

### III MATERIJAL I METODE

Za izradu magistarske teze prospektivnom studijom analizirani su uzorci tkiva benignih lezija larinksa pacijenata konsekutivno operisanih na odeljenju otorinolaringologije KBC Zemun u periodu od 01.09.2000. do 31.12.2000. godine prema sledećim kriterijumima:

1. Klinička dijagnoza, postavljena na osnovu indirektoskopskog nalaza u larinksu i laringomikroskopskog statusa, odgovarala je benignoj leziji larinksa (polip, čvorić, Reinke-ov edem).

Kriterijumi za postavljanje kliničkih dijagnoza bili su sledeci (17):

**POLIP.** Lezije na prednjoj trećini glasnice, često na slobodnoj ivici, sesilni ili pedunkularni i veoma mobilni za vreme fonacije ako su pedunkularni.

**ČVORIĆ.** Male obostrane lezije glasnica, strogo simetrične, na slobodnoj ivici glasnice u predelu spoja nje prednje i srednje trećine, najčešće nepokretne za vreme fonacije.

**REINKE-ov EDEM.** Unilateralni ili bilateralni otoci duž čitavog membranoznog dela glasnice, ispunjeni fluidom, sesilni i veoma pokretni za vreme fonacije.

- a) Kod svih pacijenata je učinjena laringomikroskopija u opštoj, endotrahealnoj anesteziji.
- b) Lezije su odstranjene mikrohirurškim tehnikama, pomoću mikrohvataljki (Storz Micro Forceps, No. 8681 A-D) i mikromakazica (Storz Micro-Scissors, No. 8684 A-D).



2. Biopsijski uzorci tkiva su obrađeni u patohistološkoj laboratoriji KBC Zemun standardnim i rutinskim patohistološkim metodama koje podrazumevaju:
- a) Dvadesetčetvoročasovnu fiksaciju uzoraka tkiva u neutralnom (pH 7) formalinu (37-40% formaldehid, "Zorka Pharma" Šabac u fosfatnom puferu) na sobnoj temperaturi.
  - b) Tkivo je potom preko procesa dehidratacije kroz seriju alkohola od 50%-99,8% ("Zorka Pharma" Šabac C. No. 1053) i jasnjenja ksilolom ("Zorka Pharma" Co. No. 1096) u automatskom tkivnom procesoru (LKB Tissue Tek II) ukalupljeno u parafinske blokove (Paraffin non caking 57-60C, "Merek" Co. No. 107158).
  - c) Parafinski tkivni blokovi su sečeni na kliznom mikrotomu (Historange microtome LKB Co. No. 2218) u rezove debljine 5 mikrometara, a potom je sledila deparafinizacija kroz ksilol i serije alkohola opadajuće koncentracije 99,8-50%.
  - d) Preseci tkiva su stavljeni na predmetna stakla (Microscop slides 76x26x1 "Merien Feld" Co. No. 1000200) i obojeni rutinskom hematoksilin-eozin metodom.
3. Preparati su analizirani svetlosnim mikroskopom (Laboval 4) pod lupom i uvećanjima 10x, 40x, 100x.

Patohistološki karakter lezije je utvrđen na osnovu sledećih kriterijuma (58):  
POLIP. Epitel uglavnom bez promena, bazalna membrana tanka ili lako zadebljana, u lamini propriji edem, fibrinski depoziti, polja svežeg krvarenja, depozit gvožđa, ektatični krvni sudovi, tromboza krvnih sudova, neovaskularizacija.

ČVORIC. Epitel sa čestom parakeratozom, bazalna membrana zadebljana, u lamini propriji edem, fibroza, bez krvarenja i bez edemskih jezeraca.

REINKE-ov EDEM. Epitel uglavnom bez promena, bazalna membrana zadebljana, u lamini propriji edemska jezerca, pukotinasti prostori, dilatirani krvni sudovi,

ekstravaskularni eritrociti, zadebljani zidovi submukoznih krvnih sudova, česta fibroza i fibrin.

Lezije su patohistološki analizirane od strane stručnog patohistologa sa posebnim interesovanjem za patologiju glave i vrata.

4. Za zahtevne imunohistohemijske metode potom smo izabrali 30 reprezentativnih slučajeva koji su:

- a) jasno patohistološki pripadali benignim lezijama larinksa (polipi, čvorići, Reinke-ovi edemi)
- b) sadržavali dovoljnu količinu tkiva za složene imunohistohemijske metode
- c) bili bez tehničkih artefakta (fragmentisan uzorak)

Odlučili smo se za primenu tri primarna monoklonska antitela:

- antitelo protiv faktora VIII, koje reaguje sa “von Willebrand” faktorom, prisutnim u endotelnim ćelijama i citoplazmi megakariocita. Ovo antitelo može da identifikuje tumore nastale od endotelnih ćelija i megakariocitne proliferacije kostne srži (17). Pomoću ovog antitela smo mogli da ispitamo vaskularne promene kod benignih lezija larinksa.
- antitelo protiv vimentina, koje snažno reaguje sa humanim vimentinom i markira ćelije mezenhimalnog porekla (91). Pomoću ovog antitela bili smo u mogućnosti da ispitamo celularne i acelularne strukture lamine proprije mezenhimalnog porekla, s obzirom na činjenicu da su patohistološke promene kod benignih lezija larinksa lokalizovane pretežno u lamini propriji.
- antitelo protiv kolagena IV se vezuje za kolagen IV, koji je glavna strukturna komponenta bazalne membrane (40). Primena ovog antitela je trebala da nam omogući ispitivanje promena u bazalnoj membrani pojedinih benignih lezija larinksa.

