

IMUNOHISTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ KŮŽE - PRAKTICKÉ POZNÁMKY

MUDr. Olga Faustmannová

Dermatovenerologická klinika, FN Brno

Následující sdělení popisuje základní principy imunohistologického vyšetřování bioptického vzorku kůže, zásady uchování a zpracování. Popisuje vhodná místa odběru kůže u jednotlivých diagnóz, přináší popis imunohistologického obrazu u chorob, kde je toto vyšetření indikováno.

Klíčová slova: imunofluorescenční technika, vzorek kůže, imunohistologické nálezy u vybraných chorob.

IMMUNOHISTOLOGICAL EXAMINATION OF SKIN - PRACTICAL NOTES

The following paper describes basic principles of immunohistological examination of a bioptic sample of skin, standards of storage and processing. The suitable locations for skin biopsy are depicted according to a particular diagnosis. The descriptions of immunohistological pictures in different skin diseases, where skin biopsy is indicated, are outlined.

Key words: immunofluorescent technique, skin sample, immunohistological findings in selected diseases.

Imunofluorescenční technika umožňuje detekci různých antigenů ve tkáních i tělesných tekutinách. Využívá reakce protilátek s antigenem k lokalizaci antigenu. Od roku 1960 zaznamenala velké rozšíření a zdokonalení. V dermatologii je běžně používána především v diagnostickém procesu u autoimunitních bulózních chorob a chorob pojivové tkáně. Pracuje s fluorochromy, které mají schopnost pohlcovat světlo určité vlnové délky a jejich elektrony se dostávají do vyššího energetického stavu. Při návratu do stabilního stavu emitují světlo charakteristické vlnové délky. Běžně používaným fluorochromem je fluorescein isothiokyanát (FITC) s absorpčním maximem 490–495 nm a emisním vrcholem 510–517 nm, vydává jasně zelenou fluorescenci. Dalším fluorochromem je např. tetramethylrhodamin isothiokyanát (TRITC) s absorpcí kolem 550 nm a emituje světlo vlnové délky 580 nm, výsledná fluorescence je červená.

Fluorochromy jsou navázány na polyklonální nebo monoklonální protilátky, které interferují s antigenem. V praxi se využívají komerčně vyráběné konjugáty – fluorochromem označené protilátky. Prasečí imunoglobuliny konjugované FITC proti lidskému imunoglobulinu IgG, IgA, IgM, Ig – polyklonální, 3. složce komplementu (C₃) a fibrinu.

Přímá imunofluorescence tedy umožňuje detekci antigenů a zejména in vivo deponovaných imunoglobulinů, komplementu a fibrinu v kůži.

Kožní vzorek, který je vyšetřován, by měl mít velikost asi 5 mm v jednom rozměru. Odběr vzorku kůže je nejlépe provádět klasickou chirurgickou cestou – skalpelem, aby nedošlo ke zbytečnému zhmoždění okrajů tkáně. Pokud část materiálu zasiláme na klasické histologické vyšetření a excidát dělíme, potom je vhodné jeho dělení žiletkou, nikoliv stříháním. Je třeba zabránit denaturaci tkáně. Získaný materiál je vhodné zmrazit – vložit do tekutého dusíku (–170 °Celsia). Při větší vzdálenosti bioptického pracoviště od laboratoře jsou využívána zvláštní transportní média např. roztok maleinimidu – jeho trvanlivost je omezena při uchovávání v chladničce asi na jeden měsíc.

Vzorek lze uchovat 24 hodin až 10 dnů. Brzké zpracování však zaručí zřetelnější pozorovaný obraz v imunofluorescenčním mikroskopu.

Důležité je místo odběru kůže.

U onemocnění skupiny pemphigu – pemphigoidu odebíráme bezprostřední okolí čerstvého puchýře. U dermatitis herpetiformis Duhring odebíráme vznikající puchýřek nebo kůži v těsné blízkosti léze. U erytematodu odebíráme morfu nejlépe z oblasti kůže vystavené slunečnímu záření, zdravou kůži vyšetřujeme z oblasti neosluněné kůže při podezření na systémové onemocnění pojiva (např. z volární plochy paže).

Vzorek kůže je zpracováván na kryostatu, kde jsou nařezány řezy o síle 4 mikrometry. Tyto jsou dále na sklech zpracovávány s patřičnými konjugáty (obvykle 2–3 s jedním konjugátem). Řezy na podložních sklech zasychají 15–20 minut, poté je aplikován konjugát. Materiál inkubujeme ve vlhké komůrce 30–45 minut.

