

Neuromišićne biopsije – tri godine nacionalnog iskustva

Sanja M. Milenković

Služba kliničke patologije, Kliničko bolnički centar Zemun, Beograd, Srbija

Apstrakt

U ovom radu prikazujemo iskustvo sa 162 konsektivne neuromišićne biopsije analizirane u period od 2009 do 2012 godine. Neuromišićne bolesti predstavljaju veliku grupu naslednih i stečenih bolesti koje se karakterišu gubljenjem mišićne mase i slabošću mišića. Razlikovanje miopatija od perifernih neuropatija, bolesti ćelija prednjih rogova kičmene moždine (i bolesti neuromišićne spojnice zahteva pažljivu kliničku evaluaciju, laboratorijska, neurofiziološka i elektromiografska ispitivanja, radiološka ispitivanja (npr. magnetna rezonanca), mišićnu biopsiju i genetsko ispitivanje. Rezultati mišićne biopsije se isključivo mogu interpretirati u kontekstu prethodno navedenih ispitivanja. U Republici Srbiji je 2009. god. u Službi kliničke patologije Kliničko bolničkog centra Zemun, a po odluci Ministarstva zdravlja Republike Srbije, počela rutinska dijagnostika NMB na biopsijskim uzorcima mišića, nerava i kože

Ključne reči: biopsija mišića, biopsija nervaa, imunohistohemija, populaciona studija

Uvod

Neuromišićne bolesti predstavljaju veliku grupu naslednih i stečenih bolesti koje se karakterišu gubljenjem mišićne mase i slabošću mišića. Razlikovanje miopatija od perifernih neuropatija, bolesti ćelija prednjih rogova kičmene moždine (npr. bolest motornog neurona) i bolesti neuromišićne spojnice (mijastenija gravis) zahteva pažljivu kliničku evaluaciju, laboratorijska, neurofiziološka i elektromiografska ispitivanja, radiološka ispitivanja (npr. magnetna rezonanca), mišićnu biopsiju i genetsko ispitivanje. Rezultati mišićne biopsije se isključivo mogu interpretirati u kontekstu prethodno navedenih ispitivanja^{1, 2, 3}.

Ni u jednoj grani patologije neuromišićni patolog ne pokazuje toliku sklonost da podržava uputnu kliničku dijagnozu. Prilikom analiziranja neuromišićne biopsije neuromišićni patolog uporno i neprekidno traga za morfološkim detaljima koji bi potvrdili uputnu dijagnozu⁴. U tom dugotrajnom procesu, nizu ponovljenih bojenja i velikom broju preseka on odustaje i počinje da traži alternativne morfološke pokazatelje tek kada je duboko uveren da nema patognomoničnih promena za predloženu dijagnozu. Takođe, neuropatolog pri analizi neuromišićne biopsije, pokazuje duboko nepoverenje u morfološke promene koje vidi u kontinuirano ih upoređuje sa naučnim usvojenim standardima i sopstvenim kontrolnim bojenjima.

Mišićne biopsije su još, daleke 1860. godine postale oruđe u dijagnostici neuromišićnih bolesti kada je Duchenne izveo prvu biopsiju kod pacijenta sa simptomima miopatije⁵. Uvođenje enzimohistohemijskih metoda od strane Victora Dubowitz 1970 –tih godina je napravilo revolucionarni napredak u dijagnostici različitih primarnih i sekundarnih bolesti mišića^{3, 5}.

Neuromuscular biopsy - a review of 3 years nacional experience

Sanja M. Milenkovic

Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital Center Zemun, Belgrade, Serbia

Abstract

In this paper we present the experience with 162 consecutive neuromuscular biopsies analyzed in the period from 2009 to 2012. Neuromuscular diseases are a large group of inherited and acquired diseases that are characterized by loss of muscle mass and muscle weakness. Distinguishing myopathies from peripheral neuropathy, diseases of the anterior horn cells of the spinal cord and the diseases of the neuromuscular junction requires careful clinical evaluation, laboratory, neurophysiological and electromyographical examination, radiological tests, muscle biopsy and genetic testing. Muscle biopsy results can solely be interpreted in the context of the above tests. In Serbia, 2009. in Department of Clinical Pathology Clinical Hospital Center Zemun, a decision by the Serbian Ministry of Health, began a routine diagnostic biopsy specimens in the NMB muscles, nerves and skin.

