

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOFYZIKY A FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

ÚMRTNOST PODLE HLAVNÍCH PŘÍČIN V ZÁVISLOSTI NA VĚKU

SLEDOVÁNÍ ISCHEMICKÝCH ZMĚN MYOKARDU U OSOB NAD
60 LET VĚKU POMOCÍ IMUNOHISTOCHEMICKÝCH METOD

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Monika Kuchařová, Ph.D.

Konzultant: Prim. MUDr. Pavel Toupalík, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Stanislava Rudolfová

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

V Hradci Králové dne: 5.5.2016

Podpis:

Tímto děkuji školitelce paní Mgr. Monice Kuchařové, Ph.D. za cenné rady a zvláště děkuji Prim. MUDr. Pavlu Toupalíkovi, Ph.D. za podněty a připomínky k mé bakalářské práci.

Obsah

1. Cíl práce	6
2. Charakteristika dat.....	7
3. Teoretická část.....	13
3.1 Obecný úvod do problematiky	13
3.2 Náhlá smrt obecně	13
3.2.1 Onemocnění kardiovaskulárního systému jako příčina náhlé smrti.....	13
3.2.2 Náhlá kardiální smrt dospělých.....	14
3.3 Současné možnosti průkazu časných fází ischemických změn myokardu.....	16
3.4 Imunohistochemie a její vývoj	17
3.4.1 Odběr materiálu.....	18
3.4.2 Fixace tkání	18
3.4.3 Pufrované roztoky	18
3.4.4 Ošetření tkáňových řezů natrávením.....	19
3.4.5 Využití mikrovln k revitalizaci antigenních struktur	19
3.4.6 Blokování endogenní aktivity enzymů.....	19
3.4.7 Blokování pozadí.....	20
3.4.8 Chromogeny	20
3.5 Základní imunohistochemické metody.....	20
3.5.1 Přímá metoda.....	20
3.5.2 Nepřímá dvoustupňová metoda.....	21
3.5.3 Nepřímá trojstupňová metoda	21
3.5.4 Rozpoznání a náprava chybného postupu	22
4. Experimentální část.....	23
4.1 Materiál.....	23
4.1.1 Rostoky, činidla	23
4.1.2 Pomůcky a přístroje.....	23

4.2	Pracovní postup	24
4.2.1	Fixace, odvodnění, projasnění a prosycení tkáně.....	25
4.2.2	Zalévání tkáně do parafínu a krájení parafínových bloků.....	25
4.2.3	Histologické barvení Hematoxylin-eosin.....	26
4.2.4	Imunohistochemické barvení	26
5.	Výsledky.....	28
6.	Diskuse	32
6.1	Diagnostika ischemických změn myokardu	32
6.2	Vliv autolýzy na imunohistochemické vyšetření myokardu	32
7.	Závěr.....	34
8.	Seznam tabulek	35
9.	Seznam grafů.....	36
10.	Seznam obrázků	37
11.	Použitá literatura	38

1. Cíl práce

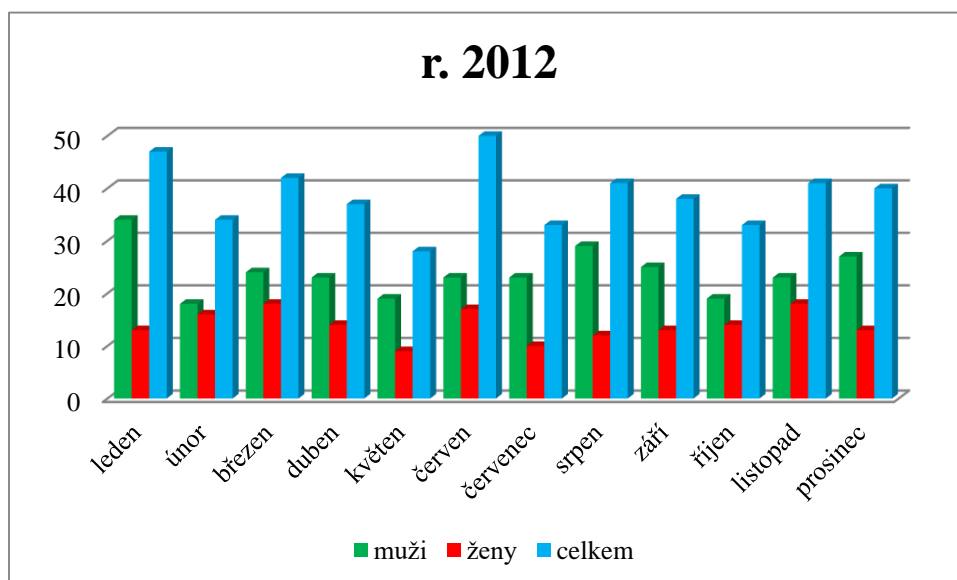
V této práci jsem se zaměřila na skupinu osob zemřelých na infarkt myokardu, a to nad 60 let věku. Cílem této práce je jednak statistické zpracování dat úmrtnosti na infarkt myokardu, evidovaném na našem Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici a za další možnost využití imunohistochemických metod v časně diagnostice infarktu myokardu. Práce popisuje vhodnost imunohistochemických metod pro soudně lékařskou praxi.

2. Charakteristika dat

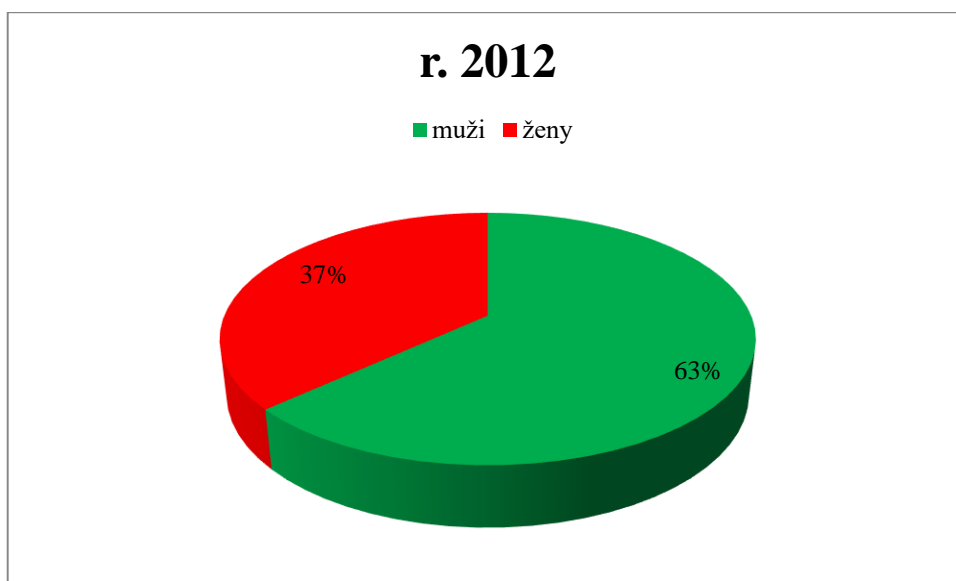
V první části práce jsem vypracovala statistiku osob, zemřelých na infarkt myokardu, nad 60 let věku, které jsou evidovány na našem Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici, za rok 2012 a 2013. Sledovala jsem pohlaví a rozdělení pacientů, dle místa úmrtí, na pitvy nemocniční označované písmenem N (pitvy prováděné na patologicko-anatomickém oddělení) a pitvy zdravotně bezpečnostní označované písmeny ZB (pitvy prováděné na oddělení soudního lékařství). Zjištěné údaje jsem shrnula v níže uvedených tabulkách a grafech (tabulky č. 1, 2, 3, 4) a (grafy č. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

měsíc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
muži	34	18	24	23	19	23	23	29	25	19	23	27
ženy	13	16	18	14	9	17	10	12	13	14	18	13
celkem	47	34	42	37	28	50	33	41	38	33	41	40

Tabulka č. 1 - počet zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2012.



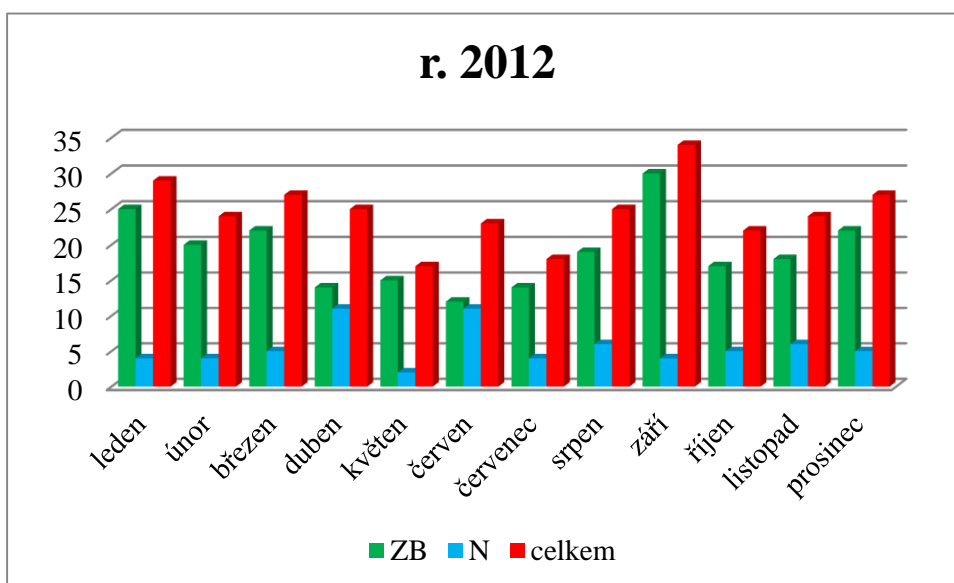
Graf č. 1 - počet zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2012.



