

Masarykova univerzita v Brně
Lékařská fakulta

**ZAVEDENÍ METODIKY KOMBINOVANÉHO PRŮKAZU
SUKCINYLDEHYDROGENÁZY A CYTOCHROMOXIDÁZY NA
TKÁŇOVÝCH ŘEZECH V DIAGNOSTICE MITOCHONDRIÁLNÍCH
MYOPATIÍ**

Bakalářská práce
v oboru zdravotní laborant

Vedoucí diplomové práce:
MUDr. Souček Ondřej

Autor:
Hanáková Markéta

Brno, Duben 2013

Jméno a příjmení autora: Markéta Hanáková

Název bakalářské práce: Zavedení metodiky kombinovaného průkazu sukcinyldehydrogenázy a cytochromoxidázy na tkáňových řezech v diagnostice mitochondriálních myopatií

Pracoviště: Ústav patologie LF MU a FN Brno

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Souček Ondřej

Rok obhajoby bakalářské práce: 2013

Souhrn: Cílem této práce je zavedení metodiky kombinovaného průkazu sukcinyldehydrogenázy a cytochromoxidázy na tkáňových řezech v diagnostice mitochondriálních myopatií a posouzení výhod a nevýhod metodiky ve srovnání s průkazem obou enzymů odděleně.

Klíčová slova: sval, svalová biopsie, sukcinyldehydrogenáza, cytochromoxidáza, mitochondriální myopatie

Souhlasím, aby práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Ondřeje Součka a uvedla v seznamu literatury všechny použité literární a odborné zdroje.

V Brně dne

.....

Poděkování

Touto cestou bych velice ráda poděkovala MUDr. Ondřejovi Součkovi za jeho připomínky, cenné rady, ochotu, strávený čas a vedení při psaní mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Květoslavě Liškové, která mi velice pomohla svými přínosnými připomínkami a také za její čas věnovaný mojí bakalářské práci.

Obsah

1 ÚVOD	8
2 OBECNÁ ČÁST	9
2.1 Svalová tkáň	9
2.1.1 Kosterní svalstvo	10
2.1.1.1 <i>Struktura kosterního svalstva</i>	11
2.1.1.2 <i>Svalová kontrakce</i>	14
2.1.1.3 <i>Chemické složení svalu</i>	15
2.1.1.4 <i>Funkce svalu</i>	15
2.1.1.5 <i>Nervosvalový přenos</i>	16
2.1.1.6 <i>Energetický metabolismus svalového vlákna</i>	16
2.2 Úvod k odběru svalové tkáně	17
2.2.1 Indikace k odběru svalové tkáně	18
2.2.2 Výběr místa bioptického odběru svalu	18
2.2.3 Vlastní odběr svalové tkáně	18
2.2.4 Manipulace a transport svalové biopsie po odběru	19
2.2.5 Zpracování svalového vzorku v bioptické laboratoři	19
2.3 Metody bioptického vyšetření svalové tkáně	20
2.3.1 Přehledná tkáňová barvení	20
2.3.2 Histochemické vyšetření	21
2.3.2.1 <i>Myofibrilární (myozinová) kalcium-dependentní adenosintrifosfatáza (Ca²⁺+ATPáza)</i>	21
2.3.2.2 <i>Svalová fosforyláza</i>	21
2.3.2.3 <i>Mitochondriální dehydrogenázy</i>	21
2.3.2.4 <i>Lysosomální hydrolázy</i>	21
2.3.2.5 <i>Cholinesterázová aktivita a znázornění motorických plotének</i>	22
2.3.2.6 <i>Reakce na lipidy</i>	22
2.3.2.7 <i>Reakce na glykogen</i>	22
2.3.2.8 <i>Průkaz cytochromoxidázy (COX)</i>	22
3 SPECIÁLNÍ ČÁST	23
3.1 Zařízení histochemické laboratoře	23
3.2 Cytochromoxidáza	23
3.3 Sukcinyldehydrogenáza	23
3.4 Mitochondrie	23
3.5 Myopatie	24
3.5.1 Hodnocení funkčního stavu a změny stavu u myopatií	25
3.5.2 Mitochondriální myopatie	27
3.5.2.1 <i>Celulární mechanismy mitochondriálních myopatií</i>	29
3.5.2.2 <i>Jiné než vrozené a geneticky podmíněné mitochondriální myopatie</i>	29
4. PRAKTICKÁ ČÁST	30
4.1 Princip vyšetření sukcinyldehydrogenázy (SDH)	30
4.2 Princip vyšetření cytochromoxidázy (COX)	30
4.3 Postup metody při průkazu sukcinyldehydrogenázy (SDH)	30

4.3.1 Příprava jednotlivých reagensí	30
4.3.2 Výsledek při průkazu sukcinyldehydrogenázy	31
4.4 Postup metody při průkazu cytochromoxidázy	31
4.4.1 Příprava jednotlivých reagensí	32
4.4.2 Výsledek při průkazu cytochromoxidázy	32
4.5 Kombinace cytochromoxidázy a sukcinyldehydrogenázy	32
4.5.1 Postup kombinované metody pro cytochromoxidázu a sukcinyldehydrogenázu	33
4.5.2 Příprava jednotlivých reagensí	33
4.5.3 Výsledek při kombinovaném použití COX a SDH	33
5. DISKUZE	35
6. ZÁVĚR	36
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

Seznam použitých zkratk:

ACh – acetylcholin

ADP – adenosindifosfát

ATP – adenosintrifosfát

Ca²⁺ATPáza – kalcium dependentní adenosintrifosfatáza

CK – kreatinkináza

COX – cytochromoxidáza

DAB – diaminobenzidin tetrahydrochlorid

EMG – elektromyografie

mtDNA – mitochondriální DNA

NADH – redukovaný nikotinamidadenindinukleotid

NBT – nitroblue tetrazolium

SDH – sukcinyldehydrogenáza

T-tubuly – transverzální tubuly

1 Úvod

Hlavním tématem této práce je zavedení metodiky kombinovaného používání sukcinyldehydrogenázy a cytochromoxidázy při prokazování mitochondriální myopatie na tkáňových řezech.

Mitochondriální myopatie jsou heterogenní skupinou onemocnění, která postihuje především kosterní svalstvo a nervovou soustavu. Jedná se o dědičná metabolická onemocnění způsobená mutací buď v jaderných genech pro mitochondriální enzymy, nebo mutací mitochondriální DNA. Vyznačují se specifickým typem dědičnosti s výraznou variabilitou manifestace onemocnění u potomků. Odhad incidence mitochondriálních onemocnění je 11,5 postižených na 100 000 obyvatel. Nemoc se projeví při zastoupení 60–90 % mutantních mitochondrií v daném místě tkáně. Mitochondriální poruchy jsou pro své závažné klinické projevy, progredující charakter onemocnění s nepříznivou prognózou a genetickým přenosem s mendelovským i maternálním typem dědičnosti významným zdravotnickým problémem.

2 Obecná část

2.1 Svalová tkáň

Svalová tkáň je soustava buněk, obsahujících a vytvářejících specializované kontraktilní systémy, ovládaná většinou nervovými stimuly. Předpokladem stažlivosti svalové tkáně je schopnost měnit chemickou energii ATP na energii mechanickou, která vede ke zkrácení buněk nebo vláken ve směru pohybu. Specifické proteiny, aktin a myosin, se podílejí na všech druzích pohybů^[6]. V průběhu svalového stahu se molekuly aktinu váží s molekulami myosinu v aktomyosinový komplex^[10].

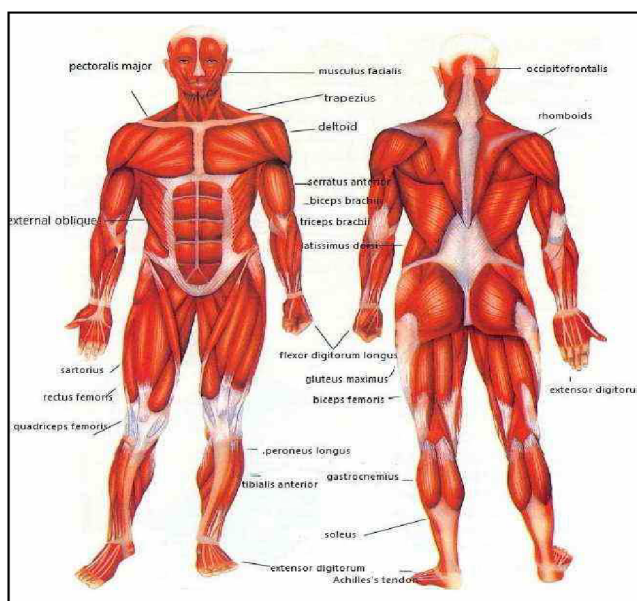
Svalovou tkáň rozlišujeme podle vzhledu, lokalizace a funkce na hladkou, kosterní a srdeční svalovinu^[6].

Svalstvo hladké se skládá z protáhlých, vřetenitých buněk s jádrem tyčinkového tvaru. V cytoplazmě buněk probíhají tenoučká aktinová mikrofilamenta (vláčenka), mezi kterými se místy nacházejí o něco silnější mikrofilamenta myosinová. Myosinových mikrofilament je mnohem méně. Větší část molekul myosinu není uspořádána v mikrofilamenta a seskupuje se v tato vláčenka až na začátku kontrakce^[10].

Chybění uspořádání aktinových a myosinových mikrofilament ve vyšší jednotky (tzv. myofibrily) podmiňuje homogenní barvitelnost celé buňky hladkého svalu na rozdíl od příčně pruhovaného svalu.

Svalové buňky se vyskytují buď jednotlivě, nebo tvoří snopečky či souvislé vrstvy, složené z mnoha buněk^[10].

Hladké svalstvo je inervováno autonomním nervstvem, takže nepodléhá naší vůli. Kontrakce jsou pomalé, trvají dlouho a mohou být rytmické. Při řízení činnosti hladkého svalstva se uplatňuje souhra autonomních nervů a hormonálního působení^[10].



