

FAGLIG

Dette bachelorprojekt viser, at kombinationen af immunmarkøren anti-CD45 og specialfarvningerne Alcian Blue, PAS og D-PAS kan standardiseres og digitaliseres

STANDARDISERING OG DIGITALISERING AF DOBBELTFARVNING MED IMMUNMARKØR OG SPECIALFARVNINGER TIL DIAGNOSTISK OPTIMERING AF SJÖGRENS SYNDROM

ARTIKLEN ER SKREVET AF:



SAFA AL-BAZY
Bioanalytiker
Rigshospitalets
Patologiafdeling.



LOUISE B. LARSSON
Kandidatstuderende
Tekno-Antropologi
Aalborg Universitet.

Målet med projektet var at udvikle en standardiserbar farveprotokol, der gør det muligt at kombinere immunhistokemi (IHC) og specialfarvning på samme vævssnit. Kombinationen af de to farvemethoder vil øge kvaliteten af diagnosen, idet de ønskede vævskomponenter fra henholdsvis IHC- og specialfarvning kan vurderes samtidigt. I forhold til den hidtil anvendte metode, hvor resultatet af de to farvemethoder vurderes separat, kan man ved brug af denne metode skabe et grundlag for en mere præcis diagnose. Såfremt dette lykkedes, var et efterfølgende mål at digitalisere de kombinationsfarvede vævssnit ved hjælp af scanneren NanoZoomer og optimere processen yderligere ved at muliggøre en automatiseret diagnostik af Sjögrens Syndrom.

Baggrund for projektet

På Rigshospitalets patologiafdeling bliver der årligt diagnosticeret mellem 20 og 30 tilfælde af den autoimmune bindevævssygdom Sjögrens Syndrom (1). Sygdommen påvirker primært kroppens eksokrine kirtler, særligt spyt- og tårekirtler, og manifesterer sig ved udtørring af mund og øjne. Årsagen til sygdommen er endnu ukendt, men viser sig typisk i et histologisk billede indeholdende infiltrater af T- og B-celler i det eksokrine væv (2). Sygdommen er endnu ikke mulig at helbrede. Ej heller er tilstanden livstruende, men nedsættende for patientens livskvalitet ved gener i mund og øjne (3). I sjældne tilfælde udvikles værre sygdomstilstande, såsom lymfekræft, blindhed samt lever- og nyresvigt (2,3). Tidlig diagnosticering og behandlingsstart er derfor essentielt, da det reducerer sygdomssymptomer

og samt risiko for senkomplikationer. I dag stilles diagnosen ved vurdering af patientens kliniske symptomer og de histologiske fund fra en udtaget læbebiopsi (4,5). Patologen udfører mikroskopisk eksaminering af vævssnit fra biopsien og betragter særlige "fokusområder". Dette er betegnelsen for de lymfocytinfiltrater, som kendetegner sygdommens tilstedeværelse. Mængden af lymfocytinfiltrater og arealet af spytkirtlerne vurderes, og på baggrund heraf giver patologen en score, der definerer sygdommens sværhedsgrad. Vævsnittene fra den udtagne biopsi farves rutinemæssigt med H/E og specialfarvningerne AB, PAS og D-PAS. Mængden af lymfocytter visualiseres ved H/E-farvningen, mens specialfarvningerne visualiserer vævets slimområder. PAS og D-PAS anvendes til differentiering mellem tilstedeværelse af glykogen i pladeepitelet, hvilket også er en indikator for sygdommen.

Anti-CD45

Den anvendte immunmarkør, anti-CD45, er et monoklonalt antistof, der har affinitet til antigener på overfladen af både B- og T-lymfocytter. På den måde vil den immunhistokemiske farvning (IHC) visualisere alle tilstedeværende lymfocytter i spytkirtlerne, som er målet med den immunhistokemiske farvning til diagnosticering af Sjögrens Syndrom (6).

