



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Korelace imunohistochemických a histologických obrazů u melanomových lézí

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Denisa Čapková

Vedoucí práce: MUDr. Jindřich Branžovský, Ph.D.

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Korelace imunohistochemických a histologických obrazů u melanomových lézí jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu své práce MUDr. Jindřichovi Branžovskému, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, poskytnutý materiál a trpělivost při zpracování bakalářské práce.

Korelace imunohistochemických a histologických obrazů u melanomových lézí

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou melanomových lézí. Melanom je nejběžnější typ rakoviny kůže a jeho incidence se neustále posouvá směrem k mladší generaci. Protože se toto onemocnění vyskytuje zejména na pokožce vystavované ultrafialovému záření, je ochrana před UV zářením jedním z nejlepších možných způsobů, jak tomuto onemocnění předejít. Chránit se můžeme použitím opalovacích krémů s UV faktorem, nošením oblečení, které zakrývá ruce a nohy a vyhýbáním se používání solárií. Prognóza počínajícího melanomu je ve většině případů dobrá, proto je včasné rozpoznání a následné zahájení léčby velmi důležité.

V teoretické části jsou shrnuty dosavadní poznatky o melanomových lézích, jejich charakteristika, výskyt, klasifikace, prevence a současné možnosti léčby. V praktické části jsou pak popsány základní laboratorní diagnostické postupy, zejména barvení Hematoxylin-eosinem a imunohistochemické metody. V rámci této bakalářské práce byla porovnána pozitivita HMB-45 markeru mezi jednotlivými histologickými kategoriemi. Tento marker je absolutně specifický pro hodnocení melanocytárních tumorů a je velice užitečný pro patologa při diferenciaci nádorů neurčitého původu. V letech 2012 až 2018 bylo na Oddělení patologie v Nemocnici Písek a.s. imunohistochemicky vyšetřeno 61 vzorků. Z celkových 61 vzorků byl v 58 případech marker HMB-45 pozitivní. Dále byla práce zaměřena také na prokázání charakteristického imunohistochemického profilu u jednotlivých histologických skupin. Tento profil byl potvrzen v 92% případů.

Klíčová slova

Melanom; histologie; imunohistochemie, HMB-45, imunohistochemický profil

Immunohistochemical and histological correlation of melanoma lesions

Abstract

The bachelor thesis deals with the problematic of melanoma lesions. This theme is actual because melanoma is the most serious type of skin cancer and its incidence is moving to the younger generation. Because melanomas occur primary due to ultraviolet light exposure, one of the best possible ways to reduce the risk of developing melanoma is to protect yourself from ultraviolet radiation by using the sunscreen, wearing clothing that covers arms and legs and avoid using tanning beds. The prognosis of early melanoma is usually very good, so the detection and treatment is very important.

In the theoretical part the current knowledge of melanoma, the characteristic, the occurrence, the classification, the prevention and the current possibilities of treatment were summarized. In the practical part the Hematoxylin eosin staining and the immunohistochemical method was described. There is also comparison of positive HMB-45 marker between each histological groups. The HMB-45 marker is absolutely specific for melanocytic tumors and has great utility for the pathologist in differentiation of tumors with uncertain origin. From 2012 to 2018 were immunohistologically examined at the Department of Pathology Nemocnice Pisek a.s. 61 samples. Out of total 61 samples were 58 HMB-45 positive. The thesis has been focused on the immunohistological profile of each histological group. The immunohistochemical profile was proven in 92%.

Keywords

Melanoma; histology; immunohistochemistry, HMB-45, immunohistochemical profile

Obsah

Úvod.....	7
1 Teoretická část	9
2 Kůže	9
2.1 Pokožka.....	9
2.2 Dermis.....	10
2.3 Podkožní vazivo.....	10
3 Maligní melanom	10
3.1 Genetické faktory	12
3.2 Prekurzory melanomu	13
3.3 Klasifikace.....	13
3.4 Diagnostika	16
3.5 Průběh a prognóza.....	19
3.6 Vyšetření sentinelové uzliny	20
3.7 Nepříznivé klinické prognostické faktory	21
3.8 Léčba.....	24
3.9 Prevence	25
4 Histologie.....	26
5 Cytologické charakteristiky melanomu.....	27
6 Architektonické rysy melanomu	27
7 Cíl práce	29
8 Metodika	30
8.1 Preanalytická fáze	30
8.2 Analytická fáze.....	30
8.3 Postanalytická fáze.....	35
9 Výsledky	36
10 Diskuze.....	44
11 Závěr	45
12 Bibliografie	46

Úvod

Maligní melanom je nádor, který má potenciálně letální průběh. Vzniká z pigmentových buněk, takzvaných melanocytů, a to nejčastěji v kůži, méně často na sliznicích v ústní dutině, nosní dutině, a raritně i v dalších lokalizacích. Tento typ nádorového onemocnění nejčastěji postihuje starší pacienty, typicky s výskytem kolem šedesátého roku života. Stále více se ovšem začíná objevovat u osob středního věku a u mladých dospělých.

Za nejčastější příčinu vzniku nádoru je dnes obecně přijímána expozice slunečnímu záření. Proto je také jeho charakteristický kožní výskyt na místech exponovaných oslunění, zejména na obličeji, krku, zádech, ramenou a dolních končetinách. V dnešní době, kdy je trendem snědá, opálená pokožka lidé využívají i externích zdrojů UV záření prostřednictvím návštěv solárií. V obou případech je na místě se před UV zářením chránit, a to zejména krémy s dostatečným UV faktorem. Na vzniku se mimo UV záření uplatňuje řada genetických faktorů, které jsou zodpovědné za vznik, růst a částečně i za chování nádorového onemocnění. U řady případů, zejména u nádorů vznikajících v partiích, kde lze expozici UV záření vyloučit, je etiologie doposud neznámá.

Pro toto nádorové onemocnění platí, že včasný záchyt a odstranění nádoru je neúčinnější léčbou. Proto je důležitá výchova laické populace k časnému rozpoznání počínajícího nádoru. Současně stěžejní je rovněž důkladná výuka lékařů a všech zdravotníků, aby i oni uměli počínající nádor rozpoznat, diagnostikovat a správně určit následné kroky. K přesnému stanovení diagnózy je nutné mikroskopické vyšetření vzorku. Vzorek pro histologické vyšetření je obarven základním barvením Hematoxylin eosin. V případě, že není možné při základním barvení jednoznačně stanovit diagnózu, přichází na řadu imunohistochemická metoda, která využívá detekce specifických antigenních determinant využitím vzniku imunokomplexu na principu vazby antigenu a protilátky. Antigen prokazujeme v buňkách a ve tkáních protilátkami, které se na buňky nebo tkáňové řezy nanášejí. V případě, že je antigen ve tkáni přítomen, vznikne imunokomplex, který se zviditelní detekčním systémem.

Bakalářská práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. Teoretická část je věnována samotné problematice melanomu. Praktická část byla zpracována na Oddělení patologie Nemocnice Písek pod odborným vedením MUDr. Jindřicha Branžovského, PhD. Prvním cílem praktické části práce bylo porovnat pozitivitu markeru MHB-45 u

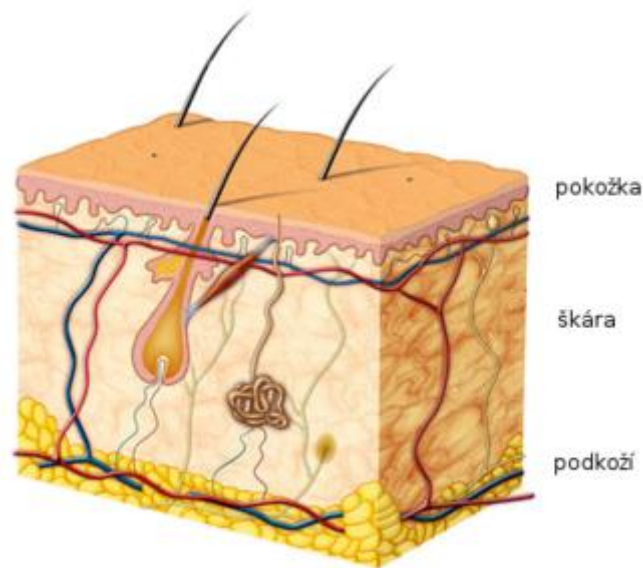
jednotlivých histologických kategorií melanomu. Jako druhý cíl bylo stanoveno potvrdit naprostou převahu imunohistochemického profilu u všech histologických kategorií melanomu.

1 Teoretická část

2 Kůže

Kůže je plošný orgán dosahující u dospělého člověka téměř 2 m² a hmotnosti až 20 kilogramů. Jedná se o největší samostatný orgán celého těla a skládá se ze tří hlavních vrstev: pokožka (epidermis), škára (dermis, corium) a podkoží (subcutis). (Číhák, 1997)

Obrázek č.1: Anatomie kůže



Zdroj: <https://www.hojeni-ran.cz/anatomie-lidske-kuze>

2.1 Pokožka

Epidermis neboli pokožka je povrchová vrstva kůže, jejíž hlavní funkcí je ochrana hlubších vrstev. Tvoří ji čtyři hlavní druhy buněk: keratinocyty, melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. Z pokožky vznikají i tzv. deriváty epidermis, kam řadíme chlupy, nehty a kožní žlázy.

Keratinocyty jsou základní a nejpočetnější buňky pokožky. Produkují bílkovinu keratin.

Melanocyty tvoří v epidermis asi 4% buněčné populace. Nejvíce se nacházejí v oblastech kůže trvale vystavených slunečnímu svitu (obličej, hřbet ruky). Uvnitř melanocytů se nacházejí melanosomy, které postupně dozrávají a hromadí barevný pigment melanin. Melanosomy jsou posléze z melanocytů vyloučeny a následně fagocytovány keratinocyty. Každý melanocyt tímto způsobem zásobuje asi 30 keratinocytů. U populací, které jsou dlouhodobě vystavovány silnému slunečnímu

záření, se melanin v cytoplazmě keratinocytů hromadí nad jádrem z důvodu ochrany genetické informace před ultrafialovým zářením.

Langerhansovy buňky hrají významnou roli v kožních imunitních reakcích, mají funkci podobnou makrofágům, a to především fagocytózou. V případě kontaktu s antigenem jej dovedou rozpoznat, zpracovat a následně prezentovat T-lymfocytům.

Merkelovy buňky jsou řídké rozmístěné smyslové buňky, které jsou součástí komplexů s mechanorecepční a neurosekreční funkcí. (Čihák, 1997)

2.2 Dermis

Dermis zpevňuje epidermis a spojuje ji s podkožním vazivem. Je složená z vaziva se zvládnými kolagenními a elastickými vlákny. Tato kombinace zajišťuje jak její pevnost, tak pružnost. Na rozhraní epidermis a dermis se nalézají škárové papily, ve kterých se nacházejí kapilární sítě a nervová zakončení. (Čihák, 1997)

2.3 Podkožní vazivo

Tela subcutanea neboli podkožní vazivo je nejhlubší vrstva kůže a spojuje dermis s povrchovou fascií nebo s periostem. V místech těchto spojení není kůže posunlivá a nemůže se zde tedy tvořit vysoký tukový polštář. Mimo tato fixovaná místa je tela subcutanea prorostlá tukovými lalůčky. Podkožní tukové vazivo představuje jakési skladiště zásobních látek, má izolační funkci v rámci tělesné termoregulace a na některých místech slouží jako mechanická ochrana. Probíhají skrze něj také větší cévy a nervy. (Čihák, 1997)

3 Maligní melanom

Maligní melanom je nádor, který vzniká z melanocytů, tedy z pigmentových buněk, nejčastěji v kůži, méně často na sliznicích čiv oku. Má v čase narůstající tendenci a v poslední době je zřetelný posun výskytu i do mladších věkových skupin. Pokročilý a metastatický melanom patří mezi onkologické diagnózy s nejhorší prognózou – medián přežití od diagnózy je jen 8-10 měsíců. (Zámečník, 2019; Ryška et al., 2017)

Na pravděpodobnosti vzniku se podílí genotyp a fenotyp hostitele, ale také působení rizikových faktorů zevního prostředí. Mezi více náchylné osoby k jeho vzniku se řadí lidé se světlou kůží, světlými či zrzavými vlasy, neschopností se opálit. Tendence k tvorbě pih po oslunění, vysoký počet melanocytárních névů, přítomnost

atypických névů nebo geneticky snížená schopnost opravovat poškození DNA vzniklé působením ultrafialového záření se rovněž řadí mezi rizikové faktory. Typickým případem pacienta s tímto nádorovým onemocněním je osoba, pracující uvnitř, jenž je nepravděpodobně vystavována UV záření, ale trávící dovolenou v místech se silným slunečním svitem.

