



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Úloha histologického laboranta při diagnostickém procesu u karcinomu prostaty

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor: Martina Loudová

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Holan

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Úloha histologického laboranta při diagnostickém procesu u karcinomu prostaty 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

.....
podpis

Poděkování

(předvolený formát viz složka s názvem Doplnující vzory včetně log)

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce a primáři Oddělení patologicko – anatomickému, Nemocnice Písek a.s., MUDr. Pavlu Holanovi, který mě podporoval a vždy dobře poradil.

Můj dík patří i vrchní laborantce, paní Marcele Máškové Dis., která mě všemu naučila a vždy měla dostatek trpělivosti.

Děkuji i svým kolegyním z Oddělení patologicko – anatomického, které mi pomohly vždy, když jsem potřebovala.

Největší dík patří mé rodině, která měla se mnou opravdu velkou trpělivost a vždy mě podpořila.

Úloha histologického laboranta při diagnostickém procesu u karcinomu prostaty

Abstrakt

Bakalářská práce se zabývá imunohistochemickým vyšetřením při diagnostice karcinomu prostaty. Dále se zabývá korelací mezi diagnostickými závěry z punkčních biopsií prostaty a radikální prostatektomie. Práce byla vypracována na Oddělení patologicko – anatomickém, Nemocnice Písek a.s. Oddělení patří spíše mezi menší, ale řádně akreditované, pracující v režimu normy ČSN EN ISO 15189.

V teoretické části je zpracovaná anatomie, topografie a fyziologie prostaty. Největší část je zde věnována patologii. Nezhoubné onemocnění prostaty bývá velmi častým onemocněním a způsobují nejvíce klinických příznaků. Karcinom prostaty je většinou pouze lokalizovaný, do dalších orgánů se rozšiřuje méně. Pokud metastazuje, potom většinou do kostí nebo do lymfatických uzlin. Popisují zde i diagnostické možnosti a klasifikaci nádoru, která napomáhá k určení léčby.

V praktické části charakterizují Oddělení patologicko – anatomické, Nemocnice Písek a.s. Popisují zde proces, kterým se zpracovává histologický materiál, od jeho příjmu až po odevzdání lékaři. Důležitá součást diagnózy může být imunohistochemické vyšetření. Jedná se o speciální barvení, které je založené na reakci antigenu a protilátky. Na našem oddělení se k diagnostice karcinomu prostaty používají dvě protilátky. Monoklonální myší antihumánní prostatický specifický membránový antigen (PSMA) a monoklonální myší antihumánní cytokeratin, s vysokou molekulovou hmotností (CK HMW). Reakce probíhá nepřímou dvojstupňovou metodou. To znamená, že se na antigen naváže primární protilátka, na kterou se poté naváže protilátka sekundární. Sekundární protilátka obsahuje chromogen, který slouží k vizualizaci reakce.

V databázi pacientů Oddělení patologicko – anatomického, Nemocnice Písek a.s. jsem vyhledala vyšetření punkční biopsie prostaty a radikální prostatektomie a pozorovala u nich možnou korelaci.

Abstrakt v českém jazyce

(předvolený formát viz složka s názvem Doplnující vzory včetně log)

Klíčová slova

Karcinom prostaty; imunohistochemické vyšetření; punkční biopsie; radikální prostatektomie

The role of the histological laboratory technician in the diagnostic process in prostate cancer

Abstract

The bachelor thesis deals with immunohistochemical examination in the diagnosis of prostate cancer. It also deals with the correlation between diagnostic conclusions from puncture biopsies of the prostate and radical prostatectomy. The work was prepared at the Department of Pathology – Anatomical, Hospital Písek a.s. The department is rather one of the smaller but properly accredited, working in the ČSN EN ISO 15189 standard mode.

In the theoretical part is processed anatomy, topography and physiology of the prostate gland. The largest part here is devoted to pathology. Benign prostate disease is a very common disease and causes the most clinical symptoms. Prostate cancer is usually only localized, it spreads less to other organs. If it metastasizes, then mostly to the bones or to the lymph nodes. I also describe the diagnostic options and classification of the tumor, which helps to determine the treatment.

In the practical part I characterize the Department of Pathology – Anatomical, Hospital Písek a.s. I describe here the process by which histological material is processed, from its reception to the surrender to the doctor. An important part of diagnosis can be immunohistochemical examination. This is a special coloring, which is based on the reaction of the antigen and antibody. In our department, two antibodies are used to diagnose prostate cancer. Monoclonal mouse antihuman prostate specific membrane antigen (PSMA) and monoclonal mouse antihuman cytokeratin, high molecular weight (CK HMW). The reaction is carried out by an indirect two-stage method. This means that the primary antibody is based on the antigen, which is then followed by a secondary antibody. The secondary antibody contains a chromogen, which is used to visualize the reaction.

In the patient database of the Department of Pathology – Anatomical, Hospital Písek a.s., I examined the examination of puncture biopsy of the prostate and radical prostatectomy and observed a possible correlation with them.