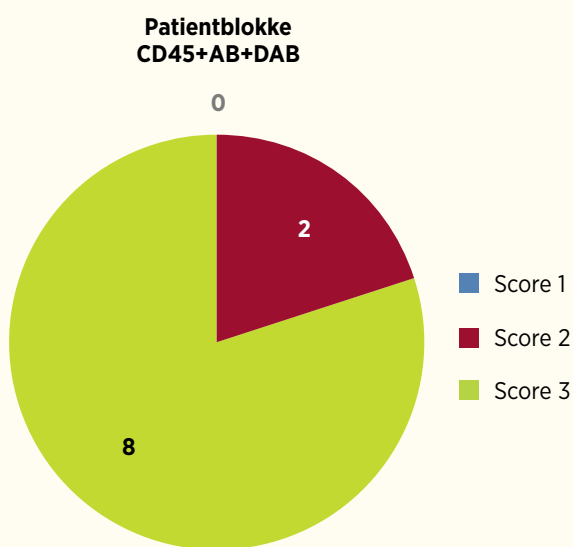
Alcian Blue, PAS & D-PAS

I projektet beskæftiger vi os med tre typer af specialfarvninger. Fællesnævneren for disse er visualiseringen af slimområder i de undersøgte mundspytkirtler. Derudover anvendes special- »

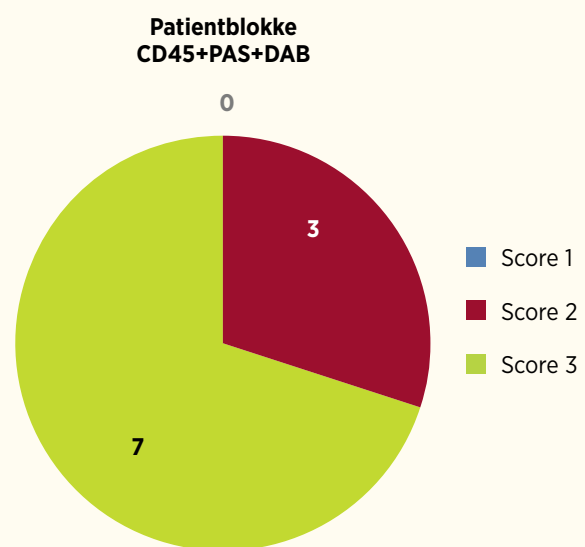
Resultater:

Score	Vævs morfologi
3	Optimal – IHC- og specialfarvning er begge optimale.
2	Acceptabel – IHC- og specialfarvning er begge acceptable. Her kan forekomme uspecifikke bindinger og baggrundsfarvning.
1	Uacceptabel – IHC- og specialfarvning er begge uacceptable. Her forekommer uspecifikke bindinger og baggrundsfarvning.

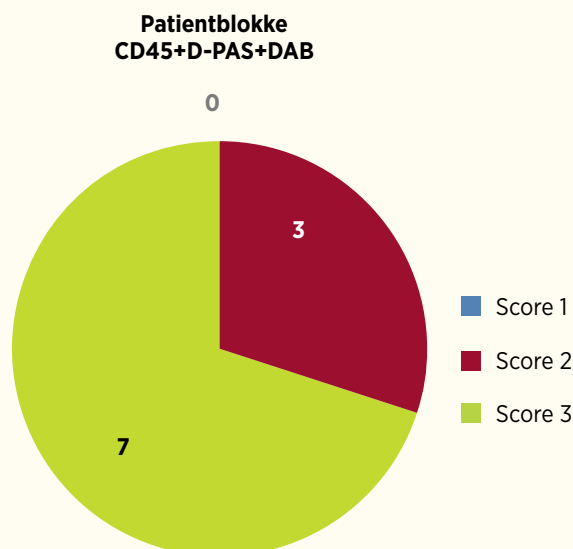
Figur 1. Scoringsskema til vurdering af kombinationsfarvede vævssnit. Scoren (1-3) tildeles med udgangspunkt i farvnings-kvalitet.



Figur 2. Diagrammet illustrerer resultatet af overlæge Katalin Kiss' vurdering/scoring af vævs-snit med kombinationen CD45+Alcian Blue. Her tildeles 8 ud af 10 med optimal score.