Nádorový zvrát melanocytů nejčastěji započiná onkogenní mutací, která není účinně opravena. Za určitých podmínek tím spouští kaskádu procesů, které vedou k nekontrolovatelnému množení patologicky změněných melanocytů. Melanom vzniká z jedné nádorově transformované buňky nebo vzácněji z několika buněk transformovaných v jednom časovém intervalu. V případě, že tyto nádorově změněné melanocyty nesou stejnou mutaci, jedná se o monoklonální původ, v případě že nesou různé onkogenní mutace, jedná se o polyklonální původ. V obou dvou případech však obvykle vznikají nekontrolovatelně a invazivně rostoucí populace melanocytů se schopností metastazovat. (Fikrle, 2010; Krajsová, 2006)

Toto onemocnění postihuje převážně dospělé a starší pacienty, s nejčastějším výskytem kolem šedesátého roku života. V posledních letech se nicméně objevuje stále více u osob středního věku a mladých dospělých, a jsou pozorovány i případy výskytu u dětí či adolescentů. Obzvláště nebezpečné je opakované spálení kůže sluncem v období dětství a dospívání. Uvádí se, že děti, které se do věku 12 let vícekrát spálily, mají 3,6x vyšší riziko vzniku. Tento druh karcinomu nejčastěji nacházíme na obličeji, uchu, krku, zádech, ramenou, nebo dolních končetinách.

Klinické rysy jsou rozličné, záleží na typu, místu a stádiu vývoje nádoru. Melanomy se mohou objevit de novo, tedy bez prekurzorové léze, nebo se mohou vyvinout z již existujícího benigního melanocytového névu. Všechny typy melanocytových névů mohou dát vznik melanomu, ale například u vrozeného melanocytového névu je pravděpodobnost vzniku melanomu vyšší. Nádor může vzniknout i v místě jizvy, typicky po předchozím odstranění suspektní léze. Nový nárůst v místě jizvy po předchozí biopsii nebo vyjmutí tumoru je známka neúplné excize primární léze.

Melanom roste ve dvou fázích:

1) Horizontální - kdy se atypické melanocyty šíří epidermis. Nádor roste pouze do šířky a většinou je prognosticky příznivý.

2) Vertikální - kdy nádorové buňky pronikají do koria, kde se množí. Tato fáze je již prognosticky méně příznivá. Do vertikální fáze přejde v průběhu doby většina karcinomů. (Fikrle, 2010; Arenbergerová, Arenberger, 2005; Ditrichová et al., 2002)

3.1 Genetické faktory

Pouze sluneční záření ke vzniku melanomu nestačí. V jeho vývoji se mimo jiné uplatňuje řada genetických faktorů, které způsobují vznik, růst a částečně i další chování nádorového onemocnění.

Přirozená schopnost kůže odolávat škodlivým vlivům zevního prostředí, které mají negativní dopad na dědičnou informaci, je geneticky podmíněná. Tyto obranné mechanismy bývají za běžných okolností utlumené a spouští se, až když je potřeba. Například při intenzivním působení UV záření na pokožku dochází ke zvýšení tvorby melaninu. Geneticky podmíněný je i kožní fototyp, který určuje, do jaké míry je kůže odolná. Ani jeden typ ochrany však není vždy schopen kompletně zabránit poškození a eliminovat nežádoucí vlivy vnějšího prostředí. Navíc většina těchto obranných funkcí výrazně klesá s věkem, což může být jedním z důvodů stoupající incidence tohoto druhu onemocnění ve vyšším věku.

Řada genů je asociována se zvýšeným rizikem vzniku melanomu. Vznik tohoto druhu nádoru je důsledkem značného počtu změn v genetické výbavě melanocyty. Mezi dobře charakterizované patří zejména mutace genu CDKN2A (inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A). Tato mutace způsobuje tvorbu aktivního komplexu, který stimuluje přechod buňky z G1 fáze do S fáze. Tímto mechanismem je zprostředkována iniciální fáze vývoje karcinomu a nadměrná, nebo dokonce zcela nekontrolovatelná proliferace atypických melanocytů. Mezi změny genetické výbavy řadíme i chromozomální aberace vzniklé působením UV záření. V současné době ovšem není znám žádný konkrétní gen, který by byl charakteristický výlučně pro melanom. Další možnou příčinou vzniku tohoto nádorového onemocnění je geneticky podmíněná neschopnost opravovat chromozomální změny. Samotný vznik tohoto onemocnění je složitý mnohastupňový proces, který směřuje od benigního melanocyty až k heterogenní populaci nádorově transformovaných buněk, které se úplně vymanily kontrolním regulačním mechanismům buněčného dělení, diferenciace a odumírání. Některé genetické změny, které odpovídají za vznik nádoru, se vyskytují už v časných fázích kancerogeneze (iniciace, transformace), jiné spíše v pozdních fázích (invaze, metastazování). (Krajsová, 2006; Tuong, 2012)

3.2 Prekurzory melanomu

Nejčastěji se vyskytující pigmentovou lézí na kůži je melanocytární névus. Pojmem névus se označuje určitá kategorie kožních afekcí, protože v minulosti nebyl znám původ buněk a pojem névus byl používán pro téměř všechny kongenitální ohraničené projevy na kůži. V běžném smyslu se névus definuje jako ohraničená, trvalá a vrozená malformace kůže, která roste pouze s věkem, nemající zevní příčinu. V klinické dermatologii a dermatopatologii se pojem pigmentový névus používá jak pro vrozené melanocytární léze, tak pro melanocytární afekce, které vznikly v průběhu života. (Pizinger, 2003)

Až 1/3 melanomů vzniká z melanocytárních névů. Tyto névy jsou benigní kožní léze, které vznikají ložiskovým zmnožením a transformací melanocytů převážně v místech bazální vrstvy epidermis a dermoepidermální junkce. (Krajsová, 2006)

Více než 2/3 melanomů ale vzniká de novo, ve zdravé kůži a bez předchozího pigmentového ložiska. Proto melanocytární névy není možno považovat za skutečné prekurzory melanomu. Nicméně u osob se zvýšeným počtem běžných melanocytárních névů (>100), nebo s atypickými melanocytárními névy (>5), lze konstatovat zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění. Osoby mající mnohačetné atypické névy mají až 25x vyšší riziko vzniku melanomu než běžná populace. Nepatrně vyšší riziko vzniku nádorového onemocnění mají i osoby s vrozenými melanocytovými névy většími než 2 cm v průměru. (Krajsová, 2006; Fikrle a Pizinger, 2010)

3.3 Klasifikace

Melanomy dělíme do čtyř hlavních kategorií, kdy se z histologického hlediska posuzuje jejich umístění, vzhled a hloubka zasažené tkáně.

Melanoma in situ

Jedná se spíše o počínající vývojovou fázi karcinomu, kdy se nádorové buňky zatím nestačily rozšířit mimo úroveň epidermis. Klinickým vzhledem připomíná atypický névus, je v úrovni okolní kůže, výrazně a často skvrnitě pigmentovaný. Mívá nepravidelné okraje a trvale se zvětšuje. Pokud nedojde k odstranění, pokračuje proliferace nádorových buněk, které začnou prostupovat přes bazální membránu epidermis do horních vrstev koria, a nádor přechází v pokročilejší klinické varianty. (Krajsová, 2006)

Povrchově se šířící melanom (SSM)

Jedná se o nejčastější typ onemocnění. Ve svém počátku je charakterizován horizontálním šířením nádorových buněk. Může se objevit téměř na všech částech těla, zejména na těch, které jsou často vystavovány slunečnímu záření. U žen se nejčastěji vyskytuje na nohou, u mužů na trupu. Příčina vzniku není přesně objasněna, nicméně velkou roli hrají akutní, intermitentní spálení kůže v dětství. Také častá sluneční expozice a používání solárií může zvyšovat riziko vzniku SSM. (LeBoit, 2006; WHO Classification of Skin Tumours, 2018)

Pigmentace může být od světle hnědé přes tmavě hnědou až po černou. Šedá nebo bílá místa značí regresi, která jsou považována za imunitní odpověď organismu a nemají vliv na prognózu nádoru, protože současně s regresí v jedné části může docházet k aktivnímu růstu v jeho jiné části. Povrch SSM může být lehce vyvýšený. Z důvodu typického pomalého a nepravidelného horizontálního růstu bývají okraje nepravidelné a sotva hmatatelné, často lze pozorovat i členění nebo zářezy. Je možné zaznamenat i občasné ne příliš intenzivní svědění v místě nádoru. Pokud nedojde k odstranění léze v horizontální fázi šíření, vždy se objeví vertikální růst. Nádor s horizontální i vertikální fází se označuje jako sekundárně nodulární melanom. (Krajsová, 2006; Kružnicová, 2010; LeBoit, 2006)

Obrázek č.2: Povrchově se šířící melanom



Zdroj: <https://www.melanom.cz/Co-je-to-melanom>

Nodulární melanom (NM)

Tento typ nádorového onemocnění je druhý nejčastěji se vyskytující. Jde o nejagresivnější variantu, přičemž prognóza je většinou špatná. Oproti povrchově se šířícímu melanomu se nodulární melanom běžně vyskytuje ve starší části populace. Může se vyskytnout na jakémkoliv místě na těle, nejčastěji se ale objevuje na trupu,

hlavě, krku a dolní části nohou. Diagnostika bývá v mnoha případech obtížná, protože nodulární melanom nemívá klasické ABCDE rysy. (Krajsová 2006; LeBoit, 2006)

Vzniká převážně de novo a může se prezentovat jako hladký uzlík pokrytý kůží nebo jako vyvýšená modročerná papula, která rychle roste, eroduje, mokvá či krvácí. Velikost tohoto typu karcinomu se pohybuje v průměru mezi 10 a 20 milimetry, může být ale i větší. Histologicky je typická vertikální fáze růstu a při histologickém vyšetření je vždy důležité pečlivě zhodnotit hlubší partie nádoru, kde může docházet k intralymfatickému a intravaskulárnímu šíření nádorových buněk. (Krajsová, 2006; Rosai 2011)

Obrázek č.3: Nodulární melanom



Zdroj: <https://www.melanom.cz/Co-je-to-melanom>

Lentigo maligna a lentigo maligna melanoma (LM a LMM)

Lentigo maligna je považován za přednádorový stav a až při jednoznačném zvratu v plně vyvinutý maligní nádor je označován jako lentigo maligna melanoma.

Jedná se o formu onemocnění, která se objevuje na kůži u starších lidí, kteří jsou velmi často, až chronicky, vystavováni slunečnímu záření. LMM se nejčastěji objevuje na obličeji, méně častěji na krku, horní části zad a na předloktí. (LeBoit, 2006; WHO Classification of Skin Tumours, 2018)

Lentigo maligna začíná jako plochá, pomalu rostoucí léze, mající světle hnědou až černou barvu a v průběhu let se zvětšuje a vytváří různě veliká ložiska nepravidelného tvaru. V počínající fázi onemocnění je možnost léčby excizí. K recidivě může dojít v případě, že zákrok není dostatečně radikální. Pokud se lentigo maligna neodstraní, až polovina případů může přejít v lentigo maligna melanom. (Krajsová, 2006; Rosai 2011)

LMM je charakteristický pro svůj nodulární růst v původně plochém ložisku. V okamžiku, kdy se objeví vertikální růst, nádor získává schopnost invazivního růstu i metastázování. (Krajsová, 2006)

Obrázek č.4: Lentigo maligna melanom



Zdroj: <https://www.melanom.cz/Co-je-to-melanom>

Akrolentiginózní melanom (ALM)

Tento typ se nachází na dlaních, ploskách nohou a nehtových ploténkách a častěji se objevuje u negroidní rasy. Postihuje většinou osoby kolem 60. roku života. (Krajsová, 2006; LeBoit, 2006; Rosai, 2011)

Obrázek č.5: Akrolentiginózní melanom



Zdroj: <https://www.melanom.cz/Co-je-to-melanom>

3.4 Diagnostika

Primární kožní maligní melanom je ve většině případů diagnostikován již klinickým vyšetřením za pomoci dermatoskopu. Dermatolog vyšetřuje kůži celého těla včetně dlaní, plosek a kštice. Včasné zjištění a chirurgické odstranění nádoru se považuje za nejúčinnější léčbu. Diagnostika je ovšem v některých případech obtížná. Až

1/3 z nich není klinicky nebo histologicky rozpoznána. Největší obtíže v tomto hledisku způsobují zejména počínající melanomy, nodulární melanomy a lentigo maligna bez horizontální fáze růstu a akrolentiginózní melanomy při lokalizaci na ploskách a pod nehtovými ploténkami. (Klener, 2002)

Toto nádorové onemocnění se může poměrně vzácně vyskytnout na sliznici jícnu, konečnicku či v anu, kožní výskyt je ovšem nejčastější, a tím pádem i přístupný vyšetření pohledem. Vzhled není stacionární. Klinický obraz pak může být podmíněn jednak jeho variantami, lokalizací, ale i pokročilostí samotné léze.

