

# Možnosti využití imunohistochemie pro upřesnění diagnózy z historických parafinových bloků

Aleš Ryška<sup>1</sup>, Jan Betlach<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fingerlandův ústav patologie, Lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Hradec Králové

<sup>2</sup>Oddělení patologie, Nemocnice Havlíčkův Brod

## SOUHRN

Autoři ve svém kazuistickém sdělení prezentují výsledky dodatečného histochemického a imunohistochemického vyšetření parafinových bloků archivovaných 60 roků odebraných při pitvě královéhradeckého biskupa Mořice Píchy zeměděle s generalizovaným níže diferencovaným adenokarcinomem neznámého primárního původu. Imunohistochemie umožnila ozřejmit pravděpodobný primární zdroj nádoru. Jsou diskutovány možnosti využití archivních parafinových bloků pro provádění moderních imunohistochemických a molekulárních vyšetření a dopad fenoménu tzv. stárnutí antigenu na validitu takto provedených vyšetření.

**Klíčová slova:** pitva – parafinový blok – archivovaná tkáň – stárnutí antigenu – imunohistochemie

## Potential use of immunohistochemistry for diagnosis precision in historic paraffin blocks

### SUMMARY

Authors present an autopsy case report where the immunohistochemical examination of tissues archived as paraffin blocks for more than 60 years enabled to identify the most probable primary origin of disseminated poorly differentiated adenocarcinoma. The potential issues caused by so called antigen decay and limitations of immunohistochemistry in archive material are discussed.

**Keywords:** autopsy – paraffin block – archive tissue – antigen decay – immunohistochemistry

*Cesk Patol 2019; 55(2): 122–125*

Vyšetření imunohistochemickými a molekulárně patologickými metodami má nenahraditelný význam v současné diagnostické praxi a výsledky těchto doplňkových metod jsou dnes standardním doplňkem morfologického nálezu v biopstických i autoptických vzorcích. Studií zabývajících se uchováním antigenů v archivovaných tkáních fixovaných ve formalínu a zalitých do parafinu existuje několik, v naprosté většině však jde o práce zabývající se materiálem poměrně recentním, archivovaným maximálně několik málo dekád. Vzhledem ke skutečnosti, že výsledky historických studií nejsou zcela konzistentní a současně k tomu, že v posledních letech dochází k velmi dynamickému metodickému rozvoji, jenž umožňuje vyšetření i tkání poměrně výrazně poškozených během pre-analytické fáze, je obtížné spolehlivě rozhodnout, nakolik se lze o dříve publikovaná data opírat a nakolik je k upřesnění původní autoptické diagnózy využitelný parafinový pitevni materiál po době delší než půl století. Na neobvyklé a z historického hlediska zajímavé kazuistice biskupa královéhradecké diecéze, který zemřel na generalizovaný maligní nádor a byl pitván ve Fakultní nemocnici Hradec Králové před více, než 60 lety, demonstrují autoři současné možnosti provedení imunohistochemického vyšetření na historickém materiálu s cílem pokusit se ex post určit makroskopicky původně neidentifikované primární sídlo nádoru.