Key words: muscle biopsy, nervaa biopsy, immunohistochemistry, population studies

Novi progress nastaje 90-tih godina dvadesetog veka sa uvođenjem imunohistohemije, a početak 21 veka je obeležen spektakularnim progresom molekularnih metoda. Terapija neuromuskularnih bolesti takođe pokazuje snažan napredak sa uvođenjem genetskog terapijskog pristupa. Napredak postignut u proteklih 25 godina je omogućio otkrivanje novih uzročnika genetskih defekata sa mnogo novih proteina uključenih u neuromišićne bolesti (ažurirani spisak MDS i odgovornih gena mogu se naći na <http://www.musclegenetable.org>). Danas, mišićna biopsija uz primenu svih savremenih metoda obrade predstavlja zlatni standard u dijagnostici neuromišićnih bolesti^{6,3}.

Neuromuskularne bolesti (NMB) se javljaju kod ljudi svih uzrasta od rođenja, preko adolescentnog i odraslog doba do duboke starosti. Mogu biti u vidu blagih formi, ali i u vidu teških formi sa smrtnim ishodom. Ne postoji zemlja ni region na svetu u kome se ove bolesti ne javljaju. U opštoj populaciji incidenca iznosi 1 na 1000 novorođenčadi, muskularne distrofije javljaju sa incidencom 1 na 2000 novorođene dece a, posebno teška, ali i najčešća Duchenne-ova muskularna distrofija je sa incidence 1 na 3.500 muške novorođene dece⁷.

Veliki, vekovni, problem pacijenata sa NMB je njihova kulturalna i socijalna marginalizacija u većini zemalja sveta, a posebno u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju. Pored navedenog problema, dodatni problem zemalja u razvoju i nerazvijenih zemalja je nepostojanje adekvatne dijagnostike i formiranje nacionalnih baza podataka koje bi omogućile uvid u distribuciju i familijarne rizike oboljevanja.

U Republici Srbiji je 2009.god. u Službi kliničke patologije Kliničko bolničkog centra Zemun, a po odluci Ministarstva zdravlja Republike Srbije, počela rutinska dijagnostika NMB na biopsijskim uzorcima mišića, nerava i kože. Većina pacijenata su pacijenti iz pet centara: Klinike za neurologiju Kliničkog centra Srbije, Instituta za dečiju neurologiju i psihijatriju, Vojnomedicinske akademije Beograd, Univerzitetske dečije klinike Tiršova Beograd i Kliničkog centra Vojvodine. Takođe, sporadično se upućuju pacijenti iz drugih ustanova u Srbiji, susednih država, ali i iz inostranstva. U cilju formiranja Nacionalne baze za mišićne distrofije Ministarstvo nauke je odobrilo petogodišnji naučni projekat pod nazivom "Ispitivanje molekularno genetskih, patohistoloških i biohemijskih karakteristika neuromišićnih bolesti"⁸ (br. 175083).

U ovom radu prikazujemo naše iskustvo sa 162 konsektivne neuromišićne biopsije analizirane u period od 2009 do 2012 godine.

Materijal i metode

Za protekle tri godine je analizirano 162 neuro-mišićna biopsijska uzorka dobijena procedurom otvorene hirurške biopsije⁴.

Kriterijumi na osnovu kojih su pacijenti uključeni u studiju su:

- a) da su bili upućeni iz primarnih i sekundarnih zdravstvenih institucija u referentne centre za adultnu i dečiju neurologiju
- b) da su detaljno, svim raspoloživim metodama pregledani od strane neurologa u referentnim centrima
- c) da su biopsije otvorenim putem uzete od strane posebno edukovanih hirurga u Kliničko bolničkom centru Zemun za adultne pacijente, a za dečiji uzrast u Univerzitetskoj dečijoj klinici Tiršova
- c) da su sveži reprezentativno uzeti i pripremljeni biopsijski uzorci u vremenskom period ne dužem od 30 minuta dopremljeni u Službu kliničke patologije KBC Zemun
- d) Pojedinačni pacijenti, sporadično upućeni iz drugih ustanova ili parafinski blokovi doneti na konsultaciju nisu uključeni u ovu studiju (ukupno 32).

Uzorci biopsija mišića i nerava su obrađeni u Službi kliničke patologije KBC Zemun Beograd. Pravilnom orijentacijom uzorka pod stereomikroskopom Nikon SMZ1500 i brzim smrzavanje uzorka u tečnom azotu (ili izopentanu ohlađenom u tečnom azotu) odmah po dostavljanju uzorka iz hirurške sale smo započinjali proces obrade. Pripremano je 20-30 smrznutih preseka na super frost pločicama za histohemiju, enzimohistohemiju ili imunohistohemiju. Obrada se nastavlja procesiranjem uzorka kroz formalinsku fiksaciju do parafinskog kalup, a deo tkiva za elektronsku mikroskopiju smo procesirati kroz 4% glutaraldehid.

