

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2007

Marcela Jarošová

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

ZAVEDENÍ ANTIGENNÍHO MAPPINGU DO NON-
MOLEKULÁRNÍ DIAGNOSTIKY EPIDERMOLYSIS
BULLOSA CONGENITA
(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Odborný školitel: MUDr. Karel Veselý

Konzultant: prof. MUDr. Jan Buček, CSc.

Práce provedena na I.patologicko-anatomickém ústavu
LF MU BRNO

Hradec Králové, 2007

Marcela Jarošová

Poděkování

Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

MUDr. Karel Veselý

Prof. MUDr. Jan Buček, CSc.

Prof. MUDr. Aleš Rejthar, CSc.

Za cenné rady a připomínky

OBSAH

ABSRAKT

SEZNAM ZKRATEK

1. ÚVOD

2. TEORETICKÁ ČÁST

- 2.1. Mikroskopická anatomie kůže
- 2.2. Struktura dermoepidermální junkce
- 2.3. Obecné metody diagnostiky
- 2.4. Klasifikace mechanobulózních dermatóz obecně
- 2.5. Epidermolysis bullosa simplex (EBS)
- 2.6. Epidermolysis bullosa junkční
- 2.7. Epidermolysis bullosa dystrofická

3. CÍL PRÁCE

4. LABORATORNÍ ČÁST

- 4.1. Použitá metoda – nepřímá imunofluorescence
- 4.2. Protokolární postup práce
- 4.3. Konkrétní práce s primárními protilátkami
- 4.4. Konkrétní práce se sekundárními protilátkami
- 4.5. Přístrojové vybavení

5. VÝSLEDKY A DOKUMENTACE

6. DISKUZE

7. ZÁVĚR

8. SEZNAM LITERATURY

Jarošová Marcela: **Zavedení antigenního mappingu do non-molekulární diagnostiky epidermolysis bullosa congenita.**

ABSTRAKT

Východiska práce. Přesná diagnostika vrozené epidermolysis bullosa vychází z genetické definice jednotlivých jednotek tohoto onemocnění. Práce vychází z minimalizované analýzy imunofenotypu kůže, který jednoznačně odráží dané genetické odchylky.

Metody. Základní metodou bylo použití imunohistologie s vizualizací reakce antigen-protilátka pomocí fluorescence. Bylo nutno vytitrovat optimální koncentrace primárních i sekundárních protilátek a standardizovat odběr i zpracování materiálu. Každý vyšetřovaný vzorek pacienta byl srovnáván se známou reakcí použité protilátky v kůži zdravého dárce.

Výsledky. Do současnosti jsme pomocí antigenního mappingu vyšetřili 7 pacientů s výsledky, které byly v dobré korelaci s nálezy při elektron-mikroskopickém vyšetření a při mutační DNA analýze.

Závěr. Vytčených cílů bylo dosaženo zavedením antigenního mappingu, který je plně použitelný k diagnostice EBC na specializovaném centrálním pracovišti. Do budoucna bude vhodné rozšířit základní panel primárních protilátek a testovat nejčastěji postižené molekuly (např. laminin 5, kolagen VII) několika různými protilátkami proti různým částem studovaného proteinu.

Jarošová Marcela: The Introducing of Antigen Mapping into the Non-Molecular testing of Epidermolysis Bullosa Congenita.

SUMMARY

The background of the study: An exact diagnosis of congenital epidermolysis bullosa is based on genetic definitions of subtypes of this disease. The objective is to introduce the analysis of immunophenotype of skin, the so-called antigen mapping which may exactly determine the individual genetic alterations to routine laboratory workload.

Methods: We use methods of immunohistochemistry with visualization of reaction antigen-antibody by indirect fluorescence. We had to assemble appropriate panel of commercially available primary antibodies and to find optimal concentrations of primary and secondary antibodies. Also it was necessary to standardize the sampling and processing of material. Each specimen of patient's skin in question was compared with a known reaction of the antibody in normal human skin.

Results: To date, a group of seven patients has been analysed using the antigen mapping leading to results that were in good correlation with ultrastructural findings acquired in electron-microscopic examination and in mutational DNA analysis.

Conclusion: The antigen mapping in the nonmolecular testing of EBC was successfully introduced to our laboratory and given diagnostic procedure is fully applicable to identifying and subtyping of EBC. In future it will be desirable to expand the panel of primary antibodies to test the most frequently affected molecules (e.g. laminin 5, collagen VII) by various antibodies directed against different parts of the involved protein.

SEZNAM ZKRATEK

AD	autosomálně dominantní
AM	antigenní mapping
AR	autosomálně recesivní
bb	buňky
BM	bazální membrána
BPAg1	antigen bulózního pemfigoidu 1
BPAg2	antigen bulózního pemfigoidu 2
CK	cytokeratin
CK HMW	vysokomolekulární cytokeratin (high molecular weight)
DDEB	dominantní dystrofická epidermolysis bullosa
DEB	dystrofická epidermolysis bullosa
DEJ	dermo-epidermální junkce
EB	epidermolysis bullosa
EBC	epidermolysis bullosa congenita
EBD	epidermolysis bullosa dystrophica
EBJ	epidermolysis bullosa junkční
ELMI	elektronová mikroskopie
FITC	fluoresceinisothiokyanát
GABEB	generalizovaná benigní atrofická epidermolysis bullosa
GI	gastrointestinální
GIT	gastrointestinální trakt
HE	hematoxylin eosin
HS	Hallopeau Siemens
IHC	imunohistochemie
JEB	junkční epidermolysis bullosa
JEB PA	junkční epidermolysis bullosa s pylorickou atresíí
JEB-H	junkční epidermolysis bullosa-Herlitz
kD	kiloDalton
LB	lamina basalis
LD	lamina densa
LL	lamina lucida
NHS	normal human skin
PAS	Periodic acid Schiff
RDEB	recesivní dystrofická epidermolysis bullosa
SLD	sublamina densa

1. ÚVOD

Onemocnění epidermolysis bullosa congenita (EBC) patří do heterogenní skupiny chorob, projevujících se **tvorbou puchýřů na kůži nebo sliznicích**, a to po drobných traumatech nebo i spontánně. Podle současných znalostí jde o nevhodný název a málo výstižný.(1)

Epidermolysis odpovídá pouze simplexní formě, kde se jedná o skutečnou lýzu epidermálních buněk s tvorbou intraepidermálního puchýře. V dnešní době se užívá pojmu mechanobulózní dermatózy.(1)

Puchýře u tohoto kongenitálního onemocnění většinou vznikají po mechanickém dráždění a rovina štěpení může být epidermální (**EB SIMPLEX**), v oblasti dermoepidermální junkce (**EB JUNKČNÍ-ATROFICKÁ**) nebo subepidermálně (**EB DYSTROFICKÁ**). Původní klasifikace byla založena jen na klinických projevech, zejména na způsobu hojení puchýřů, postižení nehtů, sliznic, zubů, vlasů a dalších systémových projevech. Postupně bylo rozpoznáno více než dvacet tři klinických obrazů, které se liší průběhem onemocnění, dědičností, elektron-mikroskopickými (ELMI) a imunohistochemickými (IHC) nálezy, genetickými mutacemi a prognózou. U většiny případů lze prokázat autosomálně recesivní (AR) nebo autosomálně dominantní (AD) dědičnost. Existují i případy, kde lze předpokládat spontánní dominantní mutace.(1)

Incidence onemocnění se liší v jednotlivých zemích, těžší recesivní formy se pohybují asi 1:200 000 až 1:500 000 porodů. Odhadovaný počet pacientů s EB v České republice je asi 120.(6)

Pro EBC je typické, že závažnost projevů onemocnění se může lišit i v jedné rodině. V novorozeneckém období mohou být projevy dramatičtější, než později (EB SIMPLEX – Dowling – Meara, EB JUNKČNÍ – mitis (non-Herlitz).

Prognosticky závažné AR dystrofické formy EBC a junkční formy EBC, u kterých dochází k těžkému postižení až plné invaliditě pacientů, vedou k hlubokému zásahu do rodinného soužití.(1)

2. TEORETICKÁ ČÁST

2. 1. MIKROSKOPICKÁ ANATOMIE KŮŽE

Kůže se skládá z **epidermis** (pokožka), rohovějícího vrstevnatého dlaždicového epitelu, původem z ektodermu a **dermis** (škára), vrstvy tuhého vaziva, které vzniklo diferenciací z mezenchymu dermatomů. Spojení kůže s podkladem zajišťuje různě tlustá **hypodermis** (podkožní vazivo, tela subcutanea).(2)

Epidermis – je v podstatě mnohvrstevný dlaždicový epitel, jehož buňky (bb), keratinocyty, směrem k povrchu postupně rohovějí a průběžně se odlučují v podobě jemných šupinek. Do populace epidermálních keratinocytů jsou vloženy buňky se speciální funkcí, které jsou trojího typu: melanocyty, Langerhansovy buňky a buňky Merkelovy. Mikroskopicko-anatomicky pokožka sestává z pěti vrstev, které od škáry směrem k povrchu následují v pořadí: **stratum basale, stratum spinosum, stratum granulosum a stratum corneum.**(2)

Stratum basale - tvořeno jednou vrstvou kubických až cylindrických bb, jejichž jádra jsou uložena většinou apikálně. Báze bb jsou více či méně členité a k lamina basalis jsou poutány hemidesmosomy. Na laterálních površích bb jsou hojné interdigitace, které končí v desmozomech. Cytoplazma obsahuje málo organel, jsou v ní hojná asi 10 nm tlustá intermediární filamenta – tonofilamenta.(2)

Stratum spinosum – je součástí epidermis, složena z kubických až polyedrických bb. Každá obsahuje jedno centrálně uložené jádro. Mezi bb jsou široké intercelulární štěrbiny, patrné již ve světelném mikroskopu. Buňky vysílají do mezibuněčných prostor četné interdigitace a silnější výběžky, kterými jsou navzájem v kontaktu. Spojení mezi výběžky a interdigitacemi sousedních bb jsou zpevněny desmosomy, které zvyšují jejich vzájemnou soudržnost při tlaku a tření. Svazy tonofilament, protkávající cytoplazmu keratinocytů všemy směry, pravidelně vstupují i do cytoplazmatických výrůstků a interdigitací, kde končí v osmiofilních ploténkách desmosomů.(2)

Stratum granulosum – se skládá u tenké kůže z jedné, u tlusté ze 3-5 vrstev oploštělých bb s centrálně uloženými jádry. Bb jsou mezi sebou spojeny desmosomy, v lehce bazofilní cytoplazmě obsahují cytoplazmatická granula dvojího typu: keratohyalinová a lamelární. Keratohyalinová granula vznikají syntetickou činností volných ribosomů, nemají membránu, chemicky se skládají z proteinů s vysokým obsahem histidinu a cysteinu, jsou velká 2 až 3 μm.

Stratum corneum – rohová vrstva, skládá se z oploštělých zrohovělých a těsně k sobě přiložených šupinek. Následkem rozvolnění desmosomů se snižuje soudržnost mezi šupinkami, ty se z povrchu neustále odlupují (**stratum disjunctum**). Zrohovělé keratinocyty jsou bezjaderné elementy, obsahují svazky kondenzovaných tonofilament. Tonofilamenta se skládají z vláknitého dvojlomného skleroproteinu, tzv. keratinu, chemicky se vyznačujícího přítomností disulfidových můstků a alfa-helixovou konformací.(2)

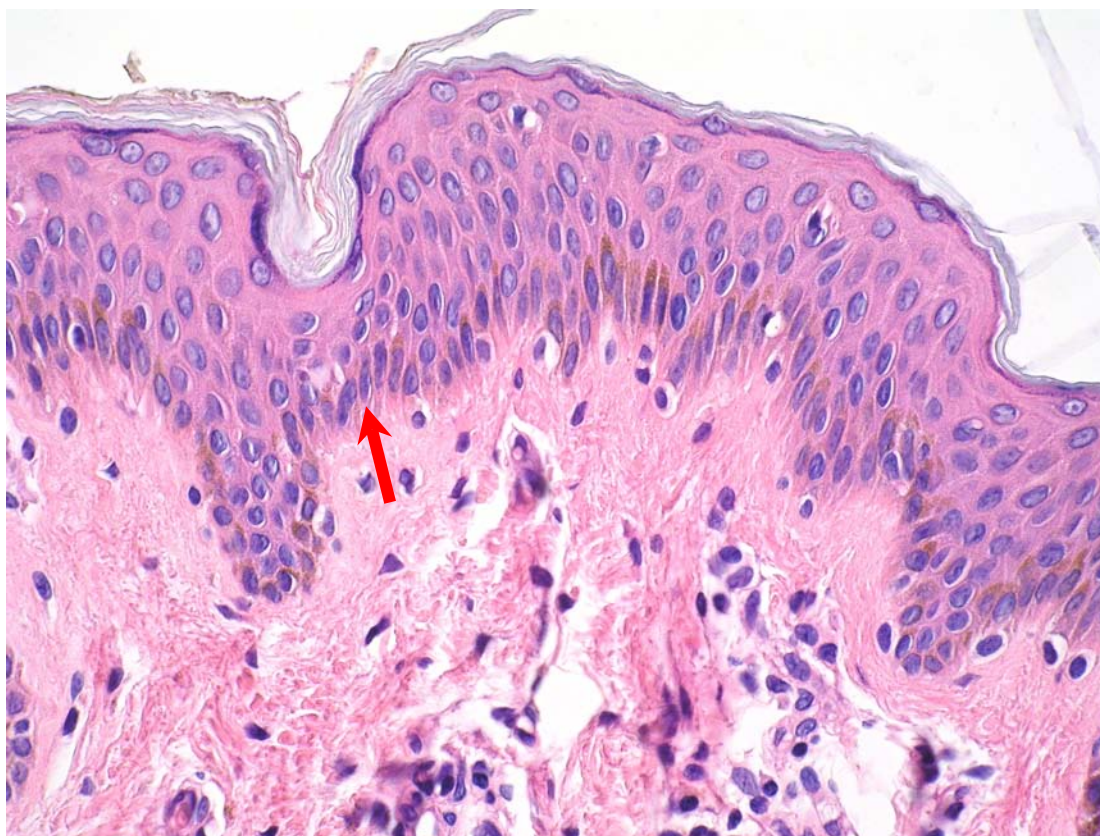
Dermis (škára, corium) – spojuje pokožku s podkožním vazivem. Rozlišujeme dvě vrstvy: pod epidermis **stratum papillare** a hlouběji uložené, hutnější **stratum reticulare**. (2)