Pro vznik karcinomu mohou nasvědčovat změny již existující léze nebo nově vzniklého útvaru, které lze shrnout do tzv. ABCDE pravidla, kdy platí, že čím více kritérií je pozitivních, tím je větší pravděpodobnost, že se jedná o maligní variantu. Toto pravidlo je odvozeno od počátečních písmen pěti anglických výrazů pro posuzování kritérií. Tato původně mnemotechnická pomůcka byla zavedena do širokého použití roku 1985 a umožňuje tak snadněji a včas rozpoznat kožní melanom jak zdravotnické, tak laické veřejnosti.

- A = asymmetry – Ložisko má asymetrický tvar. To znamená, že jedna polovina ložiska není stejná jako druhá. Čím více je asymetrické, tím spíše bude maligní.
- B = border – Okraje ložiska jsou nepravidelné, s četnými zářezy a výběžky, kterými se nádor postupně šíří do okolí. Opět platí, že čím je větší nepravidelnost okrajů, tím spíše bude léze maligní.
- C = color – Barva ložiska je většinou výrazná, tmavě hnědá s častými barevnými nepravidelnostmi, mohou se nacházet i různé odstíny hnědé až černé barvy, často růžové, červené, šedomodré až bílé plošky. U tohoto bodu nejde ani tak o celkovou sytost jedné barvy, jako hlavně o výskyt více barev v rámci jedné léze.
- D = diameter – Přesahuje-li velikost ložiska 6 mm, může být považována za více suspektní.
- E = elevation – Ložisko je vyvýšené nad okolní úroveň pokožky. Nepravidelně vyvýšená nebo výrazně vyvýšená ložiska jsou více podezřelá z maligního zvratu.

Obrázek č.6: ABCDE pravidlo



Zdroj: ABBASI, N., R., SHAW, H., M., RIGEL, D., S., et al., 2004. Early diagnosis of cutaneous melanoma – Revisiting the ABCD criteria

Některé zdroje E vůbec neuvádějí a některé ho nahrazují pojmem evolution, který značí změnu, zvětšení i vyvýšení ložiska. Uvedená kritéria mají svá omezení a příliš se neuplatní v diagnostice primárně nodulárních melanomů, které často postrádají asymetrii, nepravidelné okraje, barevné variace a rozměr větší než 6 mm. (Abbasi, 2004; Becker et al., 2002; Arenbergerová a Arenberger, 2005; Krajsová, 2006)

Krvácení, svědění, zánětlivý okraj či ulcerace nasvědčuje pokročilému stadiu onemocnění. (Arenbergerová a Arenberger, 2005)

Nezákladnější vyšetřovací technikou je dermatoskopie. Tato metoda využívá manuální nebo digitální dermatoskop, který umožňuje dermatologovi pozorovat struktury kůže až do oblasti dermoepidermální junkce. Dermatoskop má na spodní části okuláru se zvětšovací sklem ještě jedno ploché sklo, které se přímo dotýká kůže. Prostor mezi kůží a sklem je vyplněn imerzním olejem. (Arenbergerová a Arenberger, 2005; Arenberger, 2006)

K potvrzení diagnózy je vždy nezbytně nutné provést histologické vyšetření. Excize melanomu se provádí s dostatečným lemem zdravé tkáně. V případě, že je

primární tumor do 1 mm výšky, odebírání se tumor s 1 cm okolní tkáně. V případě že je hlubší, je nutné odebrat 2-3 cm zdravé tkáně. Taková diagnostická excize je často zároveň i léčebnou excizí melanomu. (Ditrichová et al., 2002)

3.5 Průběh a prognóza

Biologické chování tohoto druhu zhoubné léze je variabilní a do značné míry nepredikovatelné. Jako u jiných nádorů platí, že prognóza onemocnění souvisí se stupněm pokročilosti. Za významné faktory k určení prognózy se považuje hloubka invaze nádorových buněk do různých vrstev dermis a podkoží (hodnocení dle Clarka), stanovení maximální tloušťky nádoru (hodnocení dle Breslowa) a přítomnost či absence ulcerace. Hodnocení dle Breslowa je nejvýznamnější prediktivní faktor. Tloušťka nádoru se měří v milimetrech. Hodnotí se kalibrovaným okulárním mikrometrem od horního okraje stratum granulosum epidermis vertikálně k nádoru, nebo k nejhluběji uložené nádorové buňce v korii či podkoží. V případě, že je povrch tumoru ulcerován, měření se provádí od spodiny ulcerace. Stejně je tomu v případě zachycené krusty na povrchu nádoru, která se do tloušťky nádoru nezapočítává. Vždy je nutné změřit největší rozsah nádoru, proto je základním předpokladem správné prokrájení preparátu. Tloušťka se má měřit v několika sériových řezech, aby byla zachycena nejvyšší možná hodnota. Čím vyšší je Breslowa hodnota, tím horší je prognóza onemocnění. Teprve zavedení vyšetřování sentinelových uzlin změnilo význam tohoto hodnocení, protože pozitivita vyšetření sentinelových uzlin je prognosticky významnější než samostatná tloušťka nádoru. Hodnota Breslowa je však jedním z parametrů indikujících vyšetření sentinelové uzliny. U pacientů s negativními sentinelovými uzlinami zůstává tloušťka nádoru stále nejvýznamnějším prognostickým faktorem. (Ryška et al., 2017)

Hodnocení melanomu dle Clarka ztrácí postupně na významu. Jedním z důvodů je subjektivní hodnocení. Hloubku invaze u týchž histologických preparátů hodnotí řada patologů rozdílně. Hloubka invaze podle Clarka je rozdělena do 5 hladin:

Clark I – nádor pouze v epidermis, tedy melanoma in situ

Clark II – znamená prorůstání nádorových hnízd do vrchních vrstev korie, ale jen do části stratum papillare

Clark III – nádor v celé vrstvě stratum papillare

Clark IV – postižení stratum reticulare

Clark V – průnik nádorových buněk do podkožní tukové tkáně (Krajsová, 2006; Krška, 2014)

K nezávislým prediktivním ukazatelům patří i pohlaví s lepší prognózou u žen. Horší prognózu znamená věk nad 50 let, zvláště u mužů. Všechny tyto parametry mají statisticky významnou prognostickou váhu, přesto však vývoj a případnou recidivu předpovědět prakticky nelze. Zhruba polovina pacientů má v době diagnózy detekovatelné cirkulující nádorové buňky v krevním oběhu a v lymfatických uzlinách izolované tzv. spící buňky, které dále neproliferují a jsou kontrolovány protinádorovou aktivitou imunitního systému. Pokud dojde k selhání imunitního dozoru, může prakticky kdykoliv dojít k expanzi těchto elementů a vzniku klinických manifestních metastáz. (Ryška et al., 2017)

Maligní melanom může metastazovat buď lymfogenní cestou do spádových regionálních uzlin, později i do uzlin vzdálenějších, nebo hematogenně do kteréhokoliv orgánu, nejčastěji do plic, jater, CNS či kostní dřeně, vzácněji pak do srdce, sleziny, štítné žlázy apod. Poměrně často může metastazovat i do kůže. Kožní metastázy jsou vždy známkou minimálně III. stadia nádoru. (Klener, 2002; Ryška et al., 2017)

Průběh onemocnění maligním melanomem se dá rozčlenit do 4 klinických stádií:

- I. tenký primární nádor omezený na kůži (Breslow < 1,0 mm s ulcerací nebo < 2,0 mm bez ulcerace)
- II. primární nádor omezený na kůži jakékoliv tloušťky (min. Breslow > 1 mm s ulcerací a Breslow > 2 mm bez ulcerace)
- III. primární nádor s prokazatelnými metastázami v regionálních uzlinách nebo intransitními metastázami (postihují kůži nebo podkoží ve směru toku lymfy dále než 2 cm od primárního nádoru, ale nejdále k regionální lymfatické uzlině)
- IV. primární nádor se vzdálenými metastázami (Arenbergerová a Arenberger, 2005)

3.6 Vyšetření sentinelové uzliny

Nádorové buňky se mohou z původního ložiska šířit různými cestami, z nichž je u maligního melanomu nejčastější šíření mízními cévami. Dříve se proto od určité tloušťky tumoru odstraňovaly veškeré mízní uzliny v příslušné spádové oblasti. Ty totiž slouží jako jakýsi filtr, který může nádorové buňky vycytat a nějakou dobu zabránit jejich rozšíření dále do organismu. Nedovede je ale zlikvidovat, takže při jejich ponechání v uzlině se může vytvořit druhotné nádorové ložisko. Později se zjistilo, že lymfa teče obvykle nejprve do jedné uzliny a teprve potom pokračuje do dalších uzlin v

okolí a nádorové buňky se tedy zachytí v první uzlině a teprve později se mohou šířit do okolních uzlin. V dnešní době již existují metody, pomocí kterých lze tuto sentinelovou uzlinu objevit. Nejčastěji se využívá označení radioizotopem či barvivem nebo kombinace obojího. K tomuto zákroku jsou indikováni všichni pacienti s klinicky velmi podezřelým nádorem, u kterého očekáváme tloušťku větší než 1 mm nebo pacienti, u kterých byl již tento druh nádoru odoperován a histopatolog změřil tloušťku rovnou nebo větší 1 mm. Tato indikace vychází z celosvětově platných doporučení.

V praxi zákrok vypadá tak, že pacient obvykle za krátkodobé hospitalizace absolvuje výkon v místním znecitlivění, kdy se vyjme již zmíněná spádová uzlina, která se podle lokalizace melanomu nachází většinou ve třísle, v podpaží nebo na krku. Před samotným zákrokem se provede vlastní označení, které má 2 fáze. Nejprve se na pracovišti nukleární medicíny vstříkne podkožně v okolí nádoru nebo jizvy malé množství radioaktivně značených částic, které se mízní cestou dostanou do hledané mízní uzliny a v ní se vychytají. Těsně před operací se do stejného místa podkožně vstříkne roztok patentní modři, který se stejným způsobem dostane do mízní uzliny. Operace se pak zahajuje po předchozí kontrole místa nad uzlinou speciální sondou, která je schopna změřit intenzitu záření vysílaného označenou mízní uzlinou. Toto vyšetření umožňuje najít nejbližší místo na kůži, pod kterým je uzlina uložena, a tím provést chirurgické odstranění spádové uzliny co nejšetrněji. I během operace se k vyhledávání průběžně používá sterilní vyhledávací sonda a přesné dohledání umožní navíc barevné označení patentní modří.

Uzlina se po vyjmutí odešle k histologickému a imunohistochemickému vyšetření. V případě, že se v ní najdou nádorové buňky, provede se následně odstranění všech uzlin ve spádové oblasti. Pokud tomu tak není, je pacient, u kterého by se dříve tato tzv. "elektivní lymfadenektomie" provedla, tohoto zatěžujícího výkonu ušetřen. (Arenberger, 2006)

3.7 Nepříznivé klinické prognostické faktory

U každého pacienta je možné se již při základním klinickém vyšetření a vyslovení podezření na melanom alespoň orientačně vyjádřit k dalšímu průběhu onemocnění. Existuje několik základních klinických parametrů označujících závažnější prognózu onemocnění.