Figur 3. Diagrammet illustrerer resultatet af overlæge Katalin Kiss' vurdering/scoring af vævs-snit med kombinationen CD45+PAS. Her tildeles 7 ud af 10 med optimal score.



Figur 4. Diagrammet illustrerer resultatet af overlæge Katalin Kiss' vurdering/scoring af vævs-snit med kombinationen CD45+D-PAS. Her tildeles 7 ud af 10 med optimal score.

farvning med PAS/D-PAS også til påvisning af glykogen i epitelet. Alcian Blue er et kationfarvestof med op til fire positive ladninger og et stort upolært aromatisk ringsystem og bruges til at påvise sure kulhydrater, der ved reaktion udfældes ved et turkis slutprodukt i vævet. Ved pH 2,8 er Alcian Blue selektiv for både carboxylerede og sulfaterede grupper.

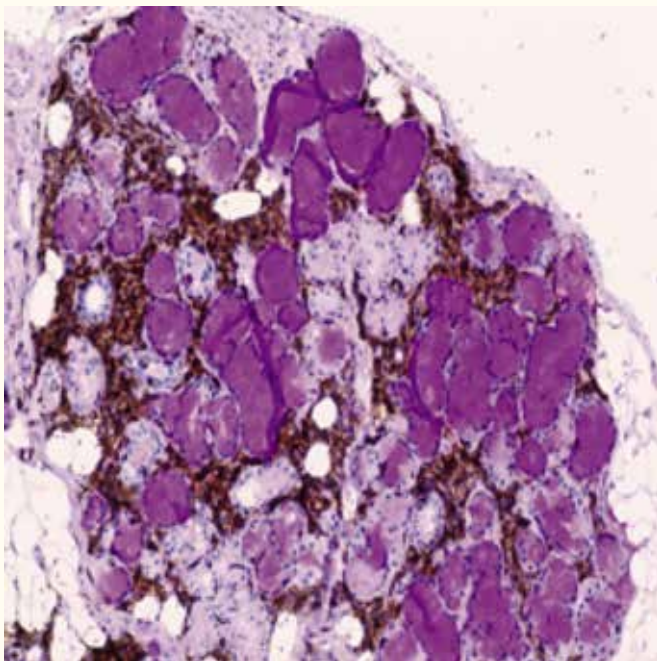
Specialfarvning med PAS påviser neutrale kulhydrater og sure glykoproteiner ved en magenta udfældningsreaktion. Denne reaktion forløber i to trin, hvoraf første trin indebærer en fremoxidation af aldehydgrupperne i kulhydraterne. I andet trin dannes der kovalente bindinger mellem de fremoxiderede aldehydgrupper og sulfonsyregrupperne i Schiffs reagens. Snittet skylles i vand for at hæve pH-værdien fra 2 til 7, så sulfonsyregruppen bundet til det centrale atom i Schiffs reagens bliver fraspaltet. Hermed vil de tre aromatiske ringe genvinde deres konjugerede dobbeltbindinger og udfældes magentafarvet. D-PAS bruges som kontrol for tilstedeværelse af glykogen i et vævspræparat. Specialfarvningen med PAS farver flere forskellige kulhydrattyper og heriblandt også glykogen. For at afgøre, hvorvidt en PAS-positiv reaktion stammer specifikt fra glykogen, kan der laves et kontrolsnit med D-PAS. Ved anvendelse af en diastase, i form af en α -amylase, spaltes α , 1,4 glukosidbindinger i glykogen, og herved fraspaltes glykogen fra vævssnittet. Dette muliggør sammenligning af de to farvninger, og således kan en eventuel glykogenaflejring afgøres (7).