Rutinski smo preseke neuromišićnih biopsija bojili hematoxilin-eozin (H&E) i modifikovano Gomori tricrom bojenja na osnovu koji smo procenjivali:

arhitekturu mišićnih vlakana (oblik, veličinu, atrofiju i hipertrofiju, poziciju jedara)

inflamatorne infiltrate
 intersticijum i krvne sudove
 patognomonične histološke promene za mitohondrijalne miopatija, nemalinske miopatije, tubularnih agregata i "rimmed" vakuole

Smrznuti preseci tkiva su obrađivani histohemijskim i enzimohistohemijskim metodama bojenja na osnovu standardno preporučenih paleta³ (Tabela 1.)

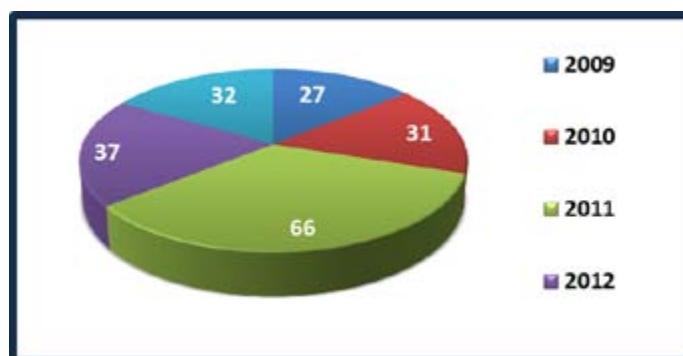
Spectrin	g-Sarcoglycan
Dystrophin (N term)	δ-Sarcoglycan
Dystrophin (rod domain)	b-Dystroglycan
Dystrophin (C-term)	Collagen VI
Utrophin	Emerin
nNOS	Desmin
Myotilin	MHC class I
Lamin A/C	Fast Myosin
Dysferlin Ham1	Slow Myosin
Dysferlin Ham2	Developmental Myosin
a-Sarcoglycan	Neonatal Myosin
b-Sarcoglycan	g-Sarcoglycan

Tabela 1. Lista sadrži deo palete antitela za otkrivanje primarnih ili sekundarnih oštećenja, kao i za procenu kvaliteta i očuvanja uzoraka

Imunohistohemijsko bojenje je rađeno automatski u imunostejneru Labvision sa automatskim predtretmanom u PT modulu. Svi uzorci mišićnih biopsija su rutinski bojani na izoforme miozina Tip 1 (slow), Tip 2 (fast) i neonatalni miozina (Slika). Kompjuterskim softverom LAS V37 programom je merena veličina vlakana kod svakog uzorka na 100 preseka (50 obojenih brzim miozinom, 50 vlakana obojenih sporim miozinom) po najužem prečniku. Očuvanost mišićne sarkoleme je procenjena imunohistohemijskim bojenjima ili na laminin $\alpha 2$ ili collagen VI. Za procenu statusa mnogih protein kod različitih miopatija je bila korišćena široka paleta komercijalnih antitela dostupnih na tržištu (Tabela 1.). Kompjuterska baza analiziranih uzoraka je formirana za period 2009-2012 godine. Patohistološki izveštaj je sadržao detaljnu analizu svih parametara sa reprezentativnim fotografijama, dijagnozom ukoliko je bilo moguće postaviti, ili predlogom za eventualna dodatana imunohistohemijska, molekularna ili elektronsko mikroskopska ispitivanja.

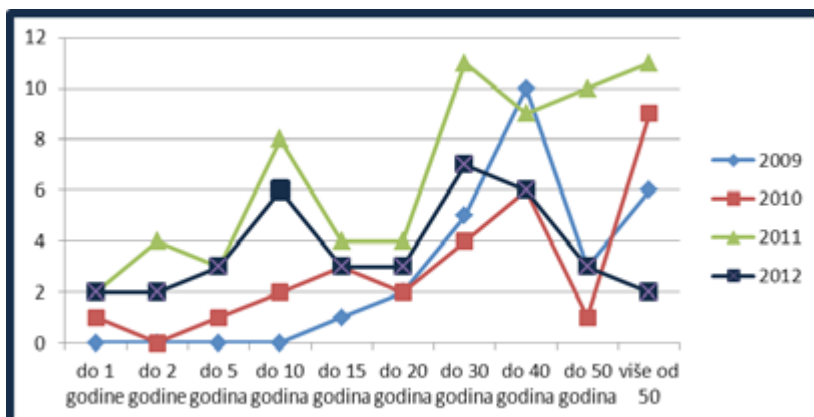
Rezultati

Analizirano je ukupno 162 uzorka neuromišićne biopsije koje su upućene iz referentnih centara i 31 sporadične biopsije (Dijagram 1.).