Keywords

Prostate cancer; immunohistochemical examination; puncture biopsy; radical prostatectomy

Obsah

1	Úvod	10
1.1	Uvedení práce.....	10
2	Anatomie, topografie	10
3	Fyziologie	13
4	Nezhoubné onemocnění prostaty	14
4.1	Akutní prostatitid	14
4.2	Chronická prostatitis	14
4.3	Granulomatózní prostatitis	14
4.4	Specifická prostatitis	15
4.5	Malakoplakie.....	15
4.6	Benigní hyperplazie prostaty.....	15
5	Karcinom prostaty	15
5.1	Histologické subtypy.....	16
5.1.1	<i>Prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN)</i>	16
5.1.2	<i>Atypická proliferace malých acinů</i>	16
5.1.3	<i>Hlenotvorný adenokarcinom</i>	16
5.1.4	<i>Malobuněčný karcinom</i>	16
5.1.5	<i>Duktální karcinom</i>	16
5.1.6	<i>Dlaždicobuněčný karcinom</i>	17
5.1.7	<i>Karcinom z přechodného epitelu</i>	17
5.1.8	<i>Adenokarcinom</i>	17
5.2	Diagnostické možnosti	18
5.2.1	<i>Vyšetření per rectum</i>	18
5.2.2	<i>Transrektální ultrasonografie (TRUS)</i>	18
5.2.3	<i>Výpočetní tomografie a magnetická rezonance</i>	18
5.2.4	<i>Scintigrafie skeletu</i>	18
5.3	Staging.....	18
5.3.1	<i>TNM klasifikace</i>	19
5.4	Grading.....	20
5.4.1	<i>Klinická stádia</i>	21
5.4.2	<i>Prognostické skupiny</i>	21
5.5	Léčba karcinomu prostaty	21
5.6	Léčba lokalizovaného karcinomu prostaty.....	22
5.7	Léčba lokálně pokročilého a metastatického karcinomu prostaty	22

6	Role histologického laboranta v diagnostickém procesu onemocnění předstojné žlázy	22
6.1	Charakteristika oddělení.....	22
6.1.1	<i>Bioptická laboratoř</i>	22
6.1.2	<i>Cytologická laboratoř</i>	22
6.1.3	<i>Nekroptická laboratoř</i>	23
6.1.4	<i>Imunohistochemická laboratoř</i>	23
6.1.5	<i>Konzultační činnost laboratoře</i>	23
7	Cíle práce	23
7.1	Přínos imunohistochemického vyšetření v rámci diferencovaně diagnosticky obtížných lézí prostaty	23
7.1.1	<i>Získávání protilátek pro imunohistochemii</i>	24
7.1.2	<i>Základní typy imunohistochemických metod</i>	24
7.1.3	<i>Blokování endogenní aktivity enzymů</i>	25
7.1.4	<i>Blokování pozadí</i>	25
7.1.5	<i>Chromogen</i>	26
7.1.6	<i>Artefakty</i>	26
7.1.7	<i>Kontroly</i>	26
7.1.8	<i>Příprava roztoků</i> :.....	29
7.2	Korelace mezi diagnostickými závěry z vyšetření vzorků punkčních a z radikálních prostatektomií.....	30
7.2.1	<i>Korelace mezi punkční biopsií a radikální prostatektomií</i>	31
8	Metodika	31
8.1	Preanalytická fáze	31
8.2	Analytická fáze.....	33
8.2.1	<i>Barvení preparátů</i>	35
8.3	Postanalytická část	37
8.3.1	<i>Nebezpečné chemikálie</i>	38
9	Výsledky	39
10	Diskuze	42
11	Závěr	43
12	Použité zkratky	44
13	Přílohy	45
14	Seznam literatury	51

1 Úvod

1.1 Uvedení práce

V dnešní době je karcinom prostaty druhým nejčastějším druhem rakoviny u mužů. Nejvyšší výskyt je v Severní Americe, Karibiku, Brazílii, některých západoevropských zemích, Austrálii a na Novém Zélandu. Nejnižší výskyt je v Asii, několika zemích Blízkého východu a Africe. Počet diagnostikovaných případů přibývá, ale klesá úmrtnost, protože se díky screeningovému vyšetření prostatického specifického antigenu (PSA) zjistí karcinom v raném stádiu. Nevýhoda tohoto screeningového vyšetření je v tom, že PSA vylučují jak zdravé buňky, tak i buňky postižené rakovinou.

Histologické vyšetření je stále velmi důležité při diagnostice řady chorob. Rozhodující roli zde hrají dobře připravený preparát a zkušenosti patologa.