Materialer og metode

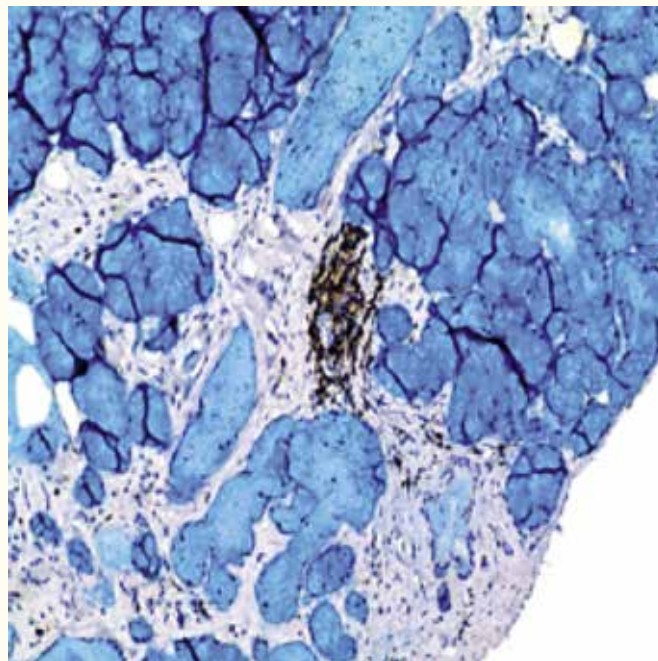
Projektet blev udført på Rigshospitalets patologiske afdeling i samarbejde med overlæge Katalin Kiss. Der blev fra 20 forskellige patienter indsamlet mundbunds-resektater, som indeholder spytkirtler med slimområder og lymfocytinfiltrater. Alle vævssnit blev forbehandlet med HIER (Heat-Induced-Epitope-Retrieval), der er en metode til at demaskere epitoperne på antigenerne. Dette er nødvendigt for at kunne anvende immunmarkøren anti-CD45 ved den immunhistokemiske farvning, der udføres inden specialfarvningerne (6). Da vi udfører tre specialfarvninger i kombination med IHC, er det vigtigt, at disse tre vævssnit er skåret som "nabosnit", altså lige efter hinanden (6). Indholdet af slimområder og fokusområder skal helst være identiske for at opnå en optimal sammenligning. For at højne pålideligheden af vores resultater foregik vurderingen af disse i samarbejde med overlæge Katalin Kiss. Katalin vurderede de kombinationsfarvede vævssnit ved hjælp af et scoringsskema (1-3), hvor scoren 3 svarer til en optimal kvalitet af begge farvemethoder på samme vævssnit.

Diskussion

I udarbejdelsen af vores protokol opstod der udfordringer i kombinationen mellem D-PAS og IHC. Den rutinemæssigt anvendte α -amylase i D-PAS viste uacceptable resultater i sin standardopløsning, når denne blev kombineret med den immunhistokemiske farvning. På Rigshospitalets patologiske afdeling anvendes en α -amylase opren-



Figur 5. Digitaliseret vævssnit fra læbebiopsi, hvor slimområder er repræsenteret ved magenta udfældning (lyserød) og lymfocytinfiltrater ved udfældning med DAB (brun).



Figur 6. Digitaliseret vævssnit fra læbebiopsi hvor slimområderne illustreres ved den blå udfældning fra Alcian Blue, og et lymfocytinfiltrat illustreret ved den brune udfældning fra DAB.

set fra svine-pancreas til specialfarvning med D-PAS. I forsøget på at kombinere D-PAS med immunmarkøren anti-CD45 opstod der uacceptable resultater, som medførte ufarvede slimområder i vævsnittet. Ved efterfølgende forsøg blev koncentrationen af α -amylasen op- og nedjusteret for at af- eller bekræfte vores hypotese om en eventuel overspaltning af glykogenet, men dette uden positiv effekt. Det kunne også tænkes, at den anvendte amylase opløste slimens muciner i vævsnittet. I så fald ville disse muciner fraspaltes og dermed ikke farves af Schiffs reagens og på den måde fremstå som ufarvede slimområder. I dialog med fagpersonalet på patologiafdelingen blev vi informeret om en tidligere metode, hvor humant spyt anvendtes som den spaltende α -amylase i specialfarvning med D-PAS. Denne metode anvendes ikke længere, da efterfølgende studier har vist, at koncentrationen af α -amylase påvirkes af biologiske variationer såsom stress, fysisk aktivitet og graviditet (8). Anvendelsen af humant spyt anses derfor ikke som værende standardiserbar, idet den individuelle spytproduktion varierer fra person til person. På baggrund af den tidligere metode valgte vi at indkøbe en α -amylase oprenset fra humant spyt. Dette viste sig at være løsningen, og vi kunne herved opnå acceptable kombinationsfarvninger med anti-CD45 og D-PAS. Det er endnu uklart, hvorfor α -amylasen oprenset fra humant spyt virker bedre end α -amylasen oprenset fra svine-pancreas. En mulig årsag kan være, at disse amylaser har forskellig oprindelse i hhv. dyr og menneske. Dette kan have betydning for enzymets specifikke opbygning. Ifølge Brayer et al. ses der en forskel i sekvenserne hos de aminosyrer, der udgør enzymet hos hhv. α -amylasen i humant pancreas og α -amylasen i humant spyt (9). Derfor kunne det tænkes, at der også forekommer en forskel i opbygningen af α -amylasen oprenset fra svine-pancreas og α -amylasen oprenset fra humant spyt.