Stratum papillare – proti pokožce vybíhá v četné výběžky – koriové papily. Papilární vrstvu od stratum basale epidermis odděluje basální membrána (BM), která představuje sumační obraz komplexní DEJ. Stratum papillare je tvořeno řídkým kolagenním vazivem, obsahujícím hojná elastická vlákna, četné vazivové bb, krevní cévy a senzitivní vazivová zakončení.(2)

Stratum reticulare – skládá se z kolagenního vaziva neuspořádaného typu, obsahujícího jen málo fibrocytů. Celá vrstva je protkána sítí elastických vláken, ztenčujících se směrem ke stratum papillare. Do škáry, zejména stratum reticulare, jsou zasazena přídatná kožní adnexa: vlasové folikuly s vlasy, potní a mazové žlázy.(2)

Tela subcutanea – podkožní vazivo připojuje kůži ke svalovým povázkám, periostu, perichondriu a dovoluje její pohyb a klouzání po tomto podkladu. Podstatnou část tela subcutanea tvoří husté kolagenní vazivo, dále obsahuje tukové bb. Strana podkožního vaziva přivrácená k podkladu bývá zhuštěna v souvislou blánu, označovanou jako fascia superficialis.(2)

Orientace v histologickém preparátu normální lidské kůže (normal human skin, NHS) je velmi důležitá při hodnocení vzorku pacienta. Preparát normální kůže nám slouží jako pozitivní kontrola, s kompletně zachovanou antigenní strukturou DEJ.



Obrázek 1. Normální zdravá lidská kůže, barveno HE, původní zvětšení 200x, bazální keratinocyty označeny šipkou

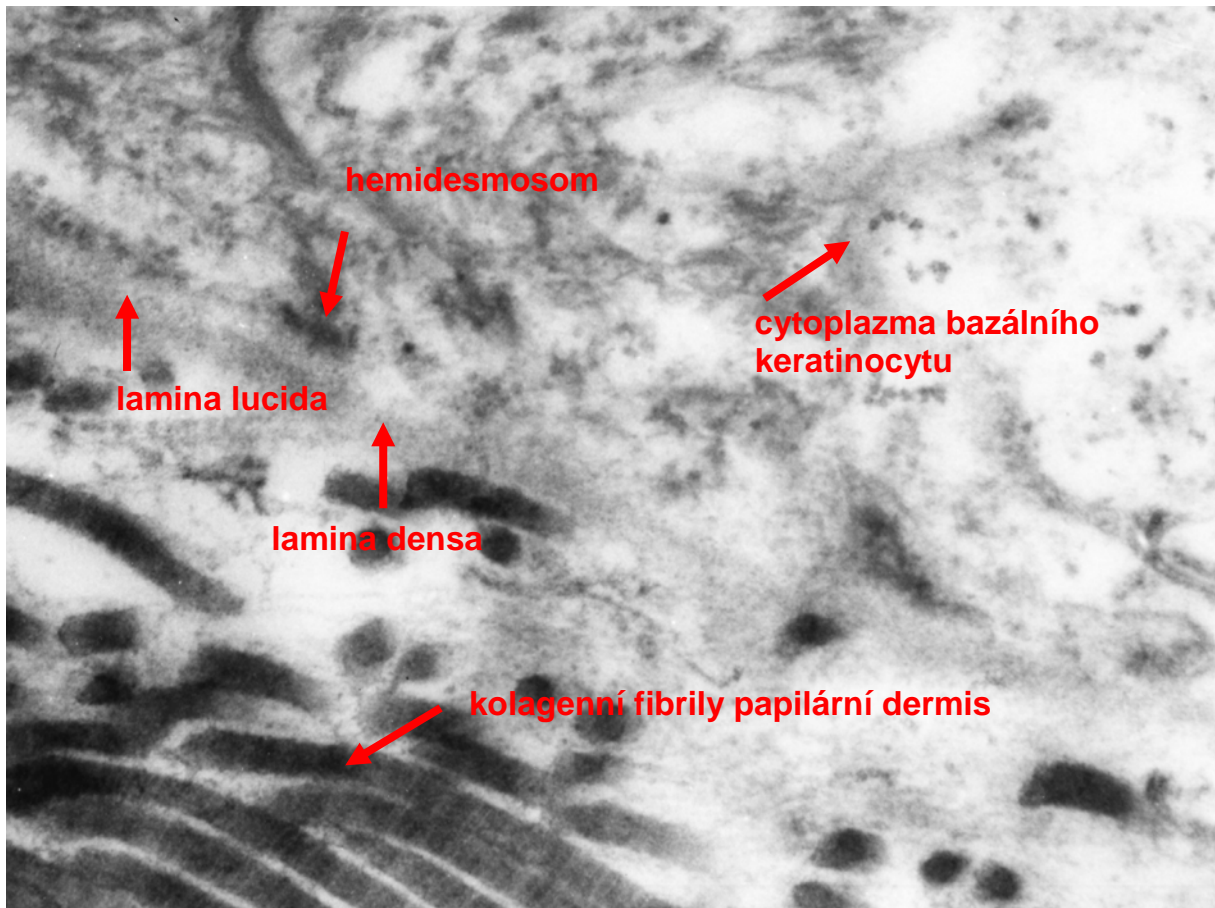
2. 2. STRUKTURA DERMOEPIDERMÁLNÍ JUNKCE

V normálním histologickém obraze je dermoepidermální oblast vymezena:

- **bazálními keratinocyty** - mají v pravidelných intervalech, podél plazmatické membrány, která se obrací směrem k lamina lucida (LL) – hemidesmosomy.(3)
- **epidermální bazální membránou (BM)** – je ve světelné mikroskopii výrazně PAS (Periodic Acid Schiff) pozitivní a neodpovídá elektron–mikroskopické struktuře skutečné BM, tedy lamina densa (LD). LD je asi 45 nm silná. Ve světelné mikroskopii PAS pozitivní zóna tzv. BM je v průměru 20krát silnější a představuje sumační obraz daný jak lamina lucida (LL), lamina densa (LD) a sublamina densa (SLD). Sumační obraz PAS pozitivní BM vzniká zřejmě vysokou účastí neutrálních polysacharidů ve všech zmíněných vrstvách.(1)
- **vazivovými strukturami** v nejtěsnější blízkosti BM.(1)

V ultrastruktuře dermoepidermální jункce konvenčně rozděljuje na čtyři oblasti:

- a) plazmatická membrána bazálních keratinocytů.
- b) lamina lucida (asi 35 nm široká).
- c) lamina densa (asi 30-50 nm široká).
- d) subbazální fibroretikulární vrstva (subbazální fibrózní vrstva – sublamina densa, která obsahuje alespoň 17 různých antigenů).(3)



Obrázek 2. Ultrastruktura oblasti DEJ na elektronogramu. Původní zvětšení 18 000x.

Ad a) **Plazmatická membrána bazálních keratinocytů** obracející se do oblasti LL nejnižší položených bazálních bb má vytvořeny hemidesmosomy, do nichž se upínají cytokeratinová tonofilamenta (**CK 5,14**).(1)

Intracelulární část hemidesmosomů obsahuje **antigen bulózního pemfigoidu 1 (BPAg1)**. Tento protein je propojen s keratinovým cytoskeletem a připojuje jej ke komplexu kotvících filament. **Plectin** je velká, multidoménná adhesní molekula (cca. 500 kD), je koncentrován převážně v basálních buňkách epidermis, kde je strukturální součástí hemidesmosomů. V hemidesmosomech spojuje plectin střední keratinová (tono)filamenta

s cytoplasmatickou doménou beta-4 podjednotky alfa-6 beta-4 integrinu a váže se i s intracytoplazmatickou částí BPAg2 .

Keratiny (cytokeratiny, CK) – tvoří rozsáhlou skupinu více jak třiceti antigenních subtypů. Rozdělují se do dvou hlavních skupin:

- malé acidické keratiny (typ I)
- velké, neutrální nebo bazické keratiny (typ II)

In vivo jsou keratiny v párech, kdy jeden přispívá druhému, vždy po jednom z každé skupiny (tj. bazální keratiny obsahují typy 5 a 14, suprabazální typy keratinů jsou **typy 1 a 10**). Oploštělé a plně diferencované části stratum corneum obsahují převážně keratin 1 a 10. Hyperproliferativní stavy, jako je hojení ran, jsou spojeny s expresí keratinu 6 a 16. První typ keratinu kóduje chromozom 17, zatímco typy II jsou kódovány na chromozomu 12.

Keratiny jsou tvořeny alfa helikální spirálou z 310 aminokyselin a nehelikálních částí, které tvoří hlavovou a koncovou doménu. Typy keratinu I a II ve svých stočených částech tvoří heterodimery a každé dva heterodimery tvoří stabilní heterotetramery. Více jak 5 000 heterotetramerů tvoří jedno 10 nm keratinové filamentum, které je 20 μm – 30 μm dlouhé. Keratiny tvoří síť kolem jádra a upínají se do desmosomů a bazálně do hemidesmosomů.(3)

Hemidesmosomy mají v průměru 500 – 1 000 nm, jejich počet je na jednotku délky cytoplazmatické membrány konstantní, a to bez ohledu na věk, pohlaví a eventuálně i místo odběru (kůže, rohovka, bukalní sliznice). Na 1,8 μm cytoplazmatické membrány připadá jeden hemidesmosom.(1)

Ad b) **Lamina lucida** obsahuje (stejně jako oblast cytoplazmatické membrány) proteiny, které jsou zakotveny uvnitř cytoplazmy bazálního keratinocyty a mají rozsáhlé externí části v oblasti lamina lucida, kde se váží na další složky, např. lamininy. Je pravděpodobné, že tyto extracelulární struktury, ať už spojené s LL (lamininy), tak i transmembranózní proteiny, které vycházejí z bazálních keratinocytů – **antigen bulózního pemfigoidu 2 (BPAg2, kolagen XVII)** a integriny (**zvláště alfa 6 beta 4 integrin**) ve svých vzájemných interakcích odpovídají za adhezi bazálních bb k lamina densa.(1)

Integriny představují skupinu heterodimerních membránových glykoproteinů, které mají řadu funkcí, představují receptor pro extracelulární adhezní molekuly, fungují jako adhezní molekuly mezi jednotlivými bb, jsou důležité v řadě biologických procesů (agregace trombocytů, zánět, imunitní reakce, vznik nádorových metastáz aj). Všechny integriny jsou složeny ze dvou nekovalentně vázaných podjednotek (alfa, beta), rozdělují se do tří skupin (beta 1, beta 2, beta 3). Váží se na celou řadu matrixových proteinů (kolagen, laminin,

fibronectin a další). Klinický význam je patrný při jejich chybění nebo anomální stavbě. Odchylná stavba způsobuje některé těžké formy epidermolýzy (např. EBJ).(1)