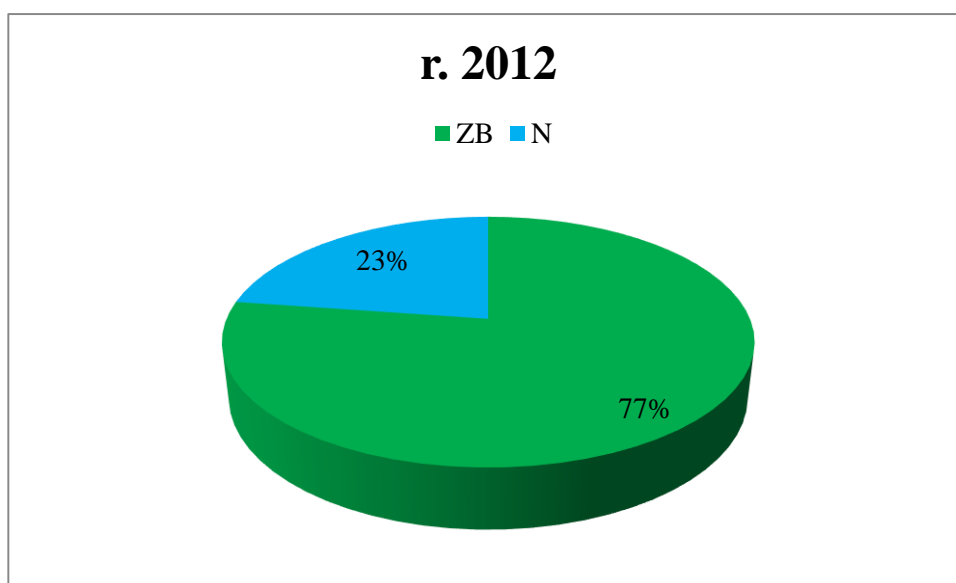
Graf č. 2 – procentuální rozdělení počtu zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2012.

měsíc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ZB	25	20	22	14	15	12	14	19	30	17	18	22
N	4	4	5	11	2	11	4	6	4	5	6	5
celkem	29	24	27	25	17	23	18	25	34	22	24	27

Tabulka č. 2 - počet provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2012.



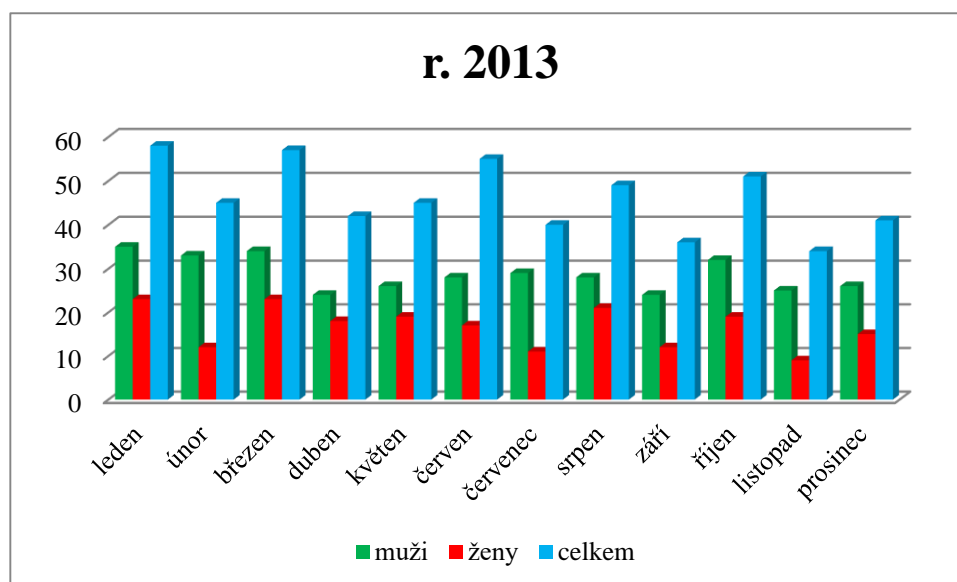
Graf č. 3 - počet provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2012.



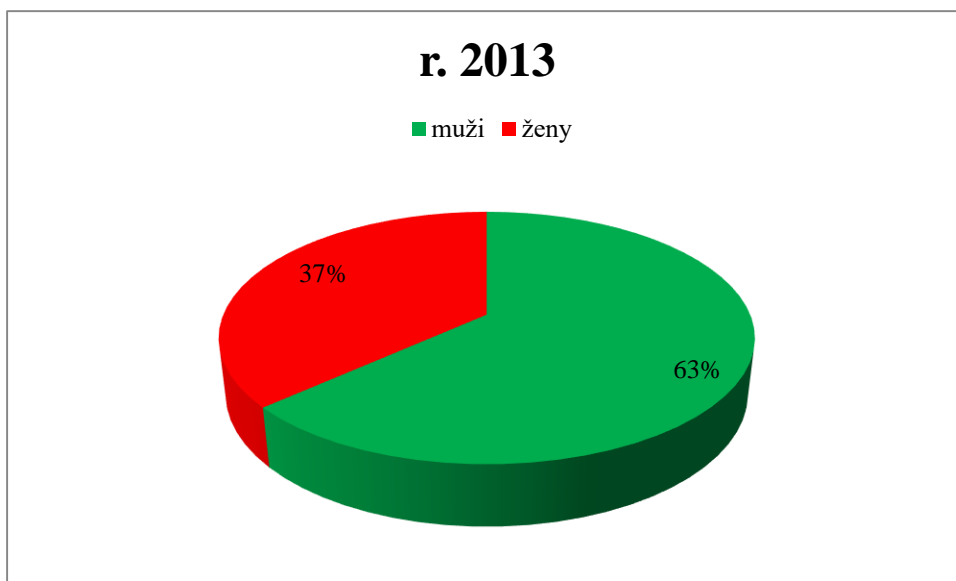
Graf č. 4 - procentuální rozdělení provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2012.

měsíc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
muži	35	33	34	24	26	28	29	28	24	32	25	26
ženy	23	12	23	18	19	17	11	21	12	19	9	15
celkem	58	45	57	42	45	55	40	49	36	51	34	41

Tabulka č. 3 - počet zemřelých mužů a žen na infarkt myokardu, nad 60 let věku evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.



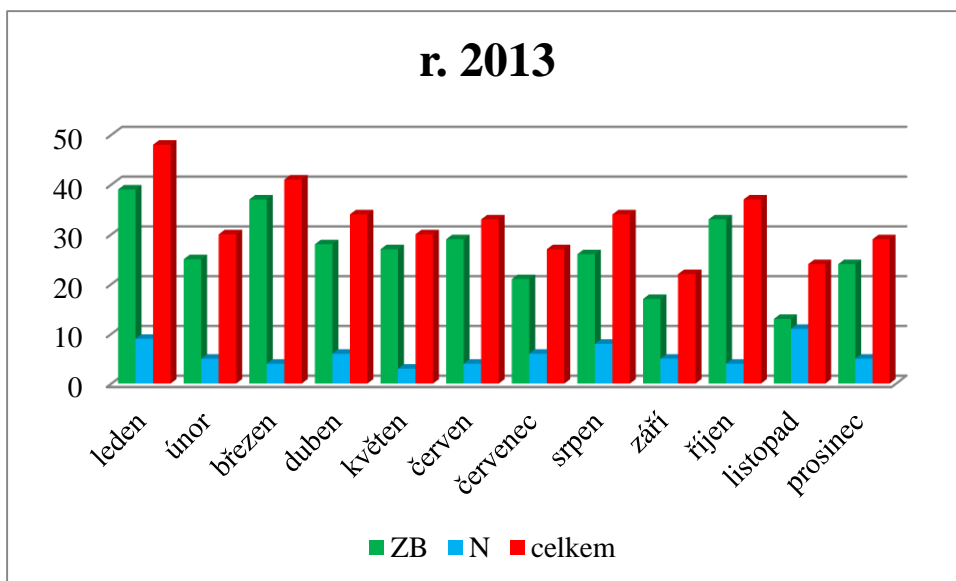
Graf č. 5 - počet zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.



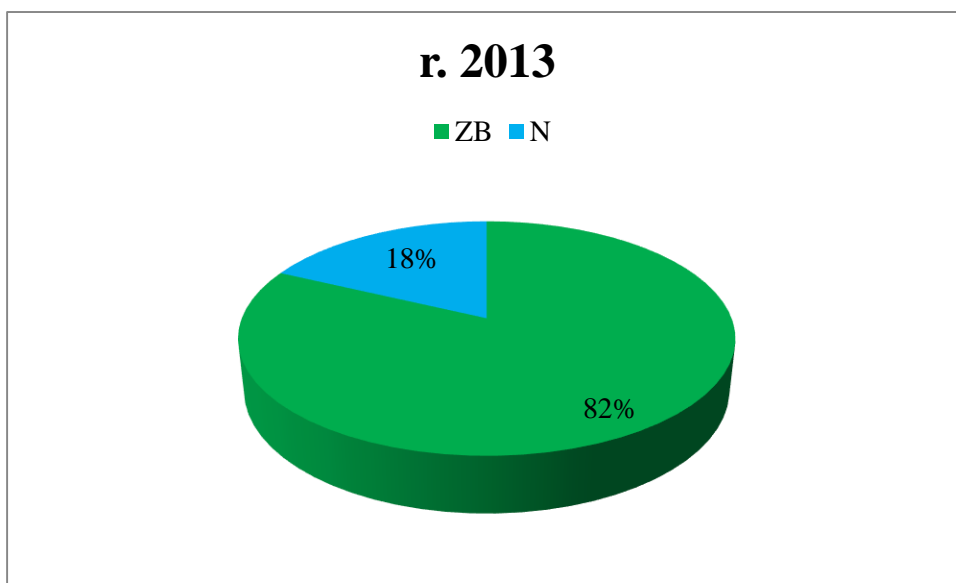
Graf č. 6 - procentuální rozdělení počtu zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.

měsíc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ZB	39	25	37	28	27	29	21	26	17	33	13	24
N	9	5	4	6	3	4	6	8	5	4	11	5
celkem	48	30	41	34	30	33	27	34	22	37	24	29

Tabulka č. 4 - počet provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.



Graf č. 7 - počet provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pítav, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.



Graf č. 8 - procentuální rozdělení provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pítav, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.

3. Teoretická část

3.1 Obecný úvod do problematiky

Na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubicích se často setkáváme s nutností diagnostikovat časná stádia ischemického poškození myokardu. Jedná o početnou skupinu náhle zemřelých osob, z nichž nejvíce umírá na nemoci kardiovaskulární.

Běžné histologické metody, které dosud rutinně využíváme, nejsou, schopny zachytit změny vznikající v myokardu během prvních hodin trvání ischemie. Pokud v tomto časovém úseku dojde k úmrtí, bývá makroskopický i běžný histologický nález na myokardu zcela negativní.