Obrázek č.1 Svaly lidského těla^[17]

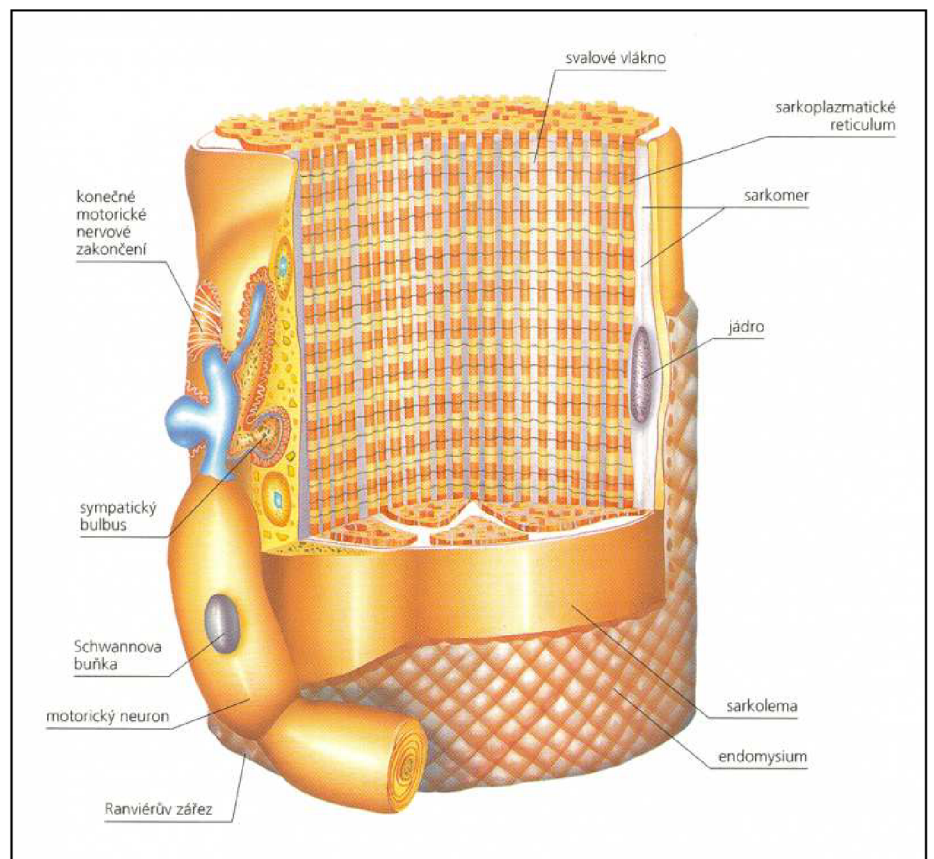
Svalstvo příčně pruhované se vyznačuje přítomností žíhaných fibril (myofibril), která se jeví ve světelném mikroskopu jako vlákénka složená z pravidelně se střídajících úseků silněji a slaběji zbarvené hmoty^[10].

Svaly spolu s kostrou tvoří pohybovou soustavu člověka a zajišťují pohyb jednotlivých částí těla. Člověk má asi 700 různých svalů tvořících 30 – 50 % tělesné hmotnosti^[28].

2.1.1 Kosterní svalstvo

Kosterní svalstvo ovládáme vůlí^[24]. Je inervováno nervy mozkomíšními^[10]. Společně s kostmi a šlachami odpovídá za všechny formy volního pohybu (např. chůze) a zapojuje se také do automatických reakcí (reflexů)^[24]. Kromě toho zabezpečuje mimiku obličeje a udržuje vzpřímenou postavu^[28].

Spojení svalu se šlachou je velmi pevné, tak pevné, že dojde dříve k přetržení svalu než k odtržení šlachy od svalu. Pevné spojení je dáno zalitím fibril kolagenních vláken šlachy do hmoty bazální membrány na povrchu sarkolemy^[10].



Obrázek č.2 Průřez kosterním svalem^[24]

2.1.1.1 Struktura kosterního svalstva

Strukturu kosterního svalu můžeme popsat na několika na sebe navazujících úrovních. Jsou to: myofilamentum, myofibrila, svalové vlákno a vlastní sval^[1].

a) **Myofilamentum** – molekuly kontraktilní bílkoviny aktinu a myosinu jsou základními strukturálními elementy kosterních svalů a tvoří tzv. silná (myosinová) a tenká (aktinová) myofilamenta^[1].

Myosinová filamenta sestávají ze tří segmentů: dvoudílné hlavy, krčku a ocasní části. Dvoudílná hlava je kloubovitě spojena s krčkem, který se (opět kloubovitě) spojuje s ocasní částí filamenta. Hlava s pohyblivým krčkem vyčnívá směrem k sousednímu aktinovému myofilamentu a v průběhu kontrakce s ním tvoří tzv. můstky, které umožňují reverzibilní vazbu na myosin a vzájemný teleskopický posun aktinových a myosinových myofilament. Ocasní části jsou soustředěny kolem centrální molekuly titinu, který společně s nebulinem zajišťuje flexibilitu a pružnost svalového vlákna.

Na stavbě molekuly myosinu se podílejí těžké polypeptidové řetězce a dva druhy lehkých polypeptidových řetězců. Myosin je tak tvořen dvěma identickými těžkými řetězci a dvěma odlišnými typy lehkých řetězců^[1].

b) **Myofibrila** – je vyšší strukturální jednotka. Skládá se z aktinových a myosinových myofilament, probíhajících rovnoběžně s osou svalového vlákna a navzájem paralelně a uspořádaných tak, že šest aktinových myofilament obepíná jedno myosinové filamentum. Dále je myofibrila tvořena bílkovinami titinem a nebulinem (zmíněnými výše), troponinem, tropomyozinem, desminem a vimentinem. Ve světelném mikroskopu vykazují myofibrily kosterního svalu příčné pruhování (odtud také synonymický název příčně pruhovaného svalstva) dané střídáním opticky jednolomných a dvojlomných úseků. Světlé úseky (opticky jednolomné) nazývané izotropní (I proužek) obsahují pouze aktinová filamenta, tmavé (opticky dvojlomné) anizotropní úseky (A proužek) jsou tvořeny aktinovými i myosinovými filamenty. Uprostřed světlého izotropního úseku se nachází tenký anizotropní proužek T (telofragma). Úsek mezi dvěma telofragmaty se označuje jako sarkomera. Pravidelným uspořádáním filament je každá myofibrila předem připravena k rychlé kontrakci, při které se aktinová filamenta zasunou hlouběji mezi filamenta myosinová, sarkomera se podstatně zkrátí a T proužky se k sobě přiblíží^[1,10].

c) **Svalové vlákno** – je základním strukturálním elementem na buněčné úrovni. Kosterní svalové vlákno je válcovitého tvaru a je tvořeno mnohojadernými buňkami, které vznikají sloučením myoblastů (jednojaderných buněk) v průběhu vývoje^[7]. Myoblasty postupně splývají a v cytoplazmě se diferencují myofibrily. Tak vzniknou svalová vlákna, jež nemají buněčnou stavbu; označujeme je názvem syncytia^[10].

Mnohojaderná vlákna kosterního svalu mají průměr 10-100 um a jsou velmi dlouhá (až 30cm). Mají velmi organizovanou strukturu. Podél periferie vlákna pod plazmatickou membránou jsou uložena jádra^[6]. V centru svalového vlákna se nachází kontraktilní aparát, který je organizován do řady opakujících se jednotek – sarkomer. Sarkomera se skládá z vysoce organizovaných proteinových sestav, která poskytují svalovému vláknu charakteristický pruhovaný vzhled^[7].

Svalové vlákno obsahuje sarkoplazmu s několika jádry a organelami. Hlavní součástí sarkoplazmy jsou myofibrily, které probíhají paralelně s podélnou osou vlákna. Myofibrily jsou obklopeny sarkoplazmatickým retikulem tvořícím uzavřený systém představující zásobárnu vápníkových iontů a oddělený od intra- i extracelulárního prostoru. Výčlipky sarkolemy (tzv. transverzální tubuly – T tubuly) křížují sarkoplazmatické retikulum a probíhají napříč svalovými vlákny^[1].

Energie potřebná pro kontrakci je poskytována zejména mitochondriemi, kromě toho svalové vlákno obsahuje i značné množství glykogenu a kapének lipidů^[6]. Mitochondrie ve svalu nalézáme ve dvou lokalitách, a to subsarkolematicky a mezi myofibrilami^[7]. V mitochondriích se spalují živiny za přítomnosti kyslíku a vzniká tak energie, která se ukládá ve formě ATP^[24].

Pomocí tzv. nervosvalové (motorické) ploténky je každé svalové vlákno v kontaktu s axonovými terminály alfa-motoneuronu. Nervosvalová ploténka je umístěna obvykle ve střední části svalového vlákna^[1].

Jeden alfa-motoneuron zásobuje určitý počet svalových vláken (který kolísá od 5 u zevních okohybných svalů až po více než 1000 vláken např. v posturálních zádoových svalech) a tvoří s nimi tzv. motorickou jednotku. Svalové vlákno může být také inervováno motoneurony třídy gama^[1].

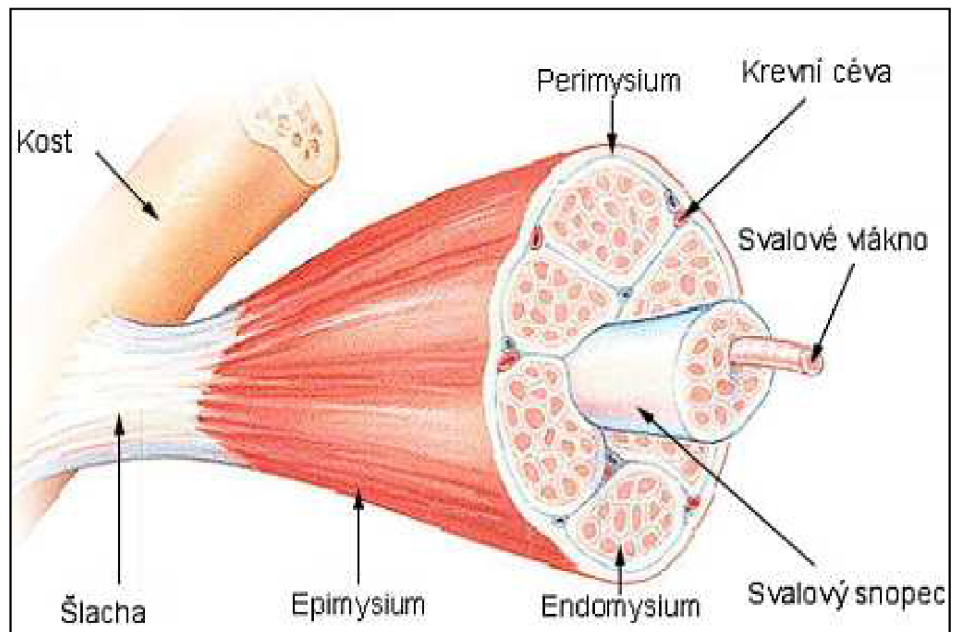
Svalová vlákna tvoří svazky. Tyto svazky mají na řezu průměr 5-10 mm. Vlákna sousedních motorických jednotek se však prolínají, protože jednotky nejsou navzájem anatomicky odděleny. V jedné motorické jednotce je vždy pouze jeden typ svalových vláken. Svalová vlákna se mohou lišit histologickou, histochemickou a fyziologickou charakteristikou^[1].