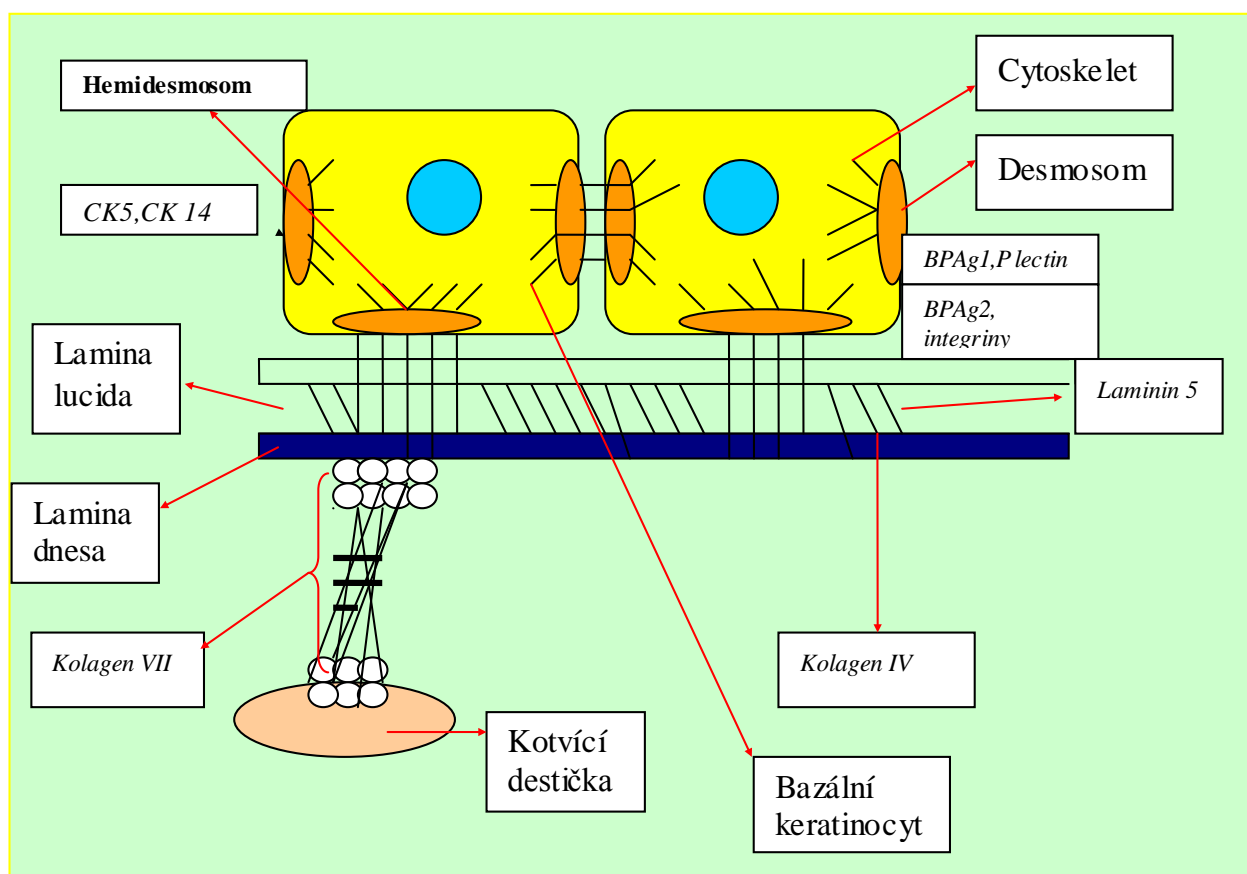
Je zřejmé, že alfa 6 beta 4 integrin je receptorem pro laminin 1 a 5.

Laminin 5 (kalinin, nicein, BM 600) je rozpoznáván monoklonální protilátkou GB3, je ligandem pro alfa 3 beta 1 integrin, který je rovněž exprimován bazálními keratinocyty a fibroblasty.(3)

Laminin je heterodimerický protein, který se skládá ze tří polypeptidových řetězců alfa 3, beta 3, gamma 2, z nichž každý je kódován odlišným genem, LAMA3, LAMB3, LAMC2. Když jsou protilátky proti lamininu 5 injekčně podány dospělé myši, vzniknou subepidermální puchýře.(4)

Ad c) **Lamina densa** - je epidermálního původu, přibližně 30-50 nm široká. LD je tvořena mřížkovitě uspořádanými strukturálními proteiny, jejichž hlavní komponentou je **kolagen IV**. Jinými antigenními komponentami jsou laminin 1, nidogen, percelan, heparan sulfát a chondroitin sulfát.(4)

Ad d) **Sublamina densa** – obsahuje velké množství komponent, nejdůležitější se zdají kotvící fibrily a mají nejdůležitější roli v udržení integrity této oblasti. Kotvící fibrily se na jedné straně upínají do lamina densa, na straně druhé do kotvících destiček v papilární dermis. Kotvící destičky jsou tvořeny kolagenem IV, lamininem a dalšími složkami.(4) Kotvící fibrily jsou tvořeny **kolagenem VII_a** jsou syntetizovány fibroblasty i keratinocyty. Kolagen VII se pevně váže s fibronectinem. Množství a denzita kotvících fibril jsou různé v různých částech epidermis těla.(1)



Obrázek 3. Schematické znázornění skladby dermoepidermální junkce, volně podle (9)

2. 3. OBECNÉ METODY DIAGNOSTIKY

Základem spolehlivé diagnózy je klinické vyšetření kožním specialistou rozšířené o celkové vyšetření pacienta. Klinické vyšetření je v těchto případech nutně doplňováno i genetickou anamnézou nejbližších příbuzných a celé rodiny. Podezření na mechanobulózní onemocnění je potom potvrzeno rozšířeným histopatologickým vyšetřením, které zahrnuje hodnocení polotenkových řezů ze vzorků zalitých do epoxydových nebo jiných pryskyřic, hodnocení ultratenkých řezů v elektronovém mikroskopu a hodnocení elektronogramů. V našem případě používáme transmisní elektronovou mikroskopii.

V současnosti, s bližší znalostí biologického podkladu onemocnění, je diagnostika s výhodou rozšířena o mapování charakteristických antigenů (jejich detekce) z oblasti dermoepidermální junkce – antigenní mapping. Zde je využita technika imunohistologie s použitím monoklonálních nebo polyklonálních protilátek, které reagují na kryostatových

nebo parafinových řezech. My jsme zvolili kryostatové řezy a vizualizaci navázané protilátky metodu nepřímé imunofluorescence. Antigenní mapping se stal vedle konvenčního histologického vyšetření a elektronové mikroskopie takřka nezbytným k zařazení onemocnění do jedné ze tří základních skupin a slouží současně k navedení molekulárně patologické a genetické laboratoře ke konkretizaci vyšetřovaného místa změn v genomu.

Dalšími typy diagnostického vyšetření jsou genetické a molekulárně patologické metody, vesměs finančně vysoce náročné a vyžadující speciální materiální i personální vybavení pracoviště. Tyto metody však umožňují bezpečné rozlišení subklasifikačních variant základních skupin onemocnění.

2. 4. KLASIFIKACE MECHANOBULÓZNÍCH DERMATÓZ (OBECNĚ)

EBC je heterogenní skupina chorob, u nichž kůže, někdy i sliznice vytvářejí **puchýře jako odpověď na mírné trauma (tření či tlak)** - odtud mechanobulózní.(3) Převážně jde o choroby vrozené, většinou jde o autosomální způsob dědičnosti.(1) EBC představují skupinu chorob, které mají rozličnou prognózu, příznaky se během života mohou měnit. Klasifikace závisí zejména na :

- klinických projevech a jejich vývoji
- přítomnost nebo chybění extrakutánních pojevů
- způsobu dědičnosti
- ultrastrukturálním a imunohistochemickým nálezem
- odlišnosti poruch na molekulárně biologické úrovni (3)

U pacientů s podezřením na EBC se doporučuje vyšetřit rodokmen, zaměřit se na vznik prvních projevů onemocnění, přítomnost extrakutánních projevů (oči, larynx, gastrointestinální trakt (GIT), muskuloskeletální systém, defekty zubní skloviny aj.), které mohou pomoci určit některé varianty tohoto onemocnění.(3)

Rozlišujeme tři hlavní skupiny:

- **Epidermolysis bullosa simplex (EBS)** – je úroveň štěpení uvnitř epidermis jako následek cytolýzy

- **Epidermolysis bullosa junctionalis (JEB)** – charakterizována štěpením uvnitř lamina lucida
- **Epidermolysis bullosa dystrophica (EBD, DEB)** – u této formy dochází ke štěpení těsně pod lamina densa v oblasti kotvících fibril

2. 5. EPIDERMOLYSIS BULLOSA SIMPLEX (EBS)

Většinou AD (autosomálně dominantní) dědičnost, s mírnými klinickými projevy.

Popsáno alespoň devět variant onemocnění. Slovo simplex bylo původně přidáno proto, že u většiny pacientů nebylo prokazatelné jizvení.(3) V etiopatogenezi se předpokládá, že jde o chybu cytoskeletu na genetickém podkladu, poruchy **cytokeratinů bazálních keratinocytů CK5,14**, výsledkem je fragilita vlastních cytokeratinových filament nebo jejich neschopnost vzájemně agregovat a vytvořit správný heterodimer.

Histologie:

Rovina štěpení intraepidermální – puchýře neobsahují erytrocyty a zánětlivé bb, PAS pozitivní BM je v bázi puchýře.(4) U staršího puchýře opticky již nelze přesně rozlišit, zda rovina štěpení je v bazálních bb nebo je junkční (v oblasti lamina lucida), tedy rozlišení mezi simplexní a většinou mnohem závažnější junkční EB (epidermolysis bullosa). V některých případech nepomáhá ani EM (elektronová mikroskopie). Pozici puchýře potvrdíme AM (antigenním mappingem).

Antigenní mapping:

- BPAg 1, BPAg 2, laminin 5, kolagen IV v **bázi puchýře, nezměněné pozitivní reakce**
- **CK 5,14** reakce výrazně oslabena nebo úsekovitě zcela chybí, což podporuje dg. EBC simplex (*až na naprosté výjimky, kdy jeden z CK chybí zcela – homozygotní mutace obou alel pro CK 14, EBC simplex, AR*), úchylná struktura jednoho uvedeného cytokeratinu poškodí tvorbu celého heterodimeru (CK5,14).
- drobné zbytky bazálních keratinocytů jsou **prokazatelně i v bázi puchýře**, lze dokázat protilátkami Anti-CK MNF 116 (obsahuje keratiny 5, 6, 8, 18) a Anti-CK HMW (high molecular weight, CK 1, 5, 10, 14).

Elektronová mikroskopie:

Obvyklým nálezem je subnukleární vakuolizace bazálních bb, zhroucení cytoskeletu a cytolýza, někdy s tvorbou homogenních shluků tonofilament.(1) Melanocyty a Langerhansovy bb jsou nepostiženy.(5)

Varianty EBS

EBS – Weber – Cockayne, AD (mutace v genech pro CK5 nebo CK14)

Nejběžnější forma EBS, ložiska jsou omezena na dlaně a plosky, objevují se v prvních letech života. Pacienti s mírnějšími příznaky onemocnění mají projevy až ve školním věku nebo až kolem dvacátého roku. Puchýře se hojí bez jizvení, projevy jsou výraznější v letních měsících (summer blistering). Nejsou postiženy oči, zuby, nehty.(3)

EBS – Koebner - generalisata, AD (mutace v genech pro CK5 nebo CK14)

Varianta, charakterizována serózními puchýři již od narození nebo kojeneckém věku. Mohou být po celém těle, převážně jsou postiženy ruce a nohy. Summer blistering.(3)

EBS – herpetiformis Dowling – Meara, AD (mutace v genech pro CK5 nebo CK14)

Od prvních měsíců života vývoj serózních nebo hemoragických puchýřů na trupu a končetinách, mohou být přítomny zánětlivé léze, někdy postižení nehtů a sliznic, s věkem se stav lepší. Tato varianta EBS má zvláštní ultrastrukturální rysy: shlukování tonofilament, příčina není známá.

EBC- simplex (generalisata) se skvrnitou, retikulární pigmentací (mottlet pigmentation)

M-P s nebo bez keratodermie, AD (mutace v genu pro CK5)

Vzácná generalizovaná forma.. Charakteristickým rysem je nález skvrnité nebo retikulární hyperpigmentace, která je na laterálních částech krku, na končetinách i na trupu. Pigmentace blednou a ztrácejí se s věkem pacienta. Obecně nejsou žádné další extrakutánní projevy.

EBC simplex generalisata s neuromuskulárním postižením (M-D), AR, mutace v genu pro plectin, PLEC1

Dříve označována jako EBC simplex letalis. Onemocnění je charakterisováno závažným, generalizovaným výsevem puchýřů, které jsou již od narození nebo se tvoří až kojeneckém období. Běžná jsou milia, atrofické jizvy, dystrofie nehtů, stejně jako jizvící se alopecie. Kůže je velmi fragilní. Orální postižení zahrnuje eroze sliznice, u některých pacientů i změny

skloviny zubů. Středně závažná až závažná anémie, stejně jako růstová retardace, jsou poměrně běžné nálezy. Mohou zde být různé anomálie v GI traktu a polykací potíže.. Charakteristické je postižení kosterních svalů. Označováno jako muskulární dystrofie, která postihuje zvláště pletenec pánevní a ramenní, ale většinou až v pozdním dětství. Svalové onemocnění má progresivní charakter. Byly popsány i případy s kongenitální myasthenia gravis. Běžná je značná mortalita u tohoto onemocnění, buď již v kojeneckém věku nebo později, v dětském věku.

EBC simplex generalisata – varianta Ogna, AD, mutace v genu PLEC1, vada plectinu

Varianta EBC simplex, která byla popsána v jedné norské rodině. Puchýře se tvoří až v raném dětství s tendencí ke generalizaci, jsou hemoragické a jsou zde i kožní podlitiny, povrchová dystrofie nehtů.