V případě posuzování zejména časných stádií ischemických změn myokardu dnes již nelze vystačit s rutinními histologickými metodami, které nemohou poskytnout dostačující informaci o skutečném rozsahu a charakteru ischemického poškození myokardu. Jisté naděje v této oblasti představuje imunohistochemie, která je však k průkazu infarktu myokardu využívána minimálně a pokud ano, tak většinou pouze k průkazu skupinových vlastností systému AB0 v kosterním svalu a myokardu při pokročilých posmrtných změnách, kdy nelze využít běžné sérologické metody [1].

3.2 Náhlá smrt obecně

Náhlá a neočekávaná smrt nastává v cca 15-20 % všech úmrtí a z hlediska diagnostiky kausální patogeneze představuje v soudním lékařství významné místo [2]. Vedle násilné smrti je tato skupina těžištěm soudně lékařského posuzování. Tato úmrtí nastávají zpravidla mimo zdravotnická zařízení – doma, v zaměstnání, při sportu, v přírodě, ale též ve vozidlech lékařské služby či v příjmových zdravotnických zařízeních. Nelze zcela vyloučit ani náhle probíhající příhody u osob v sociálních zařízeních, kde není vždy dostatečně zajištěn příslušný dozor [4].

3.2.1 Onemocnění kardiovaskulárního systému jako příčina náhlé smrti

V rozvinutých zemích patří k nejčastějším příčinám náhlé smrti choroby kardiovaskulární [2]. Zatímco v dospělém věku se jedná zejména o ischemickou chorobu srdeční [2], v nižších věkových skupinách bývají příčiny náhlé kardiální smrti odlišné.

Zatímco v novorozeneckém období (a to i v širším, tj. 28denním) se jedná o problematiku okrajovou, v kojeneckém i batolecím věku lze již taková úmrtí diagnostikovat. Předškolní období a první roky školního života jsou z tohoto hlediska skupinou nevýznamnou (převažují zde příčiny akutního respiračního selhání), ale u tzv. „náctiletých“ - adolescentů a též ve věku mezi 20 a 35, jedná se o fenomén významný. V tomto období jsou náhlá úmrtí spojená zejména s tělesnou aktivitou [6].

Ve středním a vyšším věku patří náhlá kardiální smrt k nejčastější příčině náhlého úmrtí, a právě o této skupině zemřelých osob bude pojednáno níže [4].

3.2.2 Náhlá kardiální smrt dospělých

Nejvíce náhlých úmrtí z příčin kardiovaskulárních je zapříčiněno ischemickou chorobou srdeční (ICHS), při které na podkladě ischemie myokardu dochází k akutní insuficienci srdeční či k exacerbaci chronické srdeční nedostatečnosti. Postižena je převážně střední a starší věková skupina, výjimkou však není ani výskyt ischemické choroby srdeční u mladších jedinců. Zatímco u žen před klimakteriem dochází k náhlým úmrtím zapříčiněným ICHS jen výjimečně, po 60. roce je poměr mužů a žen již vyrovnaný [2].

Koronární aterosklerosa je nejčastější příčinou ischemie myokardu. Vedle genetických faktorů se na jejím rozvoji podílejí i další faktory, zejména způsob života (kouření, strava bohatá na živočišné tuky, stresové situace) a jiná onemocnění (hypertenze, diabetes mellitus).

Morfologická diagnostika je založena jednak na nálezů stenózy koronární tepny a jednak na hodnocení vlastního myokardu. Okluze věnčitých tepen způsobenou postupným narůstáním ateromového plátu nachází patolog či soudní lékař spíše zřídka, neboť se jedná o proces probíhající v delším časovém horizontu. Klinické příznaky obvykle donutí takovéto pacienty vyhledat lékařskou pomoc. V praxi se častěji setkáváme s náhle vzniklou okluzí způsobenou exulcerací ateromového plátu či trombosou nasedající na zvrhodovatělý plát. Právě takováto náhle vzniklá okluze je často příčinou náhlé srdeční insuficience, při které pacienti umírají mimo zdravotnická zařízení s minimální nebo žádnou anamnesou. Kromě postupujícího sklerotického procesu však existují i další příčiny náhle vzniklé ischemie myokardu, např. svalové mŕstky či spazmy věnčitých tepen.

U věnčitých tepen záleží nejen na typu zúžení (uzávěru), ale též na lokalizaci zúžení, množství kolaterál a anastomos mezi hlavními větvemi a na dřívějším postižení myokardu. Z hlediska lokalizace patří mezi nejzávažnější postižení sestupné větve levé koronární arterie,

někdy nazývané též „arterií náhlé smrti. U myokardu hraje roli jak ischemické postižení (myofibrosa, jizvy po infarktech), tak i případná hypertrofie svaloviny, která může vést k tzv. relativní koronární insuficienci, kdy relativně intaktní koronární řečiště není schopno dostatečně zásobovat zbytně sval kyslíkem. Všechny tyto stavy je tedy nutné při morfologické diagnostice zohlednit.

Vlastní makroskopický nález na myokardu nemusí být vždy přesvědčivý. U náhle zemřelých osob se zdaleka ne vždy stačí vytvořit dostatečný morfologický nález na srdečním svalu, tj. infarkt myokardu. K tomu, aby bylo možné makroskopicky diagnostikovat při pitvě infarkt myokardu, jakožto koagulační nekrosu tvořící v srdeční svalovině žlutavé jílovité ložisko, je nutná určitá doba trvání ischemie (zpravidla více než 24 hodin). Většina takto postižených pacientů však z důvodu klinických obtíží vyhledá lékařskou pomoc a k jejich případným úmrtím pak dochází obvykle ve zdravotnickém zařízení. Pitva takto zemřelých osob pak probíhá na odděleních patologie, nikoliv na soudním lékařství [4].

V některých případech vede infarkt myokardu k ruptuře stěny komory s následným krvácením a tamponádou srdce. Morfologická diagnostika v takovýchto případech nečiní obtíže.

Vedle ischemické choroby srdeční mohou být další příčinou náhlé smrti v dospělém věku myokarditidy, zejména virového původu, které nejsou včas klinicky diagnostikovány. U myokarditid nepozorujeme žádnou výraznou převahu ve výskytu, pokud jde o pohlaví či věk. Často se jedná o parainfekční zánět myokardu, který vznikl buď v průběhu nerozpoznané infekce, nebo se rozvinul později po prodělané infekci. K dekompenzaci srdeční činnosti dochází často při zvýšené fyzické námaze, zejména při sportu, při namáhavé fyzické práci apod. K náhlé smrti tak často dochází bez předchozích klinických příznaků, případně mohou být obtíže zcela necharakteristické (febrilie, dušnost, únava apod.) a mohou být považovány za běžné virové onemocnění. Rizikem je také podcenění rekonvalescence po prodělané virose.

Makroskopický nález při pitvě bývá necharakteristický, obvykle lékař pozoruje pouze známky akutního oběhového selhání s otokem plic, otokem mozku a překrvením vnitřních orgánů. Při mikroskopickém vyšetření myokardu pak bývají diagnostikována ložiska zánětlivé lymfoplasmocytární infiltrace či dispersně uložené myomalacie [4].

Z kardiovaskulárních příčin náhlé smrti je nutno zmínit ještě některá další onemocnění srdce a cév - zejména nepoznané chlopenní vady s následnou hypertrofií srdce, dále valvulární stenózu aorty, která se vyskytuje nejčastěji u mužské populace mezi 20. a 50. rokem života a ruptury aneurysmat aorty. Ruptura aneurysmatu může probíhat jak jednorázově tak

dvoufázově s krvácením do stěny aorty. Fatálním následkem pak je zakrvácení dutiny hrudní či břišní či krvácení do osrdečníku s tamponádou srdce [4].

3.3 Současné možnosti průkazu časných fází ischemických změn myokardu

Běžnými histologickými metodami lze akutní ischemické změny myokardu prokázat až po uplynutí více hodin, což v soudně lékařské problematice často nedostačuje. Nesporného pokroku v této oblasti bylo dosaženo aplikací histochemie, o jejíž rozvoj se u nás zasloužil zejména Lojda, Neoral [3, 4]. Ke zlepšení makroskopické diagnostiky časných fází ischemického poškození myokardu přispěla u nás v 70. letech aplikace makroenzymatické reakce na průkaz dehydrogenáz v srdečním svalu [3]. Princip metody spočívá v tom, že v nepoškozeném svalu dojde účinkem dehydrogenáz k redukci vhodného indikátoru na barevný produkt, kdežto v místě ischemického poškození ke zbarvení nedochází buď vůbec, nebo v podstatně menší míře. Neora použil v původní metodě jako indikátor telurit, který je však příliš málo citlivý. Jiní autoři proto doporučili užití tetrazoliových solí, a to trifenylnitrotetrazoliumchlorid, neotetrazolium a jodonitrotetrazolium [3, 4]. Formazan uvedených tetrazoliových solí má červenou barvu, a proto je kontrast poškozených a nepoškozených svalových vláken malý. Proto byl na zasedání expertů WHO v roce 1968 doporučen Lojdou postup podle Nachlase a Shnitky, v němž se užívá jako tetrazoliové soli nitrotetrazoliová modř. Tato metoda má podle autorů umožnit diagnózu ischemického poškození myokardu po 7 až 8 hodinách trvání ischemie. Nevýhodou nitrotetrazoliové modři je poměrně velká citlivost, takže se zachycují i místa se sníženou aktivitou poměrně dobře. Lojda a Strejc doporučují vlastní modifikaci makroenzymatické reakce na dehydrogenázy s použitím tetrazoliové modři [3]. Makroenzymatická reakce na průkaz dehydrogenáz byla prováděna současně s použitím nitrotetrazoliové modři i tetrazoliové modři, přičemž při porovnání obou metodik bylo trvalejších a názornějších výsledků dosaženo s tetrazoliovou modři [3].

Nespornou výhodou a přínosem enzymatických reakcí je skutečnost, že nemusíme pro potřebu histologického vyšetření odebrat tkáňový vzorek „naslepo“, ale pouze z místa s nejpravděpodobnějším poškozením svaloviny. I z našich zkušeností vyplývá další výhoda enzymatického vyšetření, a to posun diagnostických možností směrem k časným fázím ischemie. V našich vlastních studiích jsme na našem oddělení vyšetřovali enzymatickou aktivitu SDH (sukcinátdehydrogenázy), přičemž snížení až vymizení reakce vždy předcházelo

ložiskovým změnám myokardu patrným pouhým okem. Nevýhodou enzymatických metod je naopak relativně malá odolnost vůči autolýze [6].