Vzorky jsou promyty v pufovaném fyziologickém roztoku (pH 7,2) 3× po 20 minutách. Částečně se osuší, uzavřou se pomocí montovacího média a vyhodnocují se ve fluorescenčním mikroskopu (7).

Imunohistologické nálezy u vybraných chorob

Lupus erythematosus

Vyšetření se provádí u všech typů erytematodu. Při pozitivním nálezu je v dermoepidermální junkci viditelný jasně zelený fluoreskující pruh. V roce 1963 nezávisle na sobě zjistili Burnham a spol. a Cormane pomocí přímé imunofluorescence uloženy imunoglobulinů a komplementu fixované v oblasti bazální membrány na rozhraní mezi epidermis a koríem ve formě lupusového pruhu. Typickým imunohistologickým nálezem je tedy pruh uložení IgG a komplementu na hranici mezi epidermis a koríem prokázaný buď v záhybech epidermis, nebo v celém průběhu bazální membrány. Kromě IgG a C₃ jsou přítomny i další uloženy IgM a IgA. Imunoglobuliny IgD a IgE se nepodařilo prokázat, zatímco uloženy fibrinu jsou časté. V kožních lézích jsou nalézány imunoglobuliny IgG a IgM i IgA společně, nebo samostatně IgG a nebo IgG a IgM. Depozita IgM samostatně jsou častým nálezem, ale mohou být i u řady jiných zánětlivých kožních lézí. Zde je nutno hodnotit nález v kontextu s klinikou a klasickou histologií.

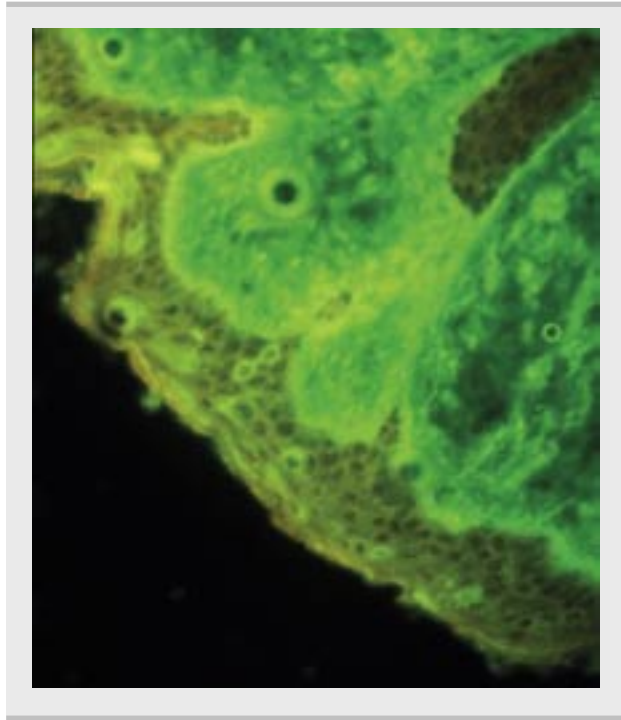
V normální kůži u SLE je IgM nejčastěji. Přítomnost IgG samostatně nebo v kombinaci s IgM koreluje s aktivitou choroby. IgM pruh představuje obvykle mírnější postižení.

Při popisu imunofluorescenčních nálezů se uvádí (7) několik morfologických typů subepidermálních pruhů:

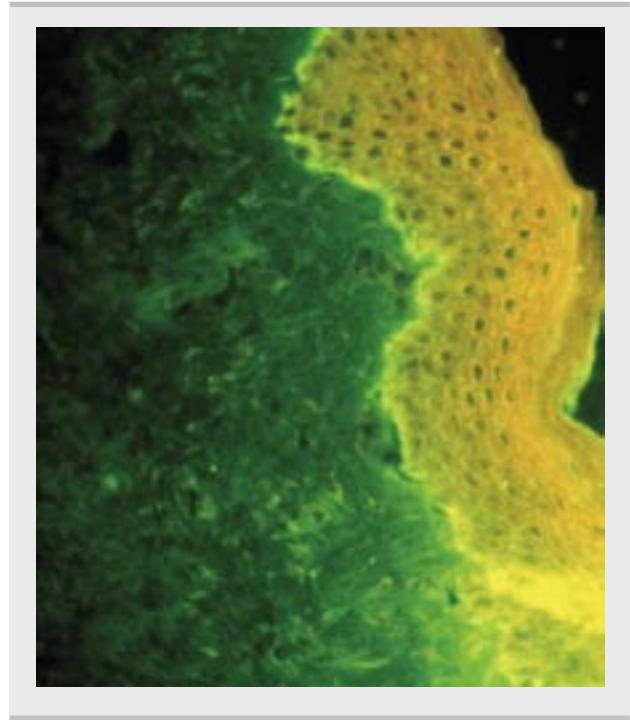
- homogenní – představující souvislou linii nestejně širě