2. 6. EPIDERMOLYSIS BULLOSA JUNCTIONALIS (JUNKČNÍ, ATROFICKÁ, JEB)

V r. 1935 popsal Herlitz nejživčí se variantu EB s letálním zakončením v novorozeneckém, kojeneckém nebo batolecím věku. Původně byla považována za těžkou formu dystrofické EB. Až v r. 1974 bylo ELMI prokázáno štěpení nad bazální membránou, v oblasti lamina lucida. Všechny varianty JEB jsou autosomálně recesivně dědičné, JEB je nejvzácnější ze všech forem.(8) Většina pacientů má mutaci v jednom ze tří genů, které kódují laminin 5, který je součástí kotvících filament. Tyto mutace u nejtíže postižených jedinců jsou spojeny s redukcí nebo úplným chyběním hemidesmosomů. Některé klinicky mírnější formy (přesto generalizované), mají příčinu v mutaci genů pro BPAg 2 (Kolagen XVII), který tvoří intracelulární komponentu matrix hemidesmosomů a má transmembranózní doménu.(9)

Histologie:

Světelná mikroskopie je málo diagnosticky výtěžná, puchýř je chudý na zánětlivé bb.

Antigenní mapping:

- kolagen IV, kolagen VII v bázi puchýře, pozitivní nezměněná reakce

- BPAg 1, CK 1, 5, 10, 14 **nezměněná pozitivní reakce**
- reakce s lamininem 5 (GB3) **je zeslabena nebo chybí úplně**
- BPAg 1 **ve stropu puchýře**

Elektronová mikroskopie:

V ultrastruktuře je patrné, že puchýře vznikají mezi bazálními bb a v oblasti lamina lucida v důsledku zhoršené funkce hemidesmosomů. Hemidesmosomy mohou být pozměněny, může být snížen jejich počet nebo chybí vůbec.(1)

Typy JEB je možné rozdělit na formy lokalizované a generalizované, podle novější, revidované klasifikace, jen na formy Herlitzova a non-Herlitzova typu a formu s pylorickou atresii (JEB PA).(7)

Subklasifikace EBC junkčního typu (7)

Lokalizovaná forma JEB, forma minimalis (AR)

Puchýře se tvoří již od narození, hlavně na rukou a nohou. Nehty postupně zanikají. Eroze v dutině ústní jsou běžné. Hypoplazie skloviny vede ke změnám tvaru zubů. Někteří pacienti mají puchýře i v oblasti nosní sliznice.

Lokalizovaná forma JEB označovaná jako EB progressiva (AR)

Výskyt tvorby puchýřů až v pozdním dětství. Nejčastější lokalizací jsou ruce, nohy, lokty a kolena. Může být atrofické jizvení. Nehty jsou dystrofické nebo chybí. Jsou eroze v dutině ústní a hypoplazie skloviny.

Lokalizovaná forma JEB, cicatricalis (AR)

Tvorba puchýřů již od narození a u některých pacientů může být generalizovaná, akrální oblasti jsou nejnáchylnější k tvorbě puchýřů. Běžným rysem je atrofické jizvení. Tvoří se puchýře v ústní dutině, hypoplazie skloviny a extenzivní zubní karies. Vzácně je anemie. Diagnostickým znakem u této formy je nález **pseudosyndaktylií** na rukou i nohou. Popsána byla i postižení jícnu, ledvin, zevních částí oka, laryngu a nosní sliznice.

Generalizovaná JEB gravis, Herlitzova typu , (AR), mutace v genu pro laminin 5

JEB-H je nejtěžší generalizovanou formou JEB. Puchýře jsou patrný již od narození. Atrofické jizvení, dystrofie nehtů nebo chybění. Nejcharakterističtějším kožním příznakem je tvorba oblastí s nadměrně vytvořenou granulační tkání. Rozsáhlé eroze v dutině ústní jsou u JEB-H běžné, stejně jako intraorální jizvení. Zuby extenzívně kazivé, je těžká, multifaktoriálně podmíněná anémie a růstová retardace. Nejvýraznějším postižením u JEB-Herlitz, je **postižení laryngo-tracheální oblasti**, kde opakovaný výsev puchýřů vede k tvorbě striktur. Tato výrazná komplikace může způsobit i náhlé úmrtí anebo může vést k progresivní respirační insuficienci.

Úmrtnost je u této formy velmi vysoká. Příčiny jsou nejčastěji sepse, tracheolaryngeální postižení s obstrukcí, progredující polykací potíže, které vedou k těžké malnutrici a dalšími onemocněními s malnutricí souvisejících.

Generalizovaná forma JEB s mírnějším fenotypem, označovaná jako JEB non-Herlitz mitis nebo GABEB (generalizovaná atrofická benigní EB), (AR), mutace v genu pro laminin 5 nebo vzácněji v genu pro BPAg 2 (kolagen XVII)

Puchýře se tvoří již od narození, jsou po celém těle a hojí se s četnými krustami a erozemi. Atrofické jizvení a chybění nebo dystrofie nehtů jsou velmi častými, ne-li dokonce charakteristickým příznaky. U některých nemocných jsou výrazné pozánětlivé změny a poruchy pigmentace. Nálezy v dutině ústní jsou jako u JEB-Herlitz, ale většinou méně závažné. Anémie a růstová retardace obvykle není. Mohou být postiženy jak jícnem, tak i anus nebo oba orgány současně. Jen u některých je postižen genitourinální trakt a zevní oko. U některých mitis variant může být i závažné tracheobronchiální postižení. U většiny pacientů není chorobou zkrácena normální délka života. Je zde ale vyšší počet úmrtí v kojeneckém věku, většinou v důsledku laryngo-tracheální obstrukce.

JEB generalizata s pylorickou atresií (PA), mutace v genu pro alfa-6 beta-4 integrin

Je to vzácná varianta s generalizovanými kožními projevy JEB podobnými Herlitzovu typu a navíc je zde stenóza nebo atrézie pyloru. Dnes je tato varianta považována za samostatnou jednotku, kde genová analýza prokázala vadu v alfa-6 beta-4 integrinu nebo ve zcela malém počtu případů, vadu v plectinu.

2. 7. EPIDERMOLYSIS BULLOSA DYSTROPHICA (EBD, DEB)

Skupina zahrnuje jak dominantní, tak recesivní formy onemocnění, všechny jsou charakterizovány dystrofií nehtů a výrazným jizvením. U všech forem je dermolytický typ štěpení.(5) Dermolytické (dystrofické) varianty jsou charakterizovány štěpením pod lamina densa v oblasti kotevních fibril. Kolagen VII je hlavní složkou kotevních fibril, je výrazně redukován nebo chybí dokonce i u vzácných recesivních variant.(4) Syntéza kolagenu je řízena genem COL7A1 a je zde výrazná genetická vazba mezi tímto genem a dominantními i recesivními variantami EBD.

Histologie:

Proces štěpení se děje pod lamina densa, dochází tedy k celé řadě sekundárních zánětlivých změn. Při hojení puchýře dochází k zánětlivé infiltraci, tvorbě granulační tkáně, proliferaci vaziva a kapilár.(1)

Antigenní mapping:

- všechny Ag (antigeny) keratinocytů a Ag lamina lucida (laminin 5 (~~6134~~), integrin) **pozitivní nezměnná reakce**
- Kolagen IV (lamina basalis), BPAg1, laminin 5 **ve stropu puchýře**
- Reakce kolagenem VII **slabá nebo chybí úplně**

Elektronová mikroskopie:

Kotvící fibrily (obsahují kolagen VII) jsou redukovány nebo chybí u pacientů s těžkými formami recesivní DEB, u méně těžkých forem jsou fibrily sice prokazatelné, jejich počet může být snížen.(9) Typické u dermolytických puchýřů je, že LD je ultrastrukturálně v iniciální fázi vývoje puchýře v jeho stropu. U starších puchýřů hodnocených ultrastrukturálně může dojít k enzymové lýze LD, remodelaci puchýře, s novotvořením a translokací LD. Tyto sekundární změny mohou vést k chybné interpretaci ultrastrukturálních řezů.(1)

Subklasifikace EBC dystrophica (7)

Zahrnuje všechny lokalizované i generalizované formy EBC dystrophica, jak AD tak i AR dědičné, jejichž společným znakem je některá mutace v genu COL7A1 s různě defektně vytvořeným kolagenem VII.

Lokalizované formy:

Dominantní dystrofická EB (DDEB), (acralis) minimalis, (AD)

Puchýře se tvoří již od narození, někdy se jejich tvorba se může projevit i později (kojenecké období, batolecí věk). Puchýře postihují převážně akrální oblasti. U některých pacientů se s věkem tvorba puchýřů zmírňuje a může zcela vymizet. Nehty, zvláště palců, jsou dystrofické.

DDEB localisata praetibialis, Kuske-Portugal.

Onemocnění začíná v časném dětství. Charakteristicky je postižena kůže pretibiálních oblastí, ale i dorsální části nohou. Léze se hojí atrofickými jizvami. Mohou být abnormality nehtů jak na dolních, tak i na horních končetinách.

Recesivní dystrofická EB, (RDEB) inversa

Puchýře se tvoří již od narození. Později se puchýře nacházejí převážně v oblastech kožních záhybů, jizvení, atrofie a dystrofie nehtů. Může být postižen i jícen a to různě závažně, až s tvorbou striktur a stenóz.

DDEB centripetalis

Je to velmi vzácná varianta, která je označena podle toho, že zpočátku převážně akrální distribuce puchýřů má v dalším průběhu progresivní centripetální šíření změn. Charakteristická jsou milia, dystrofie nebo chybění nehtů a jizvení.

DEB, která je označována jako EB pruriginosa

Charakteristickým rysem u dosud osmi popsaných pacientů jsou vysoce svědivé, nafialovělé kožní noduly. Jinými popsanými změnami jsou milia, dystrofie nehtů, puchýře. Jizvení je zvláště vyznačeno v oblastech kotníků. Začátek onemocnění je velmi variabilní.

Generalizované formy:

DDEB generalisata Pasini

Charakteristickým rysem onemocnění jsou malé, hypopigmentované, masově zabarvené papuly, které jsou označovány jako albopapuloidní léze, které se nejčastěji nacházejí na kůži v horních částí hrudníku anebo na zádech. Morfologicky se albopapuloidní léze podobají névům z pojivové tkáně nebo hypertrofickým jizvám.

DDEB Cockayne – Touraine

Je morfologicky neodlišitelná od Pasiniho varianty. Klinicky se liší tím, že nemá albopapuloidní léze. Zda-li je tato forma samostatná nebo je geneticky skutečně odlišná od Pasiniho varianty, nebylo zatím molekulárně genetickými studiemi jednoznačně prokázáno. Obě tato onemocnění jsou řazena (Pasini i forma Cockayne-Touraine) jen do jednotky DDEB.

RDEB generalisata gravis – forma Hallopeau-Siemens (HS)

Puchýře se tvoří již od narození. Pro onemocnění jsou charakteristická milia a extenzivní atrofická jizvení. Nehty chybí nebo jsou dystrofické. Sliznice dutiny ústní je těžce postižena: mnohočetné eroze, puchýře a tvorba jizev. U těchto pacientů je velmi výrazná multifaktoriální anemie a výrazná růstová retardace. Pro RDEB HS je charakteristický vývoj progresivních akrálních kontraktur a pseudosyndaktilie prstů na ruce a nohou. Tyto deformity se mohou vytvářet již od prvních let života, ale mnohem častěji a i více jsou vyjádřeny až později. Obvykle těžce je postižen jícn, tenké střevo a anus, méně ale rovněž uretra, vagina, močový měchýř a ledviny (glomerulonefritis). Pacienti s RDEB HS mohou zemřít v důsledku sepse. Pacienti jsou též výrazně ohroženi vznikem spinocelulárního karcinomu již v dospívání nebo ve střední věku.

RDEB generalisata mitis, Hashimoto

Pacienti mají kožní změny neodlišitelné od DDEB Cockayne -Touraine. Pokud se současně vyskytuje i extrakutánní postižení, pak je obvykle mnohem nižší závažnosti, než u RDEB HS.

3. CÍL PRÁCE

Cílem práce je zavedení **ANTIGENNÍHO MAPPINGU** (AM) pro non-molekulární diagnostiku epidermolysis bullosa congenita v našich podmínkách.

Příznaky onemocnění se vyvíjejí, jsou rozdílné i v rodině a stanovit diagnózu vyžaduje zkušenosti s klinickou a histopatologickou diagnostikou. Péče o děti s EBC a nákladná diagnostika vyžaduje koncentraci pacientů do center, kterým se v loňském roce naše pracoviště, jako jediné v ČR, stalo - projekt Geneskin.

Prvním úkolem bylo zajistit soubor vhodných a komerčně dostupných protilátek, což jsme konzultovali, pro metodickou shodu, s paní Gabriela Pohla-Gubo, PhD z Federal Hospital Salzburg. Dalším krokem se stalo vypracovat pro každou z těchto protilátek metodický postup a důkladně ho ověřit na zdravé nativní kožní tkáni, která slouží jako pozitivní kontrola.