Klinicky patrný vertikální růst

Jakmile se nádor začíná vyklenovat nad okolní kůži, je zřejmé, že se objevila vertikální fáze růstu. K výšce léze nad pokožkou je nutné připočítat část nádoru, která roste do hloubky epidermis a koria. Podle rozsahu nodulárního růstu je tak možné přibližně odhadnout hodnotu Breslowa, a tím určit radikalitu následné chirurgické excize nádoru. Současně můžeme se stoupající elevací nádoru očekávat závažnější průběh onemocnění.

Klinicky patrná ulcerace

I když je pro objektivní hodnocení ulcerace nádoru závazný její průkaz při histologickém vyšetření, je vždy nezbytné klinicky popsat povrch nádoru a všítat si případných šupin a krust, které mohou překrývat porušený kožní povrch, a tak maskovat přítomnost ulcerace. Čím je nádor větší a pokročilejší, tím vyšší je pravděpodobnost porušení jeho povrchu. Ulcerace na povrchu tenkých, prognosticky příznivých melanomových lézí bývá zachycena zřídka, ale její průkaz je v těchto případech ještě závažnější, protože významně zhoršuje průběh onemocnění.

Nevýrazná pigmentace nádoru

Počínající karcinomy jsou ve většině případů výrazně pigmentované, někdy až černě zbarvené. S rostoucím nádorem dochází častěji ke ztrátě schopnosti buněk produkovat pigment a v melanomu se objevují depigmentované okrsky. Častým úkazem je rychlý růst amelanotického nodulu v plošné, sytě pigmentované části nádoru, což bývá většinou známkou vzniku více dediferencovaného, agresivnějšího klonu nádorových buněk.

Přítomnost spontánní regrese

Nelze jednoznačně říci, že přítomnost regrese je příznivým nebo nepříznivým prognostickým ukazatelem. Vznik spontánní regrese však může způsobovat falešný pocit bezpečí, protože díky ní dochází ve většině případů k oploštění původně vyvýšeného ložiska, k zahojení případné ulcerace, ke zmenšení nebo dokonce úplnému vymizení nádoru. Částečně regredované nádory mají převážně nízké hodnoty Breslowa, nejsou ulcerované a často mizí i výrazné buněčné atypie a mitózy. Klinický i histologický obraz imituje prognosticky příznivé nádory, nevylučuje však vznik metastáz.

Axiální lokalizace

Mnoho studií již opakovaně potvrdilo význam anatomické lokalizace nádoru pro celkové přežití. Tumory postihují horní i dolní končetiny, s výjimkou plosek a dlaní, mají příznivější průběh onemocnění, zatímco nádory lokalizované na trupu, na hlavě a ve kšitici mají prognózu závažnější. Nejméně příznivou oblastí jsou horní partie zad. Axiální lokalizace tak naznačuje možnost závažnějšího průběhu onemocnění.

Věk nemocných

Většina starších nemocných přichází na první vyšetření s pokročilými karcinomy s vysokou hodnotou Breslowa a často přítomnou ulcerací, proto u nich bývá prognóza onemocnění velmi závažná. Některé studie navíc prokazují horší průběh u starších nemocných, zejména ve věku nad 65 let, bez závislosti na charakteristikách primárního nádoru.

Pohlaví

Opakovaně se objevují práce prokazující příznivější prognózu onemocnění u žen než u mužů. Hlavním důvodem mírnějšího průběhu onemocnění u ženského pohlaví je častější výskyt léze na dolních končetinách a záchyt nádoru v časnějších fázích jeho růstu. Při porovnávání typů melanomů u mužů a žen mají ženy v průměru nižší hodnoty Breslowa i méně často ulcerované nádory. A tak otázka, zda muži mívají horší průběh onemocnění než ženy, ještě stále nebyla jednoznačně zodpovězena. Velmi pravděpodobně není prognóza ovlivněna pohlavím, ale charakteristikou nádoru.

Makroskopické satelitní metastázy

Přítomnost satelitních ložisek do 2 centimetrů v okolí primárního nádoru již při prvním vyšetření pacienta znamená jednoznačně horší prognózu onemocnění. Vyžaduje radikální chirurgický zákrok, který zajistí odstranění satelitů v sousedství nádoru, a znamená jednoznačnou indikaci k vyšetření sentinelové uzliny, pokud již nejsou postiženy regionální lymfatické uzliny makroskopicky. Velmi často však v těchto případech dochází ke vzniku lokálních recidiv v jizvě i po radikální excizi primárního nádoru. Častěji jsou popisovány také následné satelitní, intranzitní i vzdálené metastázy.

3.8 Léčba

Léčbou první volby je resekce primárního ložiska. Své pevné místo však kromě chirurgické terapie nachází i chemoterapie, imunoterapie a radioterapie. Podobně jako u jiných solidních nádorů i zde závisí úspěšnost léčby na časnosti zachytu. Na rozdíl od většiny ostatních zhoubných nádorů je časný záchyt o něco snazší, protože většina melanomových lézí se vyskytuje na kůži, a tudíž je od počátku lépe viditelná. (Becker et al., 2002; Bajčiová et al., 2011)

U nízkorizikových pacientů, tedy u těch, kteří se nacházejí v I. a II. stadiu onemocnění, po chirurgickém odstranění nádoru nenásleduje žádná další léčba.

Rizikovější pacienti, kteří se obvykle nacházejí ve III. stadiu onemocnění, jsou léčeni tzv. adjuvantní imunoterapií, a to po dobu 1-2 let. Tato terapie spočívá v podávání interferonu alfa. Jeho podávání je poměrně jednoduché. Pacient si většinou sám vstříkne do podkoží stanovené množství léku z předplněné injekční stříkačky nebo pomocí speciálního dávkovacího pera. Interferon alfa je za normálních okolností tvořen v malém množství buňkami imunitního systému. V případě zvýšení hladiny této látky v krvi se výrazně podpoří obranyschopnost organismu a dojde k jejímu nasměrování proti nádorovým buňkám, které by se mohly šířit do tkání. V několika klinických studiích byl prokázán nejen jeho tlumící vliv na růst a množení nádorových buněk, ale i jeho příznivý účinek na regresu nádoru.

Pacienti ve IV. stadiu onemocnění jsou léčeni chirurgicky, aktinoterapií, chemoterapií cytostatiky, imunoterapií, chemoimunoterapií, biologickou či cílenou léčbou. Toto nádorové onemocnění nejčastěji metastazuje do plic, jater, mozku, kostí a dalších orgánů. Na našem trhu jsou dva preparáty pro metastazující maligní melanom, které jsou hrazeny zdravotní pojišťovnou. Je to konkrétně biologikum ipilimumab (Yervoy) a cílený preparát vemurafenib (Zelboraf). Ipilimumab (Yervoy) odblokovává konkrétní receptor, a tím zaktivizuje imunitní systém, který se posléze lépe vypořádá s nádorovou tkání. Jako nežádoucí účinek může být nastartování autoimunitních reakcí, které vedou k poškození tkáně střeva, štítné žlázy či hypofýzy. Na léčbu zareaguje asi 15% nemocných a ve 20% byla pozorována stabilizace nemoci. Preparát vemurafenib (Zelboraf) je prvním úspěšným preparátem z oblasti cílené léčby u diseminovaného maligního melanomu. Cíleně blokuje mutovaný protein BRAF, který se nachází asi u poloviny melanomů. Jde o takzvanou malou molekulu, což znamená, že se účinná látka dokáže vstřebat i při perorálním podání. Viditelný efekt tohoto léku na zmenšení nádorové tkáně nastupuje velmi rychle. Může ovšem dojít k vytvoření rezistence, kdy si

nádor zřejmě najde jinou dráhu aktivace růstu než tu, která je blokována podávaným lékem. Mezi nejzřetelnější nežádoucí účinky patří fotosenzibilita, kdy se pacient při nedostatečné fotoprotekci může spálit, zvýšená únava a vznik sekundárních kožních nádorů ze skupiny keratoakantomů nebo spinaliomů. (Arenberger; 2006; Lakomý, 2013)

Po prodělání chirurgické léčby je důležité, aby pacient docházel na následné kontroly. Tento proces se nazývá dispenzarizace. Je nezbytné dodržovat časový harmonogram návštěv stanovený lékařem v závislosti na stádiu pacienta. Tyto pravidelné kontroly jsou důležité ze dvou důvodů. Prvním je, že se se zvyšujícím stádiem nemocného zvyšuje i riziko vzniku metastáz. Druhým důvodem je, že pacienti s jedním melanomem jsou ohroženi vznikem druhého melanomu desetkrát častěji než zbytek populace. Proto se při každé kontrole provádí fyzikální vyšetření kůže. Vyšetřuje se i kštice, sliznice, dlaně a plosky, důkladně se kontroluje také jizva vzniklá odstraněním původního ložiska a palpačně se vyšetřují spádové mízní uzliny. V pravidelných časových úsecích se provádí i zobrazovací metody (CT, PET-CT) ke zjištění případných metastáz. Nejvyšší četnost kontrol je v prvních 5 letech od chirurgické léčby primárního tumoru, především proto, že 50% metastáz vzniká právě v tomto časovém úseku. Pozdní metastázy jsou sice vzácné, ale možné, a proto by měla být následná péče, byť v omezené míře, doživotní. (Arenberger, 2006)

3.9 Prevence

Melanom je onemocnění, jehož vzniku lze zabránit změnou životního stylu, hlavně změnou přístupu k oslunění u nejvíc rizikových skupin obyvatelstva.

Prakticky všechna známá rizika pro vznik tohoto onemocnění souvisejí s vystavením UV záření, proto hraje ochrana před slunečními paprsky velkou roli v prevenci. Je důležité dodržovat zásady správného opalování, tedy zejména vyhýbat se prudkému slunci, hlavně mezi 11. a 14. hodinou. Dodržování této zásady znamená snížení expozice UVB záření až o 60-80% z celkové denní dávky. V případě, kdy je pobyt na slunci nevyhnutelný, je třeba chránit pokožku krémy s ochranným faktorem. Výši faktoru je důležité volit úměrně k typu pokožky, vzdálenosti od rovníku a době strávené na slunci. V případě, kdy dojde ke spálení kůže, je důležité chránit i spálenou část těla před další expozicí slunečnímu záření, a to až do té doby, dokud se kůže úplně nezhojí.

Vzhledem k tomu, že za nejrizikovější skupinu jsou považovány malé děti, zaměřuje se primární prevence hlavně na ně a na mladé dospívající jedince.