V diagnostice časných ischemických lézí myokardu se dostává v poslední době do popředí zájmu zejména imunohistochemie. Pomocí imunohistochemických metod je prokazováno vymizení bílkovin primárně přítomných v myokardu (např. myoglobinu a desminu) nebo ukládání bílkovin, které pronikají do poškozených srdečních svalových vláken z krve (např. fibrinogen). Na možnost využití imunohistochemické detekce myoglobinu, jakožto markeru ischemického poškození myokardu, u nás upozornil v 80. letech Neoral [4, 6].

3.4 Imunohistochemie a její vývoj

Imunohistochemie zahrnuje všechny techniky využívající monoklonální nebo polyklonální protilátky k detekci příslušných antigenních struktur ve tkáních. Prvopočátky imunohistochemie lze datovat od roku 1941, kdy Coons a jeho spolupracovníci provedli poprvé průkaz antigenů ve tkáních pomocí fluoresceinem značené protilátky tzv. přímou metodou [5, 18]. Nevýhodou však byla potřeba použití nativního materiálu, což značně omezovalo možnosti využití zejména v diagnostické praxi. K rozvoji imunohistochemie dochází v roce 1976, kdy Milstein a Köhler připravili protilátky proti jednomu epitopu antigenní molekuly – tzv. monoklonální protilátky [2, 16, 18]. Širší zavedení imunohistochemie do praxe představuje konec 70. let, kdy se podařilo spojit enzym s protilátkou a tím využít tkáňových řezů fixovaných ve formolu a zalitých do parafinového bločku [5, 18]. To umožňovalo jednak do jisté míry unifikovat odběr materiálu pro histologické i imunohistochemické vyšetření, ale též se tím otevřela možnost retrospektivních vyšetření již dříve odebraných tkáňových řezů. Významným přínosem bylo použití sendvičové metody [6, 18].

Imunohistochemie je v současnosti hojně využívána v patologii, kde slouží zejména v diferenciální diagnostice nádorů [5, 6]. V soudně lékařské praxi je dosud imunohistochemie využívána minimálně, a pokud ano, tak většinou pouze k průkazu skupinových vlastností systému ABO v kosterním svalu a myokardu. Pro medicínský obor soudní lékařství je tedy neodkladným úkolem implementace vhodných imunohistochemických metod i do této problematiky [6,1].

3.4.1 Odběr materiálu

V soudním lékařství, oproti patologii, převažuje odběr nekroptického materiálu. Výhodou je, že při imunohistochemickém vyšetřování naprosté většiny orgánů či tkání, tedy i myokardu, plně postačuje odběr tkáňových řezů rutinním způsobem po provedení pitvy [6].

Pokud odebírá lékař materiál u zemřelých pitvaných více dnů po smrti, snaží se o odběr více vzorků tkáně z různých míst myokardu, pokud možno co nejméně zasažených autolýzou [6]. Z odebraných vzorků provedeme nejdříve běžné histologické zpracování tkáňových řezů s barvením hematoxylinem-eosinem. Mikroskopicky zhodnotíme stupeň autolýzy v jednotlivých řezech a pro finančně náročnější imunohistochemické vyšetření pak volíme řez, který je autolýzou nejméně poškozen [2, 5, 6].

3.4.2 Fixace tkání

K fixaci tkání se nejčastěji používají aldehydy, přičemž pro světelnou mikroskopii se běžně užívá formaldehyd. Aldehydy při fixaci reagují rychle zejména s aminoskupinami aminokyselin a dalších sloučenin a za určitých podmínek ponechají zachovanou alespoň část enzymatické a imunoglobulinové aktivity, což umožňuje použít imunohistochemické metody na lokalizaci příslušných aktivit ve tkáních. Nepříznivé vlivy fixace na tkáň můžeme částečně ovlivnit dalšími postupy. Mezi nejčastější fixační tekutiny patří pufrovaný formol, který do jisté míry chrání antigenní struktury ve tkáních před nepříznivým vlivem výkyvů pH [2, 5, 6].

3.4.3 Pufrované roztoky

Pufry mají schopnost udržet si svou hodnotu pH i po přidání menšího množství kyselin a zásad. V imunohistochemii jsou pufry používány na oplachování řezů i na ředění protilátek. V případě, že používáme imunoperoxidázovou metodu, nesmějí pufry obsahovat NaN_3 . Jeho přítomnost v roztoku blokuje peroxidázu a znemožňuje tak demaskování antigenního komplexu [6].

Mezi nejpoužívanější pufry v imunohistochemii patří fosforečnanové tlumivé roztoky. 0,01M fosfátový pufr slaný (PBS pH 7,2 až 7,4) připravíme rozpuštěním 1,48 g NaHPO_4 a 0,43 g KH_2PO_4 v 1 l destilované vody a přidáme 7,2 g NaCl.

0,05 M TRIS pufr s pH 7,6 připravíme rozpuštěním 6,1 g TRIS (trihydroxymethylaminometan) v 50 ml destilované vody. Přidáme 37 ml 1M HCl a objem doplníme do 1 l destilovanou vodou.

Při reakci s AEC (3-amino-9-etyl-karbazolem) použijeme acetátový pufr. Připravíme ho smícháním 210 ml 0,1M ledové kyseliny octové a 790 ml 0,1M octanu sodného [2, 5, 6].

3.4.4 Ošetření tkáňových řezů natrávením

Nepříznivé vlivy fixace na tkáňové antigenní struktury lze do jisté míry zmírnit použitím proteolytických enzymů. Natrávením Ig (imunoglobulinové) molekuly lze do určité míry obnovit antigenní vlastnost biologického materiálu v parafinovém bločku. Mezi nejpoužívanější proteázy v imunohistochemii patří trypsin, pepsin a pronáza. Trypsin používáme v koncentraci 0,1–1 % v destilované vodě s obsahem 0,1 % CaCl_2 při teplotě 37 °C a pH 7,8 po dobu 10 až 30 minut. Pepsin aplikujeme v 0,1–0,3% koncentraci v 0,01M HCl při 37 °C. Pronáza je nejúčinnější v 0,05–0,1 % koncentraci v 0,05M TRIS-HCl při pH 7,4.

Při aplikaci proteolytických enzymů se stává, že tkáňové řezy ztrácejí přilnavost ke sklíčku. Tomu lze zabránit potahováním sklíček speciálními médii, jako je např. Elmerova želatina či chromželatina apod. Dnes spíše používáme komerčně vyráběná skla [2, 5, 6].

3.4.5 Využití mikrovln k revitalizaci antigenních struktur

Proteolytické enzymy používané k natrávení Ig (imunoglobulinové) molekuly mají na parafinových řezech limitovaný dosah účinnosti a pravděpodobně narušují jen povrchové části proteinů. Při použití mikrovln vstupuje do procesu revitalizace antigenních struktur tepelný efekt, který urychluje difuzi, podporuje vznik chemické reakce a stabilizuje bílkoviny. Tento fakt podstatně mění názor, že nadměrně vysoká teplota by mohla nepříznivě ovlivnit tkáň z důvodu denaturace bílkovin. Účinnost řady komerčně dostupných protilátek je závislá na použití mikrovln. Při rozhodování, zdali zařadit ošetření tkání mikrovlnami, se řídíme především instrukcemi výrobce protilátek. Využití mikrovln však přináší určitý efekt i v případech, kdy výrobce podmiňuje účinek preparátu použitím speciálního detekčního systému, fixačního média či změnou postupu zpracování. Zde se osvědčuje provést vlastní testování konkrétní protilátky na sérii pozitivních a negativních kontrolních vzorků tkáně, kdy porovnáváme na stejných tkáňových řezech účinek mikrovln [2, 5, 6].

3.4.6 Blokování endogenní aktivity enzymů

Pro důkaz vazby antigen – protilátka se běžně využívají protilátky značené enzymem (např. peroxidázou, alkalickou fosfatázou). Protože se tyto enzymy vyskytují přirozeně ve tkáni, mohou do značné míry znehodnotit výsledek vyšetření ve smyslu falešně pozitivní reakce.

Z toho vyplývá potřeba bloku endogenní aktivity enzymů. V případě použití peroxidázy použijeme jako substrát 1–3% roztok H_2O_2 v metanolu nebo destilované vodě po dobu 20 až 30 minut. V případě použití alkalické fosfatázy použijeme v závěrečném médiu levamizol (6,18). Pro blokování endogenního avidinu a biotinu lze použít blok s 0,1 – 0,01% avidinem v PBS 20 minut a následně blok s 0,01 – 0,001% biotinem v PBS 20 minut.

Volba správné metodiky umožňuje potlačit endogenní aktivitu enzymů a pro správný výsledek vyšetření je zcela nezbytná [2, 5, 6].

3.4.7 Blokování pozadí

Příčinou falešně pozitivního výsledku může být nespecifická reakce pozadí. Nejčastějším důvodem je vazba primární protilátky na kolagen a jiné pojivové struktury. Příčin nespecifické reakce pozadí je několik. Může se jednat např. o endogenní avidin-biotinovou aktivitu. Biotin a avidin potlačíme inkubací s 0,1 – 0,01% avidinem a 0,001% biotinem. Další možnou příčinou reakce pozadí může být difuze tkáňových antigenních struktur do okolní tkáně. Typickým příkladem je difuze thyreoglobulinu z epitelu do koloidu a okolní tkáně. Další formou reakce pozadí je pohlcení antigenu fagocyty. V některých případech může jít též o křížovou reakci protilátky s podobnými epitopy na různých antigenech [2, 5, 6].

3.4.8 Chromogeny

Samotná vazba antigenu s protilátkou ve tkáni probíhá bez viditelné reakce. K vizualizaci reakce je tedy nutno použít další látku, tzv. chromogen. V případě, kdy je detekční komplex značený peroxidázou (např. peroxidáza-anti-peroxidáza komplex, PAP), používáme jako chromogen 3,3 diaminobenzidín (DAB). Křenuv peroxidáza reaguje se substrátem H_2O_2 v inkubačním roztoku, přičemž oxidací DABu vzniká stabilní hnědý produkt. Vedle DABu lze dále použít 3-amino-9-etylkarbazol (AEC) karmínově červené barvy. V případě použití systému značeného alkalifosfatázou používáme jako substrát Fast red nebo Fast blue. Výsledkem pak je červené, resp. modré zbarvení reakce [2, 5, 6].