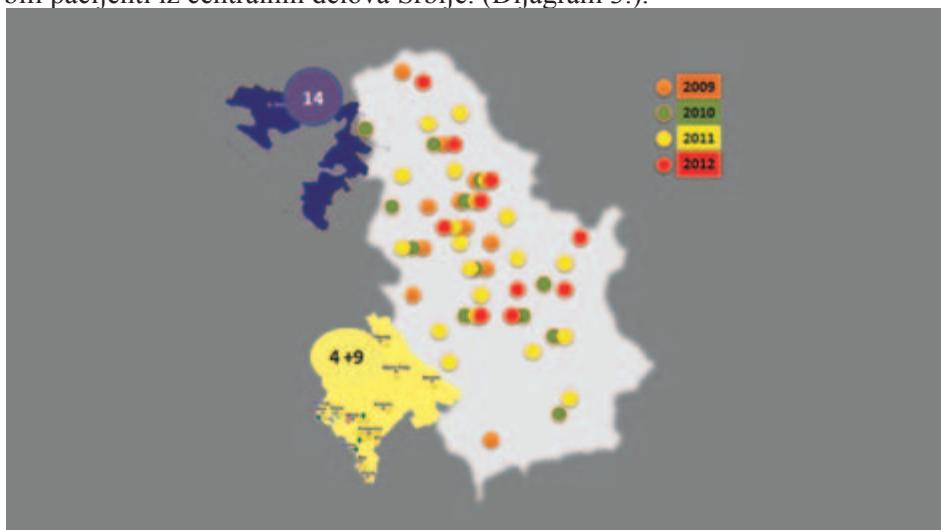
Dijagram 1. Broj pacijenata po godinama koji su upućeni iz referentnih centara

Od ukupnog broja pacijeneta 34 (21,11%) su bili pacijenti starosti do 10.godina, a najveći broj pacijenata je bio u starosnim grupama posle 30 godine (Dijagram 2.)



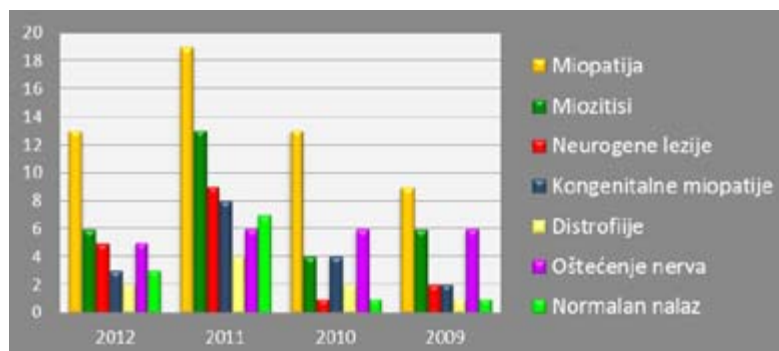
Dijagram 2. Starosna struktura pacijenata

U odnosu na regione republike Srbije nije postojala posebna učestalost pacijenata iz nekog dela Srbije, i uglavnom su bili pacijenti iz centralnih delova Srbije. (Dijagram 3.).



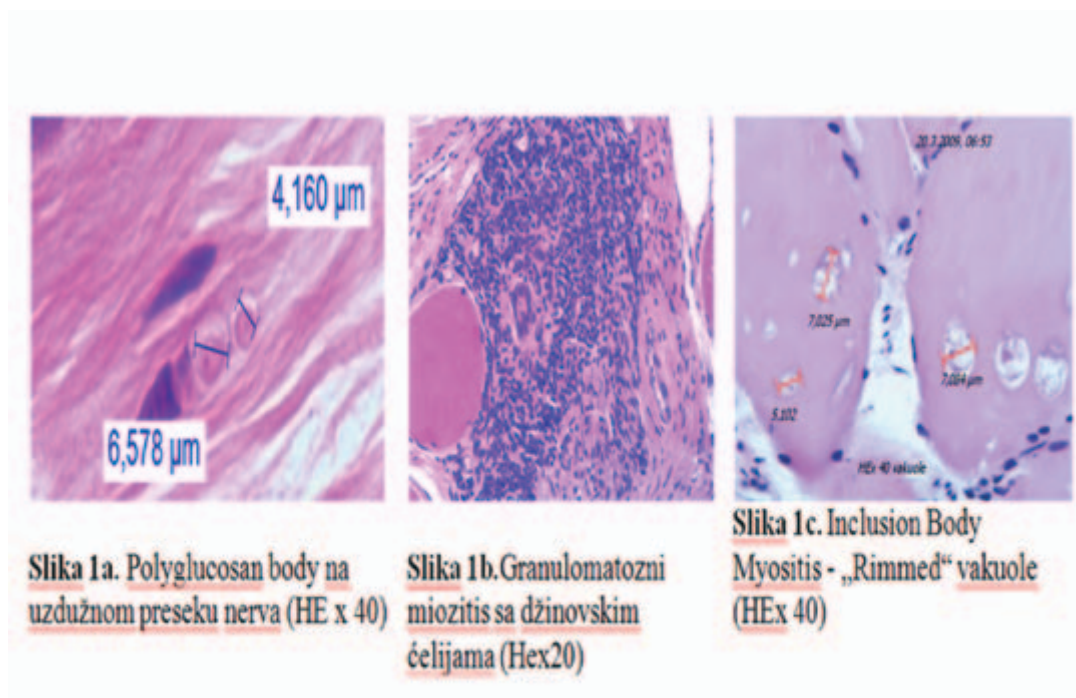
Dijagram 3. Distribucija pacijenata prema regionima Srbije