Ve svalovém vlákně dále nacházíme Golgiho šlachová tělíska reagující na napětí, volná nervová zakončení vedoucí hluboký tlak a bolest a také Ruffiniho a Pacciniho tělíska, což jsou tlakové receptory^[1].

Z hlediska anatomického a fyziologického rozlišujeme tři typy svalových vláken:

1. červená vlákna – jsou tenčí a obsahují více mitochondrií, glykogenu a myoglobinu. Jsou tonická, tzn. že se kontrahují pomalu^[6].
2. bílá vlákna – jsou objemnější a obsahují méně mitochondrií, glykogenu a myoglobinu. Mají rozsáhlejší sarkoplazmatické retikulum. Jsou fázická, kontrahují se rychleji^[6].
3. intermediární vlákna – představují přechod mezi oběma předchozími typy vláken^[6].

d) **Sval** – je tvořen jednotlivými vlákny obklopenými tenkou vazivovou vrstvou – endomysiem, která se dále sdružují v tzv. primární, případně sekundární svalové snopce, obklopené a oddělené navzájem perimysiem^[1]. Pro výměnu metabolitů mezi svalovým vláknem a kapilárami a pro tok iontů je toto oddělení vláken a svalových snopců důležité^[6].



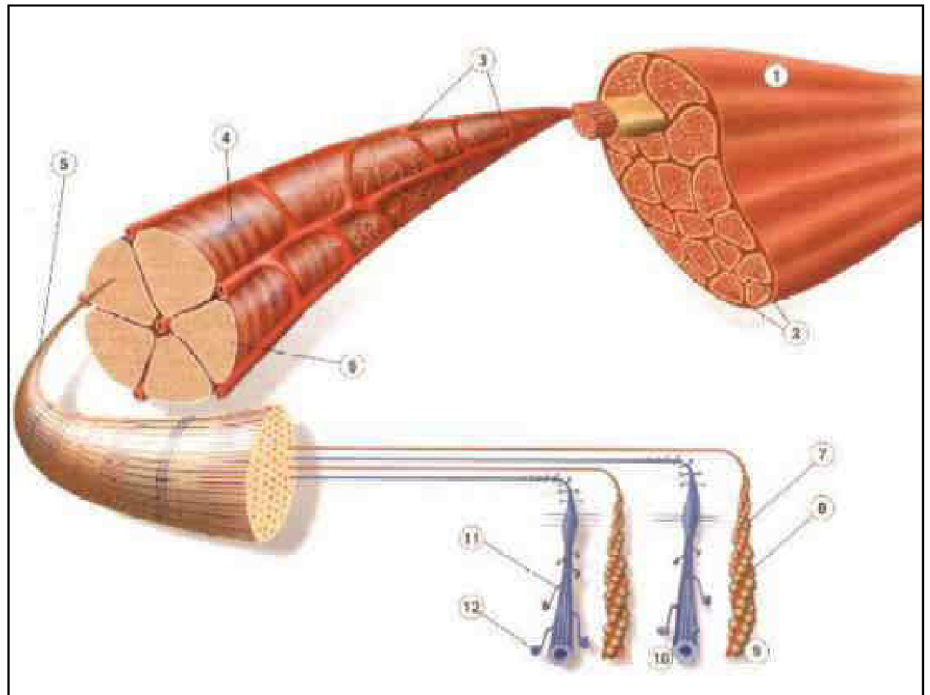
Obrázek č 3 Stavba kosterního svalu I^[15]

Sval je nakonec obklopen epimysiem a hlubokou fascií. Na konci svalu se nachází junkční oblast, kde je vazivo zahušťuje a pokračuje jako šlacha^[6]. Pomocí šlach je zajištěno připevnění kontraktilních elementů ke kostem^[1].

Ve vazivu jsou umístěny cévy a nervy zásobující sval. Svaly jsou velmi bohatě cévně zásobeny. Cévy vstupují do svalu společně s nervy ve svalovém hilu.

V tzv. ploténkové zóně jsou obvykle ve svalu lokalizovány nervosvalové ploténky^[1].

Sval je zásoben motoricky větví některého periferního nervu^[1]. Vysláním impulsu z mozkové kůry k opačné straně těla, míchou dolů a prostřednictvím motorických nervů ke kosterním svalům je vyvolán vůlí ovládaný pohyb^[24].



Obrázek č.4 Stavba kosterního svalu II ^[29]

1. Sval, 2. Svazky svalových vláken, 3. Krevní cévy, 4. Jádro svalové buňky, 5. Myofibrila, 6. Svalové vlákno, 7. Aktin, 8. Tropomyosin, 9. Tenké myofilamentum, 10. Tlusté myofilamentum, 11. „Krček“ molekuly myosinu, 12. „Hlavička“ molekuly myosinu

2.1.1.2 Svalová kontrakce

Podstatou kontrakce je přesun aktinových myofilament mezi myosinová myofilamenta vzájemnou vazbou postraních řetězců jejich molekul. Vzniká aktomyosinový komplex. K tomuto jevu dochází současně ve všech myofibrilách svalového vlákna a ve všech svalových vláčknech svalu – sval se zkrátí (kontrakce). Podnět ke kontrakci vychází z nervového zakončení motorického nervu. Významnou úlohu při spouštění kontrakce mají vápenaté ionty. Vápenaté ionty jsou transportovány k myofilamentům systémem sarkoplazmatického retikula. Nezbytnou energii k tvorbě aktomyosinového komplexu poskytují četné mitochondrie, které jsou lokalizovány mezi myofibrilami. Když působení nervového podnětu pomine, aktinová myofilamenta v myofibrile zaujmou výchozí postavení. Myofibrily a svalová vlákna se prodlouží a tím se celý sval vrátí do původní délky (relaxace)^[10].

2.1.1.3 Chemické složení svalu

Sval tvoří anorganické látky – 70-75% vody, ionty Ca^{2+} , K^+ , Na^+ a dále pak organické látky – a to jsou bílkoviny aktin, myosin a myoglobin, což je svalová bílkovina, která obsahuje hem pro navázání kyslíku^[24]. Myoglobin dodává svalovým vláknům červené zbarvení^[10]. Mezi organické látky dále patří glukóza, glykogen, ATP, kreatinfosfát, který je významný pro energetický metabolismus^[24].

2.1.1.4 Funkce svalu

Svalová vlákna podle funkce lze rozdělit na **tonická** (s tendencí ke zkrácení) a **fázická** (s tendencí k ochabnutí).

Tonická vlákna zajišťují stabilitu a fixují tělo při pohybu. Jsou uložena hlouběji, jsou odolnější proti únavě a rychleji se zotavují. Fázická vlákna slouží k provedení pohybu. Jsou snadno unavitelná a musí se posilovat^[16].

Sval plní funkci tím, že vyvíjí tažnou sílu. Jeden konec je fixovaný a na druhém se pak projeví tah. Svaly často pracují v páru a to tak, že kontrakce jednoho svalu působí proti kontrakci druhého svalu. Kontrakce druhého svalu pak může vrátet pohybovanou část do původní polohy^[24].

Hlavní vykonavatel pohybu je sval, který vykonává pohyb určitým směrem. Tento sval nazýváme **agonista**^[16]. Svaly se mohou v roli agonisty i střídát v různých fázích pohybu^[30]. Sval, který vykonává pohyb opačným směrem než agonista, je nazýván **antagonista**^[16]. Na pohybu prováděném agonistou se významně podílí, protože je současně aktivován s agonistou na začátku pohybu, zejména při pohybu rychlém. Této současné kontrakci agonisty i antagonisty se říká kokontrakce. Na konci pohybu funguje antagonist jako brzda, která pohyb prováděný agonistou zastaví^[30]. Pomocný sval, který pracuje stejným směrem jako agonista, je nazýván **synergista**^[16]. Agonistovi v jeho úsilí pomáhá a za určitých patologických stavů může jeho funkci převzít^[30].

Zvláštním typem jsou **svaly fixační** (stabilizační), které umožní zpevnění části těla, odkud pohyb vychází. Tyto svaly se sice nepodílejí přímo na pohybu, ale udržují pohybový segment v takové poloze, která je pro pohyb nejvýhodnější^[16].

Svaly, které ruší svou činností nežádoucí složky pohybu vykonávané hlavními a pomocnými svaly, označujeme jako **svaly neutralizační**^[16].

Svaly posturální (antigravitační) jsou působením zemské přitažlivosti napínány a zabezpečují vzpřímený postoj^[16].

2.1.1.5 Nervosvalový přenos

Nervosvalový přenos je uskutečňován nervosvalovou ploténkou, což je specializovaná synapse, která slouží k uskutečnění přenosu vzruchu z nervu na sval. Mediátorem přenosu je acetylcholin (dále jen ACh). Ten je uskladňován v presynaptických nervových zakončeních axonových terminál. Uvolněná molekula ACh reaguje s acetylcholinovým receptorem postsynaptické membrány, což vede otevření sodíko-draslíkového kanálu. Jednotlivá kvanta ACh jsou spontánně uvolňována a každé z nich otevře asi 2000 iontových kanálů a tím dojde k influxu sodíku^[1].