(Pražský, 2013; Rigel, 2000; Zlejšilová a Liptáková, 2013; Krajsová, 2006)

Sekundární prevence zahrnuje včasnou detekci tohoto nádorového onemocnění v co možná nejranější fázi, jejímž výsledkem je snížení mortality. Nejdostupnější možností je výchova laické populace k časnému rozpoznání počínajícího nádoru. Současně je velmi důležitá výchova lékařů a všech zdravotníků, aby i oni uměli počínající nádor detekovat, diagnostikovat a správně určit všechny nezbytné následné kroky. Přínos screeningu nebyl u asymptomatických jedinců v obecné populaci prokázán. U vysoce rizikových jedinců, mezi které řadíme malé děti a dospívající, lidi se světlou kůží, s tendencí ke spálení a tvorbě pih, lidi s velkým počtem běžných získaných névů a nositele dyplastických névů, je však doporučováno pravidelné vyšetřování dermatologem. Je také silně doporučováno pravidelně provádět samokontroly. (Tuong, 2012; Krajsová, 2006)

4 Histologie

Pro stanovení správné histologické diagnózy je nezbytná úzká spolupráce klinika a patologa, kvůli vzájemnému předání informací důležitých pro přesné zhodnocení vyšetřovaného nádoru. Pro patologa jsou důležité všechny esenciální informace o pacientovi i o vyšetřovaném vzorku, zvláště o velikosti ložiska, jeho přesném anatomickém umístění, o případné přítomnosti ulcerace či regrese léze, či zda se jedná o parciální nebo kompletní excizi. Naštěstí v poslední době díky zvyšujícím se počtům hodnocených melanomů výrazně stoupá přesnost klinické i histopatologické diagnostiky. (Krajsová, 2006)

Neexistuje žádné jednoduché kritérium, které by bylo schopno jednoznačně odlišit benigní a maligní melanocytární lézi. K přesnému stanovení diagnózy nádorového onemocnění je vždy nutné mikroskopické vyšetření vzorku, odebraném při biopsii nebo v průběhu rozsáhlejší operace, kdy se hodnotí architektonické a buněčné rysy vyšetřovaného nádoru, včetně oblasti výskytu samotných melanocytů, charakteru šíření nádorových buněk a okraje excize, zda došlo ke kompletnímu odstranění léze. Při histopatologickém vyšetření je vyšetřován celistvý vzorek tkáně. Před samotným vyšetřením se pak připravují vzorky tak, aby z nich bylo možno pořídit velmi tenké plátky, které se po vložení na sklíčko obarví. V případě, kdy ani po vyhodnocení těchto

ukazatelů není možno stanovit jednoznačnou diagnózu, představuje další krok imunohistochemické vyšetření. (Arenberger, 2006; Krajsová, 2006)

5 Cytologické charakteristiky melanomu

Melanom je histologicky charakterizován proliferací atypických (dysplastických) melanocytů s převahou jednotlivých buněk. Nádorové melanocytární buňky mohou být velké i malé, okrouhlé, oválné, nebo nepravidelné. Nejčastěji bývají zachyceny buňky epiteloidní, které mívají objemnou, granulární, typicky eozinofilní cytoplazmu s okrouhlými jádry a bývá u nich přítomen výrazný pleomorfismus a hyperchromazie. Dále to jsou buňky vřetenité, které mají protáhlý tvar, pleomorfní jádra a je častá hyperchromazie. Méně častější jsou buňky névoidního typu, buňky s dendritickými výběžky, obrovské buňky, mnohojaderné buňky a buňky balonové. Poměrně často mohou buňky nádoru připomínat vzhledem nádorové infiltráty zcela jiného původu (např. malé buňky typu lymfocytů zaměnitelné s kožními lymfomy).

Pravidlem bývají jaderné i cytoplazmatické atypie, kdy jsou jádra často deformována a mají hrubý, nepravidelně uspořádaný chromatin, hyperchromazii a četné jaderné pseudoinkluze. Cytoplazma může být eozinofilní i bazofilní, granulární nebo vakuolizovaná a pravidelně obsahuje velké množství melaninu. V případě, že melanin není možné prokázat, bývá diagnóza melanomu obtížnější.

Ve všech úrovních léze se nacházejí mitózy, které jsou často atypické. Jejich průkaz v hlubokých strukturách nádoru podporuje diagnózu. Jako pomocný ukazatel může posloužit ztráta schopnosti vyzrávání nádorových buněk směrem do hlubších partií koria. (Krajsová, 2006; Rigel, 2000)

6 Architektonické rysy melanomu

Za základní ukazatel se považuje velikost léze, která u většiny nádorů přesahuje 5 milimetrů. Velký význam má i asymetrie ložiska a nepravidelné ohraničení jeho okrajů. Nádor ztrácí typické névové architektonické rysy, kdy hnízda melanomových buněk mají na rozdíl od névů různou velikost a tvar, splývají ve velké nepravidelné útvary a jednotlivé buňky v hnízdech ztrácejí soudržnost. Hnízda melanomových buněk se šíří do všech vrstev koria a ani tam buňky nemají tendenci k vyzrávání, typickému znaku névových lézí. Nádorové čepy mohou přecházet do podkoží, kde se pak šíří se do lymfatických a krevních cév.

Melanin bývá uložen často nepravidelně, ložiskově, v hručkách i disperzně. Může se nacházet v různých částech nádoru a bývá prokazován intracelulárně i extracelulárně.

V korii dochází ke změnám struktury vaziva. Úplně mizí elastická vlákna, přičemž dochází k postupné likvidaci vlasových folikulů a mazových a potních žlázek.

Za melanom by měla být považována léze, u které jsou dostatečně patrné cytologické i architektonické atypie. Přestože jsou všechny výše uvedené charakteristiky pro toto nádorové onemocnění typické, nemusí být vždy přítomné. Proto je diagnóza problematická hlavně v počátečních stádiích. (Krajsová, 2006)

7 Cíl práce

Prvním cílem práce je porovnat pozitivitu markeru HMB-45 u jednotlivých histologických kategorií melanomu.

Předpoklad: Vzhledem k vysoké specifitě markeru HMB-45 k melanocytárním buňkám, předpokládáme jeho pozitivitu alespoň v 80% případů.

Druhým cílem je potvrdit naprostou převahu imunohistochemického profilu u všech histologických kategorií melanomu.

Předpoklad: Imunohistochemický profil melanocytárních lézí (S100 protein, HMB-45 a vimentin pozitivní a cytokeratin negativní) je důležitým rozlišovacím faktorem v diferenciální diagnostice zejména kožních nádorů. Občas je jediným vodítkem k odlišení zejména karcinomů a lymfomů. Proto předpokládáme, že bude tento profil zachován alespoň v 80% zkoumaných případů.

8 Metodika

8.1 Preanalytická fáze

Samotnému histologickému zpracování vzorku předchází jeho odběr. Vzorek se po šetrném odebrání vloží do označené nádoby s fixační tekutinou a spolu s vyplněným průvodním listem se zasílá do laboratoře. (Jirkovská, 2006)

8.2 Analytická fáze

Na neobarvených řezech nejsou ve světelném mikroskopu vidět jednotlivé složky tkáně, proto se řezy barví. Vzorek pro histologické vyšetření je obarven základním barvením Hematoxylin-eosin. Kyselá barviva (eosin) se váží na cytoplazmu buněk, zásaditá barviva (hematoxylin) barví jádra buněk. Druhotně se pak k barvení používají imunohistochemické metody. (Vacek, 1996)

Po dopravení vzorku do laboratoře lékař makroskopicky popíše vzorek, ukrojí z něho abnormální části a určí následný typ vyšetření nezbytný pro stanovení diagnózy. Dalším krokem ke zhotovení histologického preparátu je parafinové zpracování.

Aby se mohla tkáň dobře krájet, musí nejprve dojít k odvodnění a prosycení tkáně rozehrátým parafinem. Parafin vyplní všechny mikroskopické štěrby v tkáni, takže se pak dá krájet v tenkých řezech (silných několik tisícín milimetru). Tím vznikne histologický preparát. Je-li pozorován neobarvený preparát v obyčejném světelném mikroskopu, jednotlivé složky tkáně jsou nerozeznatelné a z tohoto důvodu se barví řezy vhodnými barvivami.

Příkrojená tkáň se vloží do speciálních krabiček s číslem a v košíku se nechá proprat pod tekoucí vodou (mírně proudící) asi 10 minut. Vloží se do standardního vakuového tkáňového procesoru a zapne se program „denní“. Další pracovní den se košík s tkáněmi vyndá ze standardního vakuového tkáňového procesoru, krabičky s tkáněmi se otevrou a tkáň se v nahřívací komoře parafinové zalévací linky připraví k zalévání. K zalévání parafinem prosycené tkáně se používá parafinová zalévací linka, která je rozdělena na tři části – ohřívací zalévací a chladicí. Jsou použity speciální kovové mističky, do kterých se vkládá prosycená tkáň, zalije se parafinem a nechá se vychladit na chladícím modulu. Z dobře vychlazených tkáňových bločků se zhotovují na sáňkovém mikrotomu SLIDE 4003 E tenké histologické řezy, silné několik tisícín mm. Ke krájení jsou použity žiletkové nože. Ukrojené parafinové řezy se napínají v teplé vodní lázni a jsou nabírány na označené podložní sklo. Řezy je třeba na sklíčka

montovat pokud možno bez jakýchkoli záhybů. Příliš mnoho nerovností by mělo dopad na výsledný barevný produkt. Takto připravené preparáty jsou vloženy do stojánku a usušeny v termostatu při 60-65°C na 20 minut. (Vacek, 1996)

Barvení Hematoxylin-eosin

Patří mezi základní a nejpoužívanější histologická barvení. Hematoxylin-eosin odlišuje základní buněčné struktury. Roztok hematoxylinu sám o sobě jádra buněk nebarví, ale až po oxidaci v hematein. Díky barvení Hematoxylin eosin jsou odlišeny jádra buněk tmavě modře, cytoplazma růžově, svalstvo červeně a chrupavka modře.

Vlastní postup pro ruční barvení Hematoxylin Eosin (Vacek, 1996):

Xylen – 20minut

- 1) 96% ethanol – oplach
- 2) 80% ethanol – oplach
- 3) 70% ethanol – oplach
- 4) H₂O – oplach
- 5) Hematoxylin – 2 minuty (pokud se barví nativní řez, barvení začíná od hematoxylinu)
- 6) H₂O – oplach, nechat zmodrat
- 7) Eosin – 3-5 minut
- 8) 96% ethanol – oplach
- 9) 96% ethanol – oplach
- 10) Aceton – oplach
- 11) Xylen – oplach

Obarvené preparáty se montují pomocí vhodně zvoleného montovacího média v tomto případě Entallanu NEU. Preparáty montujeme z xylenu nebo z vody. Sklo vytáhneme z kyvety a okolí tkáně otřeme hadříkem. Na sklo kápneme skleněnou tyčinkou kapku média a řez zakryjeme krycím sklem příslušné velikosti. Pokud se pod sklíčkem vytvořily bublinky vzduchu, jemně je vytlačíme preparační jehlou.

Imunohistochemie

Imunohistochemie je laboratorní metoda, která vychází z histochemie a využívá detekce specifických antigenních determinant za pomoci imunologické vazby na principu vazby antigenu a protilátky. Toto vyšetření je nezbytné v okamžiku, kdy při základním barvení není možné jednoznačně stanovit diagnózu.

Antigen prokazujeme v buňkách a ve tkáních protilátkami, které se na buňky nebo tkáňové řezy nanášejí. V případě, že je antigen ve tkáni přítomen, specifická protilátka namířená proti tomuto antigenu se na antigen svým Fab fragmentem naváže. Tuto vazbu lze prokázat tím, že na specifickou protilátku navážeme detekční systém, který její přítomnost zviditelní. V imunohistochemických metodách je enzymem, který je součástí detekčního systému, nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. (Dvořák et al., 2008; Krajsová, 2006)

Imunohistochemické metody můžeme rozdělit na přímé a nepřímé.

Přímá metoda

V případě přímé metody se jedná o nejjednodušší způsob lokalizace antigenu ve tkáni. Primární protilátka je označena enzymem, jehož rozmístění ve tkáni následně hodnotíme. Této metody lze využít v případě, že je antigen ve studované tkáni přítomen v dostatečně vysoké koncentraci. Při použití na parafinových řezech je tato metoda málo citlivá, využívá se zejména v nativních řezech.

Nepřímá dvojstupňová metoda

V porovnání s přímou metodou je nepřímá metoda komplikovanější, ale mnohem citlivější, což je způsobeno tím, že na každou primární protilátku může být navázáno několik molekul značené sekundární protilátky. Na tkáňové řezy je nejprve aplikována neoznačená specifická protilátka nebo sérum proti prokazovanému antigenu, nazýváme ji primární protilátkou. Ve druhé vrstvě je nanášena protilátka proti Fc-fragmentu imunoglobulinů zvířete, ze kterého primární protilátka pocházela. Sekundární protilátka je značená enzymem a imunologickou vazbou se váže na primární protilátku.