## POPIS PŘÍPADU

87letý muž, který dle dostupných anamnestických údajů prodělal během života pouze běžná onemocnění, byl v 80 a 81 letech operován údajně pro lipom; bližší údaje ani biopsie se nepodařilo dohledat. Několik roků před smrtí udával postupně se zhoršující obtíže při močení (polakisurie, dysurie). Na chirurgické klinice Vojenské lékařské akademie Jana Evangelisty Purkyně (VLA JEP) v Hradci Králové umírá při postupující kachektizaci po měsíční hospitalizaci. Při pitvě, která byla provedena 15 hodin po smrti pacienta v Ústavu patologické anatomie VLA JEP (dnes Fingerlandův ústav patologie), byl hlavním nálezem diseminovaný nádor na viscerálním i parietálním peritoneu bez nalezené primární lokalizace. Stěna žaludku byla bez makroskopicky patrného ztlustění, sliznice jemná. V lumen žlučníku byly vícečetné cholesterolové kameny, stěna žlučníku byla makroskopicky zavzata ve vazivových srůstech, které postihovaly také extrahepatální žlučové cesty a duodenum. Kromě povšechné arteriosklerózy (se souvisejícími disperzními myofibrózami myokardu a oboustrannou nefrosklerózou), myoadenomatózní hypeplazie prostaty a drobné urocystolitiázy byly na ostatních vnitřních orgánech změny přiměřené věku zemřelého. Příčinou smrti při celkové sešlosti byla oboustranná hnisavá bronchopneumonie postihující všechny plicní laloky. Pro histologické vyšetření byly odebrány vícečetné vzorky z oblastí postižených nádorem (omentum, peritoneum, žlučník), obě plíce, játra, ledvina, kostní dřeň, pankreas a prostata. Tkáň byla zpracována podle v té době standardních postupů – fixována 10% formalínem a zalita do parafinu. Materiál byl archivován v prostorách Fingerlandova ústavu patologie až do současnosti ve sklepních prostorách za pokojové teploty v temnu a suchu ve formě parafinových bloků. Z těch proto bylo možné nyní, po 60 letech od původní pitvy,

### ✉ Adresa pro korespondenci:

Prof. MUDr. Aleš Ryška, Ph.D.

Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN

Fakultní nemocnice

500 05 Hradec Králové

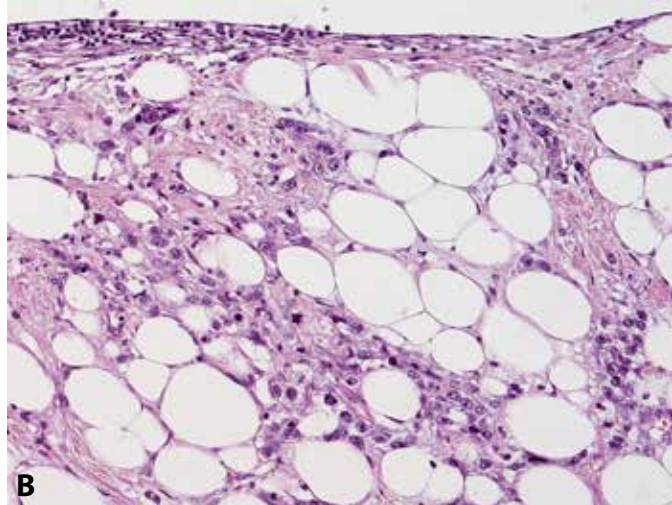
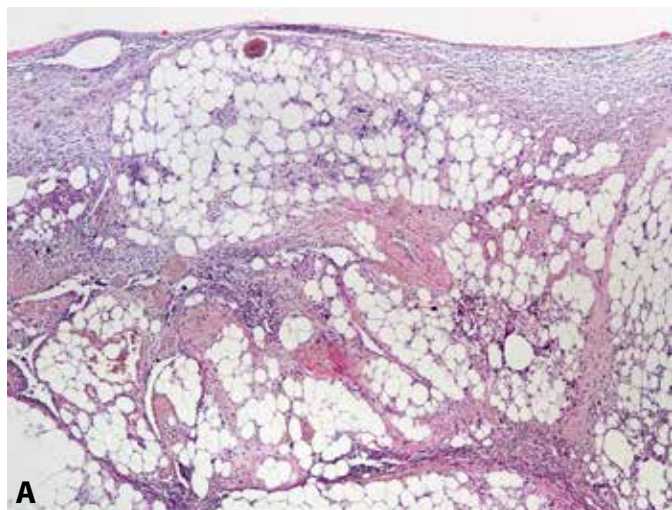
e-mail: ryskaale@gmail.com

zhotovit nové histologické řezy, které byly barveny hematoxylinem-eozinem, histochemicky na průkaz hlenu a také imunohistochemicky.