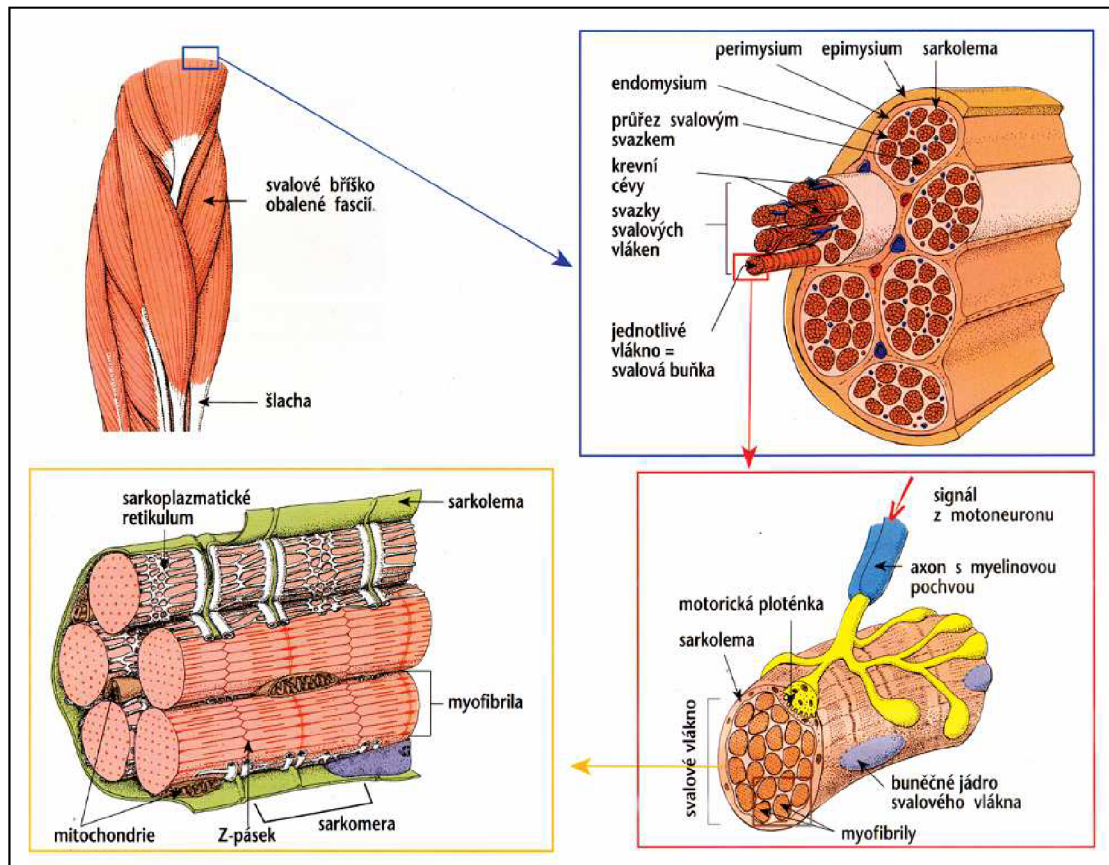
Aby mohl nervosvalový přenos normálně fungovat, musí následně dojít k inaktivaci ACh. Inaktivace ACh se děje rozštěpením pomocí enzymu acetylcholinesterázy na dvě neúčinné složky – acetyl a cholin^[18]. To ukončí jeho působení a umožní repolarizaci na sarkolemě^[1].

2.1.1.6 Energetický metabolismus svalového vlákna

Asi 70-75 % všech energetických nároků spotřebuje svalová kontrakce na cyklické štěpení a znovuvytvoření aktomyosinových můstků. Zbývajících asi 25-30 % je spotřebováno na přečerpání vápníku uvolněného do sarkoplazmy zpět do sarkoplazmatického retikula. Aktuální zásoba ATP v sarkoplazmě dokáže energeticky zajistit zhruba 8 svalových kontrakcí.

Kreatinfosfát představuje rychlý zdroj energie, kdy kreatinfosfokináza uvolní fosfát a ten spolu s ADP vytváří ATP.

Při intenzivní svalové zátěži však tyto zdroje energie nestačí. ATP je vytvářeno z glukózy a v menší míře z mastných kyselin a aminokyselin. Glukóza se dostává do svalu krevním oběhem nebo uvolněním ze zásob svalového glykogenu. Přeměnou glukózy na pyruvát v průběhu Krebsova cyklu je vyprodukováno až 36 molekul ATP. Při nedostatku kyslíku je však pyruvát metabolizován na laktát, což je z energetického hlediska málo výhodné^[1].



Obrázek č.5 Celkový přehled struktury kosterního svalu ^[16]

2.2 Úvod k odběru svalové tkáně

Odběr svalu pro svalovou biopsii je integrální součástí diagnostiky u neuromuskulárních onemocnění. Mimo nečetných výjimek poskytuje základní kámen pro diagnózu pacientů se suspektní myopatií. Navíc může hrát rozhodující roli při posuzování pacientů s neurogenní poruchou, zejména při rozlišování atypicky probíhajících neurogenních poruch od primárně myopatických. Svalová biopsie poskytuje v neposlední řadě informace pro diagnostiku mnoha systémových onemocnění.

Chirurgická excize svalové tkáně pro bioptické vyšetření je relativně snadná, ale musí se provést tak, aby byl výtěžek z vyšetření co největší.

Neomluvitelné je, pokud kvůli nevhodné komunikaci mezi jednotlivými pracovníky podílejícími se na celém procesu svalové biopsie (neurolog, chirurg, patolog, pracovníci histopatologické laboratoře) dochází k nevhodné manipulaci s odebranou tkání ^[21].

2.2.1 Indikace k odběru svalové tkáně

Svalová biopsie je obecně indikována při přítomnosti klinických, biochemických či elektrofyziologických známek nervosvalového onemocnění – slabost, křeč, únava atd. Je indikována i u systémových onemocnění, jako jsou vaskulitidy, metabolické poruchy a také u neuropatií^[1]. Indikací pro primární provedení svalové biopsie není v současnosti klinické podezření na dystrofinopatie, facioskapulohumerální dystrofii, myotonickou dystrofii, periodickou paralýzu a endokrinní myopatie – důvodem je dostupnost molekulárně-genetické analýzy pro uvedená onemocnění^[21].

2.2.2 Výběr místa bioptického odběru svalu

Svalová biopsie bývá většinou odebírána z jednoho z následujících končetinových svalů: m. biceps brachii a m. deltoideus, m. quadriceps femoris (vastus lateralis nebo rectus femoris), m. gastrocnemius nebo m. tibialis anterior. Nejvhodnější místo pro odběr je primárně determinováno klinickým obrazem onemocnění. Výtěžné informace většinou poskytne vyšetření symptomatického, ale jen středně nebo mírně postiženého svalu. Při výběru nejpostiženějších míst může být obraz změn natolik, že úbytek svalových vláken a jejich náhrada vazivově tukovou tkání zcela překryje i reziduální známky onemocnění, které k takovému stavu vedlo. Nevhodným místem odběru je také oblast předešlého EMG vyšetření^[21].

2.2.3 Vlastní odběr svalové tkáně

Před vlastním odběrem svalové tkáně je samozřejmostí včasné kontaktování myopatologické laboratoře. Dále musí být zajištěno okamžité zpracování svalové tkáně po odběru. Bez předchozí domluvy s laboratoří je lepší svalovou biopsii neprovádět, protože dlouhý svalový odstup nebo nevhodné uložení a fixace svalové tkáně může celý proces svalové biopsie nenávratně znehodnotit.

Svalovou tkáň můžeme získávat otevřenou biopsií nebo punkcí bioptickou jehlou. Jehlová biopsie je rychlejší, jednodušší a levnější metoda. Získává se jí ale jen velmi malé množství svalové tkáně, která se obtížně orientuje. Také se může snadněji zdeformovat a mohou v ní vzniknout artefakty. Navíc malé množství svalové tkáně umožní jen základní morfologické vyšetření.

Otevřené svalové biopsie mohou být většinou u starších dětí a dospělých prováděny pouze v lokální anestézii^[21].

2.2.4 Manipulace a transport svalové biopsie po odběru

Po vyjmutí vzorek svalu šetrně uložíme do Petriho misky, ve které je mul navlhčený fyziologickým roztokem a okamžitě odnášíme do myopatologické laboratoře. Vysychání tkáně zabráníme vlhkým prostředím. Svalová tkáň by však rozhodně neměla plavat ve fyziologickém roztoku, protože pak dochází k tvorbě artefaktů. V žádném případě nesmí být vzorek vložen do formolu.

Protože svalová tkáň vykazuje určitou dobu po excizi zachovanou enzymatickou aktivitu, dá se v rychle zmražených řezech tato aktivita prokazovat enzymatickou histochemií. Tuto tkáň můžeme podrobit zkoumání metabolických či mitochondriálních poruch.

Protílátky používané při imunohistochemickém vyšetření zatím vyžadují výlučně nefixovanou mraženou svalovou tkáň^[21].

Pokud je potřeba vzorek svalové tkáně transportovat na větší vzdálenost (např. z jednoho zdravotnického zařízení do jiného), šetrně ho vložíme na navlhčený tampon do uzavřené zkumavky, kterou umístíme do termosky se směsí vody a ledu. I tak by doba od odběru po definitivní zpracování neměla přesáhnout dvě až tři hodiny. Pak již počínají autolytické změny ve tkáni^[21].

2.2.5 Zpracování svalového vzorku v bioptické laboratoři

Vzorek svalové tkáně musí být okamžitě po přijetí zpracován. Drobný svazeček svalu je z bločku oddělen žiletkou a fixován. Pro potřebu polotenkových řezů a elektronmikroskopického vyšetření se provádí fixace oxidem osmičelým a glutaraldehydem.

Většina odebraného vzorku se mrazí vhodným mrazícím médiem. Tekutý dusík má velmi nízkou teplotu (-196°C), ale při jeho přímém použití dochází k tvorbě artefaktů a ty mohou zdeformovat svalovou tkáň. Vhodnější je tekutý izopentan, který je umístěn v nádobce, která je ponořená v tekutém dusíku^[21].

Ke zmrazení je vhodná i směs propanu a butanu vychlazená kapalným dusíkem. Je tak zaručen dostatečný teplotní spád – asi o 180 °C a zmrazení bloků je tak dostatečně rychlé^[8].

Excize je rozdělena na dva bločky ještě před ponořením do chladicí směsi. První je orientován na korkovou ploténku tak, aby svalová tkáň probíhala kolmo k jejímu povrchu. Ve druhém probíhají vlákna rovnoběžně s jejím povrchem. Pro lepší přilnutí tkáně k ploténce můžeme kápnout fyziologický roztok nebo jinou směs k tomuto účelu vyráběnou. Takto orientované tkáňové bločky jsou s ploténkou vloženy do směsi ke zmrazení^[8].

Po orientaci a zmrazení je svalový vzorek okamžitě transportován do kryostatu nebo do hlubokomrazícího boxu. Zde můžeme svalovou tkáň mít uloženou po dlouhou dobu, ale je

důležité, aby jednou zmražená tkáň při další manipulaci a přípravě histologických preparátů nerozmrzla.

V kryostatu se krájí řezy silné 8-10 um pro histochemické reakce a 4-6 um pro imunohistochemii^[21].