5. Primenjena je sledeća imunohistohemijska metodologija za primarna monoklonska antitela protiv faktora VIII, vimentina i kolagena IV:

a) preseki tkiva benignih lezija larinksa debljine 5 mikrona su stavljeni na silikonizirana predmetna stakla (DAKO Co.No.S 3003) i inkubirani u termostatu 60 minuta na temperaturi od 60 C° radi postizanja optimalne adherencije tkiva za predmetno staklo. Deparafinizacija je izvršena kroz 4 kivete, u trajanju od po 5 minuta sa ksilolom ("Zorka Pharma"-Šabac Co.No. 1096), a potom kroz 2 kivete sa apsolutnim alkoholom ("Zorka Pharma"-Šabac Co.No. 1053), u trajanju od po 3 minuta. Hidracija je dovršena kroz 2 serije 95% alkohola, a potom su preparati isprani u destilisanjoj vodi, u trajanju od 30 sekundi. Receptorska mesta su otkrivena primenom citratnog pufera u trajanju od 3 x 5 minuta, u mikrotalasnoj pećnici, na 700 W.

b) sama imunohistohemijska metoda je trofazni proces. Koristili smo LSAB-metodologiju (DAKO LSAB-2KIT Co.No. 681), koja se koristi i za mišija i za zečija primarna antitela. U **prvoj fazi** smo uklonili aktivnost endogene peroksidaze i blokirali neimunološko vezivanje. U **drugoj fazi** smo primenili specifično primarno antitelo, kao i sekundarno vezujuće antitelo. U **trećoj fazi** smo omogućili delovanje enzima peroksidaze na supstrat hromogena i bojenje specifičnih receptorskih mesta. To smo ostvarili kroz sledeće postupke:

- **Rabbit Anti-Human Factor VIII-Related Antigen** (DAKO Co.No. N1505) smo primenili na preparatima koji su isprani kroz nekoliko kiveta u kojima se nalazio 0, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu, u trajanju od 30 minuta, na sobnoj temperaturi i na taj način blokirali aktivnost endogene peroksidaze. Preseci tkiva su inkubirani sa primarnim antitelom preko noći, na temperaturi od 4 C°, posle rehidracije. Primenili smo sekundarno vezujuće antitelo Ulex europaeus (anti-Ulex antiserum).
- **Monoclonal Mouse Anti-Vimentin, Vim 3B4** (DAKO Co.No. N1583) smo primenili pomoću FITC metode. Receptorska mesta su prethodno

otkrivena primenom fosfatnog pufera. Preinkubacija je učinjena kozijim serumom, razblaženim 1:30, u trajanju od 30 minuta. Inkubacija primarnim monoklonskim antitelom protiv vimentina, razlaženim 1:4 je trajala 45 minuta na temperaturi od 22 C°.

- **Monoclonal Mouse Anti-Human Collagen IV, CIV 22** (DAKO Co.No. N1536) smo primenili na preparatima, koji su prethodno isprani sa 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u metanolu, u trajanju od 15 minuta, kako bi se inaktivirala endogena peroksidaza. Potom su preparati isprani u fosfatnom puferu 3 x 10 minuta. Preinkubacija sa normalnim kozijim serumom je trajala 30 minuta. Potom smo izvršili inkubaciju sa primarnim monoklonskim antitelom, razblaženim 1:300, u trajanju od 30 minuta, na sobnoj temperaturi.

Za pozitivnu kontrolu je upotrebljeno tkivo normalne glasnice, a za negativnu takođe tkivo normalne glasnice, na koje nije primenjeno primarno antitelo.

Rezultati su prikazani tabelarno i grafičkim dijagramima, a mikrofotografije reprezentativnih uzoraka su prikazani na tablama I, II i III.

U okviru magistarske teze urađena je i retrospektivna studija u kojoj smo revidirali 70 slučajeva patohistološki dijagnostikovanih benignih lezija larinksa (polipi, čvorići, Reinke-ovi edemi) pacijenata operisanih na odeljenju otorinolaringologije KBC Zemun u periodu od 01.01.2000. do 01.09.2000. godine.

Revizija je učinjena u patohistološkoj laboratoriji KBC Zemun od strane istog patohistologa, koji nije bio prethodno upoznat sa makroskopskom i mikroskopskom dijagnozom.

Ispitana je podudarnost kliničke i patohistološke dijagnoze, a rezultati su analizirani reprezentativnim statističkim metodama i prikazani tabelarno i grafički.