4. LABORATORNÍ ČÁST

4. 1. NEPŘÍMÁ IMUNOFLUORESCENCE

Fluorescenční techniky využívají vlastnosti některých molekul absorbovat světlo určité vlnové délky a emitovat záření větší vlnové délky, než jakou absorbovaly. Jestliže jsou tyto fluorofory ozářeny světlem o jejich absorpční vlnové délce a prohlíženy přes filtry propouštějící pouze světlo emitované, je na tmavém pozadí vidět záření. Což umožňuje detekovat i velmi malé množství fluoroforu. Jestliže je na molekulu protilátky kovalentně navázán fluorofor tak, že se její aktivita nezmění, získáme účinný způsob sledování distribuce jednoho proteinu (resp. antigenní determinanty) v rámci jedné tkáně nebo na úrovni jedné buňky. Nejčastější fluorofory jsou fluorescein, emitující zelenou fluorescenci a rhodamin, s fluorescencí červenou. Kombinací imunopřístupů s metodami využívajícími specifické vazby fluorochromů na jednotlivé komponenty buňky (DAPI – na DNA, RNA, Rhodamin 123 na mitochondrie) je možné získat řadu informací o vnitřním uspořádání buňky. (10)

Existují dvě základní imunofluorescenční metody, imunofluorescence přímá a imunofluorescence nepřímá. Při přímé metodě je fluorofor přímo konjugován s protilátkou žádané specifity. Častěji užívaná metoda je nepřímá imunofluorescence, kdy preparát je inkubován s primární neznačenou protilátkou a teprve ve druhém kroku probíhá inkubace se sekundární značenou protilátkou. Výhodou této metody oproti metodě přímé je, že jednu konjugovanou sekundární protilátku lze použít pro detekci mnoha antigenů. Pracujeme-li s panelem několika myších monoklonálních protilátek, můžeme k jejich detekci použít jediný konjugát protilátky proti myšimu Ig. Další výhodou je větší citlivost metody. (10)

Epifluorescenční mikroskop (Reflected light fluorescence microscope).

U tohoto typu mikroskopu prochází excitační světlo objektivem, dopadá na preparát svrchu a emisní světlo se vrací zpět do objektivu. Je zřejmé, že u tohoto mikroskopu je potřeba použít zvláštní typ zrcadla, které odráží excitační světlo do objektivu a propouští emisní světlo do okuláru. Z počátku se používalo *polopropustné zrcadlo*, které polovinu světla propouští a polovinu odráží, bez ohledu na to, o jaké světlo jde. Pochopitelně, že u tohoto zrcadla docházelo k velkým ztrátám světla, a proto se začalo používat tzv. *dichroické zrcadlo*. To propouští a odráží světlo podle toho, jakou má vlnovou délku. Používá se tedy vždy takový typ zrcadla, který maximum excitačního světla odráží a maximum emisního světla propouští. Vhodná kombinace dichroického zrcadla, excitačního a emisního filtru pro použitý druh

fluorochromu se do epifluorescenčního mikroskopu se vkládá pohromadě jako tzv. *kostka*, jejíž dvě stěny jsou tvořeny filtry a úhlopříčka dichroickým zrcadlem. Kostky jsou umístěny na výměníku a je možné je vyměňovat podle potřeby. Epifluorescenční typ mikroskopu je v současnosti více oblíbený než transmisní typ.

Obecnou komplikací fluorescenční mikroskopie je to, že fluorofory jsou intenzivním zářením rozkládány a ztrácejí schopnost absorpce a emise – tzv. fotobleaching. (11)

Používané fluorofory

FITC (fluorescein isothiokyanát) – maximum emise mezi 500-600 nm. Široce používán při imunofluorescenci.

Bisbenzimid Hoechst – značí DNA.

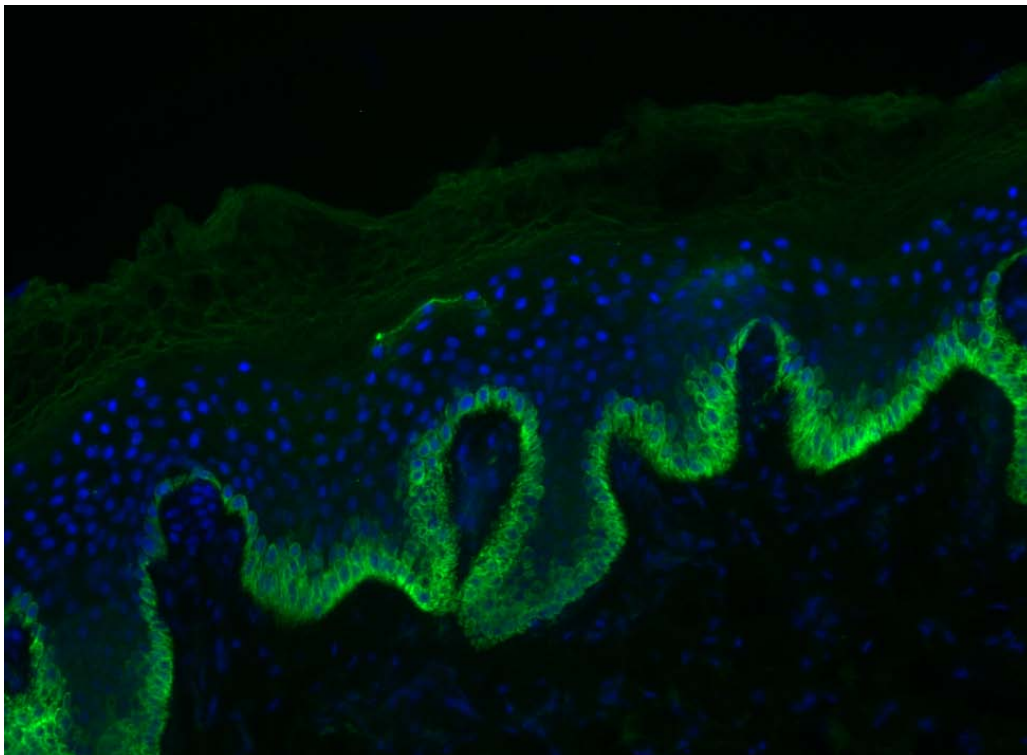
DAPI – váže se na DNA a RNA (barví se modře).

Ethidium bromid – váže se na dvouřetězcovou DNA a RNA (svítí oranžově).

Propidium Jodid – barví DNA (červeně).

Acridinová oranž – váže se na DNA (barví se zeleně) a RNA (barví se tmavě červeně).

Congo Red – váže se na amyloid (barví se růžově). (11)



Obrázek 4. Normální lidská kůže, BPAg2, sekundární protilátka značena FITC, jádra označena DAPI

4. 2. PROTOKOLÁRNÍ POSTUP PRÁCE

Odběr a transport materiálu

Optimální vzorek kožní tkáně získáváme biopsií pomocí raznice (punch biopsy), asi 4mm silnou. Menší vzorek je technicky velmi obtížně zpracovatelný. Odebrané vzorky by měly vždy obsahovat tzv. **pre-lesional skin**, která je ve světelné mikroskopii intaktní a kůži s počáteční tvorbou puchýře. Tkáň zastihující **pouze puchýř (tzv. lesional skin)** nemá být nikdy předmětem biopsie – pro falešně negativní výsledky, jako následek aktivace proteáz, které vedou ke ztrátě antigenních míst v DEJ nebo se ukáže několik etází štěpení, což způsobí, že výsledek je nehodnotitelný. V případě potřeby lze puchýř vyvolat, a to velmi šetrným způsobem, pomocí tření malým bavlněným smotkem. Jako transportní medium lze použít Michelovo medium, komerčně dostupné, které mimo pufrů obsahuje N-ethylmaleimid, (pH = 7,0). Tkáň si zachovává antigenicitu po dobu 7 dnů při pokojové teplotě. Odběr je tedy možné udělat kdykoliv bez předchozí domluvy s laboratoří.

V našem případě je nativní vzorek pacienta doručen do laboratoře ihned po odběru ve vlhké komůrce, kterou tvoří Petriho miska s gázou, navlhčenou fyziologickým roztokem.

Orientace tkáně, fixace, zhotovení preparátů

Tkáň je nutné orientovat, aby bylo jasné, kde je zastižena epidermis, rozkrojit žiletkou nebo skalpelem na dvě poloviny, z nichž jedna je předána do laboratoře elektronové mikroskopie k dalšímu zpracování.

Část pro AM je fixována chladem (zmrazena) v kapalném dusíku za daných bezpečnostních opatření a uchovávána v suchém ledu v mrazničce.

Zhotovení kryostatových řezů provádíme druhý den. Řezy tloušťky 5 μ m umístíme na podložní skla SuperFrost plus pro obtížné histologické preparáty. Problémová bývá práce s kůží, která je lehce hyperkeratotická – tkáň se trhá – oddělí se epidermis s hyperkeratózou a řez není použitelný. Stejná situace nastává při zpracování vzorku, který je tvořen pouze puchýřem. Dojde k roztržení a znehodnocení tkáňového řezu.

Imunofluorescenční reakce

1. **Inkubace s normálním sérem** zvířete, ze kterého je získána sekundární protilátka, např. jestliže použijeme jako sekundární protilátku - koza anti králik IgG - FITC, zvolíme normální kozí sérum k blokaci nespecifických vazeb. V našem případě používáme normální oslí sérum (Santa Cruz Biotechnology, sc-2044), ředěné na

10% roztok pufrům TRIS/HCl, pH 7,2; i přesto, že máme sekundární protilátky krysí, oslí a kozí. Důvodem byla finanční limitace a podle našich zkušeností se nejedná o nijak podstatnou chybu. Inkubace probíhá 20 minut ve vlhké komoře, což je komerčně dostupný plastový kontejner, vyložený vlhkou buničitou vatou. Preparáty nesmí během celého pracovního postupu zaschnout, čímž by se okamžitě znehodnotily.

2. **Inkubace s primární protilátkou** ředěnou pufrům TRIS/HCl, pH 7,2 – 7,4. Čas a konkrétní ředění je uvedeno v tabulce č. 1. Při použití vlhké komory jsme inkubovali za pokojové teploty.

Tabulka č. 1 Kompletní charakterizace primárních protilátek

Protilátka anti-	Imunizované zvíře	ředění protilátky - $\mu\text{l}/100\mu\text{l}$ TRIS/HCl	Inkubace
BPAg 1	koza	5/100	17h, v ledničce při 4°C
BPAg 2	koza	5/100	17h, v ledničce při 4°C
Cytokeratin 5	myš	1/100	60min, vlhká komora
Cytokeratin 14	myš	3/100	60min, vlhká komora
Cytoretatin 10	myš	1/100	40min, vlhká komora
Integrin $\alpha 6$	krysa	2/100	40min, vlhká komora
Integrin $\beta 4$	myš	2/100	40min, vlhká komora
Kolagen IV	myš	1/100	60min, vlhká komora
Kolagen VII	myš	1/50,1/100,1/200	60min, vlhká komora
Laminin 5	myš	3/100	40min, vlhká komora
Plectin	koza	1/100	60min, vlhká komora

3. **Inkubace se sekundární protilátkou konjugovanou s FITC** - pro krysí primární protilátku (Integrin alfa-6) používáme koza anti- krysa IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, sc-2011), pro kozí primární protilátky používáme osel anti-koza IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, sc-2024), pro myší primární protilátky koza anti-myš IgG-FITC (Chemicon, AP124F). Ředěno pufrům TRIS/HCl pH 7,2 – 7,4, inkubace ve vlhké komoře za pokojové teploty.

Tabulka č.2 Kompletní charakterizace sekundárních protilátek

Sekundární protilátka	Ředění v μ/100μl pufru TRIS/HCl	Čas inkubace
Koza anti-krysa IgG FITC	2/100	120 min, vlhká komora
Koza anti-myš IgG FITC	1/100	40 min, vlhká komora
Osel anti-koza IgG FITC	4/100	120 min, vlhká komora

4. Důkladný oplach destilovanou vodou a zamontování do DAPI. Použili jsme **Vectashield with DAPI** (Vector Laboratories, Inc., catalog. No.H-1200)
5. Hotové preparáty lze uchovávat v lednici, dle našich zkušeností i po měsíci lze ještě prohlížet.

Při každém vyšetření používáme pozitivní kontrolu, normální zdravou lidskou kožní tkáň. Tkáňové řezy pacienta a pozitivní kontroly jsou vždy na jednom podložním skle a hodnoceny současně.

Příprava pufru TRIS/HCl

12,1g trometamol

16,0g NaCl

postupně rozpustit v 1500 ml destilované vody,
přidat 30ml zásobního roztoku HCl (150 ml HCl/300 ml dest. vody),
doplnit destilovanou vodu do 2000 ml a změřit pH.
Případně upravit pomocí NaOH. pH 7,2-7,4

4. 3. KONKRÉTNÍ PRÁCE S PRIMÁRNÍMI PROTILÁTKAMI

Antigen bulózního pemfigoidu 1

BPAg1 (E-14), (sc-13776) - SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

BPAg1 (230 kDa) je hemidesmozomální protein bazální membrány kůže, jde o purifikovanou kozí polyklonální protilátku namířenou proti lidskému C – terminálnímu konci BPAg1.

V 1ml PBS pufru je obsaženo 200 µg IgG protilátky a jako stabilizátor a konzervační látka azid sodný (< 0,1%).

Výrobce doporučené ředění pro imunofluorescenci je 1 /50 až 1/500. Tato protilátka (stejně jako BPAg2) nám při doporučeném postupu dávala velmi špatné nebo vůbec žádné výsledky. Zvýšili jsme tedy koncentraci protilátky až na 5µl na 100µl pufru a výrazně prodloužili inkubaci (viz Tab.1) Výsledky jsou méně uspokojivé, v budoucnu pravděpodobně použijeme protilátku od jiného výrobce.