Bohužel, vzhledem k stáří materiálu a tehdejšímu zvyklostem není v dokumentaci žádný záznam o typu fixace (rutinně byl však historicky na hradecké patologii používán 10% vodný roztok formaldehydu neutralizovaný drcenou křídou) ani o délce fixace tkáně; ta však s vysokou pravděpodobností přesahovala dnes doporučovaných 24 hodin.

Mikroskopické vyšetření prokázalo diseminaci nízké diferencovaného disociovaného adenokarcinomu s minimální hlenotvorbou. Nádor difúzně infiltroval mesenterium, omentum a šířil se po peritoneu (obr. 1A, B). Ve vzorcích z pankreatu byla patrná lipomatózní atrofie a ojedinělé Balzerovy nekrózy, prostata vykazovala známky uzlovité myoadenomatózní hyperplázie a nevýraznou chronickou prostatitidu. Jiný tkáňový materiál pro histologické vyšetření nebyl k dispozici. Ze zachovaných parafinových bločků byly v současnosti pro dodatečné vyšetření histochemickými a imunohistochemickými metodami nakrájeny nové histologické řezy.

Pro histochemické vyšetření byly využity vzorky omenta s okrsky nádoru. Ve speciálních barveních (PAS, PAS s diastázou, alcianová modř, mucikarmín) byla patrná abortivní hlenotvorba ve formě zcela ojedinělých intracytoplazmatických vakuol (obr. 2).



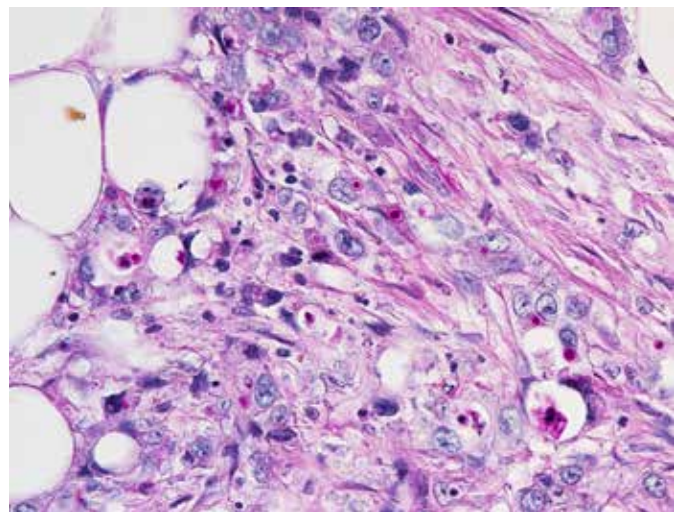
**Obr. 1. A:** Infiltrace mezenteria diseminovaným nádorem s výraznou desmoplasií ve stromatu (HE, 40x); **B:** Detail difúzně rostoucích nádorových buněk bez zřetelného organoidního uspořádání (HE, 200x).

Dále bylo z totožných bločků provedeno poměrně extenzivní imunohistochemické vyšetření se záměrem stanovit primární původ diseminovaného karcinomu. Z vyšetřovaných markerů (CK7, CK20, TTF1, WT1, MOC31, BER-EP4, HMB45, SOX10, CDX2 a E-cadherin) byla prokázána mapovitá středně silná cytoplazmatická pozitivita při použití dvou klonů necytkeratinového epiteliálního markeru EpCAM (MOC31 a BER-EP4) (Obr. 3B), a dále difúzní silná exprese CK7 (Obr. 3A). Při průkazu Ki67 byla patrná pozitivita v asi 20 % buněk, ložiskově však dosahovala až 50 % (obr. 3C). Všechny ostatní markery byly negativní. Imunofenotyp nádoru ukazuje na epitelový původ, stran původu lze usuzovat zejména na oblast horního GIT (gastro-ezofageální junkce, žaludek), případně pankreatobiliární původ. Spolu s makroskopickým nálezem srůstů v oblasti žlučníku, extrahepatálních žlučových cest a duodena, lze proto usuzovat na primární původ nádoru právě z této oblasti.