3.5 Základní imunohistochemické metody

3.5.1 Přímá metoda

Tzv. přímá metoda je nejjednodušší způsob lokalizace antigenu ve tkáni. Primární protilátka je značena fluoresceinem, enzymem nebo kovem. Konjugované protilátky jsou dostupné pro

široké spektrum antigenů a mají využití zejména v nativních řezech. Při použití na parafinových řezech je tato metoda málo citlivá. Z toho důvodu nachází uplatnění spíše v histopatologii, např. v kožní biopsii. Pro soudně lékařskou problematiku tato metoda vhodná není [1, 6, 16, 18].

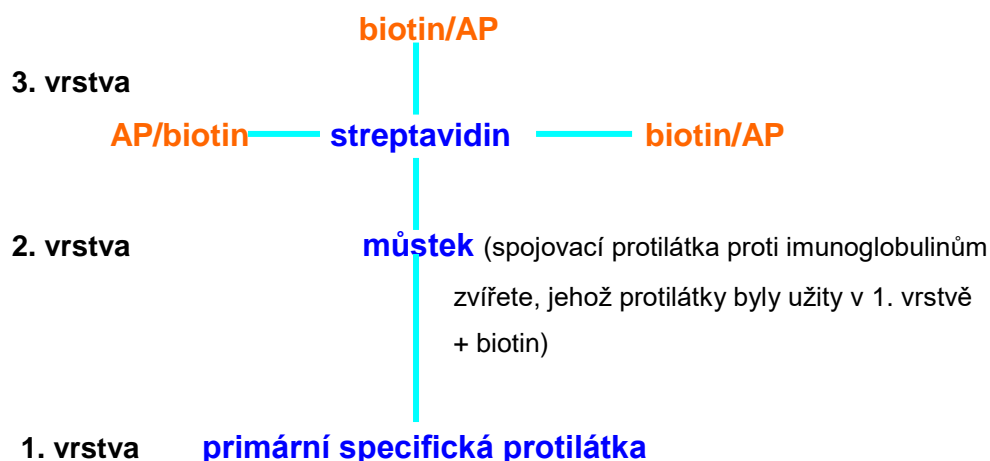
3.5.2 Nepřímá dvoustupňová metoda

Nepřímá dvoustupňová metoda je založena na imunologické vazbě primární protilátky značené alkalifosfatázou. V první vrstvě aplikujeme specifickou protilátku, následuje opláchnutí řezů. V druhé vrstvě nanášíme protilátku proti imunoglobulinům zvířete, které bylo dárce primární protilátky. Druhé antisérum je značené fluorochromem, event. enzymem. V současnosti se dvoustupňová metoda při detekci antigenů používá méně, neboť jsou k dispozici mnohem citlivější metody [1, 6, 16, 18].

3.5.3 Nepřímá trojstupňová metoda

Do této skupiny lze zařadit metodiku označovanou jako PAP (peroxidáza-anti-peroxidáza). V první fázi reaguje primární specifické antisérum s antigenem prokazovaným ve tkáni. Ve druhé fázi je aplikována protilátka (označovaná též jako protilátka spojovací, můstek) proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky se používají v první a třetí fázi. Ve třetí fázi pak nanášíme PAP komplex [6, 18]. Metodika je časově náročnější, ale poměrně citlivá. Při nahrazení peroxidázy v komplexu alkalickou fosfatázou dostaneme metodu označovanou jako APAAP (alkalifosfatáza-anti-alkalifosfatáza), [6, 18].

Další nepřímou trojstupňovou metodou je technika avidin-biotin komplexu, označovaná též jako ABC metoda (obr. 1). Využívá schopnost neimunologické vazby vaječného bílkovinného proteinu avidinu s vitamínem biotinem [6, 18]. Avidin má schopnost vázat čtyři molekuly biotinu. Některá vazebná místa jsou volná a některá vyplněná komplexem biotin-peroxidáza, resp. biotin-alkalická fosfatáza. Volná místa jsou připravena pro navázání biotinilované protilátkové molekuly (můstku). Při použití avidinu získaného z bakterie *Streptomyces avidini*, který dává lepší reakci, nazýváme tento komplex SABC (streptavidin-biotin-komplex) [6]. V současnosti jsou k dispozici velmi citlivé detekční soupravy (KITy) poskytující uspokojivé výsledky i při minimálním množství komplexu antigen-protilátka. ABC, resp. SABC metoda je v současnosti nejcitlivější a lze ji plně doporučit k vyšetřením z oblasti soudně-lékařské problematiky [1, 6, 16, 18].



Obrázek č. 1 - schéma nepřímé trojstupňové metody využívající komplex streptavidin-biotin značený alkalifosfataseou .

3.5.4 Rozpoznání a náprava chybného postupu

Na konečný výsledek imunohistochemického vyšetření má vliv řada faktorů, které mohou vést až k falešné pozitivitě či negativitě vyšetření. Správný laboratorní postup se tedy neobejde bez nezbytných kontrolních vyšetření. Jako pozitivní kontrolu k ověření správného nastavení metody a účinnosti protilátek užíváme tkáňové řezy, které prokazatelně obsahují zjišťované antigenní struktury. Jako negativní kontrolu volíme známé tkáňové struktury bez příslušných antigenů. Nеспецифickou reakci detekčního systému odhalíme vynecháním 1. vrstvy, tj. primární protilátky. Příčinou negativní či příliš slabé reakce pozitivních kontrol může být příliš krátká doba inkubace protilátky, kontaminace protilátky cizorodým materiálem, pokles titru protilátky, nevhodný pufr či pH, vyschnutí tkáňových řezů v průběhu zpracování, nesprávné ředění protilátek, nutnost enzymatické digesce či ošetření tkáně mikrovlnami, špatně zvolené detekční systémy aj. Nadměrné barvení pozadí může mít naopak příčinu ve vynechání bloku nespecifickým sérem, v endogenní aktivitě peroxidázy, avidinu či biotinu, difuzi tkáňových antigenů, příliš dlouhé inkubaci, nedůkladném oplachování řezů atd. O vlivu autolýzy na imunohistochemické vyšetření je pojednáno níže v experimentální části [1, 6].

4. Experimentální část

4.1 Materiál

- Srdeční tkáň
- Kontrolní srdeční tkáň

4.1.1 Roztoky, činidla

- 10% Formol
- Etanol
- Xylen
- Parafín
- TRIS pufr
- PBS pufr
- Destilovaná voda
- Pracovní set DAB
- Pracovní set SABC/AP

4.1.2 Pomůcky a přístroje

- Skleněné dózy
- Plastové kazetky na tkáň
- Kovová pinzeta
- Kovová preparační jehla
- Skleněná podložní skla
- Krycí páska
- Teplá plotna
- Chladicí plotna
- Mrazák
- Biologický termostat
- Rotační mikrotom Ergostar
- Barvicí automat Tissue-Tek Prisma
- Tkáňový procesor Excelsior ES
- Zalévací linka Tissue-Tek

- Mikroskop Nikon Axiomager
- Fotoaparát Canon G9Axiocam

4.2 Pracovní postup

V experimentální části mé bakalářské práce jsem se zaměřila na vliv autolýzy na imunohistochemické vyšetření myokardu. Vzhledem k tomu, že v naší ani světové literatuře nebyla nalezena zmínka o vlivu autolýzy na imunohistochemické vyšetření srdečního svalu, byl proveden vlastní experiment zaměřený na zhodnocení vlivu autolýzy na imunohistochemickou detekci myoglobinu a fibrinogenu v myokardu. Rozhodla jsem se ověřit pokus dr. Toupalíka, který obdobný výzkum prováděl se svým vědeckým týmem. Tento pokus sám popisuje ve své knize Imunohistochemické diagnostické metody v soudnělékařské praxi, vydanou v roce 2001 [6]. Tým Dr. Toupalíka prováděl testování markerů poškození myokardu, tedy myoglobinu a fibrinogenu na souboru více než 100 zemřelých osob. Jednalo se jak o náhlá úmrtí (38 osob), tak o násilné příčiny smrti (65 úmrtí). Skupina náhle zemřelých byla dále rozdělena na úmrtí s makroskopicky patrným infarktem myokardu (20 osob) a na úmrtí v důsledku pokročilé koronární aterosklerózy, avšak bez makroskopických změn myokardu [6]. Pro průkaz o vlivu autolýzy na imunohistochemické vyšetření myokardu byl v první studii použit sekční materiál z myokardu 58leté náhle zemřelé ženy s pitevním nálezem akutního infarktu přední stěny levé srdeční komory s trhlinou stěny a tamponádou srdce při trombose sestupujícího raménka levé tepny věnčité. Makroskopicky byl sval v okolí trhliny lehce prokrvácen, avšak bez jakýchkoliv ložiskových změn barvy [6]. Pro můj pokus se nám podařilo získat velmi obdobný materiál ze zemřelé 63leté ženy, taktéž s pitevním nálezem akutního infarktu myokardu přední stěny levé srdeční komory s tamponádou srdce a trombosou levé tepny věnčité.

MUDr. Toupalík, mi odebral při pitvě sérii tkáňových excizí z bezprostředního okolí trhliny. Z této série jsem si přikrojila pět kousků o velikosti 1x1cm. Vzorky jsem v časových intervalech 24, 48, 72, 96 a 168 h podrobovala autolýze. To znamená, že jsem je nechala volně na vzduchu, bez fixace. Makroskopicky jsem pozorovala na tkáni smršťování, změnu barvy, hnilobu a zápach.

Pro mikroskopické zpracování tkáně jsem zpracovala materiál základní histologickou technikou. Popsanou níže.

4.2.1 Fixace, odvodnění, projasnění a prosycení tkáně

Excizi jsem dala vždy po postmortálním intervalu 24, 48, 72, 96, 168 hodin do kazetky s uzavíratelným víčkem a popsala ji odpovídajícím postmortálním časem například 24 a vložila ji fixovat do druhého dne do 10% formolu. Účelem fixace je rychlá denaturace tkáňových bílkovin, ta zabraňuje v mém případě k další autolýze zkoumaných vzorků. Fixační tekutina musí rychle pronikat, má co nejméně porušovat strukturu tkáně a nesmí snižovat její barvitelnost [17, 18, 19]. Velmi důležité je, aby bylo fixační tekutiny dostatečné množství.

Druhý den jsem kazetku s tkání pustila do tkáňového procesoru, kazetku jsem vložila do nosiče, za pomoci, kterého se automaticky přenášel do lázni s etanolem [17, 19]. Postupně prošel šesti láznemi s alkoholy, kde se takzvaně odvodnil. Po odvodnění se musí etanol dokonale odstranit, neboť se v něm parafín nerozpouští, proto se projasnil třemi xyleny a nakonec prosytil ve dvou lázních tekutého parafínu [17, 18, 19].