Nepřímé trojstupňové metody

Nepřímá trojstupňová metoda je citlivější než předešlé dvě metody, ovšem je časově nejnáročnější. V případě této metodiky se využívá amplifikace sloužící k zesílení signálu v případě, že je ve tkáni malé množství molekul antigenu. V prvním kroku reaguje primární specifické antisérum a antigen prokazovaný ve tkáni. Ve druhém kroku je aplikována neoznačená specifická protilátka proti imunoglobulinům zvířete, jehož protilátky jsou použity v prvním a třetím kroku. Tato sekundární protilátka se nazývá také spojovací protilátka. Ve třetím kroku je nanášen značený komplex, například peroxidáza-anti-peroxidázový komplex (PAP), nebo alkalická

fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza (APAAP). V současné době se nejčastěji využívá nepřímé metody ABC (avidin-biotin komplex). Ta využívá k detekci protilátek vysoké vazební afinity mezi avidinem a biotinem. Na primární specifickou protilátku se naváže sekundární protilátka konjugovaná s biotinem. Avidin má schopnost vázat čtyři molekuly biotinu. Některá vazebná místa avidinu jsou volná a některá jsou obsazena komplexem biotin-peroxidáza. Enzymatická aktivita této peroxidázy nám pak indikuje místa v preparátu, na nichž došlo k primární specifické reakci. K dispozici jsou velmi citlivé detekční soupravy poskytující uspokojivé výsledky i při minimálním množství komplexu antigen-protilátka. (Dvořák et al., 2008; Tonar a Beranová, 2002)

V případě melanomu poslouží k první orientaci pozitivní reakce na vimentin a S100 protein spolu s negativní reakcí na cytokeratiny. Vimentin je jediným středním filamentem melanocytů a jejich derivátů. Údaje o koexpresi cytokeratinů u melanogenních nádorů jsou zcela ojedinělé. Nejčastěji používanými markery je S100 protein a protilátky HMB-45, Mart-1/Melan-A a Ki-67. HMB-45 znázorňuje buňky melanomu i névové buňky. Neznačí normální dospělé melanocyty a není vhodný k rozlišování benigních a maligních melanocytárních lézí. Protilátkou se pozitivně označilo 98% melanomů. (Lukáš, 1997)

Pro rutinní imunohistochemické vyšetření se, jak je uvedeno výše, využívá S100 protein, což je kyselý protein velmi rozšířený v centrálním i periferním systému. Jedná se o velmi senzitivní, ale ne příliš specifický marker. Nejvíce užitečný je při diagnostice nádoru nervových pochev a melanogenního systému, protože je exprimován melanomovými i névovými buňkami, nehodí se pro rozlišení maligní a benigní melanocytární léze, ale používá se k odlišení melanomu od jiných málo diferencovaných nemelanomových nádorů.

Nejčastěji používanou protilátkou proti melanomovému antigenu je HMB-45. Má relativně vysokou specifitu pro melanom a její pozitivita v hlubších nádorových vrstvách svědčí právě pro toto nádorové onemocnění. (Lukáš, 1997; Krajsová, 2006, Dvořák et al., 2008)

Samotná imunohistochemická metoda se provádí na usušených parafinových řezech při teplotě 60°C po dobu 24 hodin. Po uplynutí této doby se pokračuje následujícím postupem:

- 1) Deparafinace Xylen – 20 minut
- 2) 96% ethanol – oplach

- 3) 80% ethanol – oplach
- 4) 70% ethanol – oplach
- 5) H₂O destilovaná – oplach
- 6) Pufr pH=9 – vařit ve vodní lázni při 95-99 °C dle druhu protilátky
- 7) Chladnutí – 20 minut
- 8) Promývací pufr pH 7,4-7,8

Další inkubaci provádíme ve vlhké komoře při pokojové teplotě. Před nanášením detekčního systému je nutno udělat kroužek kolem tkáně tužkou PAP-PEN, aby se zabránilo plýtvání a roztékání chemikálií.

- 1) Duální enzymová blokáda – 5-10 minut
- 2) Promývací pufr – oplach 1-5 minut
- 3) Primární protilátka
- 4) Promývací pufr – oplach 1-5 minut
- 5) Značený polymer
- 6) Promývací pufr – oplach 1-5 minut
- 7) DAB Substrat – chromogen
- 8) H₂O destilovaná – oplach
- 9) Harrisův hematoxylin – 30 vteřin
- 10) H₂O tekoucí – oplach
- 11) 96% ethanol – oplach
- 12) Aceton – oplach
- 13) Aceton-xylen (1:1) – oplach
- 14) Xylen

Montování preparátu na sklíčko pak probíhá stejně jako v případě barvení na HE.

Na obarvených, zamontovaných preparátech se zvýrazní laboratorní číslo nesmývatelným fixem a dochází ke kompletaci s průvodním listem. Následně se preparáty vkládají do nosiče. Tyto nosiče s preparáty a průvodními listy se odevzdají lékařům.

Mikroskopování využívají jednak laboranti ke kontrole postupu barvení histologických preparátů a jednak lékaři k diagnostice.

Postup mikroskopování světelným mikroskopem:

- 1) Zapnutí síťového vypínače
- 2) Umístění filtru a nastavení vhodného jasu
- 3) Seřízení dioptrického nastavení

- 4) Seřízení očního rozestupu
- 5) Umístění preparátu na stolek mikroskopu do držáku preparátu
- 6) Seřízení změny zvětšení – nejčastěji používané zvětšení – 32x; 40x; 100x

8.3 Postanalytická fáze

Diagnostika, kterou provádí lékař – patolog, je založena na komparaci zjištěných morfologických změn – nejčastěji buněk či tkání a odborných zkušeností, které získal v rámci celého svého dosavadního vzdělávání v oboru patologická anatomie. K tomuto účelu nejvíc využívá dostupnou odbornou literaturu, webové servery, popř. konzultace se svými kolegy. Zjištěné nálezy včetně diagnóz jsou posléze cestou diktátu zaznamenány administrativní pracovníci ve výsledkovém listu. Ten je finálně zkontrolován lékařem – patologem, parafován a se všemi náležitostmi odeslán zpět klinickým lékařům. (Gomolčák, 1997; Vacek, 1996)

Pro diagnostiku se v preparátu obarveným Hematoxylin eosinem sledují buněčné struktury a přítomnost melaninu, transepidermální propagace a mitotická aktivita. V dalších krocích je vyšetření doplňováno o imunohistochemické stanovení S100 proteinu a HMB-45. S100 protein se barví při pozitivní reakci s příslušnou protilátkou cytoplazmaticky nebo nukleárně a HMB-45 cytoplazmaticky.

9 Výsledky

Prvním cílem práce bylo porovnat pozitivitu markeru MHB-45 u jednotlivých histologických kategorií melanomu.

V období od 1.1.2012 do 31.12.2018 bylo na Oddělení patologie Nemocnice Písek, a.s. imunohistochemicky vyšetřeno 63 preparátů melanomových lézí na pozitivitu markeru MHB-45. Z níže uvedené tabulky (tab. 1) je patrné, že marker HMB-45 byl ve většině případů ve všech kategoriích melanomu pozitivní.

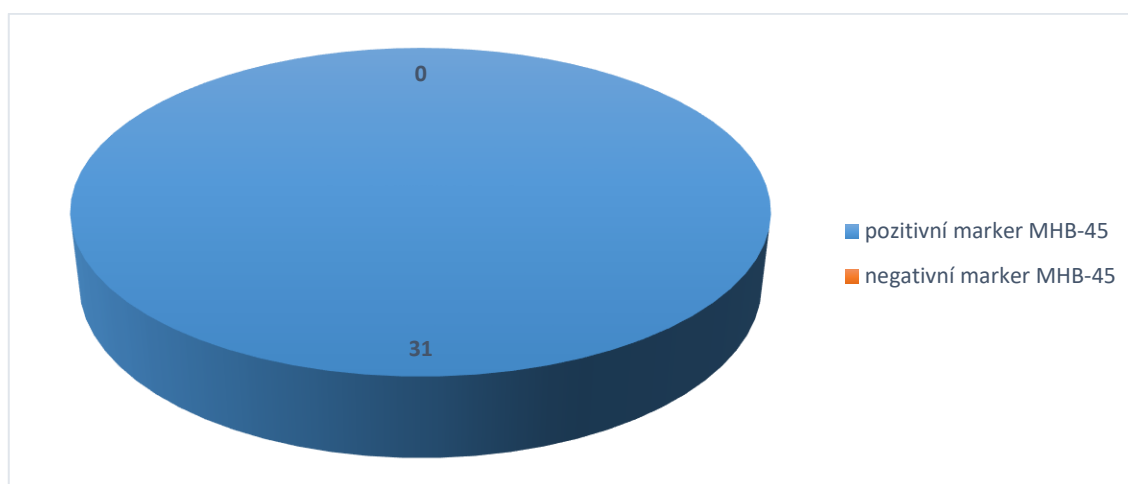
Tabulka 1. Porovnání positivity MHB-45 markeru u jednotlivých melanomových kategorií

Histologické kategorie melanomu	Marker MHB-45	
	počet pozitivních případů	počet negativních případů
Maligní melanom	31	0
Metastazující maligní melanom	15	3
Povrchově se šířící melanom	12	0
Akrolentiginózní melanom	1	1

Zdroj: vlastní výzkum

V kategorii maligní melanom byl marker HMB-45 pozitivní ve všech 31 případech, tedy ve 100% těchto vzorků, jak je patrné z níže uvedeného grafu a tabulky (obr.7, tab. 2.).

Obrázek č. 7: Grafické znázornění počtu pozitivních a negativních výsledků HMB-45 markeru u maligního melanomu



Zdroj: vlastní výzkum

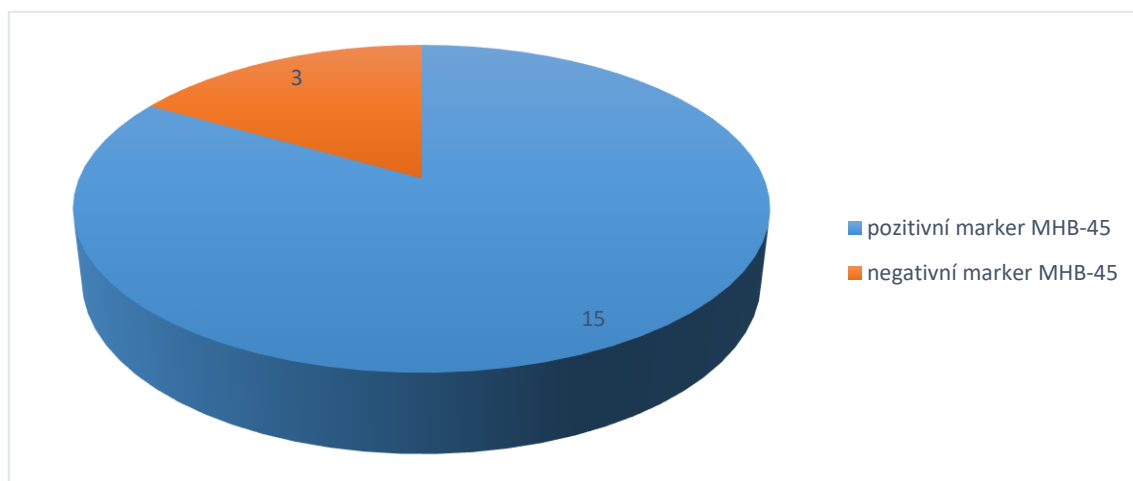
Tabulka č. 2.: Maligní melanom

	absolutní četnost	relativní četnost
počet pozitivních případů	31	100%
počet negativních případů	0	0%

Zdroj: vlastní výzkum

V kategorii metastazující maligní melanom byl marker HMB-45 z celkově 18 vzorků v 15 případech pozitivní, tedy v 83% případů, negativní byl pouze ve 3 případech, tedy v 17% (obr. 8, tab. 3)

Obrázek č. 8.: Grafické znázornění počtu pozitivních a negativních výsledků HMB-45 markeru u metastazujícího maligního melanomu



Zdroj: vlastní výzkum

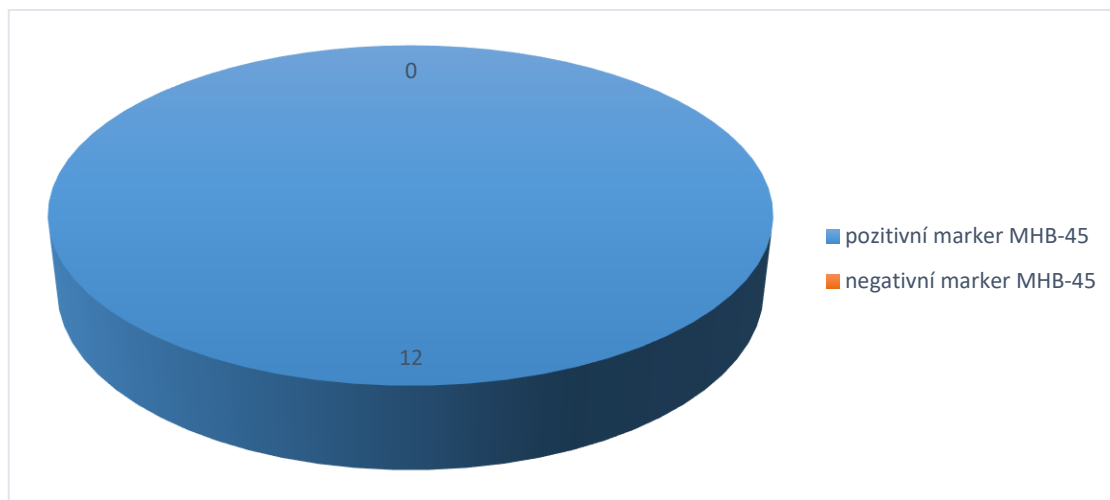
Tabulka č.3.: Metastazující maligní melanom

	absolutní četnost	relativní četnost
počet pozitivních případů	15	83%
počet negativních případů	3	17%

Zdroj: vlastní výzkum

V kategorii povrchově se šířící melanom byl ve všech 12 případech marker HMB-45 pozitivní (obr. 9, tab. 4).