Obrázek č.6 Kryostat Leica CM1950^[22]

2.3 Metody bioptického vyšetření svalové tkáně

2.3.1 Přehledná tkáňová barvení

Prvním krokem při vyšetření svalové biopsie je vždy barvení řezu klasickou metodou hematoxylinem a eozinem. Toto barvení je nezastupitelné a poskytuje velkou řadu informací. Můžeme posoudit např. velikostní kolísání svalových vláken, přítomnost kulatých nebo angulárních atrofických vláken, podélné štěpení vláken (tzv. fiber splitting), zmnožení vnitřních jader, přítomnost nekrotických a regenerujících vláken (destruktivní myopatie), patologických vakuol (metabolické myopatie, periodické paralýzy, myozitida s inkluzními tělísky atd.), patologických inkluzí (myozitida s inkluzními tělísky, kongenitální myopatie atd.), přítomnost, složení a distribuce zánětlivé celulizace (zánětlivé myopatie) a změny svalových větének^[21].

Dále se standardně používá metoda podle Gomoriho, kdy klasické barvení trichromem na průkaz kolagenu je pro vyšetření svalové tkáně modifikováno. Jeho největší přínos je v detekci tzv. ragged red fibers (RRF) se zvýšeným obsahem mitochondrií ukazující na mitochondriální poruchu, dále ve znázornění patologických inkluzí ve vláknech, jako u myozitidy s inkluzními tělísky nebo u tyčinkové (nemalinové) myopatie^[21].

2.3.2 Histochemické vyšetření

Je nutné provést alespoň základní histochemické vyšetření u každého vyšetření kosterního svalu, protože tak získáváme informace o distribuci a změně jednotlivých typů svalových vláken, přítomnosti oxidativních enzymů mitochondrií, lysozomů, atd^[21].

2.3.2.1 Myofibrilární (myozinová) kalcium-dependentní adenosintrifosfatáza (Ca²⁺+ATPáza)

Myozinová Ca²⁺-ATPáza je specifický enzym, který slouží jako základ pro typovou klasifikaci svalových vláken^[8]. Reakce se provádí s preinkubací při pH 9,6, kdy výsledkem reakce je přítomnost mozaiky svalových vláken světlých (1. typu), tmavá jsou pak vlákna typu 2. Preinkubací při pH 4,3 dosahujeme reverzního kontrastu, kdy tmavá jsou vlákna 1. typu. Pokud je potřeba rozlišit vlákna 2. typu na jednotlivé subtypy, provádí se preinkubace při pH 4,6^[21].

2.3.2.2 Svalová fosforyláza

Přítomnost tohoto enzymu v kryostatových řezech je závislá na přítomnosti intracelulárního glykogenu. Světlé místo má detekce svalové fosforylázy u diagnóz glykogenózy, kdy je ovšem glykogen jako primer přítomen v nadbytku^[1].

2.3.2.3 Mitochondriální dehydrogenázy

Dehydrogenázy jsou oxidativní enzymy, které jsou lokalizovány na mitochondriích a slouží tedy k určení jejich množství, distribuci, případně abnormalit^[1].

Z této skupiny se provádí histochemická detekce sukcinyldehydrogenázy (dále jen SDH) nebo NADH-tetrazolium reductázy tetrazoliovou technikou^[8].

2.3.2.4 Lysosomální hydrolázy

Sem patří kyselá fosfatáza, nespecifická esteráza a další kyselá hydrolázy lokalizované v lysosomech. Uplatňují se při degradaci svalových bílkovin u nejrůznějších neuro- a myopatií^[1].

2.3.2.5 Cholinesterázová aktivita a znázornění motorických plotének

Acetylcholinesterázovou aktivitou bývá prokazována přítomnost, velikost a distribuce motorických plotének. Histochemicky lze demonstrovat thiocholinovými metodami^[8].

2.3.2.6 Reakce na lipidy

Lipidy nejčastěji zjišťujeme v kryostatových řezech barvených černým sudanem nebo olejovou červení. Nepolární lipidy odstraníme z řezu acetonovou extrakcí^[1]. Všechny lipidy s výjimkou lipopigmentů odstraníme extrakcí chloroformmetanolem^[8].

2.3.2.7 Reakce na glykogen

Glykogen lze znázornit celloidinovou protekcí nebo po fixaci chloroform-metanolem metodou PAS (periodic acid – Schiff). PAS reakce však není specifická pro glykogen, proto sousední řez natrávíme diastázou či slinným Ptyalinem, který štěpí glykogen^[8].

2.3.2.8 Průkaz cytochromoxidázy (COX)

Reakce na průkaz COX se provádějí při podezření na mitochondriální myopatie. COX je enzym, který je kódován mitochondriální DNA a u mitochondriálních poruch se projevuje deficitem a přítomností COX negativních vláken^[21].

3 Speciální část

3.1 Zařízení histochemické laboratoře

Základní výbava histochemické laboratoře vychází z popsané metodiky k dosažení základního cíle, a to identifikace skupin, molekul a atomů na celulární nebo tkáňové úrovni.

Především je to chladicí a mrazicí zařízení, kapalný dusík, nádoby k hlubokému zmrazení a uchovávání zmrazených bloků a nádoby k jeho doplňování, propanbutan (v bombách do plynových vaříčů), kryostat, inkubační boxy a lázně^[4].

3.2 Cytochromoxidáza

Cytochromoxidáza neboli cytochrom-c-oxidáza je enzym dýchacího řetězce (komplex IV). Přenáší elektrony z cytochromu c na kyslík. Vazba CO nebo kyanidů na Fe (které je součástí enzymu) blokuje buněčnou respiraci. Součástí dýchacího řetězce jsou mitochondriální cytochromy a, a₃, b, c^[20]. K oxidaci cytochromu c dochází na straně cytosolu, zatímco k redukci kyslíku cytochromem a₃ na straně matrix^[23].

Při reakci s kyslíkem se změní oxidační čísla centrálního atomu železa (Fe^{II}, Fe^{III}) heminu a mědi v měďnatém chromoforu^[19].

3.3 Sukcinyldehydrogenáza

Sukcinyldehydrogenáza (komplex II) je enzymatický komplex, katalyzující oxidaci sukcinátu na fumarát za současné redukce ubichinonu na ubichinol. Komplex je navázán na vnitřní straně membrány mitochondrií. Skládá se nejméně ze 4 různých podjednotek^[27]. Hlavní podjednotky jsou A, B, C, D. Je součástí citrátového cyklu i dýchacího řetězce^[13].

3.4 Mitochondrie

Hlavní funkcí mitochondrie je syntéza ATP, což je hlavní zdroj energie pro většinu buněčných procesů. Oxidací mastných kyselin a cukrů je získávána potřebná energie pro syntézu ATP^[12]. Kromě oxidativní fosforylace pak může provádět četné a rozmanité rozklady a biosyntetické reakce^[7].

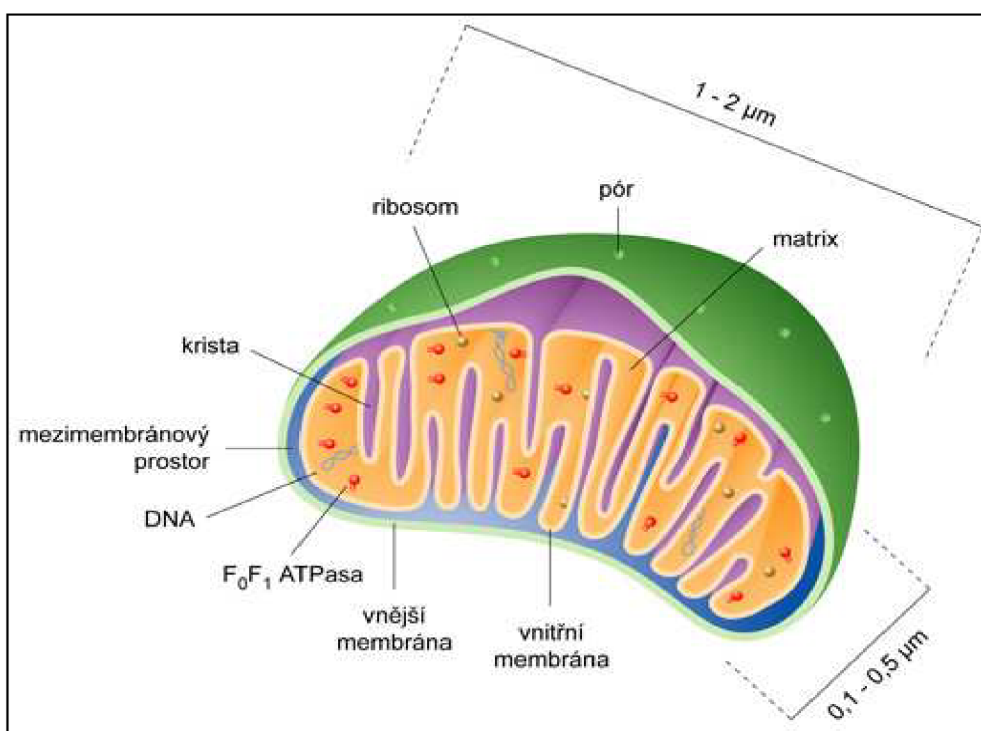
Mitochondrie jsou objemově nejrozsáhlejší komponenty buňky a mají válcovitý tvar^[12]. Jsou stálou součástí všech živočišných buněk. Ve světelném mikroskopu se jeví jako zrníčka, tyčinky nebo vláknité útvary. Elektronová mikroskopie ukázala, že mají velmi složitou vnitřní

strukturu. Stěna mitochondrie je složena z vnější a vnitřní membrány oddělených úzkým prostorem^[10].

Vnější membrána mitochondrie je relativně propustná a obsahuje množství transportních proteinů, které vytvářejí v membráně množství neselektivních kanálů (tzv. neselektivní transport)^[12]. Je volně propustná pro protony a díky porinu, tvořícím transmembránové kanálky, mohou skrze ní procházet i látky o menších molekulách (např. glukóza)^[10].

Vnitřní membránu mitochondrie tvoří mitochondriální krysty, což jsou neúplné přepážky^[12], které zvětšují povrch vnitřní mitochondriální membrány. Je relativně nepropustná vzhledem k vysokému obsahu kardiolipinu, respektive selektivně propustná jen pro určité látky, jejichž transport zajišťují molekuly specifických proteinů zvaných permeázy^[10]. Mitochondriální DNA, ribozomy, tRNA a proteosyntetické enzymy jsou pak uloženy ve vnitřním prostoru (matrix)^[12].

Přítomnost mitochondriálních proteinů umožňuje dynamiku a pohyb organely^[7].



Obrázek č.7 Struktura mitochondrie^[26]

3.5 Myopatie

Svalové onemocnění se může vyskytovat ve všech věkových skupinách a může přinášet vážné fyzické postižení. Obzvláště závažné je, pokud se postižení objeví u dětí nebo mladých dospělých. Onemocnění svalů může mít různou formu a příčinu^[9].