4.2.2 Zalévání tkáně do parafínu a krájení parafínových bloků

Třetí den, jsem tkáň zalila na zalévací lince do čistého parafínu rozehrátého na 64 °C, to jsem provedla tak, že tkáň 1x1cm jsem vložila pomocí kovové pinzety na dno kovové zalévací komůrky. Do komůrky se nalije parafín a rychle se do ní přenesou pinzetou tkáň, rovnoměrně a hlavně opatrně jsem ji přimáčkla, přiklopila kazetkou bez víčka označenou číslem 24 a zalila parafínem, dala zmrznout do mrazáku. Zhruba po 15min., kdy parafín zcela ztuhl, jsem odstranila zalévací kovovou komůrku a vyklopila hotový parafínový bloček [17, 18].

Nyní mohu vytvořený parafínový bloček nakrájet na podložní skla. Po vychladnutí, jsem si bloček upevnila do mikrotomu. Ke krájení máme na našem oddělení k dispozici rotační mikrotomy Ergostar, ten se používá ke krájení pouze parafínových řezů. Slouží hlavně k zhotovování sériových řezů.

U rotačního mikrotomu je žiletka upevněna v pevné svorce. Proti ní se pohybuje ve svislé rovině svorka s bločkem, která se automaticky vysunuje pomocí mikrometrického šroubu při každém pohybu bloku proti žiletce o předem zvolenou tloušťku řezu [17, 18, 19].

Bloček jsem si nejprve skrojila nhrubo na velikost 50mikrometrů, poté jsem bloček skrojila na velikost 3 mikrometry a vytvořila reprezentativní řez, který jsem pomocí preparační jehly přenesla na podložní sklo na kapku destilované vody [19]. Řez jsem natáhla na teplé plotně, zde se mi parafín postupně rozpustil a tím mi pomohl vypnout řez. Podložní skla s nativní tkání jsem dala usušit na 15 minut do termostatu.

4.2.3 Histologické barvení Hematoxylin-eosin

Ted' mohu teprve preparáty obarvit v barvicím automatu, kde se pomocí nosiče automaticky pohybují dle zadaného postupu barvení. Obarvila jsem preparáty metodou hematoxylin-eosin, odvodnila, projasnila a zamontovala do krycí pásky [17, 18, 19]. Preparáty jsou připravené k mikroskopii. Hematoxylin-eosin je nejzákladnější a nejpoužívanější přehledná panoptická barvicí metoda. Principem barvení je obarvení jader zásaditým hematoxylinem a ostatních složek kyselým eosinem [17, 18, 19]. Jádra buněk se barví modře, cytoplazma růžově, vazivo a sval červeně, chrupavka modře a erytrocyty oranžovočerveně.

Při běžném histologickém barvení hematoxylinem-eosinem, byl lékařem v mém preparátu zjištěn pokles bazofilie jader kardiomyocytů v místě léze, leukostasa a známky reaktivní hyperemie, mikroskopický obraz byl shodný s obrazem u 58leté ženy. Tím jsem se ujistila, že sekční materiál je vybrán správně.

Toto celé jsem vždy opakovala s tkáněmi po 48, 72, 96 a 168 hodin. Stejně postupoval i tým MUDr. Toupalíka v prvním pokusu.

4.2.4 Imunohistochemické barvení

Nyní mohu provést imunohistochemické vyšetření. K průkazu myoglobinu jsem tedy po domluvě s lékařem použila naprosto shodný pracovní postup, tady nepřímou imunoperoxidasovou metodu ve 2 vrstvách. V první vrstvě jsem aplikovala králičí specifické protilátky proti lidskému myoglobinu fy Zymed. Druhou vrstvu tvořilo prasečí sérum proti králičí bílkovině značené peroxidasou (SwAR/Px). Peroxidasovou aktivitu jsem zjišťovala reakcí s diaminobenzidinem, ten v místě pozitivního nálezu zreagoval hnědou barvou.

K detekci fibrinogenu byly v první vrstvě užity králičí specifické protilátky proti lidskému fibrinogenu fy Dako, přičemž k průkazu navázané specifické protilátky byl zvolen biotin-streptavidinový systém značený alkalifosfatasou (SABC/AP), která v místě pozitivního nálezu vytvořila červené zbarvení.

Postup barvení doporučený firmou Dako s detekčním systémem EnVision:

K průkazu hledaného antigenu (myoglobinu) používáme tkáň zpracované běžnou laboratorní histologickou technikou, fixované v 10% formolu a zalité do parafinu, viz výše. Metodu zmiňuje více autorů [1, 2, 18].

1. Odparafínování tkáně

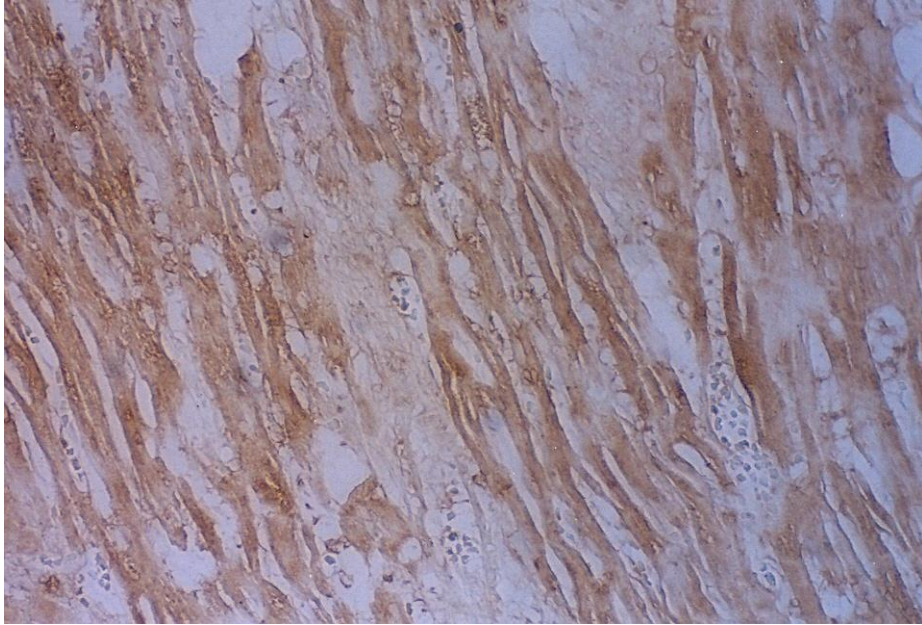
2. Oplach destilovanou vodou
3. Demaskování epitopů (mikrovlnná trouba, vodní lázeň, termostat)
4. Oplach TRIS pufrem
5. Tlumení- blokování endogenní aktivity peroxidem vodíku
6. Oplach TRIS pufrem
7. Primární protilátka
8. Oplach TRIS pufrem
9. Link- navázání enzymatického systému 1.krok
10. Oplach TRIS pufrem
11. Streptavidin- navázání enzymatického systému 2. krok
12. Oplach TRIS pufrem
13. DAB(chromogen) či SABC/AB
14. Oplach destilovanou vodou
15. Dobarvení buněčných jader hematoxylinem
16. Odvodnění, projasnění
17. Montování preparátů

5. Výsledky

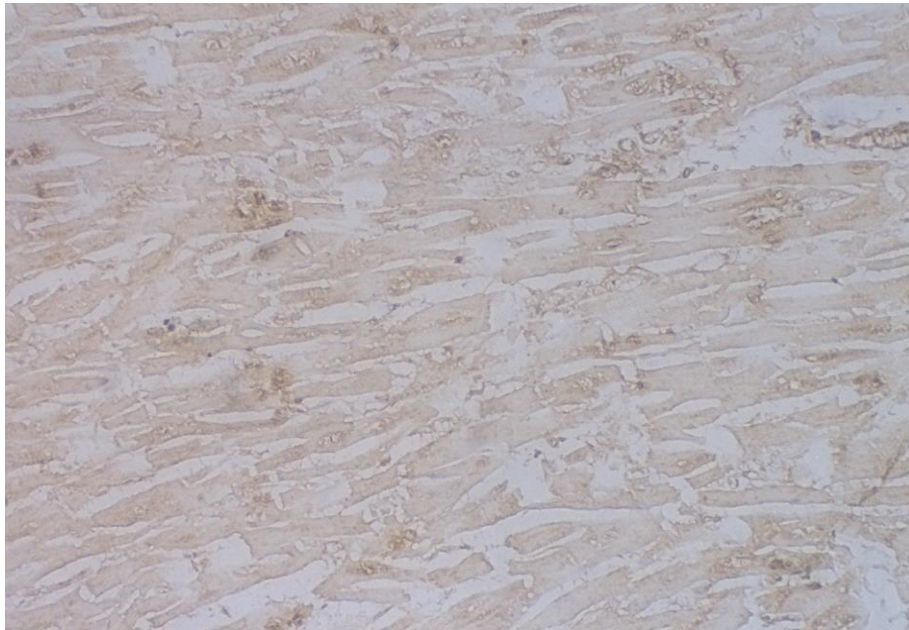
Při vyšetření myoglobinu v tkáňové excizi odebrané 24 hodin po smrti byla zjištěna zřetelná ložiska výpadku myoglobinu, která dobře kontrastovala s nepoškozenými kardiomyocyty. Rovněž při postmortálním intervalu 48 a 72 hodin byla dobře patrná ložiska výpadku myoglobinu a nepoškozená vlákna jevila intenzivní imunoreaktivitu (obr. 2). V excizi tkáně vložené k fixaci až 96 hodin po smrti však byla již velice slabá intenzita barvení a prakticky nebylo možné rozeznat poškozené kardiomyocyty od arteficiálních výpadků myoglobinu. Při postmortálním intervalu 168 hodin, již téměř nebyla patrná pozitivita imunohistochemické reakce (obr. 3).

Při vyšetření s protilátkou proti fibrinogenu v excizi odebrané 24 hodin po smrti byla zjištěna ložiskovitě pozitivní reakce v okolí trhliny myokardu i drobnější dispersně uložená depozita fibrinogenu v jednotlivých kardiomyocytech. Obdobný obraz poskytovaly i excize odebrané 48, 72, 96 a 168 hodin po smrti, na kterých i přes výraznou autolýzu bylo možno dobře odlišit vlákna poškozená s depozity fibrinogenu od vláken nepoškozených, na kterých nebyla pozorována pozitivita imunohistochemické reakce (obr. 4 až obr. 6).