U odnosu na grupu bolesti najviše dijagnostikovanih oboljenja je bilo iz grupe miopatija i miozitisa, a znatan broj je bio i pacijenata sa neurogenim lezijama mišića (Dijagram 4.)



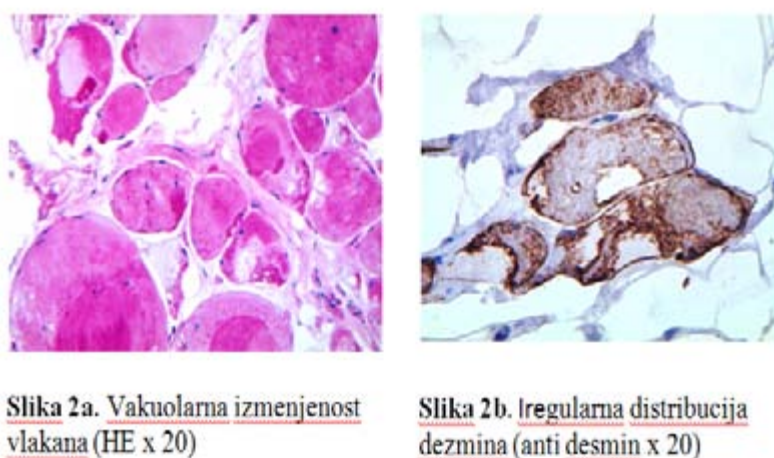
Dijagram 4. Broj pacijenata u odnosu na tip bolesti

Prilikom analize biopsija postavljene su precizne dijagnoze za mnoge bolesti, ali je jedan broj sadržavao samo opisnu formu uočenih abnormalnosti sa preporukama za dalja uglavnom molekularno genetska ispitivanja. Na HE obojenim preparatima su utvrđivane grupe promene arhitekture ali su postavljene i neke decidne dijagnoze kao npr. (Slika 1.): polyglucosan body disease (Slika 1a.), granulomatozni miozitis (Slika 1b.) ili Inclusion Body Myositis (Slika 1c.).



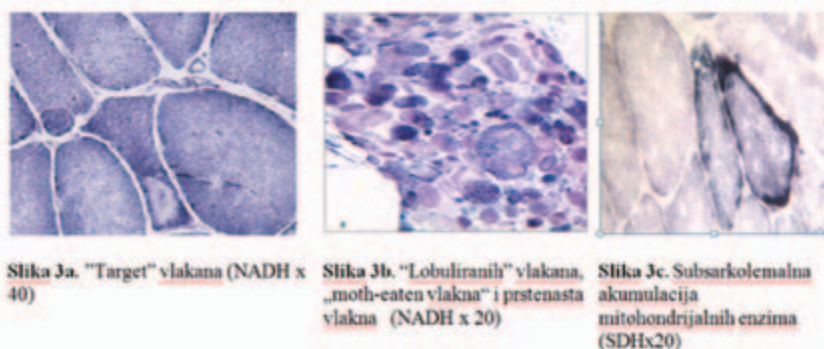
Slika 1. Patognomonične histološke promene za određene bolesti mišića i nerva

Takođe, pojedine promene ukazuju na određene proteinske poremećaje koji se mogu potvrditi imunohistohemijskim metodama, kao što je utvrđeno u slučaju dezmonopatije (Slika 2.)



Slika 2. Vakuolarna izmenjenost vlakana sa iregularnom distribucijom dezmina u slučaju dezminopatije