- tečkovitý – linie tvořená drobnými blízko u sebe uloženými hrudkami imunokomplexů popř. komplementu
- vláknitý – velmi podobný tečkovitému pruhu, pouze jednotlivá drobná ložiska jsou uspořádána kolmo ke hranici epidermis a koria, vzájemně se proplétají.

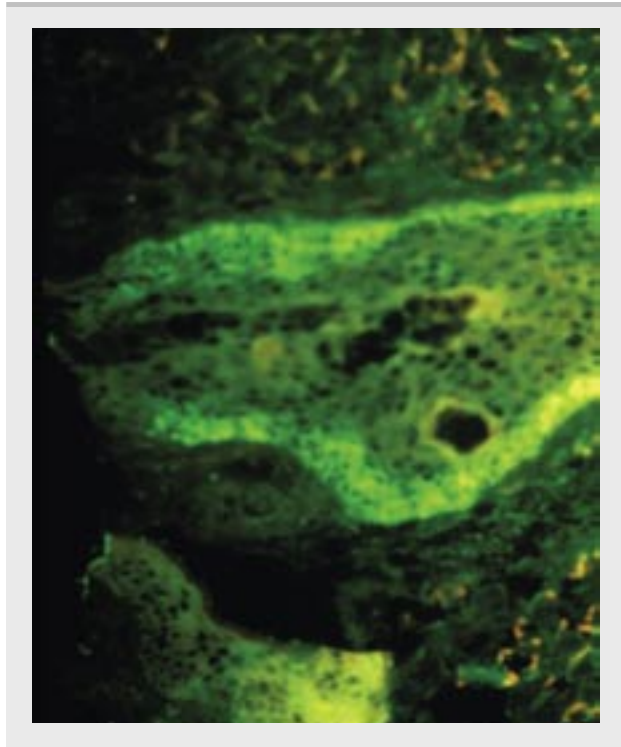
Obrázek 1. Lupózní pruh na hranici mezi epidermis a kóřem s konjugátem anti IgG a cytoplazmatická fluorescence keratinocytů u pacienta se SLE



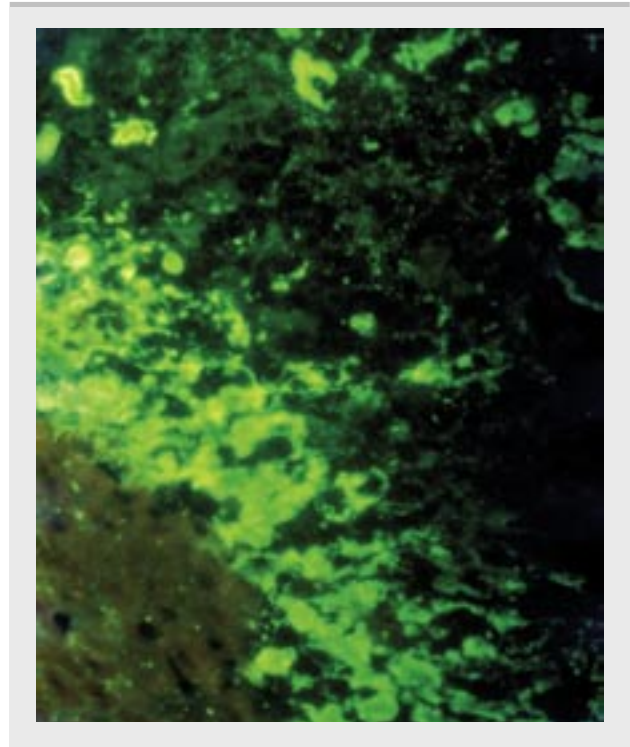
Obrázek 3. Linie v oblasti bazální membrány s konjugátem anti-IgG u pemfigoidu



Obrázek 2. Lupózní pruh kolem vlasového foliklu u pacienta s CLE



Obrázek 4. Krajkovitá linie s konjugátem anti-fibrin u lichen ruber planus



Pravidlem bývá současný výskyt dvou typů pruhů, které se různě kombinují. Při porovnávání výsledků ze vzorků kůže odebraných u téhož pacienta není morfologický vzhled pruhu konstantní.