## DISKUZE

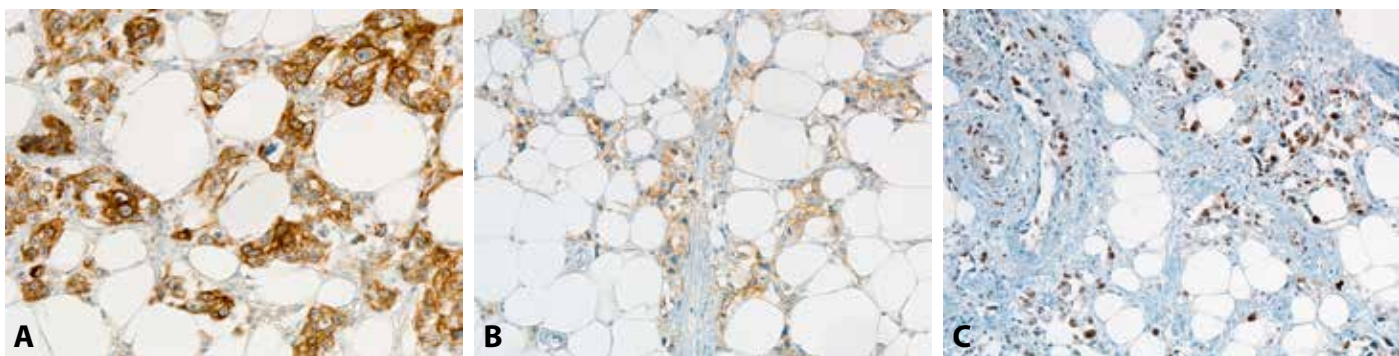
Prezentovaný případ dobře ilustruje, jak zásadní proměnou prošel obor patologie za posledních několik dekád, kdy došlo k posunu od diagnostiky makroskopické doplněné o klasické histologické techniky, k možnostem imunohistochemického či molekulárně-patologického průkazu nejrůznějších specifických markerů sloužících k upřesnění původní čistě morfologické diagnózy. Jak bylo prezentováno výše, pro tyto doplňkové metody lze využít i archivní materiál z parafinových bločků, a to i po více než půl století od původního odběru.

Využití imunohistochemie však může narazit na metodické limitace, které lze rozdělit do dvou kategorií. První z nich spočívají v historicky daleko méně rigorózním dodržování podmínek preanalytické fáze (z pitevního protokolu lze sice zpětně rekonstruovat délku doby studené ischemie, tedy intervalu mezi smrtí a časem provedení pitvy a odebráním vzorků tkáně do fixativa, nikoli však již, jak dlouho byla odebraná tkáň fixována, zda byl použit formalín v adekvátním množství, se správným pH, apod.). Všechny tyto faktory přitom mají zásadní vliv na kvalitu nukleových kyselin (jak DNA, tak zejména RNA) i proteinů (ať již využívaných pro proteomická vyšetření, tak pro imunohistochemii (1). Zatímco kritická délka intervalu ischemie od okamžiku smrti do provedení pitvy pro zachování RNA činí 4 hodiny, pro DNA zhruba 48 hodin, pro imunohistochemickou detekci bílkovin



**Obr. 2.** Polymorfní nádorové buňky s prokazatelnou abortivní hlenotvorbou (PAS pozitivní vakuoly v ojedinělých buňkách) (PAS, 400x).