Obrázek č. 9.: Grafické znázornění počtu pozitivních a negativních výsledků HMB-45 markeru u povrchově se šířícího melanomu



Zdroj: vlastní výzkum

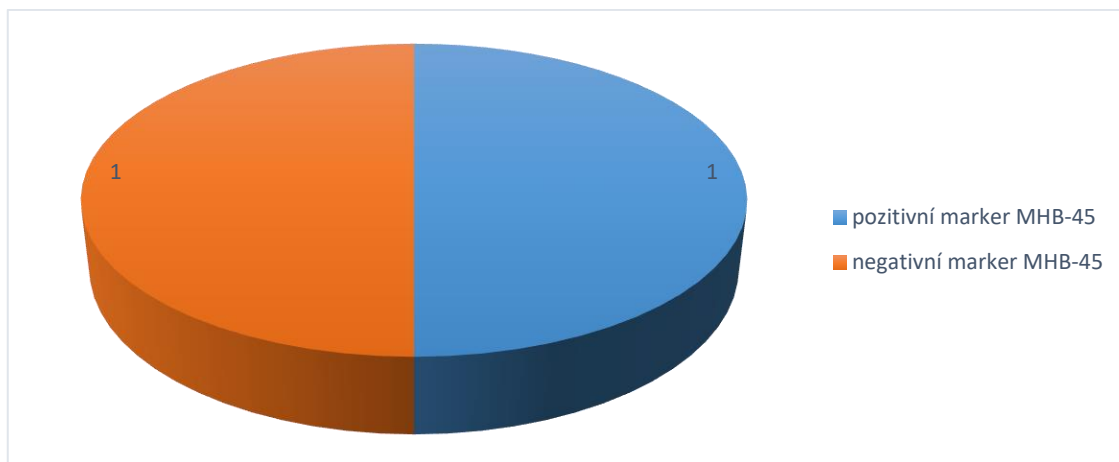
Tabulka 4.: Povrchově se šířící melanom

	absolutní četnost	relativní četnost
počet pozitivních případů	12	100%
počet negativních případů	0	0%

Zdroj: vlastní výzkum

V poslední kategorii akrolentiginózní melanom byly pouze dva vzorky, z toho byl v jednom případě marker HMB-45 pozitivní a v druhém případě negativní (obr. 10, tab. 5).

Obrázek č. 10.: Grafické znázornění počtu pozitivních a negativních výsledků HMB-45 markeru u akrolentiginózního melanomu



Zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 5.: Akrolentiginózní melanom

	absolutní četnost	relativní četnost
počet pozitivních případů	1	50%
počet negativních případů	1	50%

Zdroj: vlastní výzkum

Druhým cílem práce bylo potvrdit naprostou převahu imunohistochemického profilu u všech histologických kategorií melanomu. Imunohistochemický profil melanomu lze charakterizovat jako vimentin, S 100 protein a HMB-45 pozitivní a cytokeratin negativní.

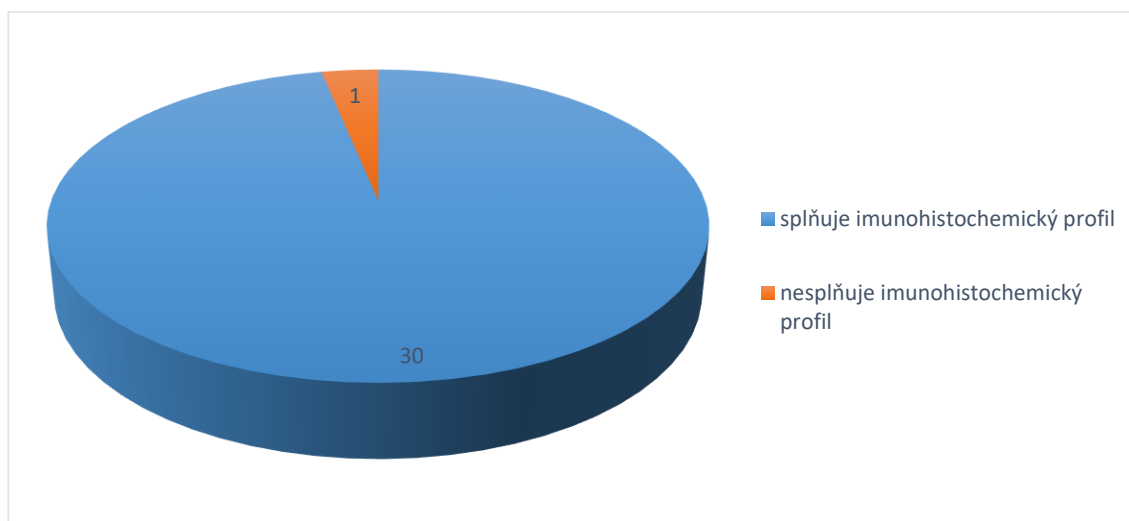
Tabulka 6.: Imunohistochemický profil u jednotlivých kategorií melanomu

Histologická kategorie melanomu	Imunohistochemický profil	
	ano	ne
Maligní melanom	30	1
Metastázující maligní melanom	15	3
Povrchově se šířící melanom	12	0
Akrolentiginózní melanom	1	1

Zdroj: vlastní výzkum

V kategorii maligní melanom byl imunohistochemický profil prokázán ve 30 případech z 31 vzorků, jak je patrné z obrázku 5 a tabulky 7.

Obrázek č. 11.: Grafické znázornění průkazu IHC profilu v kategorii maligní melanom



Zdroj: vlastní výzkum

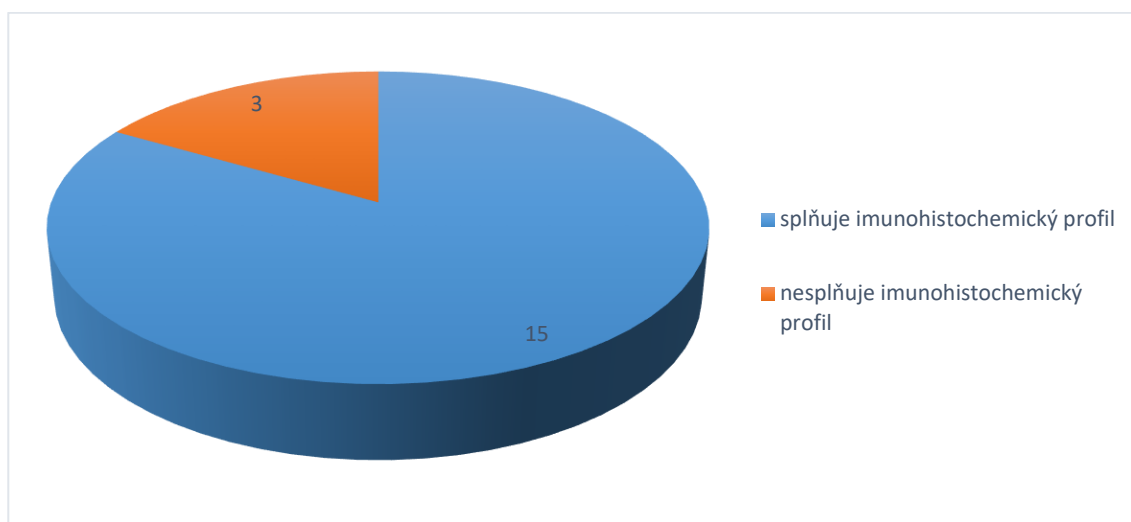
Tabulka 7. IHC profil maligních melanomů

	absolutní četnost	relativní četnost
počet splněných imunohistochemických profilů	30	97%
počet nesplněných imunohistochemických profilů	1	3%

Zdroj: vlastní výzkum

V případě metastazujícího maligního melanomu byl imunohistochemický profil prokázán v 15 vzorcích, ve zbylých 3 prokázán nebyl.

Obrázek č. 12.: Grafické znázornění průkazu IHC profilu v kategorii metastazující maligní melanom



Zdroj: vlastní výzkum

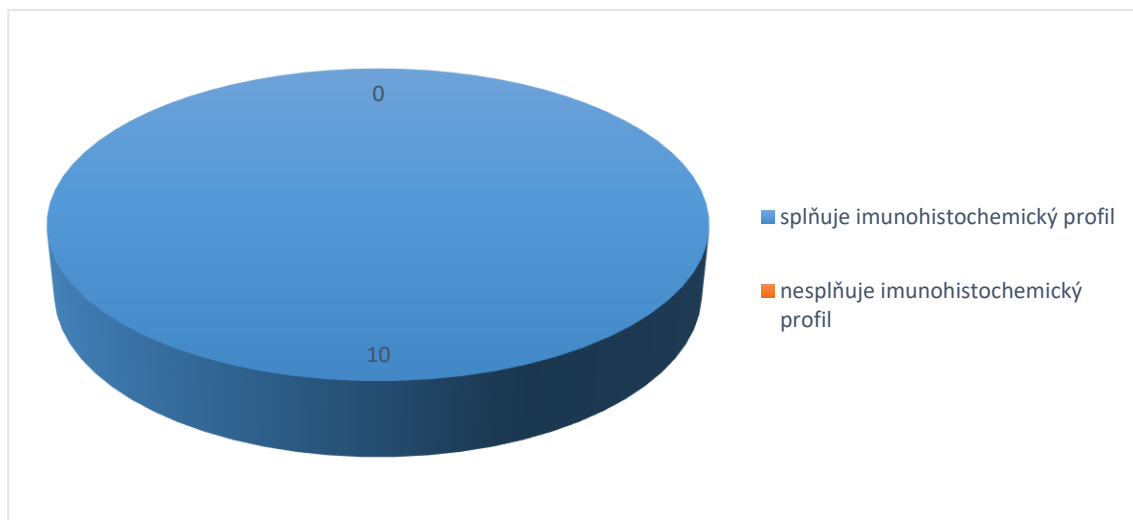
Tabulka 8. IHC profil metastazujících maligních melanomů

	absolutní četnost	relativní četnost
počet splněných imunohistochemických profilů	15	83%
počet nesplněných imunohistochemických profilů	3	17%

Zdroj: vlastní výzkum

V kategorii povrchově se šířící melanom byl imunohistochemický profil prokázán ve všech 12 vzorcích.