Technická dokonalost postupu při odběru materiálu je předpokladem správného určení diagnózy. Poté musí být vzorek správně a pečlivě zpracován v histologické laboratoři. Fáze zpracování vzorků záleží na šikovnosti a zkušenosti laborantů. Tkáň se musí nejdříve dobře zalít do parafinu, následně pak nakrájet, aby tkáň byla celá i s povrchem. Barvení provádí barvicí automat, ale při následném montování obarvených skel, musí laborant zkontrolovat, jestli je tkáň správně obarvená a zda je celá. Pokud se patologovi preparát nezdá dobrý, nechá si ho ještě jednou prokrojit. Patolog určí diagnózu, u karcinomů i prognózu, jak by se mohla nemoc vyvíjet. Pokud si není zcela jistý nebo potřebuje potvrdit diagnózu, udělá se u tkáně ještě imunohistochemické vyšetření.

V dnešním oboru patologie je imunohistochemie nezbytnou metodikou pro přesnou onkologickou diagnostiku. Každý nádor má charakteristický imunofenotyp, který napomáhá v diagnóze. Imunohistochemické vyšetření je založeno na reakci komplexu protilátka – antigen. V současné době jsou protilátky dodávány jako hotové sety, okamžitě připravené k použití.

2 Anatomie, topografie

Předstojná žláza neboli prostata má svalovou a žlázovou strukturu a je umístěna bezprostředně pod močovým měchýřem a kolem počátku močové trubice. Má tvar

komolého, předožadně mírně oploštělého kužele, obráceného bazí vzhůru k měchýři.

Skládá se z těchto částí:

- ***basis prostatae*** – baze prostaty – těsně přiléhá k močovému měchýři, do baze se vtlačuje krček měchýře
- ***apex prostatae*** – hrot prostaty – míří dopředu a dolů, dosahuje k *diaphragma urogenitale*

Prostatou probíhá úsek močové trubice od baze k apexu.

- ***pars prostatica urethrae*** – urethra pokračuje poté dále samostatně

Urethra probíhá blíže přední stěně prostaty a dělí jí na:

– preurethrální část – přední menší část

– retrourethrální část – zadní větší část

Přední plocha – *facies anterior* – je obrácená k symfýse a je s ní spojena pomocí *ligamenta puboprostatica* a *musculus puboprostaticus*.

Zadní plocha – *facies posterior* – je obrácena k rektu a je per rectum hmatná, uprostřed je lehce prohnutá.

Šikmé boční plochy (označované jako *facies inferolaterales*) jsou oblé, obrácené k *musculus lektor ani* a jsou k jeho fascii připojeny vazivem.

Mezi rektum a prostatu je vloženo ***septum rectovesicale*** (*fascia retroprostatica*) – vazivová ploténka silná asi 2 milimetry, do níž jsou také zavzaty *vesiculae seminales*.

Povrch prostaty je tvořen vazivovým obalem – ***capsula propria***. Je pevně srostlý s vazivem a hladkou svalovinou orgánu. Zvenčí na *capsula propria* naléhá *plexus venosus prostaticus*.

Prostatické žlázy tvoří epitel tuboalveolární a je jednořadý až víceřadý, s buňkami plochými až vysokými cylindrickými. Tvar buněk je závislý na sekreční aktivitě, hormonální situaci a na stáří muže. Vysoké cylindrické buňky jsou vlastní činné žlázné buňky. Ty obsahují sekreční granula a vakuoly. Lysosomy v cytoplazmě obsahují kyselou fosfatázu. V buňkách se nacházejí i další enzymy (5 – alfa – reduktáza a argináza). Tepny přicházejí k prostatě zezadu a ze strany a to z *arteria rectalis media* a z *arteria vesicalis inferior*. Zepředu zdola přicházejí větve z *arteria pudenda interna*. Tepenné větve vytvářejí ve vazivovém pouzdru síť a z ní postupují drobnější větve dovnitř žlázy. Žíly vytvářejí pleteň (*plexus venosus prostaticus*) na povrchu žlázy. Pleteň má spojení s *plexus venosus vesicalis* a z ní odtéká krev cestou *venae vesicales*

do *venae iliaca interna*. Nervy do prostaty přicházejí cestou *plexus hypogastricus inferior*. Jsou to hlavně autonomní nervová vlákna. V pouzdru prostaty se nacházejí gangliové buňky autonomních pletení. V prostatě se kolem žlázek vyskytují četná nervová zakončení, mezi nimi též sensitivní nervová zakončení typu Vater – Paciniho tělísek. Hladký sval prostaty je inervován sympatickými vlákny, která se aktivují během ejakulace. [1,2].

Průměrné rozměry prostaty jsou 3,4 cm na délku, 4,4 cm na šířku a 2,6 cm v tloušťce. Hmotnost normální žlázy je mezi 15 a 20 g.