**Obr. 3. A:** Silná difuzní exprese cytokeratinu 7 v prakticky všech nádorových elementech (400x); **B:** Slabá až středně silná exprese BER-EP4 ve valné většině buněk (200x); **C:** Průkaz Ki67 je pozitivní ve více než 50 % buněk. Pozitivní průkaz tohoto proliferačního markeru potvrzuje zachovalost antigenů a tím i použitelnost parafinového bločku pro dodatečné imunohistochemické vyšetření.

není možné tuto dobu plošně stanovit pro všechny antigeny, je však pravděpodobně ještě delší. Naproti tomu délka fixace je nejkritičtější pro proteiny (interval by měl činit 6-24 hodin), méně pro RNA (8-48 hodin) a nejméně pro DNA (do 72 hodin) (1). Vliv některých dalších proměnných – např. stáří fixativa, jeho expozice světlu či pohyb vzorku během fixace, způsob odvodnění a zalití do parafinu – pak není znám vůbec (1).

Druhým zásadním limitujícím faktorem pro provádění imunohistochemie v archivním materiálu je stárnutí, resp. degradace antigenů ve tkáni. Tento fenomén, označovaný jako „antigen decay“, je opakovaně popisován v řadě retrospektivních studií. Degradace nepostihuje všechny antigeny rovnoměrně – nejvíce patrná je u antigenů jaderných a membránových, méně nebo dokonce vůbec u antigenů cytoplazmatických (2). Degradace antigenů probíhá také podstatně rychleji v předem nakrájených řezech, než v parafinových bločcích (3-5). Z praktického hlediska je proto doporučováno krájení histologických řezů s co nejmenším předstihem před vlastním vyšetřením a nikoli archivace již předkrájených skel (5). Za kritickou délku skladování předkrájených řezů jsou pro některé antigeny (např. hormonální receptory či Ki67) uváděny 3 měsíce, zatímco u jiných antigenů (EMA, SMA, CD20, CD45) nedochází ke změně v průkazu ani u řezů starších několik let (6). Prospektivní studie zaměřená na vyloučení vlivu všech proměnných během preanalytické fáze prokázala, že degradace antigenů v předkrájených řezech postihuje prakticky výhradně antigeny membránové a jaderné (CD3, CD31, CD117, estrogenové a progesteronové receptory, Ki67, p53, TTF-1) zatímco u antigenů cytoplazmatických (SMA, cytokeratiny 7, 20, AE1/AE3, 34βE12) k degradaci nedochází. Ztráta antigenicity byla přímo úměrná stáří tkáně a závislá na způsobu skladování, lepší výsledky vykazovalo skladování při snížené teplotě (7).

Obdobná intenzivní ztráta antigenicity, k jaké dochází v předkrájených řezech, byla pozorována také v povrchových vrstvách parafinových bločků. Po snesení 500-1000 μm povrchové vrstvy bloku je již antigenicita zachována signifikantně lépe (2).

Pokud jde o ztrátu antigenicity v parafinových bločcích, jsou data z literatury poněkud nekonzistentní. Publikované práce ukazují, že většinu antigenů je možné detekovat i v bločcích starších než 50 let (2,8). Zajímavé ale je, že výsledky imunohistochemie v práci Grillové, která srovnávala barvení v bločcích z jednotlivých dekad od 60. let do současnosti, byly u většiny testovaných antigenů lepší u bločků z let 60. než u bločků o dekadu mladších. Tato skutečnost naznačuje, že kromě absolutní hodnoty stáří bločku budou při degradaci antigenů hrát roli pravděpodobně i další faktory, jako právě již zmiňované podmínky preanalytické fáze, případně podmínky skladování (bločky ze 70. let byly v této studii skladovány za suboptimálních podmínek – vystaveny světlu a vlhkosti, zatímco bločky z let 60.

byly skladovány v temnu a suchu, obdobně jako bločky v našem případě). Přitom právě expozice tkáně vodním parám je pravděpodobně hlavním mechanismem degradace antigenů (9).