Konklusion

Ud fra vores forsøg kan det konkluderes, at kombinationen af immunmarkør anti-CD45 og specialfarvningerne Alcian Blue og PAS kan opnå optimal score. Ved udskiftning af α -amylase til pulver oprenset fra humant spyt opnås der herved optimale resultater i kombinationen af D-PAS og IHC, hvilket muliggør standardisering af farveprotokollen.

Perspektivering

På baggrund af projektets positive resultater med udarbejdelsen af den standardiserbare farveprotokol ønsker Rigshospitalets patologiafdeling at implementere netop denne til rutinemæssig brug i fremtiden. Næste skridt mod en yderligere optimering vil være en automatisering af diagnostikken. I den forbindelse tog vi kontakt til

firmaet Visiopharm, der beskæftiger sig med digital patologi. Hos Visiopharm er de i stand til at udvikle en digital algoritme, der ud fra de digitaliserede vævssnit kan afgrænse og beregne de ønskede informationer om slimområder og lymfocytfiltrater, der er med til at diagnosticere Sjögrens Syndrom. På den måde vil der i fremtiden være mulighed for at erstatte en del af patologens mikroskopiske arbejde. Med en investering i denne algoritme vil man i fremtiden på Rigshospitalets patologiafdeling kunne automatisere diagnostikken af Sjögrens Syndrom og dermed opnå en yderligere optimeret kvalitet.

Tak

Vi vil gerne sige mange tak til personalet på Rigshospitalets patologiafdeling. Og en specielt stor tak til vores kliniske vejleder, Camilla Qvist, og vores vejleder fra Professionshøjskolen Metropol, Susanne Wahl. Alle har de ydet en stor og uundværlig hjælp i forbindelse med vores bachelorprojekt. □

REFERENCER

- 1 <https://www.gigtforeningen.dk/viden-om-gigt/diagnoser/sjogrenssyndrom/>
- 2 <https://www.sjogrens-syndrom.dk/Hvad-er-sj-grens-syndrom-.html>
- 3 <https://www.sundhed.dk/borger/sygdomme-a-aa/knogler-muskler-og-led/sygdomme/oevrige-sygdomme/sj-grens-syndrom/>
- 4 <http://www.mavicevap.com/medi/da/1329.html>
- 5 Muhammad S. Soyfoo and Elie Cogan (2012). Diagnostic and Prognostic Features of Sjögren's Syndrome, Insights and Perspectives in Rheumatology, Dr. Andrew Harrison (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/26385. Available from: <https://www.intechopen.com/books/insights-and-perspectives-in-rheumatology/diagnostic-and-prognostic-features-of-sjo-gren-s-syndrome>
- 6 Vyberg, Mogens (2007). Anvendt immunhistokemi. 7. udgave. København: Bioanalytikeruddannelsen
- 7 Holm, Inger (2013). Histokemi – Bindevævs- og kulhydratfarvninger. København: Bioanalytikeruddannelsen.
- 8 Brayer, G. D., Luo, Y., & Withers, S. G. (1995). The structure of human pancreatic alpha-amylase at 1.8 Å resolution and comparisons with related enzymes. Protein Science : A Publication of the Protein Society, 4(9), 1730–1742.