

Role biopsie v diagnostice neuromuskulárních onemocnění v molekulárně biologické éře

prof. MUDr. Josef Zámečník, Ph.D.

Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole, Praha

V době nových možností molekulárně genetického vyšetřování už není svalová biopsie u většiny myopatií diagnostickou metodou první volby. Při podezření na vrozenou myopatii je indikována pouze tehdy, pokud je nález z molekulárně biologických vyšetření nekonkluzivní nebo pokud nekoreluje s klinickým fenotypem onemocnění. Naopak svalová biopsie je indikována ve všech případech podezření na autoimunitní procesy – myozitidy či imunitně zprostředkované nekrotizující myopatie, případně vaskulitidy.

Klíčová slova: svalová biopsie, myopatie, biopsie nervu, neuropatie.

The role of biopsy in the diagnosis of neuromuscular disorders in the molecular biological era

Nowadays, in times of new possibilities of molecular genetic testing, muscle biopsy is no longer the diagnostic method of choice in most myopathies. In hereditary myopathies, a biopsy is indicated only if the findings from molecular biological analysis is non-conclusive or does not correlate with the clinical phenotype of the disease. On the contrary, muscle biopsy is indicated in all cases of autoimmune processes – myositis, immune-mediated necrotizing myopathies, or vasculitis.

Key words: muscle biopsy, myopathy, nerve biopsy, neuropathy.

Biopsie svalu

Indikace svalové biopsie v moderní době

U většiny myopatií, zejména v dětském věku, už dnes není invazivní diagnostika svalovou biopsií metodou první volby, přesto má v diagnostice myopatií stále své pevné místo (Nilipour, 2019). Při klinickém podezření na vrozenou myopatii (svalové dystrofie, myotonické dystrofie, kongenitální myopatie, kanálopatie a vrozené metabolické myopatie) je dnes potřeba nejdříve provést méně invazivní vyšetření – molekulárně genetické (dnes nejčastěji s využitím platformy NGS – sekvenování nové generace) či test suché krevní kapky na vyloučení Pompeho nemoci. Svalová biopsie je u těchto případů indikována pouze tehdy, pokud není nález v molekulárně biologických vyšetřeních konkluzivní nebo když nekoreluje s klinickým fenotypem one-

mocnění (Yang et al., 2019). Indikací pro provedení svalové biopsie také není podezření na endokrinní myopatie. Naopak, svalová biopsie je indikována ve všech případech podezření na autoimunitní procesy – myozitidy či imunitně zprostředkované nekrotizující myopatie, případně vaskulitidy, a také postižení svalu amyloidózou. Důvodem ke svalové biopsii je občas také klinická potřeba rozlišit primární myopatie od neurogení svalové poruchy. Ačkoli je jejich typická klinická prezentace rozdílná, v praxi se jejich symptomy i nálezy dalších vyšetření mohou překrývat. Občas může dojít také k souběhu myopatie s neurogením postižením svalu.

Co by nemělo chybět na žádance?

Myopatologie je v rámci celé diagnostické histopatologie oborem s mimořádně nízkým procentem jednoznačných diagnóz s nezaměnitelnými patognomickými znaky.

Naopak nejčastěji je nutno poskládat informace poskytnuté jednotlivými histopatologickými vyšetřovacími metodami do mozaiky, která dává smysl, ladí s poskytnutými klinickými informacemi a vede k diagnóze. Nedostatek klinických informací vede k jedinému výsledku, kterým je pouhý popis histopatologického obrazu, mozaika diagnózy zůstává nesložena a efekt takové biopsie pro pacienta je sporný. Vždy je třeba, aby mohl patolog interpretaci svalové biopsie zodpovědět diagnostický dotaz klinika, formulovaný v žádosti o vyšetření.

Na žádance ke svalové biopsii by kromě běžných náležitostí v žádném případě neměly chybět tyto údaje:

- stručný nástin klinického průběhu a symptomatologie svalových obtíží,
- další důležitá onemocnění (hlavně známé systémové choroby, endokrinopatie, malignity, i podezření na ně),



KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORKY: prof. MUDr. Josef Zámečník, Ph.D., josef.zamecnik@lfmotol.cuni.cz, Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN v Motole, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Cit. zkr: *Neurol. praxi.* 2022;23(1):54-56

Článek přijat redakcí: 1. 6. 2021

Článek přijat k publikaci: 27. 7. 2021

- dlouhodobá terapie (zejména imunosupresiva, hormony, hypolipidemika atd.),
- výsledky informativních laboratorních vyšetření a jejich dynamika – zejména kreatinkináza, myoglobin, případně AST, ALT, laktát,
- nález z elektrofyziologických vyšetření (EMG),
- klinická diagnostická rozvaha (a formulace diagnostické otázky pro patologa),
- místo odběru svalové tkáně,
- kontakt (telefon, e-mail) na ošetřujícího nebo indikujícího lékaře (neurologa), zejména pokud přichází žádanka z chirurgické ambulance.