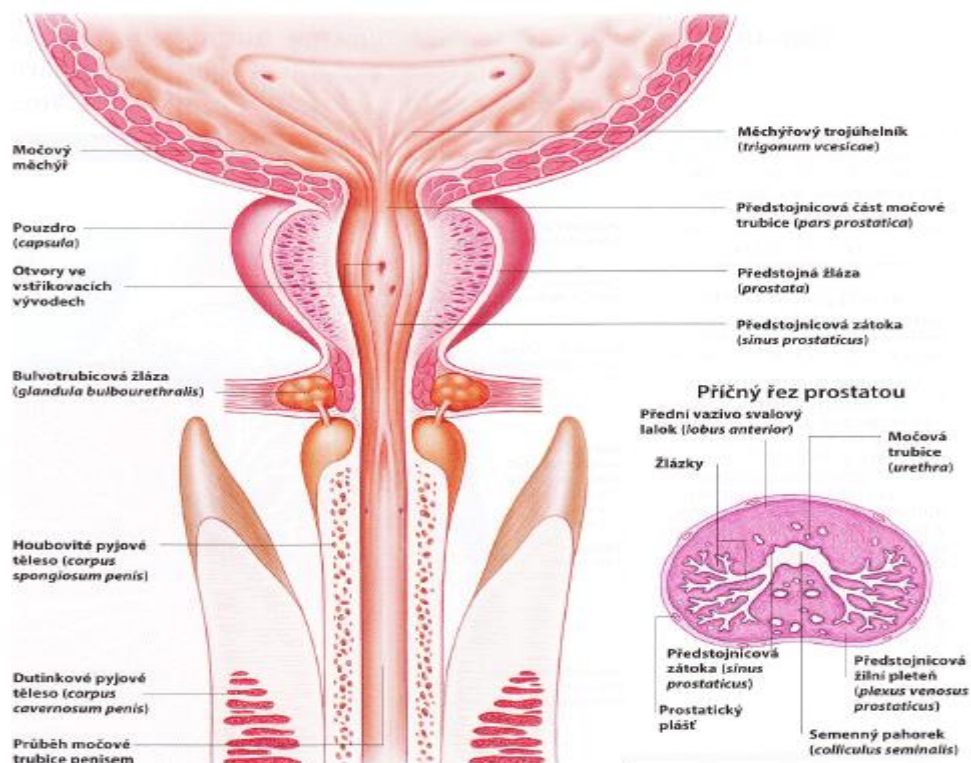
Tradičně je prostata rozdělena na anatomické laloky (inferoposterior, inferolaterální, superomediální a anteromední) močovou tubicí a ejakulačními orgány. Nicméně, klinicky důležitější je histologické rozdělení prostaty do tří zón.

Centrální zóna obklopuje ejakulační kanály, zahrnující přibližně 25% normálního objemu prostaty. Maligní novotvary centrální zóny jsou vzácné.

Přechodná zóna se nachází centrálně a obklopuje močovou tubicí, zahrnující přibližně 5 – 10% normálního objemu prostaty.

Periferní oblast představuje hlavní místo původu prostatitidy a rakoviny prostaty.

Periferní zóna tvoří hlavní těleso žlázy (přibližně 65%). Periferní zóna je především oblast pocíťovaná proti konečníku. [3]



Obrázek č. 1 *Popis prostaty* (převzato z <http://www.urologie-uh-hradiste.cz/Prostata.html>)

3 Fyziologie

Prostata je exokrinní žláza a je součástí mužské reprodukce. Produkuje prostatický sekret o pH 6,4 a tvoří až 30% objemu ejakulátu. Kromě jiných látek obsahuje sekret především prostatický specifický antigen (PSA). PSA je kódován genem, který je uložen na 19. chromozomu. Poprvé byl objeven v roce 1969 a klinicky je využíván od počátku 80. let. Prostatický specifický antigen je v současné době nejvýznamnějším ukazatelem (markerem) karcinomu prostaty. Je vylučován do semenné tekutiny, kde je zodpovědný za zkapalňování spermatu, čímž umožňuje pohyblivost spermií. Jeho koncentrace ve spermatu je velmi vysoká (0,2–0,5 mg/ml). Do krevního oběhu proniká přechodem přes bazální membránu, přičemž zvýšení propustnosti je dáno narušením architektoniky žlázek (zánět, karcinom, trauma). V séru se vyskytuje ve 2 formách – volný a vázaný s alfa 1 antichymotrypsinem nebo s alfa 2 makroglobulinem. Laboratorně stanovitelný je vázaný PSA na alfa 1 antichymotrypsin (cca 50–90 % stanovitelného PSA) a volný PSA (cca 5–50 % stanovitelného PSA). Komplex PSA s alfa 2 makroglobulinem tvoří nedetekovatelnou složku. Je produkován normálními i rakovinnými buňkami.