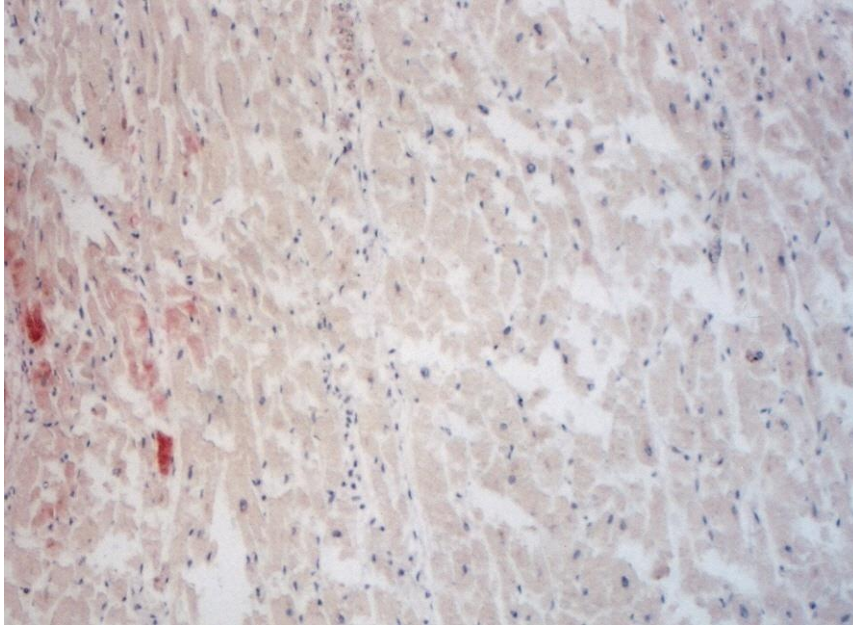
Kontrolní série stejných vyšetření byla provedena na myokardu a to v prvním pokusu u 20leté násilně zemřelé ženy s vícečetným střelným poraněním [6]. V mém případě se jednalo o materiál z 16leté dívky, která zemřela při autonehodě. V excizích odebraných 24 až 48 h po smrti byla pozorována intenzivní imunoreaktivita s protilátkou proti myoglobinu bez patrných výpadků či snížení intenzity imunohistochemické reakce, po postmortálním intervalu 72 h již byl patrný difuzní pokles intenzity barvení všech vláken, a odlišení případných ložisek poškozených kardiomyocytů od artificiálního výpadku myoglobinu se jevilo jako tudíž obtížné (obr. 7). Při detekci fibrinogenu v myokardu u násilně zemřelých žen nebyla zjištěna přítomnost tohoto proteinu v myocytech, a to ani při pokročilé autolýze. I při postmortálním intervalu 96 a 168 h bylo možno rozpoznat kontury svalových vláken, která nejevila známky artificiálního ukládání fibrinogenu.



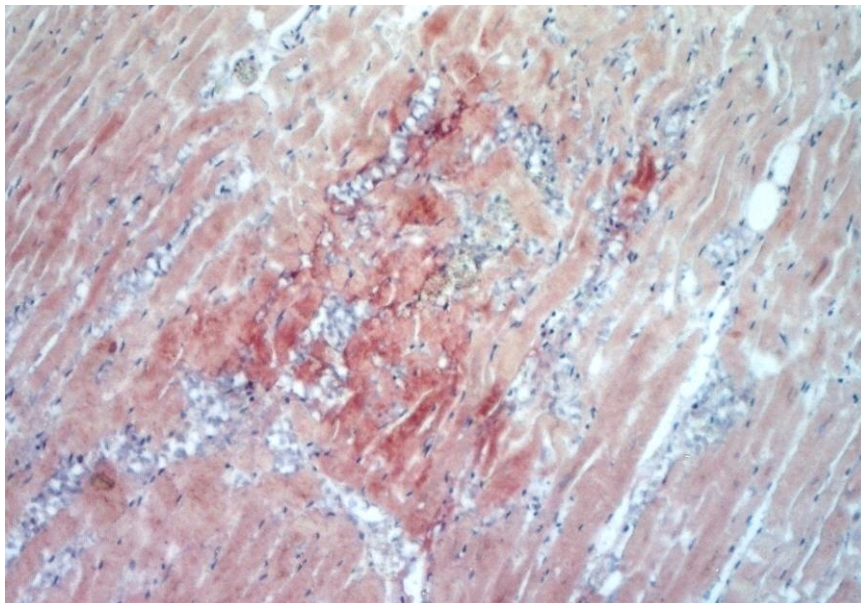
Obrázek č. 2 - postmortální interval 72 hodin: stále ještě dobře patrný rozdíl v imunoreaktivitě jednotlivých svalových vláken při detekci myoglobinu. Nepřímá imunoperoxidasová metoda s koncovkou DAB. Objektiv 40.



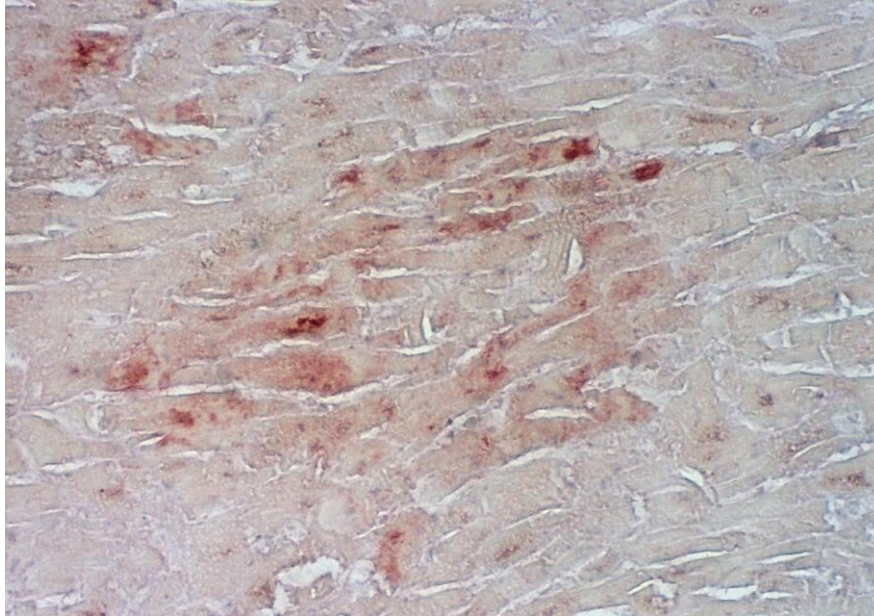
Obrázek č. 3 - při postmortálním intervalu 96 a více hodin není prakticky patrná pozitivita imunohistochemické reakce s protilátkami proti myoglobinu. Nepřímá imunoperoxidasová metoda s koncovkou DAB. Objektiv 40.



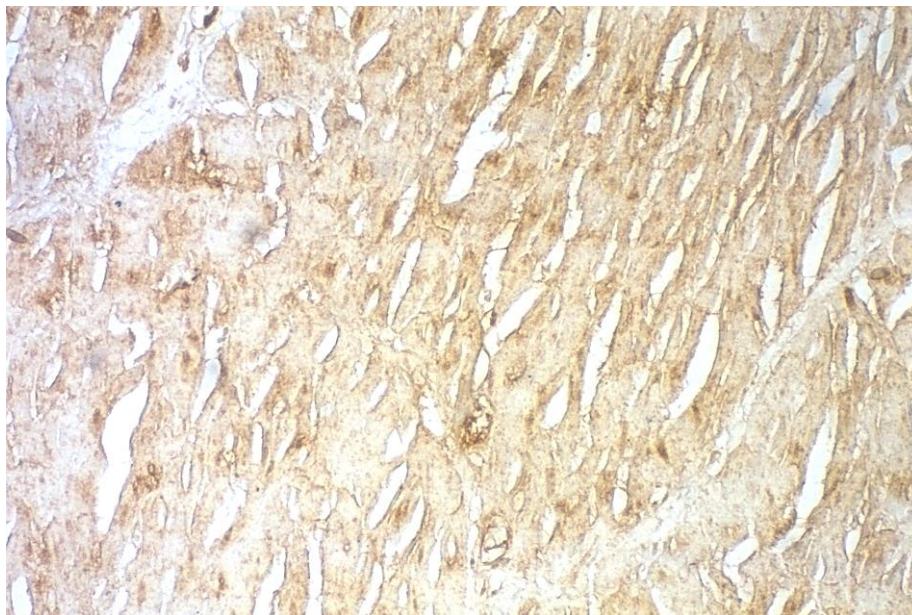
Obrázek č. 4 - postmortální interval 72 hod. – v levé části obrázku okraj ložiska nekrosy. Imunohistochemická detekce fibrinogenu zřetelně indikuje poškozené myocyty v místě nekrosy. SABC/AP, dobarveno hematoxylinem. Objektiv 10.



Obrázek č. 5 - postmortální interval 96 hod. Ložisko nekrosy vykazující intenzivní reakci s protilátkou proti fibrinogenu. SABC/AP, dobarveno hematoxylinem. Objektiv 10.



Obrázek č. 6 - postmortální interval 168 hod. I přes zřetelnou autolýzu je stále dobře patrné ložisko nekrosy s depozity fibrinogenu. SABC/AP, dobarveno hematoxylinem. Objektiv 40.



Obrázek č. 7 - myokard z kontrolního materiálu: difuzní pokles intenzity barvení při postmortálním intervalu 72 a více hodin. Detekce myoglobinu pomocí nepřímé imunoperoxidasové metody s koncovkou DAB. Objektiv 40.

6. Diskuse

6.1 Diagnostika ischemických změn myokardu

Z uvedeného případu je zřejmé, že imunohistochemická detekce myoglobinu v srdečních svalových vláknech je velmi citlivá.

Při detekci časných ischemických změn myokardu je v literatuře uváděna vysoká korelace mezi imunohistochemickým vyšetřením s protilátkami proti myoglobinu a histochemickou metodou barvení HBFP (hematoxylin-bazický fuchsin-kyselina pikrová [7]. Z histochemických metod vedle barvení hematoxylinem-eosinem spolu s fluorescencí [8, 9] jsou dále jako velmi citlivá uváděna barvení luxolovou modří [10] a chromotropní barvení anilinovou modří [11]. Brinkmann a spol. prokázal, že výsledky fluorescenční metody jsou shodné s jinými histochemickými metodami, stejně tak jsou shodné i výsledky imunohistochemického průkazu myoglobinu a desminu [12]. Doporučuje proto použití tří metod, tj. metody fluorescenční a imunohistochemický průkaz myoglobinu a fibrinogenu.