Obecně doporučujeme přiložit ke standardní žádance o histologické vyšetření kopii klinické zprávy – není pak potřeba všechny informace do žádanky přepisovat. Důležitý je kontakt na ošetřujícího lékaře.

Výběr vhodného svalu pro biopsii

Výběr svalové oblasti k biopsii je v rukou indikujícího lékaře a žádoucí místo odběru je primárně determinováno klinickým obrazem onemocnění. Výtěžné informace většinou poskytne vyšetření symptomatického, ale jen středně nebo mírně postiženého svalu (Nix et Moore, 2020). Svalová biopsie bývá většinou odebírána z jednoho z následujících končetinových svalů: m. quadriceps femoris (vastus lateralis nebo rectus femoris), m. biceps brachii, m. deltoideus, m. gastrocnemius nebo m. tibialis anterior (Mikell et al., 2013). Ostatní svaly se bioptují vesměs ze speciálních či výzkumných důvodů. Při výběru nejpostiženějších míst může být obraz změn tak pokročilý, že úbytek svalových vláken a jejich náhrada fibroadipózní tkání (tzv. „end-stage muscle“) zcela překryje i reziduální známky onemocnění, které k takovému stavu vedlo. Někdy lze v takových případech jen z přítomnosti svalových vřetének usuzovat na to, že se původně jednalo o svalovou tkáň. V dnešní době je základním vyšetřením pro výběr svalu pro biopsii magnetická rezonance svalů. Ta u zánětlivých myopatií ukazuje rozsah a distribuci zánětu, u nezáánětlivých onemocnění znázorňuje distribuci a stupeň postižení a navíc koreluje s fenotypem a pokročilostí choroby. Nevhodným místem odběru svalové biopsie je oblast předešlého EMG vyšetření.

Zpracování svalové biopsie po odběru

Je-li svalová biopsie prováděna v blízkosti myopatologické laboratoře, vyjmutý vzorek svalu šetrně uložíme do Petriho misky na mul navlhčený fyziologickým roztokem a okamžitě jej transportujeme do bioptické laboratoře. Vlhké prostředí by mělo zabránit vysychání tkáně. Sval by však neměl plavat ve fyziologickém roztoku – tak dojde ve tkáni poměrně rychle ke tvorbě artefaktů. V žádném případě by neměl být vzorek vložen do formolu! Takto fixovaný a posláze do parafínu zalitý sval je pro standardní myopatologické vyšetření po krátké chvíli zcela znehodnocen – velmi rychle dochází ke kontrakčním artefaktům, k extrakci lipidů, vyplavení glykogenu a hlavně k inaktivaci svalových enzymů. Naopak svalová tkáň má po určitou dobu (až několik hodin) po excizi zachovanou enzymatickou aktivitu, která se dá prokazovat enzymovou histochemií ve zmražených řezech. Takovou tkáň lze také podrobit analýzám ve specializovaných laboratořích zkoumajících metabolické či mitochondriální poruchy. Formol v neposlední řadě zničí důležité epitopy svalových proteinů, které prokazujeme imunohistochemicky; protilátky používané v myopatologii totiž zatím téměř výlučně vyžadují nefixovanou mraženou tkáň.

Je-li odběr prováděn mimo přímý dosah myopatologického centra a svalovou tkáň není možné na místě odběru příslušným způsobem zmrazit (viz níže), je vhodné svalový bloček šetrně umístit do uzavřené zkumavky s vloženým navlhčeným tampónem, potom umístit do termosky se směsí vody a ledu a ihned transportovat. Doba od odběru po definitivní zpracování by i při tomto opatření neměla přesáhnout dvě až tři hodiny. Pak již ve tkáni počínají autolytické změny.

V bioptické laboratoři je svalová tkáň ihned zpracována, většinou frakcionovaně (Nix et Moore, 2020). Ve většině případů je drobný svazek z bločku oddělen žiletkou a fixován v paraformaldehydu pro potřebu elektronmikroskopického vyšetření. Většina odebrané tkáně se mrazí v mrazicím mediu, které poskytne dostatečný teplotní spád, ale zároveň nevyvolá ve svalu mrazové artefakty. Při prostém zmražení svalu v tekutém dusíku, který má velmi nízkou teplotu, by došlo ke tvorbě krystalů, které zdestruují

svalovou tkáň. V myopatologické laboratoři proto používáme tekutý izopentan, který je umístěn v nádobce ponořené v tekutém dusíku. Dosáhneme tak mírnější, ale dostatečnou teplotu pro zmrazení a ke tvorbě mrazových artefaktů nedochází. S úspěchem lze také používat směs zkapalněného propanu a butanu.