Kromě lupózního pruhu zjišťujeme při imunohistologickém vyšetření kůže i další charakteristické změny. Imunoglobuliny a komplement nacházíme též v pruhu kolem vlasových foliklů, mazových žláz a vývodů potních žláz. Nezřídka bývají uloženy i v cévních stěnách zvláště v periadnexální dermis potních žláz. Na základě funkční a anatomické podobnosti potní žlázy a nefronu se ukazuje podle Vlašina určitá korelace mezi nálezem uloženin imunokomplexů s obsahem Ig ve stěnách sekrečních částí potních žláz a postižením ledvin (13).

Při imunohistologickém vyšetření nalézáme také oválné útvary velikosti buněčného jádra i větší (svítí jasně zeleně), které označujeme jako agregáty. Jsou umístěny těsně pod epidermis, kolem adnex a méně i samostatně v koriu. Z imunoglobulinů jsou nejčastěji přítomny IgM a IgG vzácněji IgA.

Velmi častá je u systémového erytematodu cytoplazmatická fluorescence keratinocytů i nukleární fluorescence. Nukleární depozita imunoglobulinů jsou nalézána také u pacientů se Sharpovým syndromem, sklerodermií, dermatomyositidou, Sjögrenovým syndromem. Jsou obvykle IgG, IgM a IgA. Fluorescence je homogenní nebo granulární. Cytoplazmatickou fluorescenci lze nalézt v biotickém vzorku také z erytematosquamózních lézí u SCLÉ.

Imunohistologický nález v kůži nemocného LE se mění až po několikaměsíční úspěšné terapii (12).

Imunofluorescenční obraz v místě morfy u CLE – chronického kožního erytematodu (diskoidní léze) je do značné míry shodný s nálezem u SLE. Typickým nálezem je ukládání imunoglobulinů IgG, méně IgM, vzácně IgA v oblasti bazální membrány, kolem vlasových foliklů a kolem mazových žláz. Lze pozorovat také agregáty s uloženinami IgM, současně IgG, zřídka IgA. Často ve stejných místech nalézáme také komplement. U diskoidního erytematodu převažuje tečkovitý pruh uloženin. U klasického CLE nejsou zjišťovány uloženiny v nepostižené kůži. Nález agregátů kolem adnex zvláště při bazi chlupů je typický. Uložení imunoglobulinů a komplementu ve stěnách cév nebo buněčných jádrech nebývají u diskoidních lézí v případě CLE zjišťovány. Jejich přítomnost svědčí pro přechodnou formu kožního erytematodu a systémového lupusu (10).

Vaskulární změny jsou více výrazné v slunci exponované oblasti. Nejvíce jsou poškozeny cévy v papilární a subpapilární dermis, v hlubší části dermis lze na cévách také nalézt změny. Depozita obsahují zejména IgG, IgM, C₃ a fibrin, méně často IgA, C₄, albumin. Nutno zdůraznit, že vaskulární nález u LE není specifický. Přítomnost masivních depozit v dermoepidermální junkci je důležitým diferenciálním znakem LE od virové hepatitidy, Schönlein-Henochovy purpury, hypokomplementémie, smíšené kryoglobulinémie.

Imunoglobulinová depozita, jak v oblasti krevních cév, tak v oblasti dermoepidermální junkce jsou přítomny u řady dalších chorob: porphyria cutanea tarda, granuloma

annulare, polymorfni světelné erupce, pityriasis lichenoides, erythema multiforme, svrabu. U těchto chorob depozita v krevních cévách jsou výraznější než depozita v dermoepidermální junkci, nejsou pravidelná a jasná, v pruhu jako u LE (4, 12).

Vasculitis

Pokud chceme získat relevantní nález při přímém imunofluorescenčním vyšetření kůže pacienta s vaskulitidou, odebíráme kožní biopsii pouze z čerstvé léze. Imunoreaktanty přetrvávají v cévních stěnách krátkodobě.