Moderní způsoby demaskování epitopů rozpoznávaných primární protilátkou dokáží v naprosté většině případů vliv degradace antigenů během stárnutí eliminovat (3). Nejcitlivější antigen, tj. Ki67, lze využít jako spolehlivý marker zachovalosti antigenicity – pokud lze prokázat jeho expresi ve tkáni (ať již bez nutnosti modifikace protokolu, nebo po intenzivnějším demaskování antigenů), lze materiál považovat za plnohodnotný, pokud jde o využitelnost pro imunohistochemii (2).

Na závěr této kazuistiky považujeme za vhodné alespoň krátce přiblížit osobnost ThDr. Mořice Píchy, O.S.L.J. (obr. 4), člena špitálního Řádu svatého Lazara Jeruzalémského., 22. biskupa královéhradecké diecéze v letech 1931-1956. Narodil se 18. dubna 1869 v Šebetově u Blanska. Studia filozofie a teologie v Praze



**Obr. 4.** Biskup ThDr. Mořic Pícha, O.S.L.J.

a Římě jej předurčovala k církevní kariéře. Kněžské svěcení přijal v římské bazilice S. Giovanni in Laterano. V letech 1897-1901 byl ceremoniářem pražských arcibiskupů, v roce 1911 získal doktorát teologie na Karlově univerzitě. Postupně se stal kanovníkem metropolitní kapituly u sv. Víta, kancléřem arcibiskupské konzistoře, radou církevního soudu a generálním vikářem. Proslul jako znalec církevního práva. V roce 1931 byl papežem Piem XI. (1851-1939) jmenován biskupem v Hradci Králové a slavnostně intronizován v katedrále sv. Ducha (10). Ve svém působení se zaměřil především na charitativní a misionářskou činnost a také na opravy chrámů a církevních památek v diecézi. Vrcholem jeho obnovitelského díla byla rozsáhlá oprava a restaurování interiéru katedrály sv. Ducha v letech 1939-1941. Diecézi vedl pevnou rukou, vnímán byl jako přísný biskup. Byl osobností pevné víry, ušlechtilosti a noblesy. Jeho suchý humor nebyl vždycky chápán. Potrpěl si ve všech ohledech na dokonalost a vytříbený životní styl. Při slavnostních příležitostech se podávalo vybrané menu podle západoevropských zvyklostí. Jeho zálibou byl lov; od 30. let vlastnil automobil a stal se dokonce členem československého autoklubu. Měl rád zvířata, v rezidenci mu dělal společnost pes a kanárek. Od školních let měl v oblíbené matematiku, rád si pro zábavu a bystření myslí počítával rovnice. Jinak ovšem pan biskup nevedl příliš zdravou životosprávu; denně prý vykouřil 40-80 cigaret. Opakovaně jezdil na léčení do Karlových Varů. Diecézi úspěšně převedl těžkým obdobím okupace a druhé světové války (11). Na jejím sklonku byl státním ministrem protektorátu Karlem Hermannem Frankem (1898-1946) donucen k napsání dopisu papežovi, v němž by ho upozornil na nebezpečí bolševizmu. Pícha dopis skutečně napsal, ovšem s dovětkem, že největším přáním českého lidu je zbavit se nacistického jha a oproti původní dohodě psaní zapečetil. Týž den byl dopis zvláštním kurýrem a letadlem doručen do Německa apoštolskému nunciovi. Zda dopis svatý Stolec dostal a nějak na něj reagoval, není známo. Papež Pius XII. (1876-1958), který byl Píchovým spolužákem na fakultě církevního práva v Římě, dobře znal jeho schopnosti a pevný charakter. Záměr jmenovat Píchu hned po válce pražským arcibiskupem a kardinálem byl však zmařen, patrně na zákrok československé vlády. Tím se bis-