Ze zmražených bločků se v kryostatů krájí 8–10 µm silné řezy pro enzymově histochemické reakce a 4–6 µm silné řezy pro potřeby imunohistochemie. Celkem se na vzorku svalové biopsie provádí více než 20 analýz. Zmražený bloček je po ukončení laboratorních vyšetření dlouhodobě uchováván v hlubokomrazicím boxu (–80 °C) pro případné další vyšetření v budoucnosti.

Možnosti laboratorního vyšetření svalové biopsie v neuropatologické laboratoři

- **Standardní histologické vyšetření** (hematoxylin-eozin, PAS, Sudan black, Gömöriho trichrom).
- **Enzymová histochemie** – tyto reakce poskytují odpovědi na mnohé otázky – znázorňují distribuci a změny jednotlivých typů svalových vláken, přítomnost oxidačních enzymů (mitochondrií), lysozomů, glykogenu, glykolytických enzymů, lipidů atd. Standardně se ve svalové biopsii vyšetřují tyto enzymy – myofibrilární ATPáza, NADH-tetrazolium reduktáza, sukcinát dehydrogenáza, cytochrom c oxidáza, nespecifická esteráza, kyselá fosfatáza a myofosforylázy (Zámečník, 2004).
- **Imunohistochemie a imunofluorescence** umožňují vizuální detekci a lokalizaci antigenu (proteinu) ve tkáni pomocí vazby se specifickou protilátkou. Standardně se ve svalové biopsii vyšetřují tyto proteiny – dystrofin (domény DYS 1–3), dysferlin, sarkoglykany (α, β, γ, δ), dystroglykany (α, β), emerlin, merosin (laminin α2), caveolin, spectrin, utrophin N a C (Vogel et Zámečník, 2005).
- **Western blotting** (imunoblot) – jedná se podobně jako v případě imunohistochemie o průkaz antigenu (proteinu) ve tkáni, avšak nikoli s možností lokalizace antigenu ve tkáňovém řezu, ale z tkáňového homogenizátu. Využívá se buď u takových antigenů (proteinů), které zatím není z technických důvodů možno

prokázat ve tkáni imunohistochemicky (např. calpain-3), nebo v případě potřeby prokázat změnu délky prokazovaného proteinu nebo jeho porušenou kvantitu (dystrofin u Beckerovy svalové dystrofie).

- **Elektronová mikroskopie** – polotenké řezy a ultrastrukturální analýza. Elektronová mikroskopie je nákladná, časově náročná a vyžaduje speciální erudici pracovníků laboratoře. Další nevýhodou této metody je možnost zkoumat jen zcela minimální vzorek tkáně. Rozvoj moderních technologií zpracování tkáně, zejména imunohistochemie, postupně omezil význam

elektronové mikroskopie a určil její diagnostický přínos jen na omezenou skupinu onemocnění. V myopatologii zůstávají tyto racionální indikace k jejímu použití při identifikaci inkluzí pozorovaných na úrovni světelné mikroskopie (inclusion body myositis, tyčinková myopatie a případně další kongenitální myopatie) či pro identifikaci střídaného materiálu a určení jeho intracelulární lokalizace. Elektronová mikroskopie může hrát důležitou roli při diagnostice akutní steroidní myopatie (ztráta tlustých filament) a může podpořit diagnózu mitochondriální myopatie

(zmnožení mitochondrií, změny v jejich tvaru, intramitochondriální inkluze).

Biopsie periferního nervu

Pokroky v neurofyzilogii a neurogenetice vedly v posledních desetiletích k významnému poklesu potřeby invazivního vyšetřování u drtivé většiny pacientů s periferními neuropatiemi. Přesto i dnes občas existuje klinická potřeba histopatologického vyšetření periferního nervu (většinou n. suralis) – zejména jsou to vaskulitidy periferních nervů, ale také neuropatie spojené s depozicí patologických látek, zejména v rámci amyloidózy.

LITERATURA

1. Mikell CB, Chan AK, Stein GE, et al. Muscle and nerve biopsies: techniques for the neurologist and neurosurgeon. *Clin Neurol Neurosurg.* 2013;115(8):1206-1214.
2. Nilipour Y. The Art of Muscle Biopsy in the New Genetic Era: A Narrative Review. *Iran J Child Neurol.* 2019;13(4): 7-17.
3. Nix JS, Moore SA. What Every Neuropathologist Needs to Know: The Muscle Biopsy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2020;79(7):719-733.
4. Vogel H, Zámečník J. Diagnostic immunohistology of muscle diseases. *J Neuropath Exp Neurol.* 2005;64(3): 181-193.
5. Yang K, Iannaccone S, Burkhalter LS, et al. Role of Nerve and Muscle Biopsies in Pediatric Patients in the Era of Genetic Testing. *J Surg Res.* 2019;243:27-32.
6. Zámečník J. Svalová biopsie. Speciální myopatologie. In: Maříková T a kolektiv. Neurogenetika svalových dystrofií a kongenitálních myopatií. Praha: Maxdorf, 2004:142-283.