Charakteristickým imunofluorescenčním nálezem jsou granulární uloženiny imunoglobulinů IgM, IgG a C₃ ve stěnách malých cév koria. Typickým znakem je nahloučení fibrinu v okolí průřezu cév. IgA depozita často korelují s diagnózou Schönlein-Henochovy purpury. Imunoglobulinová depozita s polyvalentním konjugátem často najdeme i v oblasti dermoepidermální junkce (5).

Porphyria cutanea tarda

Kožní biopsii doporučujeme provádět z insolační oblasti kůže. Intenzita fluorescence a lokalizace imunoreaktantových depozit v kůži porfyrických pacientů je různá. Liší se u různých typů porfyrie a také dle tíže choroby. Uložení IgG jsou nejčastěji pozorovaným imunoglobulinovým depozitem u porfyrické kůže – nejčastěji kolem dermálních krevních cév nebo v dermoepidermální junkci u všech typů kožní porfyrie. Agregáty – cytoidiní tělíska, v dermálních papilách obvykle imunoglobuliny IgM, jsou nalézána u těžších forem porfyrie. Charakteristickým znakem porphyria cutanea tarda jsou vakovitě dilatované stěny cév v horním koriu s uloženinami IgG a C₃. V oblasti junkční zóny jsou i uloženiny vláknité nebo homogenní (8).

Lichen ruber planus

Etiologie této choroby není známa, velmi často je však spojována s virovou infekcí. Stále je diskutován vztah k viru hepatitidy C a hepatitidy B. Pacienti často trpí primární biliární cirhózou, mají chronickou aktivní hepatitidu.

Pro imunofluorescenční vyšetření je vhodná biopsie z léze. Ve velké části biopsií je v oblasti dermoepidermální junkce pruh uloženin fibrinu a fibrinogenu ve formě krajkovité linie. Depozita imunoglobulinů IgM, méně často IgA a IgG, složek komplementu, fibrinu a fibrinogenu nacházíme ve formě koloidních tělísek (2).

Bulózní autoimunitní choroby

Imunohistologický obraz těchto chorob je většinou charakteristický a v dermatologii přímé imunofluorescenční vyšetření kůže je běžně v praxi používáno.

Pemphigus vulgaris

Ideální je odběr kůže pro imunofluorescenční vyšetření z oblasti perilezionální, která je zánětlivě změněna, ale nemá buly.

Imunofluorescenční obraz je zcela typický. Typická jsou lineární depozita IgG a C₃ na povrchu epidermálních buněk – označované v praxi jako ICS barvení. Terminologie není přesná, protože autoprotilátky jsou navázány na transmembránový glykoprotein – desmoglein 3 a ne na intercelulární substanci.

ICS barvení u pemphigus vulgaris nalézáme v oblasti suprabazální. Falešně negativní ICS barvení může být u biopsie z léze, ale i biopsie, která je příliš vzdálena od kožních morf. Negativní nález je také v kůži pacientů, kteří mají remisi choroby, jsou léčeni. Falešně pozitivní nález je např. u impetiga a lékově indukovaného pemphigu (9).

Paraneoplastický pemphigus

Je to autoimunitní choroba, která souvisí s neoplázií. Asociována je zejména s non-Hodgkinským lymfomem, chronickou lymfocytární leukémií, thymomem, Waldenströmovou makroglobulinémií a s diferencovaným retroperitoneálním sarkomem.

Perilezionální vzorek kůže vykazuje Ig a C₃ depozita na površích epidermálních buněk a často lineární granulární depozita podél bazální membrány. Velmi často je však vzorek falešně negativní, častěji než u jiných forem pemfigu (3).

Lékově indukovaný pemphigus

Je stále studován. Může být vyvolán medikací celé řady preparátů: např. D-penicilliamin, captopril, bucillamin, penicilin, cefalosporin...

V imunohistologickém obraze nalézáme depozita IgG a C₃, řidčeji i IgM na buněčném povrchu epidermálních buněk. U 10 % případů nalezneme imunoreaktanty také podél bazální membrány (11).

Pemphigoid

Biopsii je vhodné provádět z perilezionální nebo urtikariální nebulózní kůže.

Depozita IgG a C₃ jsou přítomny v kontinuální linii podél bazální membrány.