Obrázek č. 13.: Grafické znázornění průkazu IHC profilu v kategorii povrchově se šířící melanom



Zdroj: vlastní výzkum

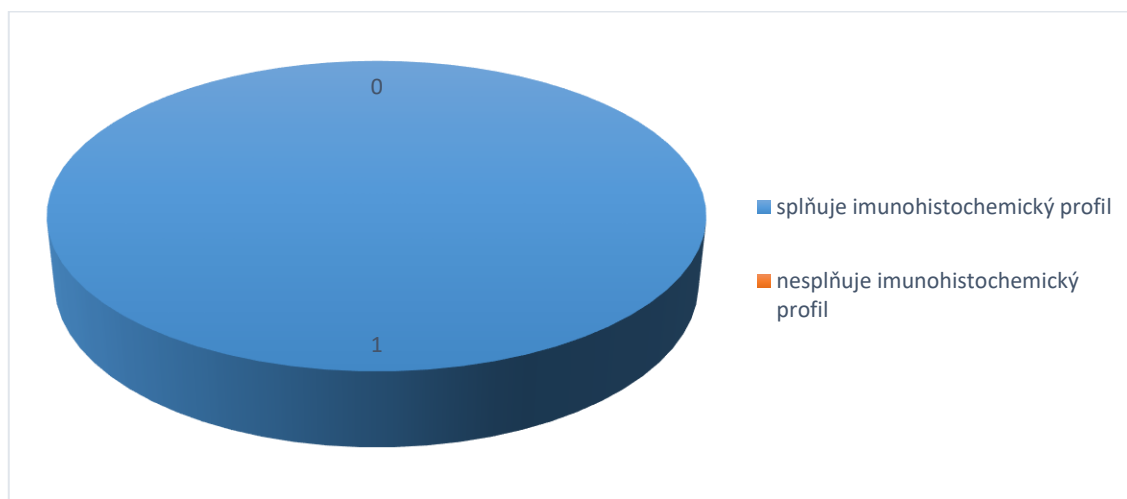
Tabulka 9. IHC profil povrchově se šířících melanomů

	absolutní četnost	relativní četnost
počet splněných imunohistochemických profilů	12	100%
počet nesplněných imunohistochemických profilů	0	0%

Zdroj: vlastní výzkum

V poslední kategorii akrolentiginózní melanom v jednom případě imunohistochemický profil prokázán byl, v druhém případě nebyla provedena celá paleta protilátek, proto jej nelze hodnotit (obr. 14, tab. 10).

Obrázek č. 14.: Grafické znázornění průkazu IHC profilu v kategorii akrolentiginózní melanom



Zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 10. IHC profil akrolentiginózních melanomů

	absolutní četnost	relativní četnost
počet splněných imunohistochemických profilů	1	100%
počet nesplněných imunohistochemických profilů	0	0%

Zdroj: vlastní výzkum

10 Diskuze

V období od 1. 1. 2012 do 31. 12. 2018 bylo na Oddělení patologie Nemocnice Písek, a.s. imunohistochemicky vyšetřeno 63 preparátů melanomových lézí. Z toho 31 pacientům byl diagnostikován maligní melanom, 18 pacientům povrchově se šířících melanom, 16 pacientům metastazujících maligní melanom a 2 pacientům akrolentiginózní melanom.

V první polovině praktické části jsem se zaměřila na porovnání pozitivitu HMB-45 markeru u všech histologických kategorií melanomu. HMB-45 marker je vysoce specifický a je vhodný pro odlišení maligního melanomu od nemelanocytárních nádorů, které nemají melanocytární původ. Jak je vidět z výsledků, v případě maligního melanomu a povrchově se šířícího melanomu byl HMB-45 marker pozitivní ve 100 % případů. V kategorii metastazující maligní melanom bylo 83% případů pozitivních a v kategorii akrolentiginózní melanom byl jeden ze dvou případů negativní. Ovšem z důvodu nízkého počtu vzorků v poslední kategorii, nelze považovat výsledek za směrodatný. Ohsie et al. (2008) ve své studii udává, že primární melanomy jsou pozitivní z 69% až 93% případů a metastazující melanomy jsou pozitivní z 58-83%. První z cílů byl tedy v souladu se statistickým výskytem uváděným v odborné literatuře a jasně splnil stanovený předpoklad, že by mělo být alespoň 80% zkoumaných vzorků hodnoceno jako pozitivních.

V druhé polovině praktické části jsem hodnotila imunohistochemický profil u všech histologických kategorií melanomu s cílem potvrdit naprostou převahu IHC profilu. Aby byl imunohistochemický profil považován za pozitivní, musí být markery vimentin, S 100 protein a HMB-45 pozitivní a cytokeratin negativní. Tak tomu bylo v 92 % zkoumaných preparátů. Konkrétně v kategorii maligní melanom byl IHC profil prokázán v 97%, v kategorii metastazující maligní melanom byl IHC profil pozitivní v 83%, v kategorii povrchově se šířící melanom byl IHC profil prokázán ve všech případech v kategorii akrolentiginózní melanom nebyla provedena celá paleta protilátek, proto jej nebylo možné hodnotit. Druhý z cílů práce lze rovněž hodnotit jako pozitivní, neboť imunohistochemický melanomový profil jasně dominuje u všech skupin (s výjimkou nehodnotitelného akrolentiginózního melanomu). Stanovená hodnota 80% případů byla jednoznačně dosažena.

11 Závěr

Maligní melanom je nejnebezpečnější formou kožní rakoviny s potenciálem metastazovat. V posledních letech se stabilizoval počet nových případů u žen bez ohledu na věk, ale nadále stoupá incidence u mužů, a to hlavně staršího věku. Protože je prognóza počínajících melanomů dobrá, je včasná diagnostika a následovné zahájení léčby důležité. Přestože by se mohlo zdát, že není důvod, aby pacient přišel k lékaři s kožním nádorem pozdě, protože jsou kožní změny volně přístupné ke sledování každému z nás, opak bývá naneštěstí často pravdou.

Základem stanovení diagnózy je histopatologické vyšetření, kterému předchází klinické vyšetření dermatologem a chirurgická excize nádoru. Ke zpřesnění diagnózy, zjištěné z histologických preparátů barvených hematoxylinem-eozinem se využívá imunohistochemické barvení. Při tomto vyšetření se nejčastěji indikuje protilátka S 100 protein, HMB-45, vimentin a cytokeratin. Pomocí markeru HMB-45 lze odlišit melanocytární nádor od nádoru jiného původu. V našem případě byl tento marker pozitivní v 59 případech z celkových 63.

Aby byl potvrzen imunohistochemický profil melanomu, musí být první tři výše uvedené protilátky pozitivní a cytokeratin negativní. V naprosté většině zkoumaných preparátů tento imunohistochemický profil byl prokázán a tím byl splněn druhý cíl. Stanovené cíle, tedy porovnat pozitivitu markeru HMB-45 u jednotlivých histologických kategorií melanomu a potvrdit naprostou převahu imunohistochemického profilu u všech histologických kategorií melanomu, lze vzhledem k výše popisovaným datům hodnotit jako splněné s výsledky potvrzujícími původní předpoklady.

12 Bibliografie

1. LEBOIT, P., E., BURG, G., 2006. *Pathology and Genetics of Skin Tumours*. Lyon: IARC Press. ISBN 9789283224143.
2. ELDER, D., E., MASSAI, D., SCOLYER, R., WILLEMZE, R., 2018. *WHO Classification of Skin Tumours*. 4th edition. Lyon: IARC Press. ISBN 978-92-832-2440-2.
3. ROSAI, J., ACKERMAN, L., V., 2011. *Rosai and Ackerman's surgical pathology*. 10th edition. Edinburgh; New York: Mosby. ISBN 9780323069694.
4. KRAJSOVÁ, I., 2006. *Melanom [klasifikace, diagnostika, terapie, prevence]*. Praha : Maxdorf-Jessenius. ISBN 80-7345-096-8.
5. RYŠKA, A., a další., 2017. Maligní melanom – od klasické histologie k molekulárně genetickému testování. *Klinická onkologie*. 30(3), ISSN 1802-5307.
6. DITRICOVÁ, D., JANSOVÁ, M., OPAVSKÝ, R., 2002. *Repetitorium dermatovenerologie*. Olomouc: Epava. ISBN 80-86297-08-X.
7. KLENER, P., 2002. *Klinická onkologie*. Praha: Galén. ISBN 80-7262-151-3.
8. PIZINGER, K., 2003. *Kožní pigmentové projevy*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0616-4.
9. BECKER, H., D., HOHENBERGER, W., JUNGINGER, T., SCHLAG, P., M., 2005. *Chirurgická onkologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0720-9.
10. BAJČIOVÁ, V., ŠTĚRBA, J., TOMÁŠEK, J., a kol., 2011. *Nádory adolescentů a mladých osob*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3554-2.
11. ZÁMEČNÍK, J., a kol., 2019. *Patologie*. Praha: Prager publishing. ISBN 978-80-270-6457-1
12. VACEK, Z., 1996. *Histologie a histologická technika II. část*. Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-202-7
13. KRŠKA, Z., HOSKOVEC, D., PETRUŽELKA, L. a kolektiv, 2014. *Chirurgická onkologie*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4284-7
14. GOMOLČÁK, P., 1997. *Základy imunohistochemie v patologii*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-239-6.
15. JIRKOVSKÁ, M., 2006. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. Praha: Galén. 80 s. ISBN 978-80-7262-263-4.
16. KRUŽNICOVÁ, Z., 2010. *Maligní melanom. Zdravotnictví a medicína*. [online]. [cit. 2019-9-19] Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/malignni-melanom-450829-2336-2987>.
17. ARENBERGEROVÁ, M., ARENBERGER, P., 2005. *Maligní melanom kůže. Melanomy*. [online] 2005. [cit: 2019-10-30] Dostupné z: <http://www.melanomy.cz/?touch=malignnimelanom>
18. DVOŘÁK, K., DVOŘÁKOVÁ, Z., FEIT, J., LUKÁŠ, Z., ŠMARDOVÁ, J., 2008. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod*. [online]. [cit. 2019-11-20]. Dostupné z: <https://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histmet.pdf>
19. BERANOVÁ, M., TONAR, Z., 2002. *Principy a příklady imunohistochemie*. [online]. [cit. 2019-10-8]. Dostupné z: http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc_hi_res.pdf

20. ARENBERGER, P., 2006. *Maligní melanom a ostatní nádory kůže. Linkos - Česká onkologická společnost České lékařské společnosti J. E. Purkyně.* [online]. [cit. 2019-10-4]. Dostupné z: www.linkos.cz. ISSN 2570-8791.
21. RIGEL, D.S., CARUCCI, J.A., 2000. Malignant melanoma: Prevention, early detection, and treatment in the 21st Century. *CA-A Cancer Journal for Clinicians*. 50(4), 215-236. doi: 10.3322/canjclin.50.4.215
22. TUONG, W., CHENG, L. S., ARMSTRONG, A. W., 2012. Melanoma: epidemiology, diagnosis, treatment, and outcomes. *Dermatologic clinics*, 30(1), 113-124. doi: 10.1016/j.det.2011.08.006
23. ZLEJŠILOVÁ, J., LIPTÁKOVÁ, K., 2013. Krémy s UV faktorem jako prevence maligního melanomu. *Sestra*. 23(5), 45-46. ISSN 1210-0404
24. ABBASI, N., R., SHAW, H., M., RIGEL, D., S., et al., 2004. Early diagnosis of cutaneous melanoma – Revisiting the ABCD criteria. *Jama-Journal of the American Medical Association*. 292(22), 2771-2776. doi: 10.1001/jama.292.22.2771
25. LUKÁŠ, Z., DRÁBEROVÁ, E., FEIT, J., VOJTĚŠEK, B., 1997. *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-0620-X
26. GOWN, A., M., VOGEL, A., M., HOAK, D., GOUGH, F., MCNUTT, M., A., 1986. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *The American Journal of Pathology*. [online]. [cit. 2020-1-14]. 123(2), 195-203. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1888307/>
27. IDIKIO, H., A., 2009. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life – cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains. *International journal of clinical and experimental pathology*. [online]. [cit. 2020-1-14]. 3(2), 169-176. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809997/>
28. FIKRLE, T., PIZINGER, K., 2010. Maligní melanom. *Solen*. [online]. [cit. 2020-2-14]. 4(4), 225-228. Dostupné z: https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201004-0003_Maligni_melanom.php
29. OHSIE, S., J., SARANTOPOULOS, G., P., COCHRAN, A., J., BINDER, S., W., 2008. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology*. [online]. [cit. 2020-2-14]. 35(5), 433-444. doi: 10.1111/j.1600.2007.00891.x
30. LAKOMÝ, R., POPRACH, A., KOUKALOVÁ, R., 2013. Současné možnosti léčby pokročilého a metastatického maligního melanomu. *Onkologie*. 7(2), s. 65-68. ISSN 1802-4475