Nemoci periferních nervů, neuromuskulárních plotének a kosterních svalů se mohou projevit několika příznaky od slabosti, smyslové ztráty, bolesti až po svalové křeče. Vrozené myopatie mají často nástup onemocnění v dětství^[5]. Příčina je většinou genetická^[9].

3.5.1 Hodnocení funkčního stavu a změny stavu u myopatií

Běžné neurologické vyšetření je schopno detekovat poškození, méně je však schopno zachytit omezení funkčních schopností a zejména změnu stavu^[1].

a) Svalová síla – nejvýznamnějším motorickým symptomem postižení kosterního svalu je svalová slabost. Testování svalové síly je důležitým prostředkem hodnocení stavu nemocného s myopatií. V klinické praxi je používán svalový test hodnotící semikvantitativně svalovou sílu pomocí několika stupňů^[1].

1) manuální svalový test: výhodou je jednoduchost, rychlost a možnost vyšetření více svalů. Nevýhodou je nepřesnost a malá citlivost.

0 – žádný pohyb

1 – náznak pohybu

2 – pohyb v kloubu s vyloučením gravitace

3 – pohyb v celém rozsahu kloubu proti gravitaci, ale nikoliv proti odporu

4 – pohyb v celém rozsahu kloubu proti lehkému odporu

5 – normální síla^[1]

2) myometrie: ruční myometrie přináší možnost semikvantitativního měření svalové síly pomocí přenosného, elektronického měřidla. Oproti manuálnímu testování je tato metoda citlivější^[1].

U fixní myometrie je myometr součástí pevného zařízení, které zajišťuje fixní polohu testované části těla. Jde o nejpřesnější a nejcitlivější metodu pro vyšetření jednotlivého svalu, zejména pokud je síla poměrně dobrá^[1].

Izokinetická dynamometrie testuje sílu pacienta fyziologičtějším způsobem než fixní dynamometrie prováděna izometricky^[1].

b) Funkční testy

1) chůze: může docházet ke kolébové chůzi, kompenzačnímu záklonu, bederní lordóze a vystrčenému břichu. Při slabosti lopatkového svalstva se při chůzi může projevit posun lopatek laterálně, horní končetiny visí ochable s dorzem ruky rotovaným ventrálně a při chůzi se pasivně kymácejí jako kyvadlo.

Při slabosti peroneálního svalstva je typická pleskavá chůze a současně postižený nadměrně zvedá dolní končetiny (kohoutí chůze).

Šouravá chůze se vyskytuje u slabosti flexorů.

Porucha chůze v rámci konverzní poruchy je bizarní, může mít charakter od opatrného našlapování až po chůzi akrobata^[1].

2) vstávání ze země: při slabosti pánevního pletencového svalstva se vstávající přetočí na slabší stranu, opře se o ruku na této straně, přitáhne kolena a přenesse váhu na ruce a kolena. Poté zvedne pánev vzhůru (tvoří oblouk, jehož nejvyšším bodem jsou hýždě). Při těžší slabosti nemocný nejprve stabilizuje polohu s vystrčenými hýžděmi, je rozkročený a oběma rukama se pevně opírá o podložku. Poté se jednou rukou opře o stehno a pomalu se napřimuje ručkováním po stehnech vzhůru (myopatický šplh, Gowensovo znamení^[1]).

3) vstávání ze židle: v případě slabosti flexorů kyčle se nemocný předkloní a pomůže si opřením rukou o opěradlo židle. Nebo se může zaklonit a poté švihem předklonit trup^[1].

4) vystoupení na schod: u počínající slabosti pletencového svalstva nemocný po našlápnutí chvíli hledá oporu pro nohu. Tato prodleva může být první známkou slabosti.

Při větší slabosti nemocný při přesunu váhy těla na našlápnutou nohou přechodně padá dozadu a také dochází k přechodnému poklesu pánve.

Při těžké slabosti si nemocný pomáhá jednou či oběma rukama^[1].

5) vzpažení: slabost svalů pažního pletence neumožňuje vzpažit z upažení^[1].

6) funkční testy na čas: poskytují kvantitativní ukazatel stupně funkční poruchy a její případné změny. Jde o pouhou modifikaci funkčních testů.

- ° překonání vzdálenosti 10 metrů. Pacient má tuto vzdálenost překonat jakkoliv a co nejrychleji (není mu řečeno, zda má jít či utíkat)

- ° postavení z lehu na podlaze

- ° vyjítí 4 standardních schodů

- ° kolíčekový test. Je měřen počet kolíčků, které pacient umístí do jamek za 30 sekund

- ° testování řeči na čas. Pacient opakuje dvě až tři slabiky a sleduje se počet opakování za 5 sekund^[1].

7) testy ventilace: jsou dobře standardizovány a velmi užitečné, protože jde o vitální funkci. Jde o usilovný výdech za 1 sekundu, dechový objem, minutový objem a maximální statický inspirační tlak^[1].

8) funkční škály: slouží k posouzení stupně postižení běžných životních funkcí^[1].

c) Laboratorní testy použitelné k sledování progresu onemocnění

- 1) kreatinkináza (CK): hladina v séru je ukazatelem progresu zánětlivých svalových onemocnění. Důležitější než aktuální hladina je trend změn^[1].
- 2) kreatin v moči: množství vyloučené v moči za 24 hodin odráží celkové množství svalové hmoty. Sledování je užitečné, pokud nemocný prodělává léčbu a vzestup váhy může být zapříčiněn jinými faktory, než je nárůst svalové hmoty^[1].
- 3) elektromyografie (EMG): má význam u sledování progresu či regrese onemocnění. EMG obraz se obvykle nemění bez klinické změny^[1].
- 4) svalová biopsie: má řadu limitací, jelikož patologické změny nejsou distribuovány stejnoměrně mezi jednotlivé svaly a dokonce ani uvnitř jednotlivého svalu^[1].
- 5) zobrazovací metody: magnetická rezonance je schopna u akutních či subakutních zánětlivých myopatií jednorázově zachytit stupeň a rozsah zánětlivého edému^[1].

K hodnocení svalového postižení máme tedy k dispozici celou paletu výše uvedených různě náročných a spolehlivých testů^[1].

3.5.2 Mitochondriální myopatie

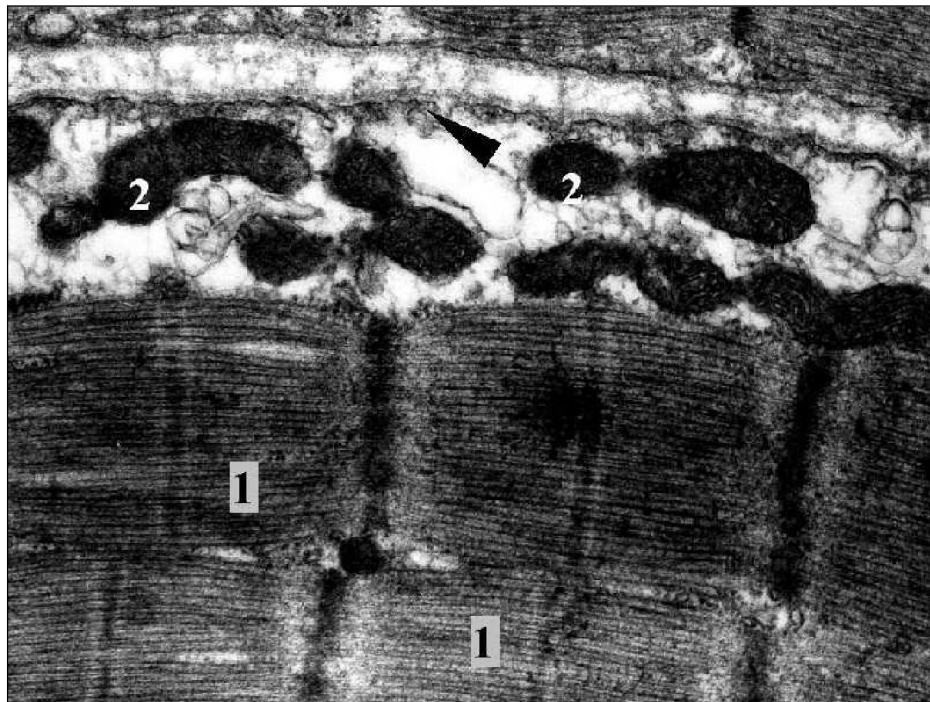
„Éra odhalení molekulárních mechanismů mitochondriálních poruch začala v roce 1988 popisem bodové mutace mitochondriálního DNA u Leberovy hereditární optické neuropatie Wallecem a spol. (1988) a delece mtDNA u některých mitochondriálních myopatií (Holt a spol., 1988)“^[1].

Mitochondriální myopatie patří mezi heterogenní onemocnění, které postihují především kosterní svalstvo a nervový systém. Vznikají většinou kvůli dysfunkci mitochondriálního respiračního řetězce. Porucha může být způsobena buď mutací mateřského dědičného mitochondriálního genomu, nebo jadernou mutací DNA^[7].

Mitochondriální poruchy jsou z genetického hlediska jedinečné, protože mitochondrie mají vlastní genom. I tak je jen velmi malé množství mitochondriálních proteinů kódováno mitochondriální DNA. Většina je kódována jadernou DNA a do mitochondrií následně transportována^[2].

Z klinických příznaků je třeba uvést svalovou slabost a únavnost, ophthalmoplegie, křeče při cvičení, myoglobinurie a syndromy s cerebellární dysfunkcí^[8]. Svalové symptomy mohou být také izolované a mají nejčastěji charakter neprogredující slabosti a únavnosti. Progresivní externí ophthalmoplegie je charakteristickým vzorcem slabosti a postihuje zevní okohybné svaly^[1].

Svalová vlákna s abnormálními mitochondriemi můžeme identifikovat histochemicky nebo elektronmikroskopicky^[1].



Obrázek č.8 Povrch svalového vlákna:myofibrily (1), nahromadění mitochondrií (2) pod sarkolemou (šipka)^[31]

Rozdělení biochemických abnormit u mitochondriální myopatie:

- a) deficity karnitinového systému
- b) defekty v utilizaci mitochondriálních substrátů
- c) defekty respiračního řetězce
- d) defekty v uchování a předávání energie^[8]

Podezření z mitochondriální myopatie by mělo vést vždy ke svalové biopsii, která nám může ukázat typické histologické, histochemické a biochemické změny. Svalová tkáň se rovněž nejvíce hodí na molekulární analýzu mutací mtDNA.