Lineární depozita IgG a C₃ jsou pozorována téměř ve 100 % případů (6).

Literatura

1. Ahmed AR, Kurgis BS, Rogers RS. Cicatricial pemphigoid. Journal of the American Academy of Dermatology 1991; 24: 987–1001.
2. Boyd A, Neldner J. Lichen planus. Journal of the American Academy of Dermatology 1991; 25: 539–619.
3. Camisa C, Helm TN. Paraneoplastic pemphigus is a distinct neoplasia-induced autoimmune disease. Archives of Dermatology 1993; 129: 883–886.
4. Dahl MV. Usefulness of direct immunofluorescence in patients with lupus erythematosus. Archives of Dermatology 1983; 119: 1010–1017.
5. Jautová J, Jarčuškova D, Szilasiová A, Martinásková K, Dubivská M. Prinos imunofluorescenčného vyšetrenia v diagnostike vaskulitid. Klin Immunol Alergológia 1995; 5: 10–12.
6. Korman N. Bullous pemphigoid. Journal of the American Academy of Dermatology 1987; 16: 907–924.
7. Kratochvíl F. Využití a klinický význam imunofluorescenčních metod v dermatologii. Acta facultatis medicae Brno 1988.
8. Maynard B, Peters MS. Histologic and immunofluorescence study of cutaneous porphyria. Journal of Cutaneous Pathology 1992; 19: 40–47.

Jizvící mukokutánní pemphigoid

Uloženiny IgG, C₃ a C₄ složky komplementu na linii bazální membrány jsou typickým nálezem. Uložení IgA a IgM nejsou přítomny. IgG a C₃ linie je také pozorovatelná na bazální membráně sekrečních částí potních žláz (1).

Epidermolysis bullosa acquisita

Při vyšetření nalézáme lineárně fixované protilátky na bazální membráně IgG, C₃ u 50 % vzorků.

Herpes gestationis (synonymum pemphigoid gestationis)

Jedná se o těhotenskou bulózní autoimunitní dermatózu. Typickým nálezem při imunohistologickém vyšetření je lineárně fixovaný komplement na bazální membráně v 90 % případů.

Dermatitis herpetiformis Duhring

Je to choroba, která je asociována velmi často s glutensenzitivní enteropatií. Charakteristickým nálezem jsou granulární depozita IgA a C₃ v dermálních papilách s maximem v jejich vrcholech, eventuálně jsou tato depozita v linii v oblasti bazální membrány.

IgA lineární dermatitida

U této choroby jsou uloženy IgG v oblasti bazální membrány pouze ojediněle, ve 100 % případů nalézáme lineárně fixované protilátky na bazální membránu IgA eventuálně C₃ (14).

Imunohistologické vyšetření kůže má svoje nezastupitelné místo v diagnostice velké řady nemocí. Je nutno však vyšetření nepřeceňovat, indikovat je uvážlivě s ohledem na hranice jeho možností. Zvážení provedení probatorní kožní excize s následným doporučením imunohistologického vyšetření je vhodné ponechat na erudovaného dermatologa. Jedině adekvátně využitá mezioborová spolupráce je přínosem pro naše pacienty a pomůže zrychlit diagnostický proces.

9. Noursari HC, Anhalt GJ. Pemphigus vulgaris, paraneoplastic pemphigus and pemphigus foliaceus. In Kaniakis J, et al. Diagnostic Immunohistochemistry of the skin Chapman Hall Medical 1998: 74–83.
10. Rowell NR, Goodfield MJD. Lupus erythematosus. In: Rook A, Wilkinson DS, Ebling FJG. Textbook of Dermatology. Champion RN 1998: 2438–2501.
11. Ruocco V, Sacerdoti G. Pemphigus and bullous pemphigoid due to drugs. International Journal of Dermatology 1991; 30: 307–312.
12. Ullman S. Immunofluorescence and diseases of skin. Acta Dermatovenerologica 1989; (suppl. 1): 40–69.
13. Vlašín Z. Immunohistology of the clinically normal skin in patients suffering from glomerulonephritis. Scripta medica 1992; 65: 259–264.
14. Wojnarowska F, Collier P, Allen J, Millard P. The localisation of the target antigens and antibodies in linear IgA disease is heterogenous and dependent on the methods used. British Journal of Dermatology 1995; 132: 750–757.