření na úmrtí po podání inkompatibilního transfúzního přípravku, nebo při určování krevní skupiny matky a plodu z placenty. V případech zpětného ověřování krevní skupiny u zemřelého lze metodu využít u roky archivovaných parafinových bločků. Metoda není nákladná a dobře slouží jako orientační metoda před samotnou analýzou DNA.

Jako každá diagnostická metoda, má i imunohistochemie svá omezení. Prokazuje pouze krevní skupinový systém AB0 a nezahrnuje další důležité krevní skupinové systémy jako je Rh faktor či MN systém. U hodnocení histologických preparátů je potřeba zkušenosti posuzovatele. Při samotném imunohistochemickém zpracování může nastat několik situací, které mohou preparát znehodnotit, proto je nutné dbát na správné provedení a kontrolu kvality procesu pomocí pozitivní a negativní kontroly. V imunohematologii jsou popsány případy onemocnění, které mohou vést ke změně nebo k útlumu antigenů krevních skupin AB0.

Imunohistochemie je důležitý nástroj soudně lékařské praxe pro určení krevních skupin v obtížných tkáňových vzorcích. Metoda má svá omezení a pro dosažení co nejspolehlivějších závěrů je vhodné kombinovat více laboratorních metod.

9. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky; český význam
ABC	Metoda avidin-biotin komplex
APAAP	Metoda alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza
APES	3-aminopropyltriethoxysilan
DAB	3,3 – diaminobenzidin tetrahydrochlorid
DANSYL	1-dimethyl-aminonaftalen-5-sulfonylchlorid
DAPI	4,6-diamidin-2-fenylindol
DIC	Difuzní intravaskulární koagulace
DNA	Deoxyribonucleic acid; kyselina deoxyribonukleová
dsDNA	Double-stranded deoxyribonucleic acid; dvouvláknová kyselina deoxyribonukleová
FITC	Fluorescein-izothiokyanát
<i>FUT1</i>	Gen kódující fukosyltransferázu 1
HRP	Horseradish peroxidase; křenová peroxidáza
IgA	Imunoglobulin A
IgD	Imunoglobulin D
IgE	Imunoglobulin E
IgG	Imunoglobulin G
IgM	Imunoglobulin M
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
PAP	Metoda peroxidáza-anti-peroxidázový komplex
PCR	Polymerase chain reaction; polymerázová řetězová reakce
RES	Retikuloendotelový systém
SIDS	Sudden infant death syndrome; syndrom náhlého úmrtí kojenců
ssDNA	Single-stranded deoxyribonucleic acid; jednovláknová kyselina deoxyribonukleová
TRITC	Tetramethyl-rhodamin-isothiokyanát
UDP	Uridine Diphosphat; uridindifosfát

10. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Základní struktura imunoglobulinu.....	11
Obrázek 2: Izotypy imunoglobulinů.....	12
Obrázek 3: Aglutinogeny a aglutininy u jednotlivých krevních skupin.....	15
Obrázek 4: Biochemie antigenních substancí AB0 na povrchu erytrocytu.....	16
Obrázek 5: Základní metody imunohistochemie.....	23
Obrázek 6: Zřetězování bílkovin při fixaci tkáně formaldehydem.....	27
Obrázek 7: Vizualizace chromogenu DAB při imunohistochemické reakci.....	29
Obrázek 8: Stavba renálního tělíska.....	33
Obrázek 9: Pozitivní reakce inkompatibilních erytrocytů dárce.....	34
Obrázek 10: Stavba kosterního srdečního svalu, příčný a podélný řez.....	35
Obrázek 11: Průkaz krevní skupinové substance B v kosterním svalu.....	36
Obrázek 12: Stavba placenty.....	37
Obrázek 13: Pozitivní reakce endotelií cév pars fetalis placenty.....	39
Obrázek 14: Stavba vlasu.....	40
Obrázek 15: Imunohistochemické stanovení krevní skupiny z vlasu.....	41
Obrázek 16: Výsledky sklíčkového testu u jednotlivých krevních skupin.....	43
Obrázek 17: Zkumavkový test.....	44
Obrázek 18: Schéma postupu při absorpčně-inhibiční metodě.....	45
Obrázek 19: Schéma jednotlivých kroků absorpčně-eluční metody.....	46
Obrázek 20: Polymerázová řetězová reakce – komponenty a schéma cyklu.....	47

11. SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Dědičnost krevních skupin	17
Tabulka 2: Procentuální zastoupení krevních skupin u různých etnik	18
Tabulka 3: Přehledová tabulka tkání a buněk tkání exprimujících ABH antigen	19
Tabulka 4: Přehledová tabulka tkání a buněk tkání, které neexprimují ABH antigen ...	20
Tabulka 5: Přítomnost solubilního antigenu ve vztahu ke krevním skupinám.....	42

12. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANSO, Itxaso, Andreas NAEGELI, Javier O. CIFUENTE, Ane ORRANTIA, Erica ANDERSSON, Olatz ZENARRUZABEITIA, Alicia MORALEDA-MONTOYA, Mikel GARCÍA-ALIJA, Francisco CORZANA, Rafael A. DEL ORBE, Francisco BORREGO, Beatriz TRASTOY, Jonathan SJÖGREN a Marcelo E. GUERIN, 2023. Turning universal O into rare Bombay type blood. *Nature Communications* [online]. 14(1), 1765. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-023-37324-z

BERÁNEK, Martin, 2016. *Molekulární genetiky pro bioanalytiku*. 1.vydání. Praha: Univerzita Karlova. ISBN 978-80-246-3246-9, str. 76-82.

BERÁNEK, Martin a Miloš TICHÝ, 2013. *Vybrané kapitoly z klinické biochemie: pro studijní program Zdravotnická bioanalytika*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2186-9, str. 161-169.

BERANOVÁ, Milena a Zbyněk TONAR, 2002. *Principy a příklady imunohistochemie* [online]. 2002. B.m.: Výukový portál Lékařské fakulty v Plzni. [vid. 2024-03-14]. Dostupné z: <https://mefanet.lfp.cuni.cz/clanky.php?aid=35>

ČÍŽKOVÁ, Kateřina, 2018. *Základy histochemických metod*. 1. vydání. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-5316-3.

DANIELS, G., 1999. Functional aspects of red cell antigens. *Blood Reviews* [online]. 13(1), 14–35. ISSN 0268960X. Dostupné z: doi:10.1016/S0268-960X(99)90020-6

DANIELS, Geoff a Imelda BROMILOW, 2007. *Essential guide to blood groups*. Malden, Mass ; Oxford: Blackwell Pub. ISBN 978-1-4051-5349-2, str. 1-32.

DEAN, Laura, 2005. *Blood groups and red cell antigens*. B.m.: NCBI Bethesda(MD): National Center for Biotechnology Information (US). Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2261/>.

FÁBRYOVÁ, Viera, 2012. *Imunohematologie a transfúzní medicína pro praxi*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4391-2, str. 21-38.

FACELLITATE, 2023. Advantages and disadvantages of PCR technology. *faCellitate* [online]. [vid. 2024-04-29]. Dostupné z: <https://facellitate.com/advantages-and-disadvantages-of-pcr-technology/>

FERRARI, Ivan Vito a Paolo PATRIZIO, 2021. *Study of Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) and Multiple Sequence Alignment (Clustal-X) of Monoclonal mice/human antibodies* [online]. 10. červenec 2021. [vid. 2024-04-29]. Dostupné z: doi:10.1101/2021.07.09.451785

HANZLOVÁ, Jitka a Jan HEMZA, 2013. *Základy anatomie soustavy trávicí, žláz s vnitřní sekrecí a soustavy močopohlavní. Fakulta sportovních studií Masarykovy univerzity* [online]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/fsps/e-learning/zaklady_anatomie/zakl_anatomie_II/index.html

HEJNA, Petr a Lenka ZÁTOPKOVÁ, 2013. Laboratorní metody v soudním lékařství. In: [online]. přednáška. Ústav soudního lékařství LF UK a FN Hradec Králové. Dostupné z: <https://www.uslhc.cz/userfiles/files/Laboratorni%20metody%20v%20soudnim%20lekarstvi.pdf>

HOŘEJŠÍ, Václav, Jiřina BARTUŇKOVÁ, Tomáš. BRDIČKA a Radek ŠPÍŠEK, 2017. *Základy imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-250-3, str. 159-160.