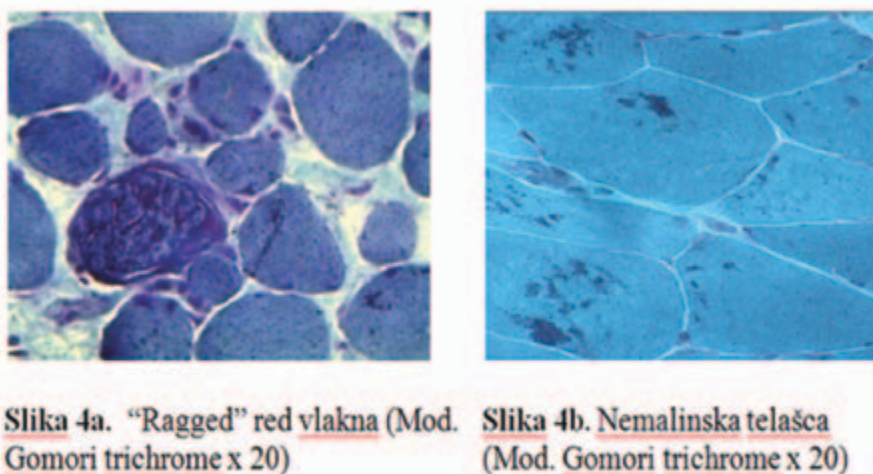
Primenjena enzimohistohemijska bojenja su omogućila analizu intermiofibrilarne mreže koju grade mitohondrije i sarkoplazmatični retikulum. Abnormalnosti unutrašnje fibrilarne arhitekture su veoma važni pokazatelji mnogih mišićnih bolesti i zahvaljujući ovim bojenjima smo utvrdili postojanje ciljnih tzv. "target" vlakana taman, svetao ili prazan centar bez bojenja mitohondrij i pojavu tzv. "lobuliranih" vlakana je opšta karakteristika ali je česta kod LGMD 2A, Ullrich Congenital Muscular Dystrophy, Bethlem myopathy sl. (Slika 3).



Slika 3. Abnormalnosti unutrašnje fibrilarne arhitekture mišićaa.

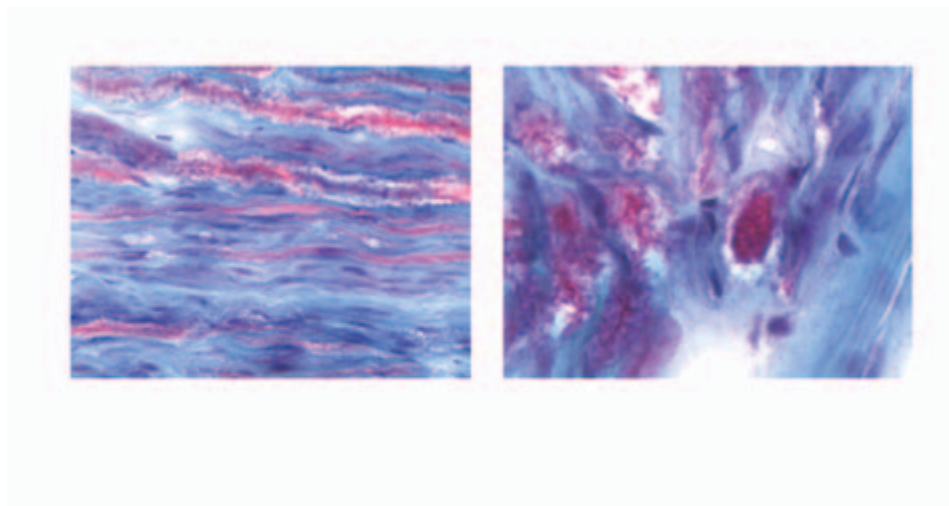
Abnormalnosti u bojenju čistih mitohondrijalnih enzima, kao na primer subsarkolemalna akumulacija succinic dehidrogenase (SDHkoje smo utvrdili u slučajevima dijagnostikovanih mitohondrijalnih miopatija (Slika 3c).

Modifikovano Gomori trichrom bojenje (Engel trichrome uvedeno od strane W. King Engel 1963.god.) je omogućilo dijagnostiku patognomoničnih abnormalnosti kod: mitohondrijalnih miopatija, nemalinske miopatije, tubularnih agregata i "rimmed" vakuola (Slika 4.).