Hodnocení koncentrace PSA je dáno dle věku muže:

- Do 49 let jsou normální hodnoty do 2,5 ng/ml
- Věk 50–59 jsou přípustné hodnoty do **3,5 ng/ml**
- Pro věk 60–69 jsou to hodnoty do **4,5 ng/ml**
- 70 a výše můžou normální hodnoty dosahovat **až 6,5 ng/ml**

Neustále se pracuje na objevení více specifických markerů. V rámci klinického testování jsou to např: PSMA (prostatický membránový antigen), Ki67 (marker buněčné proliferace), TP53 (tumor supresorový gen), IL-6 (interleukin 6), hK2 (glandulární kalikrein 2), CgA (chromogranin A), NSE (neuron specifická enoláza). Klíčovou roli v hormonální regulaci prostaty hraje hypotalamus. Většina produkce testosteronu u dospělých mužů pochází z varlat a hraje nejdůležitější roli v růstu prostaty. Další, i když menší roli hraje kůra nadledvin prostřednictvím jeho produkce steroidů. [14,28]

4 Nezhoubné onemocnění prostaty

Prostata bývá často postižena nemaligním onemocněním

4.1 Akutní prostatitid

V převážné většině bývá diagnostikována klinicky bez nutnosti biopsie. Nejčastěji bývá bakteriální a hlavními patogeny v současné době jsou *Chlamydia spec.* a *Trichomonas vaginalis*. Histologicky je charakterizována množstvím neutrofilních leukocytů v acinech a v jejich okolí. Některé jsou destruované zánětlivým procesem. Velmi vzácně je přítomen prostatický absces. Nejčastěji se vyskytuje v souvislosti s celkovou močovou infekcí způsobenou obvykle bakterií *Escherichia coli*. [8].

4.2 Chronická prostatitis

Je charakterizována opakovanými záněty močového ústrojí způsobené totožnými patogeny. Jen malá část pacientů má klinické příznaky. Při histologickém vyšetření je nutné rozlišit atrofické žlázy a struktury prostatického adenokarcinomu. Přítomnost karcinomu společně s chronickou prostatitis je možná. Problémem mohou být degenerativní změny lymfocytů a stromálních buněk. Při nejistotě je užitečné imunohistochemické vyšetření. [8].

4.3 Granulomatózní prostatitis

Je to proces, který může být způsoben jinou infekcí, alergickou reakcí či následkem předchozího biotického odběru. Nejčastější prostatitida je tzv. nespecifická, kdy se nepodaří prokázat patogenní organismus. Vyskytuje se ve věkovém rozmezí 18–86 let. Příznaky jsou podobné jako u jiných prostatitid. Nespecifická granulomatózní prostatitis dokáže napodobit klinicky i morfologicky prostatický adenokarcinom. Pacienti většinou mají pozitivní nález per rectum i ultrasonografický, rovněž mají pravidelně zvýšenou hladinu PSA. Histologicky je charakterizována dilatovanými ducty, vyplněné neutrofilními leukocyty, odloupanými epitelii, makrofágy. Okolo destruovaných tubulů se nachází zánětlivý infiltrát. Pokud se v infiltrátu nachází více epitelooidních histiocytů, může být nález mylně označen za prostatický adenokarcinom. Ke správné diagnóze pomohou četné lymfocyty, neutrofilní a eozinofilní leukocyty, popř. doplňující imunohistochemické vyšetření. [8].

4.4 Specifická prostatitis

Není v současné době příliš častá. Je způsobena mykobakterií. Vzhledem k vzestupu výskytu tuberkulózy v českých zemích, můžeme předpokládat i zvýšení výskytu této specifické prostatitidy. [8].

4.5 Malakoplakie

Je velmi vzácná, většina případů je spojena s infekcemi močového traktu způsobených *Escherichia coli*. Klinické symptomy zahrnují retenci moče, dysurii, hematurii a teploty. Prostata je celkově zvětšená. Imunohistochemicky lze prokázat histiocytární povahu léze. [8].

4.6 Benigní hyperplazie prostaty

Je to jedno z nejčastějších onemocnění postihujících starší muže. Prevalence tohoto onemocnění stoupá s věkem a lze ji histologicky prokázat u přibližně 50 % mužů starších 60 let a téměř u 90 % mužů starších 80 let. Benigní hyperplazie prostaty je uzlovité zbytnění prostaty v periuretrální oblasti, týkající se jak epiteliálních tak stromálních buněk. Podle převahy jednotlivých histologických složek rozeznáváme několik typů: stromální, fibromuskulární, muskulární, fibroadenomatózní a fibromyadenomatózní. Jedná se o chronické onemocnění, které významně zhoršuje kvalitu života pacientů a které může skončit až selháním funkce dolních močových cest. Podle problémů s vylučováním, můžeme onemocnění rozdělit na dva typy: vyprazdňovací (vznikají z útlaku močové trubice zvětšenou prostatou) a jímací (vznikají drážděním močového měchýře zvětšenou prostatou). [8].