Antigen bulózního pemfigoidu 2, BPAg 2

COLLAGEN TYPE XVII (N-18), (sc-26393) - SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

Jde o purifikovanou kozí polyklonální protilátku. V 1ml PBS pufru je obsaženo 200 µg IgG protilátky a jako stabilizátor a konzervační látka azid sodný (< 0,1%) (14).

Opět doporučené ředění 1/50 – 1/500 nám dalo velmi špatné výsledky (viz. BPAg1). Zvýšili jsme tedy koncentraci protilátky až na 5µl na 100µl pufru a výrazně prodloužili inkubaci (viz Tab.1) Tím jsme dosáhli o něco lepších výsledků než s BPAg 1.

Cytokeratin 5, CK5

CYTOKERATIN 5, (NCL -L - CK5) - VISION BIOSYSTEM

Jde o myší monoklonální protilátku, namířenou proti proteinu intermediárních filament CK5, klon XM26, třída IgG1, kappa. Jako antigen je použita směs prokaryotních rekombinantních proteinů, odpovídajících C- terminálnímu konci lidského CK 5. Supernatant, obsahující 15mM azidu sodného, pracuje na nativní tkáni i na tkáních zalitých do parafínu. Doporučené ředění 1/100.(15) Naprosto spolehlivá, kvalitní reakce.

Cytokeratin 10, CK10

CYTOKERATIN 10, (MAB1605) - CHEMICON

Myší monoklonální protilátka, třída IgG, ascites, 0,1% azid sodný. (13)

Výrobce neuvádí ředění, my jsme čerpali z informací od paní Gabriela Pohla-Gubo, PhD z Federal Hospital Salzburg. Tedy 1/100 a výsledky byly perfektní, spolehlivá protilátka.

Cytokeratin 14, CK14

CYTOKERATIN 14, (NCL-L-LL002) - VISION BIOSYSTEM

Jde o myší monoklonální protilátku, namířenou proti proteinu intermediárních filament CK14, klon LL002, třída IgG3. Jako antigen je použit syntetický peptid, odpovídající C-

terminálnímu konci lidského CK 14. Supernatant, obsahující 15mM azidu sodného, pracuje na nativní tkáni i na tkáních zalitých do parafínu. Doporučené ředění 1/20 (15). Naprosto spolehlivá, kvalitní reakce i při ředění 3/100.

Integrin alfa-6

INTEGRIN ALPHA6 [CD49F], (MAB1378) - CHEMICON

Synonyma: VLA-6 ALPHA CHAIN, CD49F

Krysí monoklonální protilátka, supernatant, pH 7,4, 0,09% azid sodný, klon NKI-GoH3, koncentrace 1mg/ml, třída IgG_{2a}. Antigenem jsou zde BALB/c myši mamární nádorové buňky. Dále protilátka značí trombocyty, megakaryocyty, T lymfocyty a buňky akutní lymfatické leukemie, epiteliální buňky. (13)

Výrobce nedoporučuje ředění, opět jsme čerpali z informací od paní Gabriela Pohla-Gubo, PhD z Federal Hospital Salzburg, použili jsme 2/100, naprosto kvalitní a spolehlivá reakce.

Integrin beta-4

INTEGRIN BETA4, (MAB 1964) - CHEMICON

Myší monoklonální protilátka, klon 3E1, třída IgG₁, určena pro imunofluorescenci a imunoprecipitaci, bez konzervačních látek, doporučené ředění 1/200 (13)

V našich podmínkách se lépe osvědčilo ředění 2/100. Reakce spolehlivá.

Kolagen IV

KOLAGEN IV, (NCL-COLL-IV) - VISION BIOSYSTEM

Myší monoklonální protilátka, klon PHM-12, třída IgG₁, antigenem jsou lidský glomerulus, pracuje jak na kryostatových, tak na parafinových řezech, doporučené ředění 1/100-1/200 (15).

V našich podmínkách ředíme 1/100. Spolehlivá kvalitní reakce.

Kolagen VII

KOLAGEN VII, (NCL-COLL-VII) - VISION BIOSYSTEM

Myší monoklonální protilátka, klon LH7.2, třída IgG₁, kappa, pracuje pouze na kryostatových řezech, doporučené ředění 1/50-1/100 (15).

V diagnostice EBD používáme: 1/50,1/100,1/200, u ostatních případů (EBC simplex a junkční) pouze 1/100. U EBD současně s kontrolou sledujeme snížení intenzity barvení, kontrola dává ve všech ředěních jasně pozitivní výsledek, na tkáňovém řezu kůže pacienta

s EBD pozorujeme postupné snížení až vymizení svitu, často už při ředění 1/100. Naprosto spolehlivá reakce.

Laminin 5

LAMININ 5 (KALININ, [GB3]), (ab 1207) - ABCAM

Monoklonální myší protilátka, značí 5 polypeptidů 93,5 – 150 kD, které se nachází v lamina lucida. Třída IgG1, klon GB3, koncentrace 1mg/ml, pracuje pouze na kryostatových řezech, doporučené ředění 1/25 – 1/200. Obsahuje 0,05% azidu sodného, pufr PBS (16).

V našich podmínkách ředíme 3/100, reakce spolehlivá, bez arteficiálního svitu.

Plectin

PLECTIN (C-20), (sc-7572) - SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

Plectin je kozí polyklonální protilátka proti C- terminálnímu konci lidského plectinu. V 1ml PBS pufru je obsaženo 200µg IgG protilátky a jako stabilizátor a konzervační látka azid sodný (< 0,1%), doporučené ředění 1/50 – 1/500 (14).

V našich podmínkách jsou nejlepší výsledky při ředění 1/100. Reakce vychází dobře, lépe než BPAg1 a 2, nicméně například integriny a kolageny dávají výsledky mnohem kvalitnější, bez arteficiálního svitu a dlouhotrvající.

4. 4. KONKRÉTNÍ PRÁCE SE SEKUNDÁRNÍMI PROTILÁTKAMI

Osel anti-koza IgG-FITC, (sc-2024) - SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

200 µg protilátky konjugované s fluoresceinem v 0,5 ml pufru PBS, doporučené ředění 1/100-1/400 (14).

Doporučené ředění nám však nedalo naprosto žádnou reakci a postupným zvyšováním koncentrace jsme dospěli až k použitelnému ředění 4/100. A to navíc při prodloužené inkubaci - z běžných 40min na 120 min.

Koza anti-krysa IgG-FITC, (sc-2021) - SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY

200µg protilátky konjugované s fluoresceinem v 0,5ml pufru PBS, doporučené ředění 1/100 - 1/400 (14).

Použitelná koncentrace pro naše podmínky je 2/100.

Koza anti myš IgG-FITC, (AP124F) - CHEMICON

Purifikovaná sekundární protilátka obsahující 14,5 µg FITC na 1mg protilátky, jako antigen požito myší sérum o koncentraci 10mg/ml. Doporučené ředění 1/50-1/200 (13).

V našich podmínkách pracujeme s ředěním 1/100.

4. 5. PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

Dewarova nádoba na kapalný dusík (Taylor-Wharton HARSCO série XTB) je určena pro skladování kryozkumavek nebo kapilár při extrémně nízkém denním odparu. Tyto Dewarovy nádoby jsou opatřeny 6 kanystry o průměru 38mm.

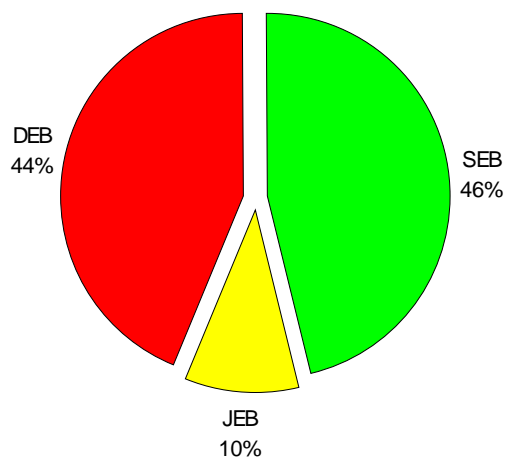
Kryostat Leica JUNG FRIGOCUT 2800 – rotační mikrotom umístěný v chlazené komoře, která umožňuje kontrolovaně rychlé zmrazení vzorku a práci s ním při velmi nízké a nekolísající teplotě. Osvědčená pracovní teplota je -24°C.

Fluorescenční mikroskop - Olympus BX51 (Japonsko) a kamera, model CCD 1300cib od VDS Vosskuhler GmbH , (Německo)

5. VÝSLEDKY A DOKUMENTACE

- onemocnění EBC je poměrně vzácné, **soubor pacientů s EBC (1971-2005) dětské kožní kliniky FN Brno : 104** (48 M, 56 Ž) 36% pacientů sledováno od novorozeneckého věku
- zemřelo : 2 DEB HS, 2 JEB-H, u EBJ šlo o 2 dívky, u EBD šlo o muže a dívku
- soubor pacientů, u kterých byl proveden antigenní mapping dosud čítá 7 pacientů, proběhl odběr u tří dalších, výsledky a dokumentace zatím nejsou k dispozici

Procentní zastoupení tří skupin EBC



Pacient číslo 1, ročník 1968, pohlaví mužské

Předchozí histologické vyšetření: před 25 lety – EBD HS

Vzorek 1) pro konvenční histologii, suspektní. iniciální spinocelulární karcinom

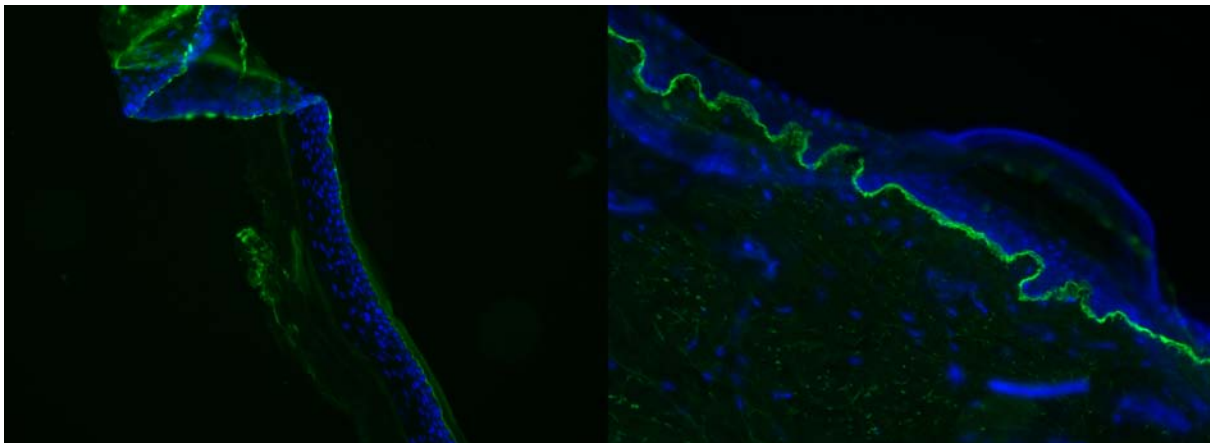
Vzorek 2) pro AM a ELMI, atrofická kůže s levé dolní končetiny, v materiálu jen korium, v dalším prokrájení oddělené nesouvislé fragmenty epidermis.

Klinická DG: EBD HS

AM: nepřímá imunofluorescence s PL proti **CK10, BPAg1, BPAg2, lamininu 5 (GB3), integrinu $\alpha 6$ a integrinu $\beta 4$, kolagenu IV** dává shodný pozitivní výsledek s kontrolou nezměněné zdravé lidské kůže. **Kolagen VII** 1/50 slabší reakce než kontrola, **1/100 stále patrna slabší reakce**, 1/200 ojedinělé pozitivní úseky. Jedná se o fragmentovaný materiál, zatížený řadou artefaktů.

ELMI: Chybění kotevních fibril, jak v oblasti puchýře, tak i mimo něj.

Závěr: RDEB HS, i když slabá pozitivita v reakci proti kolagenu VII 1/100 je v nevhodně odebrané kůži pravděpodobně artefaktem. Nutno zvážit kliniku, ELMI i antigenní mapping.



Pacient č. 1: fragment epidermis, kolagen VII, 100x, 1/50

Kontrola (NHS): kolagen VII, 100x, 1/50

Pacient číslo 2, ročník 1998, pohlaví mužské

Předchozí histologické vyšetření: před 8 lety, málo diagnostický materiál, pravděpodobně některá forma EBD.