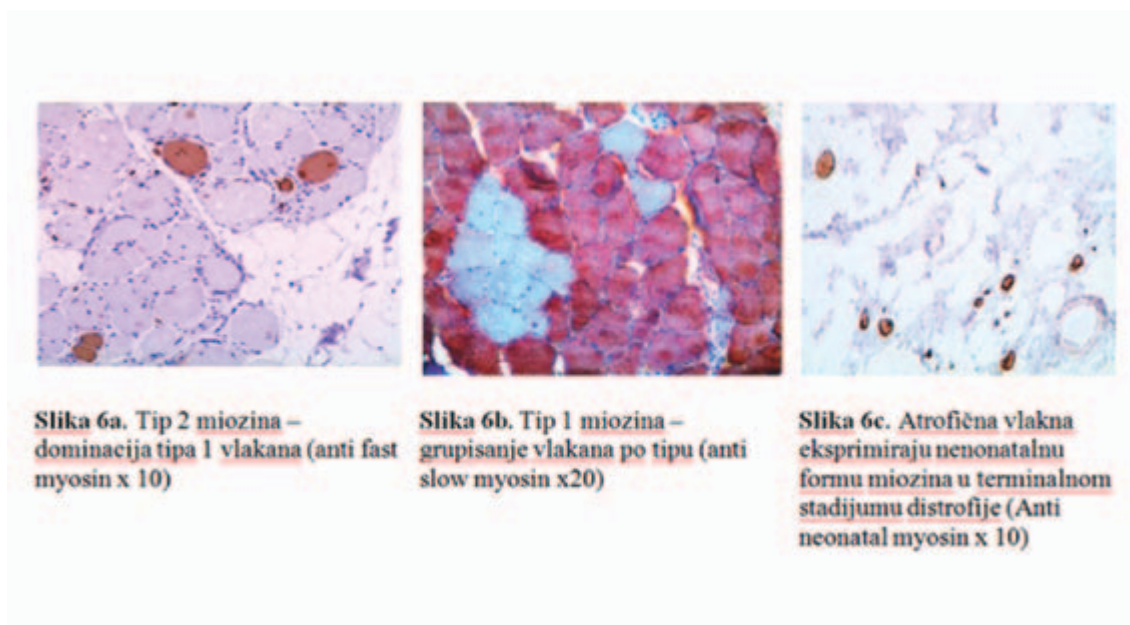
Slika 4. Patognomonične abnormalnosti kod mitohondrijalne i nemalinske miopatije

Ova metoda bojenja je bila veoma uspešna kod nervnih biopsija za procenu različitih patoloških stanja, a posebno demijelinizacija (Slika 5.),



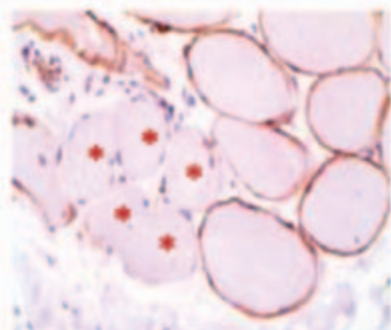
Slika 5 . Uspešnost Modifikovanog Gomori Trichrome bojenja na biosijskim uzorcima nerva

U laboratoriji smo rutinski koristili na parafinskim presecima imunohistochemijsko bojenje na brzi miozin Tip 2 (Myosin Heavy Chain, Fast, Clone Wb-MHCf) a, na kriostatnim presecima nasporni T2 miozin (Myosin Heavy Chain, Slow, Clone WB-MHCs) (Slika 6.). Pored dva osnovna tipa smo posebno u proceni kongenitalnih miopatija i utvrđivanju da li su atrofična vlakna regenerativna ili stvarno atrofična primeniti i druge izoforme miozina: neonatalni i razvojni. (Slika 6.).

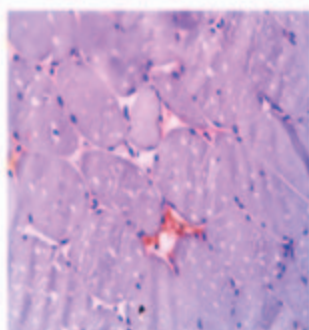


Slika 6. Ekspresija različitih izoformi miozina.

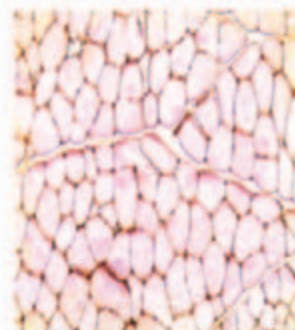
Za neke distrofije (udno pojasnih i fascioscapulohumeralnih) su detektovani proteinski defekti i moguće ih je utvrditi imunohistochemijski što smo primenjivali u dijagnostici korišćenjem svih raspoloživih klonova (Slika 7 i 8).



Slika 7a. Iregularna ekspresija (*)
Dystrophina N terminus (anti
dystrophin x 10)

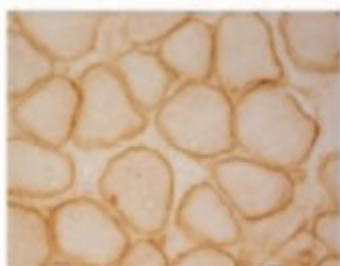


Slika 7b. Odsustvo
imunobojenja na Collagen VI
Anti Collagen Type VI (α3
Chain) Clone:64C11

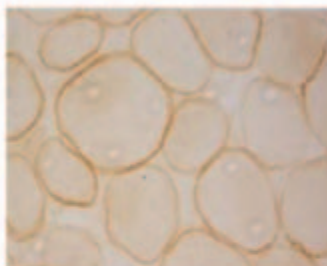


Slika 7c. Anti Laminin B2 /
gamma1 Ab-2 –kontrolno
bojenje

Slika 7. Detektovani proteinski defekti⁷



Slika 7a. Regularna ekspresija β
sarcoglicana (anti sarcoglican β x
20)