5 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty se ve srovnání s karcinomy jiných orgánů chová často jinak. Obvykle se nešíří rychlým tempem do jiných částí těla. Některé karcinomy prostaty rostou velmi pomalu a nemusí působit problémy či vyvolávat klinické příznaky po mnoho let nebo vůbec. Klíčovými histologickými rysy jsou zvýšená buněčná hustota, snížený objem lumenu, snížený extracelulární prostor a neoangiogeneze. Druhy bioptického vyšetření jsou: punkční jehlová biopsie, transuretrální resekce a radikální prostatektomie. Rakovinné buňky se mohou šířit z prostaty do dalších částí těla, zejména do skeletu (kostí) a lymfatických uzlin. Životní styl a stravovací návyky jsou již dlouho známy jako rizikové faktory pro vznik karcinomu prostaty. Nejběžnější typ karcinomu je adenokarcinom. [11,15].

5.1 Histologické subtypy

5.1.1 Prostatická intraepiteliální neoplazie (PIN)

Patří mezi prekancerózy a je lokalizována především v periferní části. Léze se nazývají intraduktální dysplazie a PIN1 představuje mírnou dysplazii, PIN2 střední a PIN3 těžkou dysplazii. V dnešní době se používá pro PIN1 termín low – grade PIN a pro PIN2 a PIN3 termín high – grade PIN. Low – grade PIN nepředstavuje pro nemocného větší riziko karcinomu. Pro sloučení PIN2 a PIN3 jako high – grade mluví jak individuální variabilita v diagnostickém odlišení, tak obdobná míra rizika karcinomu v následné biopsii. [8].

5.1.2 *Atypická proliferace malých acinů*

Nachází se v 5 – 10% bioptických vzorků z prostatické tkáně. Je charakteristická ložisky žlázy, která se svým vzhledem blíží karcinomu prostaty, ale nemá dostatek atypií v tkáňové architektuře. U všech mužů je nutné po 3 – 6 měsících provést rebiopsii. [8].

5.1.3 *Hlenotvorný adenokarcinom*

Jedna z nejméně obvyklých morfologických variant karcinomu. Vykazuje agresivní biologické chování a má tendenci vytvářet kostní metastázy. U pokročilé fáze onemocnění se zvyšuje koncentrace PSA a kyselý fosfatázy. [8].

5.1.4 *Malobuněčný karcinom*

Další karcinom s biologicky agresivním chováním. Asi polovina z těchto karcinomů jsou smíšené malobuněčné nádory a adenokarcinomy. Průměrné přežití nemocných je méně než jeden rok. V prognóze u malobuněčných a smíšených nádorů není rozdíl. Malobuněčný nádor většinou neprodukuje vyšší hodnoty PSA. [8].

5.1.5 *Duktální karcinom*

Je poměrně vzácný a vyrůstá z epitelu prostatických ductů (0,4 – 0,8% karcinomů). Nádory vyrůstající z velkých periuretrálních vývodů, rostou jako exofytická léze do urethry, většinou v oblasti colliculus seminalis, a působí obstruktivní symptomatologii, hematurii nebo zřídka hemospermii. Nádory, které vyrůstají z periferie, se diagnostikuje biopticky. Vyšetření per rectum bývá dlouho negativní a koncentrace PSA normální, v době diagnózy bývají obvykle již pokročilé. Tyto karcinomy mají agresivní klinický průběh. [12].

5.1.6 Dlaždicobuněčný karcinom

Je velmi vzácný a má většinou velmi špatnou prognózu. Nádor neodpovídá na hormonální léčbu a tvoří osteolytické metastázy. Při metastatickém onemocnění se nezvyšuje koncentrace kyselých fosfatázy. Dlaždicobuněčná diferenciace se vyskytuje v primárních nádorech a metastázách adenokarcinomu léčených estrogeny. [12].

5.1.7 Karcinom z přechodného epitelu

Primární karcinom má tendenci infiltrovat hrdlo měchýře a okolní měkké tkáně, takže ve více než 50% jde o nádory T3 – T4. V době diagnózy má 20% nemocných vzdálené metastázy. Nejčastější lokalizace metastáz jsou kosti (osteolytické metastázy), plíce a játra. Intraduktální a infiltruující karcinom z přechodného epitelu, který postihuje prostatu, se prokáže většinou u nádoru měchýře vyššího stadia. Nemocní mají špatnou prognózu díky pokročilosti nádoru. Odlišení špatně diferencovaného přechodného karcinomu a dediferencovaného adenokarcinomu je někdy velmi obtížné. Diferenciaci napomáhá většinou vyšší koncentrace PSA u adenokarcinomu. Některé cytokeratinové markery jsou naopak vyšší u karcinomu z přechodného epitelu a negativní u adenokarcinomu. [12].

5.1.8 Adenokarcinom

Je to invazivní karcinom, který se skládá z neoplastických prostatických epiteliálních buněk se sekreční diferenciací, uspořádaných do různých histomorfologických vzorů. Bazální buňky obvykle chybí. Celosvětově je druhou nejčastější malignitou u mužů. Existují velké rozdíly mezi světovými regiony a zeměmi ve výskytu adenokarcinu.