CHOTTOVÁ-DVOŘÁKOVÁ, Magdalena a Eliška MISTROVÁ, 2018. *Fyziologie krve a základy imunity*. Vydání první. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-3833-1, str. 57-62.

ITO, Nobuaki a Tadaomi HIROTA, 1992. Histochemical and Cytochemical Localization of Blood Group Antigens. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* [online]. **25**(2), III–82. ISSN 00796336. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6336(11)80056-2

JÍLEK, Petr, 2019. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0595-3, str. 46.

JIRKOVSKÁ, Marie, 2006. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 1. vyd. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-263-4, str. 45-49.

JIRKOVSKÁ, Marie, 2013. Tkáň svalová. Obecná charakteristika hladké a příčně pruhované svaloviny (kosterní a srdeční). Funkční morfologie myofibrily. Mechanismus kontrakce. Stavba interkalárního disku. In: [online]. Ústav pro histologii a embryologii, Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta. Dostupné z: <https://docplayer.cz/15813892-Univerzita-karlova-v-praze-1-lekarska-fakulta.html>

JOSHI, Mohini a J. D. DESHPANDE, 2011. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research* [online]. **2**(1), 81–97. ISSN 0976-9633. Dostupné z: doi:10.7439/ijbr.v2i1.83

KITTNAR, Otomar, 2020. *Lékařská fyziologie*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-1963-4, str.137-139; 741-746.

LAWTON, Sandra, 2020. Skin 2: accessory structures of the skin and their functions. *Nursing Times* [online]. Dostupné z: <https://www.nursingtimes.net/clinical-archive/tissue-viability/skin-2-accessory-structures-of-the-skin-and-their-functions-09-12-2019/>

LI, Hong-Yang a Kai GUO, 2022. Blood Group Testing. *Frontiers in Medicine* [online]. **9**, 827619. ISSN 2296-858X. Dostupné z: doi:10.3389/fmed.2022.827619

LI, Richard, 2015. *Forensic biology*. Second edition. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group. ISBN 978-1-4398-8972-5, str. 338-339.

LOFTHOUSE, Emma, 2014. *The accumulation of glutamate in the placental syncytiotrophoblast as a driver of membrane transport*. B.m. [online]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/299465259_The_accumulation_of_glutamate_in_the_placental_syncytiotrophoblast_as_a_driver_of_membrane_transport