kupovy perspektivy nadobro uzavřely a jeho postavení se už jen zhoršovalo úměrně propadajícímu se postavení církve ve státě. Na pokyn Vatikánu stačil ještě na biskupa tajně vysvětit 30letého Karla Otčenáška (1920-2011). V červnu 1949 byl na biskupskou konzistoř dosazen zmocněnec ministerstva školství a do vrátnice rezidence příslušník StB v civilu. V květnu 1950 byl Pícha ve svém sídle internován a na každém kroku jej hlídali dva strážci. I v tomto těžkém postavení se choval statečně a klidně. Po složení tzv. slibu věrnosti republice o rok později byla jeho izolace zrušena. Pícha byl ovšem postaven mimo úřad a správu diecéze vykonával kapitulní vikář Ladislav Hronek, který s režimem spolupracoval. Biskupův zdravotní stav se začal zhoršovat. Pod trvalým dohledem byl i při hospitalizacích v hradecké nemocnici. Zprávy o něm podával bývalý zaměstnanec nemocnice soudruh Fuks. V jeho výpovědi z února 1950 se píše: „U biskupa jsou stále sestry a jeho sekretář Rykýř... Fuks prohlásil, že mluvil s doktorem, který je dobrý soudruh a který říkal, že by panu biskupovi pomohli do nebe, ale že se to nějak nevede, protože je stále u něho nějaká návštěva. Dále Fuks prohlásil, že ani on sám ani doktor neztrácí naději, že se to nějak podaří. Mluvil též o injekci, která by oslabil biskupovo srdce“. Zlomený a těžce zkoušený biskup mohl občas veřejně vystoupit, biřmovat, celebrovat bohoslužby v katedrále a o velkých svátcích sloužil pontifikální mše. Zemřel 12. listopadu 1956 ve večerních hodinách a o týden později byl podle svého přání pochován do hrobky na hřbitově v Chrastru u Chrudimi.

#### PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují prof. MUDr. Ivo Šteinerovi, CSc., za pomoc při zpracování tohoto sdělení.

Práce byla podpořena projekty PROGRES Q40/11 a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001674

#### PROHLÁŠENÍ

Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.

## LITERATURA

- Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM.** A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med* 2014; 138: 1520-1530.
- Grillo F, Bruzzone M, Pigozzi S, et al.** Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: is there an expiry date? *J Clin Pathol* 2017; 70: 988-993.
- Karlsson C, Karlsson MG.** Effects of long-term storage on the detection of proteins, DNA, and mRNA in tissue microarray slides. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 1113-1121.
- Mirlacher M, Kasper M, Storz M, et al.** Influence of slide aging on results of translational research studies using immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2004; 17: 1414-1420.
- Nuovo AJ, Garofalo M, Mikhail A, Nicol AF, Vianna-Andrade C, Nuovo GJ.** The effect of aging of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on the in situ hybridization and immunohistochemistry signals in cervical lesions. *Diagn Mol Pathol* 2013; 22: 164-173.
- Bertheau P, Cazals-Hatem D, Meignin V, et al.** Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *Journal of Clinical Pathology* 1998; 51: 370-374.
- Grillo F, Pigozzi S, Ceriolo P, Calamaro P, Fiocca R, Mastracci L.** Factors affecting immunoreactivity in long-term storage of formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *Histochem Cell Biol* 2015; 144: 93-99.
- Litlekalsoy J, Vatne V, Hostmark JG, Laerum OD.** Immunohistochemical markers in urinary bladder carcinomas from paraffin-embedded archival tissue after storage for 5-70 years. *BJU Int* 2007; 99:1013-9.
- Xie R, Chung JY, Ylaya K, et al.** Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J Histochem Cytochem* 2011; 59: 356-365.
- Buben MM.** Encyklopedie českých a moravských sídelních biskupů. Praha: Logik, 2000.
- Croý J.** Královéhradečtí biskupové a jejich rezidence. Hradec Králové Biskupství královéhradecké a Garamond, 2014.