Slika 7b. Regularna ekspresija
α sarcoglicana (anti sarcoglican
α x 20)



Slika 7c. Odsustvo ekspresije
γ sarcoglicana (anti
sarcoglican γ x 20)

Slika 8. Detektovani proteinski defekti

Diskusija

Skeletni mišić je najveći organ u telu i posebno je teško reprezentativno odrediti mesto biopsije. Biceps, deltoideus i kvadriceps su najčešće birani mišići, ali je uvek optimalno izabrati umereno zahvaćen mišić. Druga važna tačka uspešne dijagnosstike je reeprezentativno uzorkovanje i sledstvene laboratorijske metode obrade tkiva koje mogu imati značajan uticaj na rezultat biopsije.

Zlatni standard u dijagnostici neuromuskularnih bolesti je histološka analiza. U novije vreme je dijagnostika znatno unapređena metodama imunohistohemije, pre svega u sferi utvrđivanja tipa vlakana i potiskuje 50 godina korišćenu tehniku ATP-aza koja je veoma zahtevna i kapriciozna ^{8,9, 10}.

Drugi veoma važan doprinos imunohistohemije je mogućnost utvrđivanja statusa pojedinih specifičnih proteinskih defekata što vodi ili decidnom postavljanju dijagnoze ili usmeravanju molekularno genetske analize.

Utvrđivanje populacione distribucije pojedinih naslednih bolesti i familija u kojima se one javljaju predstavlja glavni zadatak ozbiljnog vođenja brige o zdravlju ljudi jedne zemlje. No, u nerazvijenim zemljama i zemljama u razvoju finansijska nestabilnost i nedovoljna opremljenost laboratorija u tehničkom i kadrovskom smislu usporava taj process. Čak, i u mnogim razvijenim zemljama process stvaranja nacionalnih baza je predstavljao problem i rešavan je višedecenijski.

Walton i Natrass¹² su 1954 godine publikovali originalan rad u kojem su opisali 105 slučajeva od Northumberland do Durham u Severnoj Engleskoj. Oni su tada i predložili novu klasifikaciju mišićnih bolesti baziranu na detaljnoj kliničkoj opservaciji. Posle 50 godina, urađena je detaljna populaciona studija¹² sa genetskim analizama u istom region na 1100 pacijenata kod koji su utvrđivane molekularne karakteristike za 31 entitet. Ukupno 75.7% pacijenata je svrstano u taj 31 entitet. Navedena studija takođe ilustruje ogroman dijagnostički napredak od prvog regionalnog istraživanja pre više od 50 godina.

Literatura

1. Anderson JR. Recommendations for the biopsy procedure and assessment of skeletal muscle biopsies. *Virchows Arch* 1997;431(4):227-33.
2. Edwards R, Young A, Wiles M. Needle biopsy of skeletal muscle in the diagnosis of myopathy and the clinical study of muscle function and repair. *N Engl J Med* 1980;302(5):261-71.
3. Dubowitz V, Sewry C A. *Muscle Biopsy: A Practical Approach*. 3rd ed ed. China: Saunders Elsevier; 2007.
4. Milenkovic S, Rakočević-Stojanovic V. Biopsije mišića: Zašto, ko i kako? Zbornik sažetaka II kongres patologa Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Banja Luka 2012, str.215-227 (predavanje po pozivu)
5. Sundaram C, Uppin SM. Approach to the Interpretation of Muscle Biopsy. In *Muscle biopsy*. Ed. Sundaram C. Croatia, InTech 2011:15-33.
6. Rakočević-Stojanović V. Mišićne distrofije. Medicinski fakultet Beograd, I izd., CIBID, 2011, Beograd
7. Nešić S, Andrić N, Jovanović M, Milenković S, Aleksić Kovačević S. Heritable myopathy in a Labrador retriever. *Journal of Comparative pathology* 2012;146(1):74 (Meeting Abstract)
8. Padykula HA, Herman E. The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. *J Histochem Cytochem* 1955;3:170-95.
9. Padykula HA, Herman E. Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphates as measured by histochemical techniques. *J Histochem Cytochem* 1955;3:161-9.
10. Brooke MH, Kaiser KK. Some comments on the histochemical characterisation of muscle adenosine triphosphates. *J Histochem Cytochem* 1961;17:431-2.
11. Meola G, Bugiardini E, Cardani R. Muscle biopsy. *J Neurol*. 2012;259(4):601-10.
12. Fiona L. M. Norwood FLM, Harling C, Chinnery FP, Eagle M, Bushby K, Straub V. Prevalence of genetic muscle disease in Northern England: in-depth analysis of a muscle clinic population. *Brain* 2009; 132; 3175-3186