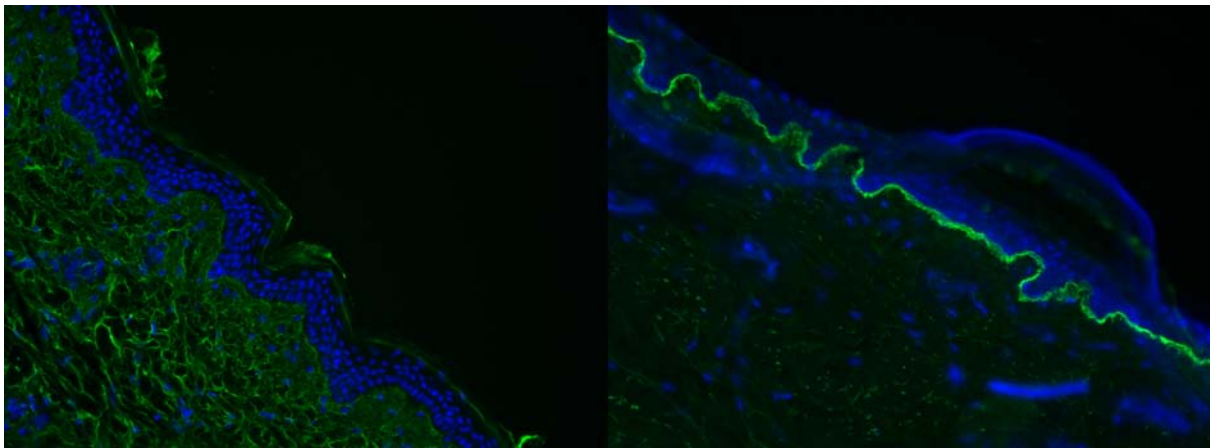
Vzorek: Z pravého stehna, v den odběru odseparování prstů (meziprstní blanky).

Klinická DG: EBD HS mitis, polykací potíže občas, typické kožní projevy.

AM: nepřímá imunofluorescence s PL proti **CK10, BPAg1, BPAg2, Lamininu 5(GB3), integrinu $\alpha 6$ a integrinu $\beta 4$, kolagenu IV** dává shodný pozitivní výsledek s kontrolou nezměněné zdravé lidské kůže. **Kolagen VII** 1/50 slabší reakce než kontrola, 1/100 a 1/200 reakce **negativní**, kontrola pozitivní.

ELMI: Distribuce nepravidelných řídkých kotevních fibril, zastiženy úseky, kde kotevní fibrily zcela chybí. (Díky částečně vytvořeným fibrilám je reakce proti kolagenu VII 1/50 ještě slabě pozitivní.)

Závěr: RDEB, forma mitis je pravděpodobná, formu HS nelze vyloučit.



Pacient č. 2: kolagen VII, 100x, 1/100

Kontrola (NHS): kolagen VII, 100x, 1/100

Pacient číslo 3, ročník 1976, pohlaví mužské

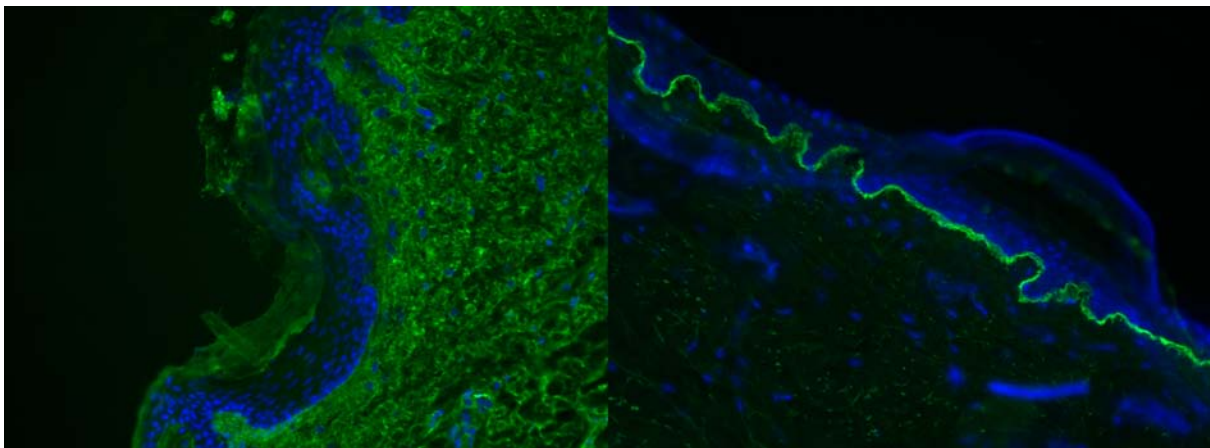
Předchozí histologické vyšetření: ELMI - před 15 lety, vyzrálý dermolytický puchýř s téměř kompletním chyběním kotvících fibril, málo diagnostického materiálu.

Klinická DG: EBD HS s typickými projevy, boxerské ruce, polykací potíže, kariézní chrup.

AM: nepřímá imunofluorescence s protilátkou proti **CK10, BPAg1, BPAg2, Lamininu 5(GB3), integrinu $\alpha 6$ a integrinu $\beta 4$, kolagenu IV** dává shodný pozitivní výsledek s kontrolou nezměněné zdravé lidské kůže. **Kolagen VII** 1/50 slabší reakce než kontrola, 1/100 a 1/200 **reakce negativní**, kontrola pozitivní.

ELMI: Pro malé množství diagnostického materiálu nebylo možno provést současné ELMI vyšetření, které by mohlo ukázat skutečnou kvantitu kotvících fibril.

Závěr: Defektní kolagen VII dávající sníženou reakci 1/50, nález vyhovuje klinické diagnóze RDEB HS.



Pacient č.3, kolagen VII, původní zvětšení 200x, 1/100

Normální kůže, kolagen VII, původní zvětšení 100x

Pacient číslo 4, ročník 1992, pohlaví mužské

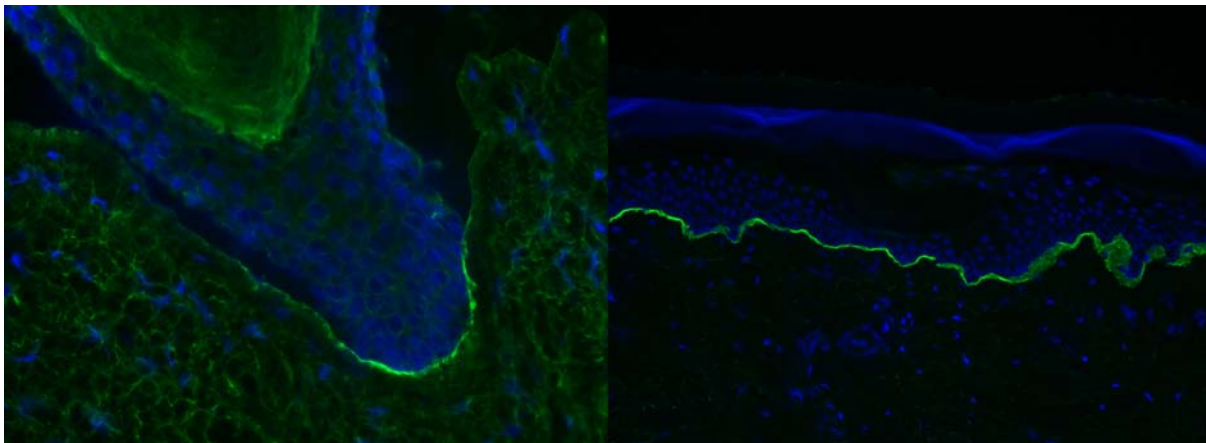
Předchozí histologické vyšetření: na jiném pracovišti, kde i ELMI vyšetření – defekt hemidesmosomů.

Vzorek: tvořící se puchýř + pre-lesional skin

Klinická DG: EBJ non Herlitz, terčovitě defekty na hýždích, otlaky plosky, dlaně, močení, polykání, defekace bez patologických změn.

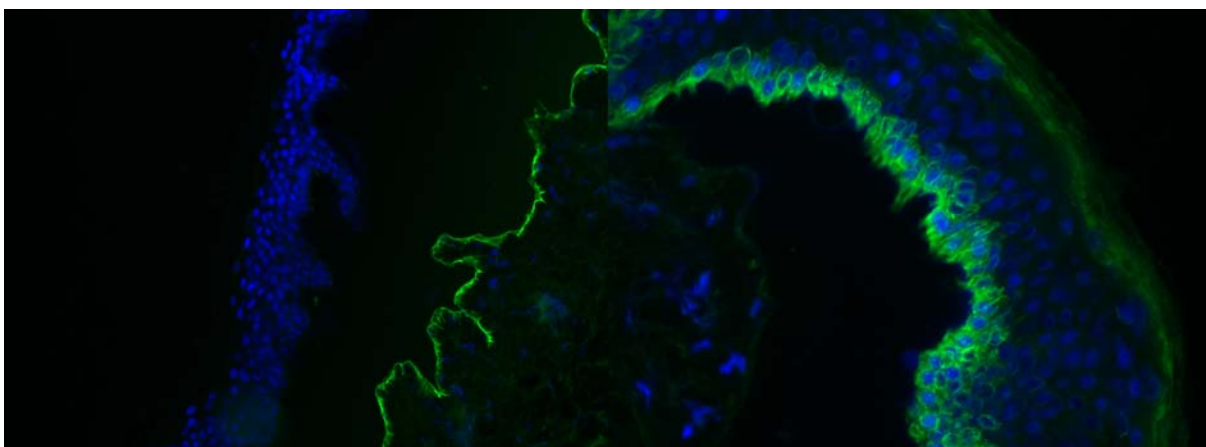
AM: V kryostatových řezech 3 materiály. Většinou převažuje výrazně vyvinutý junkční puchýř. Méně pre-lesional skin a ve zcela krátkých úsecích non-lesional skin. **BPag2, CK 5, CK14** ve stropu puchýře, **kolagen IV a VII** výrazně lineárně v bázi puchýře, reakce s **GB3 proti lamininu 5** je proti kontrole výrazně zeslabena. Lineárně v non-lesional skin a v krátkém úseku i v bázi puchýře, v puchýři reakce zcela negativní. Reakce proti **BPag1** je nelineární, ale „čárkovitá“ a granulární nebo charakteru jemných klíček. V iniciálním puchýři ojediněle v bázi i stropu, ve vyvinutém puchýři výjimečně ve stropu.

Závěr: JEB, jedná se o primární poruchu ve struktuře lamininu 5.



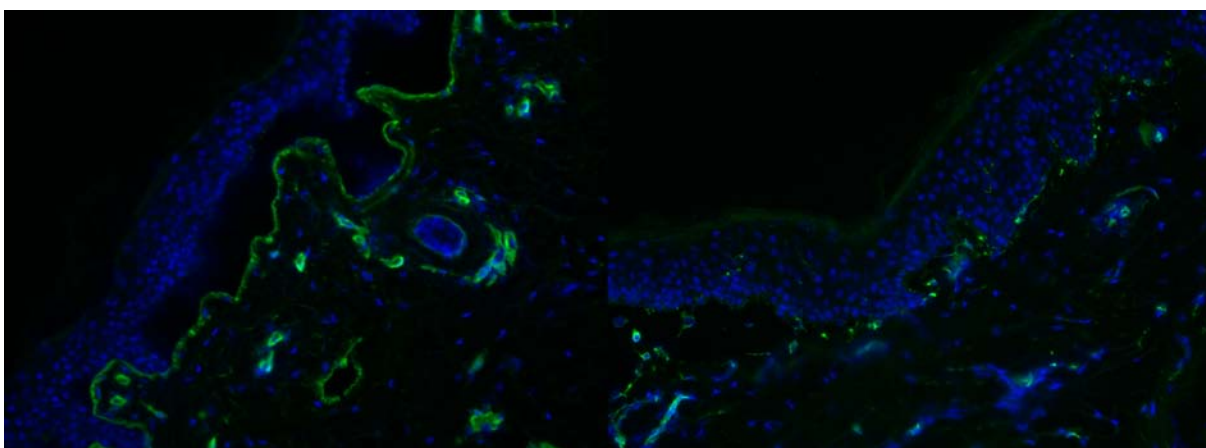
Pacient č. 4, laminin 5, 100x

Kontrola, laminin 5, 100x



Pacient č. 4, junkční puchýř, kolagen VII,
100x

Pacient č. 4, junkční puchýř, BPAg2, 100x



Pacient č. 4, junkční puchýř, kolagen IV,
100x

Pacient č. 4, junkční puchýř, BPAg1, 100x

Pacient číslo 5, ročník 1978, pohlaví mužské

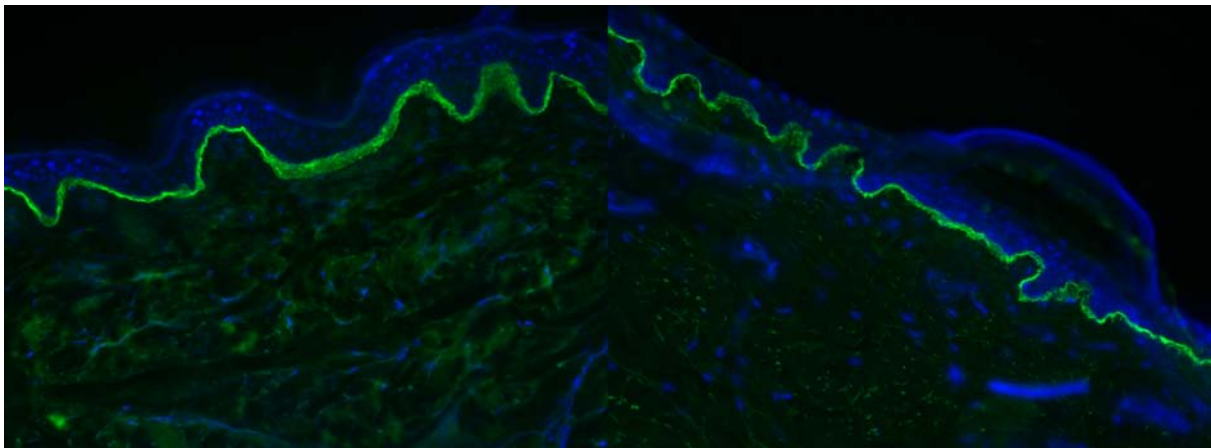
Předchozí histologické vyšetření: nemá

Vzorek: levé předloktí

Klinická DG: pacient zdravý, dcera Bartův syndrom, DEB histologicky verifikována. V molekulární genetické analýze dcery nalezena mutace G2003R typická pro Bartův syndrom (substituce glycinu, ale bez předčasného terminačního kodonu). Otec tatáž genetická odchylka, ale bez jakéhokoliv postižení a projevů DEB.