Z histochemických reakcí nejčastěji při podezření na mitochondriální myopatie používáme

- a) průkaz sukcinyldehydrogenázy, protože ta má nejvyšší senzitivitu a specifitu pro mitochondriální proliferaci
- b) průkaz NADH-tetrazoliumreduktázy, ta zachycuje i nespecifické změny mitochondrií při myopatiích jiného původu
- c) průkaz cytochromoxidázy, která může identifikovat nemocné, u kterých chybí mitochondriální proliferace, ale reakce svalových vláken na COX je snižená nebo chybí^[1].

Biopsická diagnostika spočívá v posouzení základního vzorce histopatologických změn v biopsii, zhodnocení morfologických odchylek mitochondrií a v neposlední řadě ve zjištění přítomnosti či absence tzv. „ragged red fibres“ ve vztahu k reaktivitě na COX a SDH^[14].

3.5.2.1 Celulární mechanismy mitochondriálních myopatií

Mitochondriální myopatie se mohou klinicky manifestovat širokým spektrem symptomů. Mohou to být intolerance svalové zátěže a únavnost až přes svalovou slabost a atrofii postihující končetinové, bulbární a extraokulární svaly.

K mechanismům vzniku patří:

- a) porucha oxidativní fosforylace a omezená produkce ATP
- b) poškození mitochondriálních enzymů, lipidů a DNA volnými radikály
- c) mitochondriálně navozená buněčná apoptóza^[1]

Obecným znakem u všech mitochondriálních myopatií je porucha oxidativní fosforylace. To může ovlivnit dostupnost energie pro buňku a přenos signálu. Nemocní mitochondriální myopatií mají zvýrazněnou sympatickou a cirkulační odpověď na zvýšenou intenzitu oxidativní fosforylace a mobilizují substrát jako reakci na svalovou zátěž^[1].

3.5.2.2 Jiné než vrozené a geneticky podmíněné mitochondriální myopatie

Kromě vrozených, geneticky podmíněných myopatií máme i myopatie získané, které vznikají vlivem infekce (Reyeův syndrom), toxických látek a léků^[11].

Alkoholické myopatie patří k častým toxickým nelékovým myopatiím, zvláště jejich akutní forma. Manifestuje se bolestí dolních končetin až následnou slabostí^[25].

Myopatie kritického stavu, které se rozvíjejí u značné části pacientů v kritickém stavu provázeném sepsí a multiorgánovým selháním, patří k nově popsaným jednotkám^[25].

4. Praktická část

Cílem mé práce je zavedení metodiky kombinovaného průkazu SDH a COX u pacientů s podezřením na mitochondriální myopatii. V dalším textu je popsán princip a provedení tohoto vyšetření ve svalové tkáni.

4.1 Princip vyšetření sukcinyldehydrogenázy (SDH)

Principem histochemických technik pro průkaz SDH je, že tetrazolová sůl (bezbarvá a rozpustná) jako akceptor elektronů se změní na barevný produkt formazan v místě aktivity enzymu. Běžně používaná tetrazolová sůl je Nitro blue tetrazolium (NBT), které poskytuje konečný modrý produkt. Intenzita produktu je odrazem počtu mitochondrií uvnitř vlákna. Technika průkazu SDH je specifická pro mitochondrie^[3].

4.2 Princip vyšetření cytochromoxidázy (COX)

Metoda běžně používaná pro prokazování COX aktivity používá diaminobenzindin jako donor elektronů a vytváří hnědé produkty.

Reakce pro průkaz COX odhaluje rozdíly v mitochondriálních počtech a jejich distribuci v různých vláknech. Je to rovněž důležitá metoda pro prokazování vláken postrádajících aktivitu enzymu v důsledku určitých mutací v mitochondriální DNA^[3].

4.3 Postup metody při průkazu sukcinyldehydrogenázy (SDH)

1. Inkubace ve vlhkém prostředí při 37°C na 90 minut.
2. Osušit a vložit do formolu na 15 minut
3. Oplach destilovanou vodou
4. Montovat do vodného média^[3]

4.3.1 Příprava jednotlivých reagensů

Zásobní médium sukcinátu

Sodný sukcinát	4,05 g
Destilovaná voda	20 ml
1 M kyselina chlorovodíková	0,13 ml

Upravit pH na 7 a doplnit do celkového objemu 25ml

Skladovat při teplotě -20°C v alikvótu^[3]

Tetrazoliový roztok

NBT roztok (4mg/ml)	7,5 ml
0,2 M tris pufr (pH 7,4)	7,5 ml
Destilovaná voda	10,5 ml

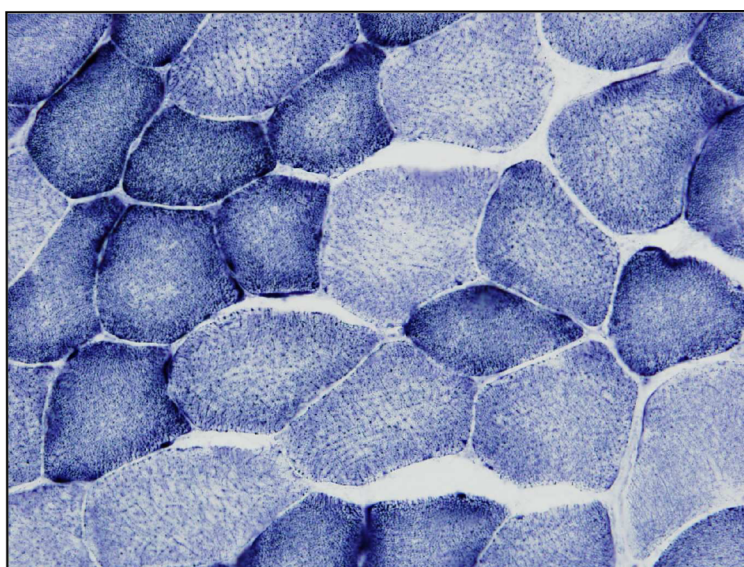
Upravit na pH 7 a skladovat při teplotě -20°C v alikvótu^[3].

Inkubační roztok

0,1 ml zásobního média sukcinátu + 0,9 ml tetrazoliového roztoku^[3].

4.3.2 Výsledek při průkazu sukcinyldehydrogenázy

Konečný produkt reakce je modro šedý. Vyšší aktivitu nalézáme ve vláknech typu 1 a v oblasti mitochondriálních agregátů. Ve vláknech typu 2A je středně silná intenzita reakce a vlákna typu 2B vykazují nejslabší intenzitu reakce^[3].



Obrázek č. 9 Průkaz aktivity SDH – norma

4.4 Postup metody při průkazu cytochromoxidázy

1. Inkubace čerstvě mraženého preparátu po dobu 3 hodin při 37°C
2. Rychlý oplach v destilované vodě
3. Fixovat ve formolu na 15 minut
4. Oplach ve vodě
5. Dehydratace vzestupnou sérií alkoholů, projasnění a montování do syntetické pryskyřice^[3]

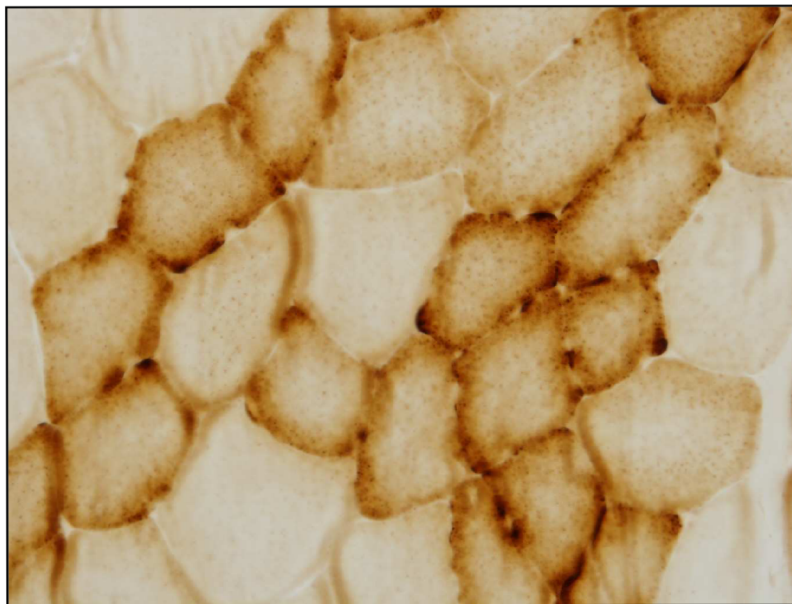
4.4.1 Příprava jednotlivých reagensů

Inkubační médium

3,3' diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB)	7,5 mg
0,1 M fosfátový pufr (pH 7,4)	9 ml
Smícháme a přidáme:	
Katalasa C roztok (4mg/ml)	1 ml
Cytochrom c	10 mg
Sacharóza	750 mg ^[3]

4.4.2 Výsledek při průkazu cytochromoxidázy

V místech cytochromoxidázové aktivity se nachází jemně hnědé skvrny (posílení osmiem dává tmavší barvu). Vlákna typu 1 jsou nejtemnější, vlákna typu 2A jsou při reakci středně intenzivní a vlákna typu 2B mají nejslabší intenzitu. Vlákna s mitochondriemi, které nesou mutaci v genech pro cytochromoxidázu, jsou čistě bílá^[3].



Obrázek č. 10 Průkaz aktivity COX – norma

4.5 Kombinace cytochromoxidázy a sukcinyldehydrogenázy

Kombinace pro COX a SDH poskytuje jasnou metodu pro identifikaci vláken, které vykazují nedostatek COX, ale udržují SDH aktivitu^[3].

4.5.1 Postup kombinované metody pro cytochromoxidázu a sukcinyldehydrogenázu

1. Inkubace čerstvě mraženého preparátu při 37°C 1 hodinu v inkubačním médiu pro cytochromoxidázu
2. Oplach v destilované vodě
3. Inkubace v inkubačním médiu pro sukcinyldehydrogenázu při 37°C 45 minut
4. Osušit a fixovat v 10% formalinu 15 minut
5. Oplach vodovodní vodou
6. Montovat vodním médiem

Průkaz aktivity cytochromoxidázy se vždy provádí jako první^[3].