Většina adenokarcinomů je multifokální (85 – 90%) s průměrem 2 – 3 samostatných nádorů na žlázu. Nejvíce druhů karcinomů je umístěno v zadní periferní zóně. Centrální zóna je většinou postižena sekundárně. Podezření na karcinom mají pacienti s vyšší hladinou PSA a s abnormálními výsledky z digitálního rektálního vyšetření. Projevy lokálně pokročilého karcinomu prostaty zahrnují vyšší frekvenci při močení a potíže s močením, které mohou simulovat benigní hyperplazii prostaty, akutní retenci moči a hematurii. Impotence může nastat v důsledku invaze neurovaskulárních svazků. Rektální invaze a uraemie (v důsledku selhání ledvin) jsou pozdní nálezy vysoce pokročilých lokálních onemocnění. Metastazující adenokarcinom může působit bolesti kostí, patologické zlomeniny edém dolních končetin a neurologické příznaky.

Hematologické abnormality jsou vzácné a zahrnují anémii a diseminovanou intravaskulární koagulaci. [9,12].

5.2 Diagnostické možnosti

5.2.1 *Vyšetření per rectum*

Toto vyšetření může diagnostikovat karcinom až ve 30 – 40 %. Prostata je na pohmat zvětšená, hrbolatá, tužší až tvrdá a asymetrická. U pokročilejších nálezů je špatně ohraničená proti okolí a při infiltraci stěva nádorem je sliznice rektální naproti prostatě nepohyblivá. Palpace je ve většině případů nebolestivá. Nehmatné bývají karcinomy vycházející z anterolaterálních částí periferní zóny. U všech mužů s abnormálním nálezem na prostatě je pro riziko karcinomu indikována biopsie bez ohledu na hodnotu PSA. [8].

5.2.2 *Transrektální ultrasonografie (TRUS)*

Je v současnosti široce dostupná, cenově nenáročná zobrazovací metoda onemocnění malé pánve u mužů. Vysoké rozlišení spolu se zobrazením ve dvou rovinách, umožňují velice podrobné hodnocení patologických změn vnitřních mužských pohlavních orgánů. Od začátku svého používání si TRUS získala pevné místo v diferenciální diagnostice ložiskových změn prostaty. Problémem zůstává nízká přesnost při odlišení benigních a maligních nálezů. K definitivnímu odlišení je nezbytná cílená nebo systematická biopsie. Kombinací vyšetření per rectum a TRUS lze v některých případech přesně zhodnotit rozsah postižení karcinomem. Kromě ložiskových změn lze prokázat jasné prorůstání nádoru přes vazivové pouzdro prostaty. [8].

5.2.3 *Výpočetní tomografie a magnetická rezonance*

Rutinně se nepoužívají při detekci lokální progresy karcinomu prostaty nebo postižení lymfatických uzlin pro jejich nízkou citlivost. [8].

5.2.4 *Scintigrafie skeletu*

Je to nejcitlivější metoda detekce kostních metastáz. Toto vyšetření se provádí pomocí látek značených radioaktivním izotopem. [8].

5.3 Staging

Pro klasifikaci zhoubných novotvarů se využívá TNM klasifikace. Slouží k popisu anatomického rozsahu solidních nádorových onemocnění v místě primárního

nádoru (T), v oblasti spádových mízních uzlin (N) a v místech vzdáleného orgánového metastatického postižení (M). Z hodnot T, N a M je následně určeno klinické stadium onemocnění. Cílem stagingového systému je prognóza a výběr léčby založený na skutečném rozsahu a dynamice onemocnění. Klasifikace se používá pouze pro adenokarcinomy. [20].

5.3.1 TNM klasifikace

Primární nádor

TX	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru
T1	nádor nezjistitelný klinicky, palpačně, ani zobrazovacími metodami
T1a	nádor zjištěn náhodně histologicky v $\leq 5\%$ resekované tkáni
T1b	nádor zjištěn náhodně histologicky ve $> 5\%$ resekované tkáni
T1c	nádor zjištěn při punkční biopsii (při zvýšeném PSA)
T2	nádor omezen na prostatu
T2a	nádor infiltruje polovinu jednoho laloku nebo méně
T2b	nádor infiltruje více než jednu polovinu jednoho laloku, ne však oba laloky
T2c	nádor infiltruje oba laloky
T3	nádor se šíří přes pouzdro prostaty
T3a	extrakapsulární šíření (jednostranné nebo oboustranné)
T3b	nádor infiltruje semenný váček
T4	nádor je fixovaný nebo postihuje okolní struktury, mimo semenné váčky: hrdlo močového měchýře,

zevní sfinker, rektum, mutulus lektor nebo stěnu
pánevní

Mízní uzliny

NX	regionální uzliny nelze hodnotit
N0	v regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy
N1	metastázy v regionálních mízních uzlinách

Vzdálené metastázy

MX	vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	nejsou vzdálené metastázy
M1	vzdálené metastázy
M1a	ne – regionální mízní uzlina (uzliny)
M1b	kost (i)
M1c	jiná (jiné) lokalizace [25].