Z uvedených literárních údajů a výsledků vlastního pozorování je zřejmé, že imunohistochemické metody patří z uvedených morfologických diagnostických metod k nejcitlivějším. S výhodou je lze užít k průkazu časných ischemických změn myokardu u náhlých úmrtí.

6.2 Vliv autolýzy na imunohistochemické vyšetření myokardu

Imunohistochemické vyšetření myoglobinu a fibrinogenu v myokardu představuje velmi citlivou metodu v diagnostice časných fází ischemického poškození srdečního svalu. V poškozených kardiomyocytech dochází jednak k vymizení myoglobinu jakožto bílkoviny primárně přítomné v myokardu, a jednak k ukládání fibrinogenu, který proniká do poškozených srdečních svalových vláken z krve. Imunohistochemická detekce obou těchto bílkovin se jeví s ohledem na předchozí studie jako vhodná kombinace metod umožňujících diagnostikovat i velmi diskrétní poškození srdečních svalových vláken [13, 14, 15]. Výhodou imunohistochemie je samozřejmě i možnost vyšetření z parafinových bločků. V soudnělékařské praxi přítomná autolýza představuje velmi častý problém nezřídka výrazně ovlivňující možnosti interpretace výsledků morfologických vyšetření.

Z výše uvedeného vyplývá možnost využití imunohistochemického průkazu myoglobinu i fibrinogenu v soudnělékařské praxi, a to náhlých úmrtí z příčin kardiálních. Z nálezů prezentovaných v této práci je zřejmé, že zatímco v časných fázích autolýzy lze s výhodou využít kombinovanou imunohistochemickou detekci myoglobinu a fibrinogenu, tak při delším postmortálním intervalu se jeví jako vhodnější metoda průkaz depozit fibrinogenu v poškozených kardiomyocytech. I při postmortálním intervalu 168 hodin bylo možné spolehlivě odlišit poškozené myocyty s depozity fibrinogenu od svalových vláken nepoškozených, která nevykazovala známky ukládání fibrinogenu.

7. Závěr

Práci jsem zpracovala na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubicích. Ze statistické části vyplývá, že za rok 2012 zemřelo na infarkt myokardu 287 mužů, což je 63 % a 167 žen, což je 37 %. Za rok 2013 zemřelo na infarkt myokardu 344 mužů, což je 63 % a 199 žen, což je 37 %. Zjistila jsem, že na infarkt myokardu zemře více mužů než žen.

Dále jsem zpracovala statistiku nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev u osob zemřelých na infarkt myokardu. Za rok 2012 bylo provedeno 67 nemocničních pitev, což je 23 % a 228 zdravotně bezpečnostních pitev, což je 77 %. Za rok 2013 bylo provedeno nemocničních pitev 70, což je 18 % a 319 zdravotně bezpečnostních pitev, což je 82 %. Z těchto výsledků vyplývá, že na infarkt myokardu za rok 2012 a 2013 zemřelo více mužů a bylo provedeno více zdravotně bezpečnostních pitev.

Z mé experimentální části vyplývá, že imunohistochemické metody jsou vhodné k průkazu již časných fází infarktu myokardu a že je negativně ovlivňuje autolýza vyšetřované tkáně, ale přes tuto skutečnost je možno spolehlivě, i po 168hodinovém intervalu odlišit poškozené kardiomyocyty, tudíž se jedná o metodu vysoce citlivou, spolehlivou a je naprosto vhodná pro soudně lékařskou praxi. Velice pozitivní pro obě laboratoře byla naprostá shoda výsledků. Což znamená, že naše laboratoř provádí kvalitní vyšetření s kvalitním odečtením a interpretací výsledků a můžeme být spokojeni s prací v laboratoři. V podstatě se dá říci, že se jednalo o vnitřní audit naší imunohistochemické laboratoře, kde jsme uspěli na výbornou.

8. Seznam tabulek

1. Tabulka č. 1 - počet zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici, za rok 2012.
2. Tabulka č. 2 - počet provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici, za rok 2012.
3. Tabulka č. 3 - počet zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.
4. Tabulka č. 4 - počet provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.

9. Seznam grafů

1. Graf č. 1 - počet zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici, za rok 2012.
2. Graf č. 2 – procentuální rozdělení počtu zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici, za rok 2012.
3. Graf č. 3 - počet provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2012.
4. Graf č. 4 - procentuální rozdělení provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2012.
5. Graf č. 5 - počet zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.
6. Graf č. 6 - procentuální rozdělení počtu zemřelých mužů a žen, na infarkt myokardu, nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.
7. Graf č. 7 – počet provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.
8. Graf č. 8 - procentuální rozdělení provedených nemocničních a zdravotně bezpečnostních pitev, u osob nad 60 let věku, evidovaných na Patologicko-anatomickém oddělení a Oddělení soudního lékařství v Pardubické krajské nemocnici za rok 2013.

10. Seznam obrázků

1. Obr. č. 1 – vlastní schéma nepřímé trojstupňové metody využívající komplex streptavidin-biotin značený alkalifosfatase.
2. Obr. č. 2 - postmortální interval 72 hodin: stále ještě dobře patrný rozdíl v imunoreaktivitě jednotlivých svalových vláken při detekci myoglobinu. Nepřímá imunoperoxidasová metoda s koncovkou DAB. Objektiv 40.
3. Obr. č. 3 - při postmortálním intervalu 96 a více hodin není prakticky patrná pozitivita imunohistochemické reakce s protilátkami proti myoglobinu. Nepřímá imunoperoxidasová metoda s koncovkou DAB. Objektiv 40.
4. Obr. č. 4 - postmortální interval 72 hod. – v levé části obrázku okraj ložiska nekrosy. Imunohistochemická detekce fibrinogenu zřetelně indikuje poškozené myocyty v místě nekrosy. SABC/AP, dobarveno hematoxylinem. Objektiv 10.
5. Obr. č. 5 - postmortální interval 96 hod. Ložisko nekrosy vykazující intenzivní reakci s protilátkou proti fibrinogenu. SABC/AP, dobarveno hematoxylinem. Objektiv 10.
6. Obr. č. 6 - postmortální interval 168 hod. I přes zřetelnou autolýzu je stále dobře patrné ložisko nekrosy s depozity fibrinogenu. SABC/AP, dobarveno hematoxylinem. Objektiv 40.
7. Obr. č. 7 - myokard z kontrolní skupiny násilné smrti: difuzní pokles intenzity barvení při postmortálním intervalu 72 a více hodin. Detekce myoglobinu pomocí nepřímé imunoperoxidasové metody s koncovkou DAB. Objektiv 40.

11. Použitá literatura

1. Klír P.: Vyšetřování skupinového systému AB0 ve tkáních při pokročilých posmrtných změnách. Soud. lék., 39, 4, 1994, 32–35.
2. Bouška I., Toupalík P.: Soudnělékařská diagnostika náhlé smrti. Karolinum Praha 2007, 53.
3. Lojda Z., Strejc P.: Modifikovaná makroreakce na dehydrogenázy v diagnostice ischemických změn myokardu. Čs. patol., 9, 2, 1973, 22–24.
4. Neoral L.: Časná stadia smrtelné hypoxie myokardu – jejich rozpoznání a soudnělékařský význam. Disertační práce k získání vědecké hodnosti doktora lékařských věd, Katedra soudního lékařství LF UK, Olomouc, 1985.
5. Gomolčák P.: Základy imunohistochemie v patologii. IPVZ Brno, 1997.
6. Pavel Toupalík: Imunohistochemické diagnostické metody v soudnělékařské praxi. Karolinum Praha 2001, 9
7. Al-Rufaie H. K., Florio R. A., Olsen E. G. J.: Comparison of the haematoxylin basic fuchsin picric acid method and the fluorescence of haematoxylin and eosin stained sections for the identification of early myocardial infarction. J. Clin. Pathol., 36, 1983, 646–649.
8. Badir B., Knight B.: Fluorescence microscopy in the detection of early myocardial infarction. Forensic. Sci. Int., 34, 1987, 99–102.
9. Sally P., Bentall H.: Usefulness of the phenomenon of histofluorescence in the identification of early myocardial necrosis. Cardiovascular Research, 20, 1986, 451–457.
10. Arnold G., Kaiser C., Fischer R.: Myofibrillar degeneration – A common type of myocardial lesion and its selective identification by a modified Luxol fast blue stain. Pathol. Res. Pract., 180, 1985, 405–415 .
11. Zollinger U.: Die Chromotrop-Anilinblau-Färbung zur besseren Darstellung frischer Herzmuskelfaserschädigungen. Z. Rechtsmed., 90, 1983, 269–275.
12. Brinkmann B., Sepulchre M. A., Fechner G.: The application of selected histochemical and immunohistochemical markers and procedures to the diagnosis of early myocardial damage. Int. J. Leg. Med., 106, 3, 1993, 135–141.
13. Toupalík P., Štefan J.: Naše zkušenosti s průkazem myoglobinu v myokardu imunoperoxidasovou metodou. Soud. Léč. 39, 4, 1994, 39–42.
14. Toupalík P.: Průkaz hypoxie myokardu imunohistochemickým vyšetřením. Soud. Léč. 42, 2, 1997, 22–25.
15. Toupalík P.: Imunohistochemické vyšetření zánětlivých změn myokardu. Soud. Léč., 43, 3, 1998, 38–40.
16. Lukáš Z., Dráberová E., Feit J., Vojtěšek B.: Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice. LFMU v Brně 1997, 20-27.

17. Vacek Z.: Histologie a histologická technika II. část. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně 1995, 25, 34, 39, 41, 53, 61- 64, 68-73.
18. Beranová M., Tonar T.: Principy a příklady imunohistochemie, příručka pro studenty, dostupné z: <http://www.lfp.cuni.cz/histologie/edukativni/guides> [cit. 2016-02-05]
19. Wagner F.: Zpracování tkáně pro histologické vyšetření. Ústav histologie a embryologie LF UP v Olomouci, dostupné z:
http://www.upol.cz/fileadmin/user_upload/LF-kliniky/histologie/studijni_materialy/histologicka_tehnika.pdf [cit. 2016-05-12]