4.5.2 Příprava jednotlivých reagensů

Cytochromoxidázové inkubační médium

3,3'-DAB	15 mg
0,05 M sodíko fosfátový pufr pH 7,4	27 ml
Sacharóza	2,25 g
Skladovat v alikvótu při -20°C ^[3]	

Inkubační médium

DAB roztok	0,9 ml
Cytochrom c	1 mg
Kataláza	0,1 mg ^[3]

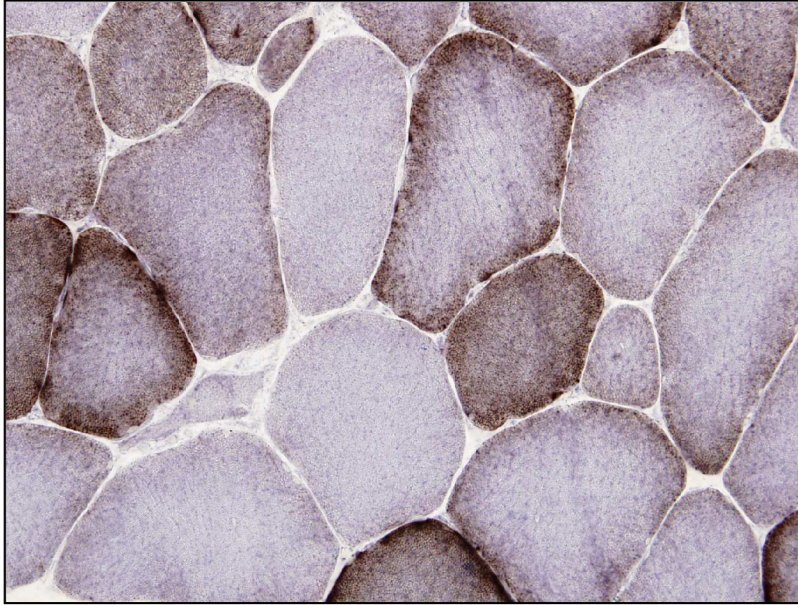
Sukcinát dehydrogenáza

0,2 M sukcinát sodný	0,5 ml
0,2 M fosfátový pufr	0,5 ml
Skladovat v alikvótu při -20°C	

Těsně před použitím přidat 1 mg NBT k alikvótu.^[3]

4.5.3 Výsledek při kombinovaném použití COX a SDH

Jemně hnědo-modro-šedá vlákna mozaikovitě uspořádaná, vlákna bez aktivity COX jsou modrá^[3].



Obrázek č. 11 Kombinovaný průkaz COX + SDH

5. Diskuze

Mitochondriální poruchy energetického metabolismu souvisí s generalizovaným nebo tkáňově specifickým poklesem produkce ATP. Nejčastěji dochází k projevům vycházející z postižení funkce svalů, myokardu a/nebo centrálního nervového systému, protože tyto energeticky náročné tkáně jsou nejcitlivější na počínající mitochondriální poruchu. Klinické příznaky závisí především na typu molekulárního defektu a zbytkové aktivitě postiženého enzymu. Navíc u pacientů s mitochondriálním onemocněním dochází často ke zvýraznění klinických příznaků v průběhu akutních horečnatých stavů, což souvisí nejen s vyšší potřebou energetických zdrojů při infekci, ale i s dalším poklesem již původně nízké aktivity postiženého enzymu při jeho zvýšené degradaci rychle uvolněnými proteázami.

První příznaky onemocnění se mohou objevit od novorozeneckého období až do dospělosti, ale i ve vysokém stáří. V některých rodinách jsou klinické příznaky natolik rozmanité, že zpočátku ani nevedou k podezření na společnou etiologii onemocnění. Avšak právě současný výskyt zdánlivě nesouvisejících klinických příznaků onemocnění u pacienta, u kterého není známa etiopatogeneze jeho onemocnění, by měl vždy vést k podezření na mitochondriální etiologii obtíží.

Zavedení metodiky kombinovaného průkazu COX a SDH bylo provedeno na 35 svalových biopsiích v období let 2008-2013, z toho ve 4 případech bylo vysloveno podezření na mitochondriální myopatii buď klinicky, nebo na základě histologického nálezu.

6. Závěr

Diagnostika mitochondriálních onemocnění je založena na spolupráci postižených rodin, ošetřujících lékařů a specializovaných laboratoří, které se zabývají diagnostikou mitochondriálních onemocnění. Při diagnostice se využívá celá škála laboratorních, zobrazovacích a elektrofyziologických metod. U většiny nemocných je však nutno pro stanovení správné diagnózy mitochondriálního onemocnění zajistit i spektrofotometrická, polarografická, histologická, elektronmikroskopická, imunohistochemická a molekulární vyšetření v bioptovaných tkáních.

Diagnostika COX negativních svalových vláken ve svalové biopsii pomocí kombinovaného průkazu COX a SDH má několik výhod oproti průkazu obou enzymů samostatně. Je to zejména jednoznačný barevný kontrast mezi vlákny COX negativními (která zůstávají modře zbarvená) a vlákny COX pozitivními, která se barví hnědo-modro-šedě. Výhodné je to zejména v případech, kdy výsledek průkazu samostatné COX není jednoznačný a je potřeba rozhodnout, zda světlá vlákna jsou opravdu COX negativní, nebo se jedná pouze o vlákna slabě zbarvená, nicméně se zachovanou aktivitou COX. Nevýhodou je potom větší časová náročnost kombinovaného průkazu a poměrně značná citlivost metody jednak na správné provedení, ale i vzhledem ke kvalitě dodaného bioptického materiálu (zejména s ohledem na stupeň autolytických změn).

7. Seznam použité literatury

- [1] BEDNAŘK J, GAILLYOVÁ R, KADAŇKA Z, a kol.: Nemoci kosterního svalstva, 1. vyd. Triton Praha 2001, 470 s.
ISBN 80-7254-187-0
- [2] BERTORINI TULLIO E.: Neuromuscular Disorders, Treatment and Management. 1. vyd. Saunders Philadelphia 2011, 452 s.
ISBN 978-1-4377-0372-6
- [3] DUBOWITZ V, SEWRY C.: Muscle Biopsy. 2. vyd. Saunders Philadelphia, 2007, 600 s.
ISBN 10:1-4160-2593-6
- [4] DVOŘÁK K, DVOŘÁKOVÁ Z, FEIT J, LUKÁŠ Z, ŠMARDOVÁ J.: Základy histopatologických vyšetřovacích metod. Brno, 2008
- [5] HUSAIN A, STOCKER J. T.: Color Atlas of Pediatric Patology. 1. vyd. Demos Medical Publishing New York 2011, 435 s.
ISBN 978-1-933864-57-0
- [6] JELÍNEK R. a kol.: Histologie a embryologie. 224 s.
- [7] KARPATIG a kol.: Disorders of Voluntary Muscle. 8. vyd. Cambridge Univerzity Press Cambridge Univerzity 2010, 520 s.
ISBN 13-978-0-521-87629-2 Hardback
- [8] LUKÁŠ Z, FEIT J.: Úvod do bioptické myopatologie. II. Patologicko-anatomický ústav a LF MU Brno 1996, 114 s.
ISBN 80-210-1294-3
- [9] SAYLER H, SIEGEL L.: The Encyclopedia of the Musile and Skeletal Systém and Disorders 1. vyd. Facto On File, INC. New York 2005, 389 s.
ISBN 0-8160-5447-9

- [10] VACEK Z.: Histologie a histologická technika, histologie 1. část. 1. vyd. Protisk Slavkov Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno 1996, 332 s.
ISBN 80-7013-201-9
- [11] World Wide Web : <http://www.atlases.muni.cz> Atlas patologie pro studenty medicíny, aktualizováno v březnu 2013 [citováno 6.4.2013]
- [12] World Wide Web : <http://www.biologievkostce.blogspot.cz/2011/05/20-stavba-funkce-mitochondrie.html>. [citováno 17.3.2013]
- [13] World Wide Web : <http://www.biopticka.cz> [citováno 17.3.2013]
- [14] SOUČEK O., JEŠINA P., ZEMAN J., ELLEDER M., HŮLKOVÁ H., LUKÁŠ Z.
Histopatologická diagnostika mitochondriálních myopatií – indikace a přínos svalové biopsie.
Článek : Cesk Slov Neurol XI 2011; 74/107(4):428-436 dostupné na World Wide Web :
<http://www.csnn.eu/ceska-slovenska-neurologie-clanek/histopatologicka-diagnostika-mitochondrialnich-myopatii-indikace-a-prinos-svalove-biopsie-35789> [citováno 17.3.2013]
- [15] World Wide Web : <http://www.e-kulturistika.cz>
- [16] BERNACIKOVA M., KALICHOVÁ M., BERÁNKOVÁ L., Fakulta sportovních studií MU dostupné na World Wide Web : <http://www.is.muni.cz/do/1451/e-learning/kineziologie/elportal/pages/funkce-svalu> [citováno 6.4.2013]
- [17] World Wide Web : <http://www.files.kklicek.webnode.cz>
- [18] World Wide Web : <http://www.klinikazdravi.cz/clanky/miastenia-gravis-postizeni-autoimunity> [citováno 7.4.2013]
- [19] World Wide Web : <http://www.leccos.com/index.php/clanky/cytochromoxidasa>
[citováno 18.3.2013]
- [20] World Wide Web : <http://www.lekarske.slovniky.cz/pojem/cytochromoxidasa> [citováno 18.3.2013]

[21] ZÁMEČNÍK J. Svalová biopsie. Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2.LF a FN v Motole dostupné na World Wide Web : <http://www.lf2.cuni.cz> [citováno 6.4.2013]

[22] World Wide Web : <http://www.mikro.cz/leica>

[23] World Wide Web : <http://www.orion.chemi.muni.cz/zakladni-pojmy-z-biochemie/page0455.htm> [citováno 7.4.2013]

[24] World Wide Web : <http://www.skolajacna.cz/biologie-cloveka>. Gymnázium a Střední odborná škola pedagogická, Znojmo, projekt SIPVZ 1842P2006, verze 1.03 [citováno 7.4.2013]

[25] BEDNAŘÍK J., Toxické a lékové myopatie. Neurologická klinika LF MU a FN v Brně dostupné na World Wide Web : <http://www.solen.sk/pdf/Bednarik1.pdf> [citováno 6.4.2013]

[26] World Wide Web : <http://www.vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid-es-002-v1/hesla/mitochondrie.htm>.

[27] World Wide Web : <http://www.wikipedia.cz> [citováno 17.3.2013]

[28] World Wide Web : <http://www.zdravi.e15.cz/447668> [citováno 6.4.2013]

[29] World Wide Web : <http://www.zdravinadlani.cz/nase-telo/0901-svaly.htm> [citováno 6.4.2013]

[30] Word Wide Web : <http://www.biomech.ftvs.cuni.cz/pbpbk/kompendium/kineziologie/anatomie.php> Funkční anatomie pohybového aparátu [citováno 24.4.2013]

[31] Word Wide Web : <http://ultrastruktura.upol.cz/v%C3%BDuka/AtlasEM/sv/slides/sv005.html>