AM: Všechny dostupné reakce jsou pozitivní shodně jako kontrola. **Kolagen VII** ve všech ředěních u otce nemocného dítěte se jeví jako normální.

Závěr: Naprosto normální výsledek (snad ovlivněn tím, že protilátka proti kolagenu VII LH7:2 značí převážně N-terminální části kolagenu, zatímco mutace se substitucí glycinu jsou v opačné části helixu, poblíž C-terminální části). Podle klinických údajů otec nemá žádné projevy DEB, doporučeno jen zpřesnit anamnézu (dětství – přechodné puchýřnaté projevy).



Pacient č.5, kolagen VII, zvětšeno 100x,
1/100

Kontrola (NHS), kolagen VII, zvětšeno 100x,
1/100

Pacient číslo 6, ročník 1994, pohlaví mužské

Předchozí histologické vyšetření: před 7 lety, ELMI – dystrofická forma EBC, s ojedinělými nálezy kotvících fibril

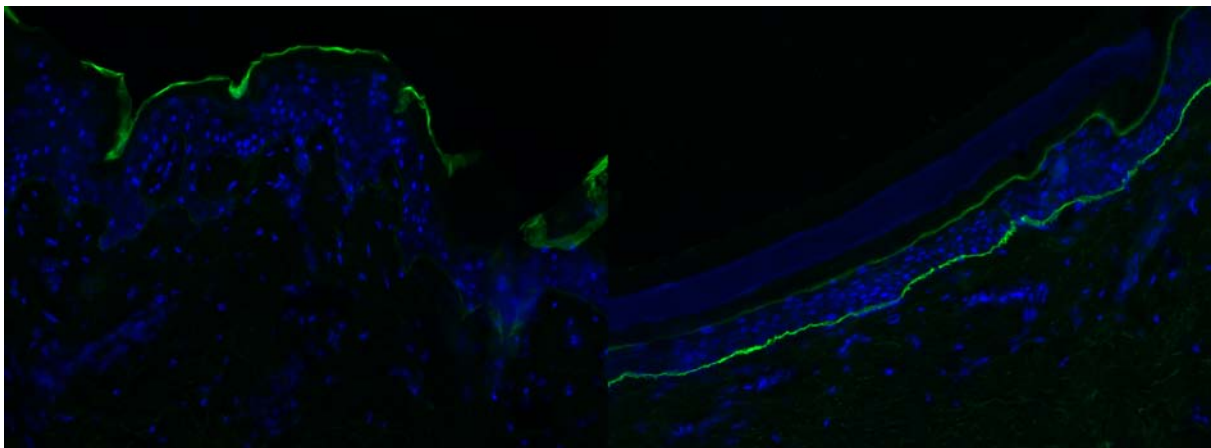
Vzorek: pravé stehno

Klinická DG: EBD, projevy od narození, nejdříve dlaně, plosky, později i trup. Postižení sliznic, včetně jícnu. Hojení pozvolné, s atrofií kůže.

AM: Reakce s protilátkou proti **CK5, CK 14, integrinu $\alpha 6$ a integrinu $\beta 4$, kolagenu IV** dává shodný pozitivní výsledek s kontrolou nezměněné zdravé lidské kůže. **Kolagen VII** 1/50 slabší reakce než kontrola, 1/100 slabší reakce než kontrola a 1/200 reakce negativní, kontrola pozitivní.

ELMI: Kotvící fibrily v oblasti lezionální skin většinou chybí, patny zcela výjimečně.

Závěr: RDEB lokalizovaná nebo generalizovaná forma, mírnější fenotyp.



Pacient č.6, kolagen VII, původní zvětšení 100x, 1/200
/arteficiální svit je hyperkeratóza/

Kontrola (NHS), kolagen VII, původní zvětšení 100x, 1/200

Pacient číslo 7, ročník 1976, pohlaví mužské

Předchozí histologické vyšetření: v ložském roce, ELMI - EBJ nebo EBS

Vzorek: 1) pre-lesional skin, dorsum pravé ruky

2) non-lesional skin (levá paže)

Klinická DG: pozitivní rodinná anamnéza ze strany otce, pacient v dětství zastřený hlas, postižení nehtů, otlaky, hemoragické puchýře s maximem na akrech.

AM: Vzorek 2) výsledky jsou shodné s pozitivní kontrolou – reakce s protilátkou proti CK5, CK 14, BPAg1 a 2, integrinu $\alpha 6$ a integrinu $\beta 4$, kolagenu IV a VII, proti plectinu.

Vzorek: 1) pre-lesional skin, dorsum pravé ruky – zastižen puchýř a výsledky jsou následující:

CK5 – převážně v bázi puchýře

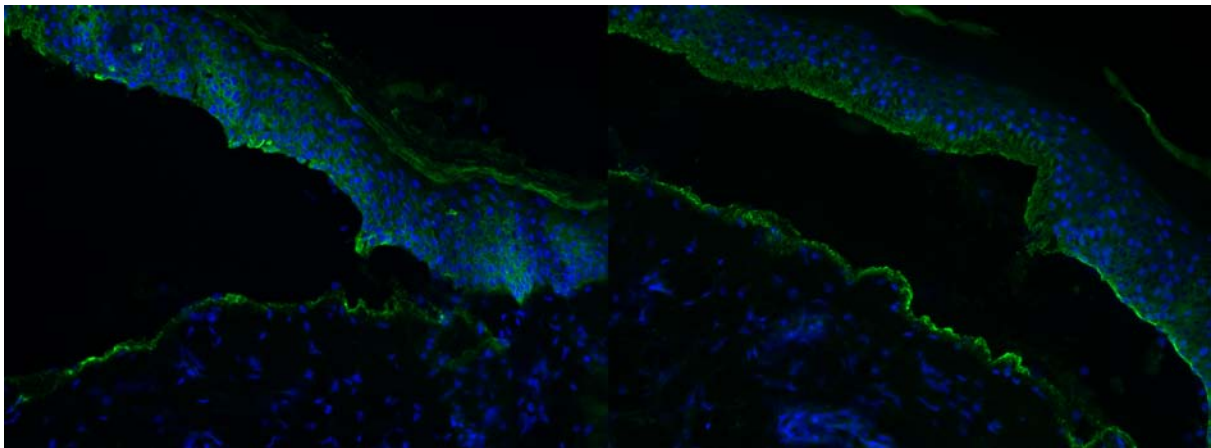
CK 14 – v bázi a částečně i ve stropu puchýře

Laminin 5 v bázi puchýře

Kolagen VII a IV v bázi puchýře

ELMI: nálezy svědčí pro EBC simplex, typu Dowling-Meara.

Závěr: reakce svědčí pro intradermální pozici puchýře, tedy EBS.



Pacient č. 7, CK5, původní zvětšení 100x, puchýř, pozitivita v bázi

Pacient č. 7, CK14, původní zvětšení 100x, puchýř, pozitivita v bázi

6. DISKUZE

Záměr zavedení nonmolekulární diagnostiky EB je na našem pracovišti podpořen grantovým projektem NR/9346 – 3 ve spolupráci s FN Brno, oddělením lékařské genetiky a dětskou kožní klinikou pod vedením prim. MUDr. Hany Bučkové, PhD.

Nejvýraznější počáteční obtíží bylo vytvoření panelu vhodných primárních protilátek a zjistit jejich komerční distributory, v čemž nám zčásti pomohla paní Gabriela Pohla-Gubo, PhD z Federal Hospital Salzburg. Některé protilátky však pracoviště v Rakousku dostalo darem a již nemají k dispozici jejich přesný zdroj. Dále se nám nepodařilo nikde najít distriburora a prodejce protilátky Uncein (19-DEJ-1) proti lamininu 6, užitečnou pro diagnostiku EBJ. Zmiňuje se o ní paní Marjon Pasmooij ve své práci *Genotyping of unusual phenotypes in epidermolysis bullosa* (ISBN: 90-367-2640-9) GRONINGEN, THE NETHERLANDS, 2006, s.202,(12) kterou jsme našli na internetu v elektronické podobě. Ovšem rovněž uvádí, že se jedná o dar od dr. J.D. Fine, Nashville, USA. Z čehož usuzujeme, že tato protilátka zřejmě není komerčně dostupná a některé laboratoře molekulární biologie jsou schopny si ji vytvořit sami pro vlastní potřebu.

Dále jsme se v literatuře setkali s naprosto protichůdnými názory na vhodný odběr vzorku kůže. Autoři Papadimitriou, J.M., Henderson, D.W., Spagnolo, D.V. (5) píší, že vzorky kůže nesmějí být odebírány raznicí. Jediným doporučeným způsobem je podle těchto autorů excize, na rozdíl od Jo-David Fineho a Lynne Thayer Smithe (7), kteří ve své práci jako optimální přístup uvádí právě biopsii pomocí raznice, která se plně osvědčila i v našich postupech.

V budoucnu se budeme snažit odstranit potíže s protilátkami BPAg1 a BPAg2, inkubace po dlouhou dobu není příliš vhodná, někdy způsobuje rozpad tkáně, obzvláště v místě puchýře. Zvolíme nejspíše jiného výrobce. Rovněž bychom chtěli zkrátit celý pracovní postup, což by znamenalo zhotovení kryostatových řezů po několika hodinách od zmražení, ne tedy až druhý den.

V České republice jiné pracoviště zabývající se touto problematikou není, rádi bychom navštívili některé ze zahraničních a přivezli si cenné poznatky a zkušenosti.

7. ZÁVĚR

Antigenní mapping je důležitou součástí diagnostiky EBC. Finančně a časově je dostupnější než ELMI a nesmírně přínosný pro laboratoře molekulární genetiky. Problémem je vymezení diagnostické skupiny protilátek, které bezpečně umožní zařazení všech geneticky charakterizovaných jednotek. Dalším problémem zůstává praktické vyzkoušení použití jednotlivých protilátek na konkrétním materiálu bioptických vzorků. Dosažením vytčeného cíle jsme vyřešili oba problémy a můžeme prohlásit, že námi používaný soubor biologicky vhodných a komerčně dostupných protilátek splňuje diagnostické potřeby moderní bioptické laboratoře. Imunohistologickými postupy vyzkoušenými a standardizovanými v naší laboratoři jsme dospěli k ekonomicky únosné diagnostice EBC, bez nutnosti použití finančně náročných genetických a molekulárně biologických metod.

8. SEZNAM LITERATURY

1. Buček, J., Bučková, H., **Epidermolysis bullosa congenita**, IDVPZ, Brno, 2000
2. Horký, D., Čech, S.: **Mikroskopická anatomie**, LF MU, Brno, 2005, s. 219 – 230
3. McKee, P.H.: **Patology of the skin**, Second Edition. Mosby–Wolfe, London, 1996, s. 1–16
4. Weedon, D.: **Skin Pathology**. Churchill, Livingstone, Edinburgh, 1997, s. 17-28
5. Papadimitriou, J.M., Henderson, D.W., Spagnolo, D.V. : **Diagnostic Ultrastructure of Non-Neoplastic Diseases**, Churchill, Livingstone, Edinburgh, 1992, ch.22., **The skin**, Anton – Lamprecht, I., s.473
6. Internetové stránky organizace DEBRA www.debra-cz.org
7. Fine, Jo-David et al.: **Revised classification system for inherited epidermolysis bullosa: Report of the Second International Consensus Meeting on diagnosis and classification of epidermolysis bullosa.**, Am.Acad.Dermatol., 2000, 42, 1051-1066
8. **Hereditární puchýřnaté choroby** (Schachner, 2005 Pediatric Dermatology)
9. J.D. Fine, L.T.: Smith, Nonmolecular Diagnostic Testing of Inherited Epidermolysis Bullosa. chapter 3, s.60-73
10. Lukáš, Z., Dráberová, E., Feit, J., Vojtěšek, B.: **Imunohistochemické metody v biologii a v biotické diagnostice**, LF MU, Brno, 1997, s.17-20,
11. Internetové stránky přírodovědecké fakulty UK
http://www.natur.cuni.cz/parasitology/parpages/mikroskopickatechnika/fluorescencnimi_kroskopie.doc(11)
12. Internetové stránky Univerzity Groningen,
<http://dissertations.ub.rug.nl/faculties/medicine/2006/a.m.g.pasmooij/>
13. www.chemicon.com
14. www.santacruzbiotechnology.com
15. www.visionbiosystems.com
16. www.abcam.com