- MASOPUST, Jiří a Martin PÍSAČKA, 2022. *Praktická imunohematologie - erytrocyty*. 2., přepracované a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-3377-2, str. 15-33; 39-52; 61-62; 155-182; 197-207.
- MESCHER, Anthony L., 2018. *Junqueirovy základy histologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-324-1, str. 1-17; 196-210; 398-401; 484-486.
- MURRAY, Robert K. a Bohuslav MATOUŠ, 2012. *Harperova ilustrovaná biochemie*. 5. české vyd., 1. v nakl. Galén. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-907-7, str. 644-661.
- NOVUSBIO, Immunohistochemistry (IHC). *Novusbio* [online]. Dostupné z: <https://www.novusbio.com/application/ihc>
- OKODUWA, Stanley I.R., 2013. Blood Group and Genotype Compatibility. *Infohealth Awareness Article*. **1**, 84–87.
- OTOVÁ, Berta a MIHALOVÁ, 2021. *Základy biologie a genetiky člověka*. Place of publication not identified: Charles University in Prague, Karolinum Press: Charles University in Prague, Karolinum Press. ISBN 978-80-246-4583-4, str. 131.
- PACKER, Davin, 2021. The history of the antibody as a tool. *Acta Histochemica* [online]. **123**(4), 151710. ISSN 00651281. Dostupné z: doi:10.1016/j.acthis.2021.151710
- PANCZAK, Aleš a Berta OTOVÁ, 2013. *Lékařská biologie a genetika (III. díl)*. 1.vydání. B.m.: Karolinum Press. ISBN 978-80-246-2415-0.
- PEDAL, I., K. KUHN a J. HÜLLE, 1985. Immunhistochemische Bestimmung von mütterlicher und kindlicher Blutgruppe (AB0) an reifem Placentagewebe. *Zeitschrift für Rechtsmedizin* [online]. **94**(2) [vid. 2024-02-19]. ISSN 0044-3433, 1437-1596. Dostupné z: doi:10.1007/BF00198683
- PENKA, Miroslav a Eva TESAŘOVÁ, 2012. *Hematologie a transfuzní lékařství. II, Transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3460-6, str. 17-32.
- PILIN, Alexander, 2022. *Soudní lékařství*. Vydání první. Praha: Univerzita Karlova, nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-5013-5, str. 431-432.
- PILIN, Alexander a Libor BAUER, 2021. Laboratorní zkoumání biologických stop v soudním lékařství. In: [online]. přednáška. Ústav soudního lékařství a toxikologie 1.LF Univerzita Karlova. Dostupné z: <https://soudni.lf1.cuni.cz/file/5716/Laboratorn%C3%AD%20metody.pdf>
- RASHID, Tabassum, Aadina MEHRAJ, Nawsheena MUSHTAQ a Shabhat RASOOL, 2022. Origin and history of immunogenetics. In: *A Molecular Approach to Immunogenetics* [online]. B.m.: Elsevier, s. 1–19 [vid. 2024-04-29]. ISBN 978-0-323-90053-9. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-90053-9.00015-4
- RAVN, Vibeke a Erik DABELSTEEN, 2000. Tissue distribution of histo-blood group antigens. *APMIS* [online]. **108**(1), 1–28. ISSN 0903-4641, 1600-0463. Dostupné z: doi:10.1034/j.1600-0463.2000.d01-1.x

ŘEHÁČEK, Vít a Jiří MASOPUST, 2013. *Transfuzní lékařství*. 1. vyd. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4534-3, str. 97; 110; 135-143; 157.

SUVARNA, S. Kim, Christopher LAYTON a John D. BANCROFT, ed., 2019. *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. Eighth edition. London? Elsevier. ISBN 978-0-7020-6886-7, str. 337-394.

SVAČINOVÁ, Jana, 2020. Fyziologie I – cvičení. *Lékařská fakulta, Masarykova univerzita* [online]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/podzim2020/BKFY0121c/um/BC_teorie_krev_5-7_tyden.pdf

SZULMAN, A.E., 1987. Evolution of ABH blood group antigens during embryogenesis. *Annales de l'Institut Pasteur / Immunologie* [online]. **138**(6), 845–847. ISSN 07692625. Dostupné z: doi:10.1016/S0769-2625(87)80004-1

ŠTEFAN, Jiří, 2012. *Soudní lékařství a jeho moderní trendy*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3594-8, str. 285; 294-296.

ŠUŠOLÍKOVÁ, Anna, 2016. *Podstriedy imunoglobínov IgG - toeria a využitie v praxi* [online]. Dostupné z: <https://www.unilabs.sk/clanky-invivo/podtriedy-imunoglobinov-igg-teoria-vyuzitie-v-praxi>

TOUPALÍK, Pavel, 2001. *Imunohistochemické diagnostické metody v soudnělékařské praxi*. 1. vyd. Praha: Univerzita Karlova v Praze : Nakladatelství Karolinum. ISBN 978-80-246-0163-2.

UNO, Akari Takaya, Satomu MORITA, Satoshi FURUKAWA, Katsuji NISHI a Masahito HITOSUGI, 2016. Determination of Both Fetus' and Mother's Blood Type from an Autopsy Case Immersed in Formalin for Over 50 Years. *Journal of Forensic Sciences* [online]. **61**(4), 1131–1134. ISSN 0022-1198, 1556-4029. Dostupné z: doi:10.1111/1556-4029.13071

VAJNER, Luděk, Jiří. UHLIK a Václava KONRÁDOVÁ, 2018. *Lékařská Histologie II. Mikroskopická Anatomie*. 3.vydání. B.m.: Karolinum Press. ISBN 978-80-246-3827-0, str. 111-115.