5.4 Grading

Karcinom prostaty má celkem heterogenní morfologii a v jednom nádoru lze vidět několik histopatologických obrazů. V minimálně 70% preparátů po radikální prostatektomii jsou mnohočetná nádorová ložiska. Dnes nejčastěji používanou patologicko – anatomickou klasifikací karcinomu prostaty je Gleasonovo skóre. Tato klasifikace stojí na pětistupňovém hodnocení architektonického uspořádání nádorových žlázek prostaty. Dobře diferencovaný nádor má Gleasonův grade 1 (GG1) a zcela dediferencovaný karcinom má GG5. Při stanovení skóre se určují dva nejčastěji se vyskytující typy tkáňové architektury (predominantní a druhý nejčastější) a jsou ohodnoceny pětibodovou stupnicí. Gleasonův grading je indikátorem růstu a progresu nádoru. Léčebný postup vychází ze stagingu a Gleasonova skóre nádoru. [21,22].

5.4.1 *Klinická stádia*

I.	T1a - T2a	N0	M0
II.	T2b - T2c	N0	M0
III.	T3	N0	M0
IV.	T4	N0	M0
	Jakékoliv T	N1	M0
	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1

5.4.2 *Prognostické skupiny*

Skupina I.	T1a - T2a	N0	M0	PSA < 10	Gleason ≤ 6
Skupina II. A	T1a–c	N0	M0	PSA < 20	Gleason 7
	T1a–T2a	N0	M0	PSA ≥ 10, < 20	Gleason ≤ 6
	T2a	N0	M0	PSA < 20	Gleason ≤ 7
	T2b	N0	M0	PSA < 20	Gleason ≤ 7
Skupina II. B	T2c	N0	M0	Jakékoliv PSA	Jakékoliv Gleason
	T1–2	N0	M0	PSA ≥ 20	Jakékoliv Gleason
	T1–2	N0	M0	Jakékoliv PSA	Gleason ≥ 8
Skupina III.	T3a–b	N0	M0	Jakékoliv PSA	Jakékoliv Gleason
Skupina IV.	T4	N0	M0	Jakékoliv PSA	Jakékoliv Gleason
	Jakékoliv T	N1	M0	Jakékoliv PSA	Jakékoliv Gleason
	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1	Jakékoliv PSA	Jakékoliv Gleason

[25].

5.5 **Léčba karcinomu prostaty**

Léčba a prognóza je závislá na pokročilosti onemocnění. Velmi se liší léčba lokalizovaného karcinomu ohraničeného na prostatu, karcinomu lokálně pokročilého s místní propagací do okolí a metastatického nádoru s hematogenním nebo lymfogenním šířením. Léčba také závisí na biologickém stavu nemocného, na přítomnosti dalších onemocnění a na přání nemocného. [8].

5.6 Léčba lokalizovaného karcinomu prostaty

Více než jedna třetina nově diagnostikovaných karcinomů je lokalizovaných. Možnosti řešení zahrnují pozorné sledování, aktivní vyčkávání, radikální prostatektomii nebo radioterapii. [8].

5.7 Léčba lokálně pokročilého a metastatického karcinomu prostaty

Uplatňuje se ablační hormonální léčba a antiandrogenní léky. V případě, že je hormonální léčba neúčinná užívá se chemoterapie. [8].

6 Role histologického laboranta v diagnostickém procesu onemocnění předstojné žlázy

6.1 Charakteristika oddělení

Patologicko-anatomické oddělení je nelůžkové oddělení Nemocnice Písek a.s. Oddělení patologie tvoří jednotný celek, který se dělí na dva komponenty pracovišť:

1/ Pracoviště laboratorní se sestává z laboratoří bioptické, nekroptické, cytologické a laboratoře imunohistochemické. K pomocným zařízením patří archivy dokumentace, archiv bločků a preparátů.

2/ Pitevni pracoviště se sestává z pitevniny, chladicího boxu a úpravné i vystavovací místnosti

6.1.1 Bioptická laboratoř

Patologicko-anatomické oddělení poskytuje vyšetření histologického materiálu, histologické vyšetření tvrdých tkání a peroperační histologické vyšetření indikované ošetřujícími lékaři různých odborností pro potřeby diagnostiky nebo případné sledování vývoje diagnosy a účinků terapie.

6.1.2 Cytologická laboratoř

Tato laboratoř poskytuje zpracování a vyhodnocení cytologického materiálu jako jsou výpotky, punktáty, sekrety, výplachy bronchů a mozkomíšni mok pro potřeby diagnostiky nebo sledování vývoje diagnosy. Dále zpracovává zaslaný gynekologicko-cytologický materiál, jako jsou stěry z děložního cervixu (diagnostická cytologie) a stěry na průkaz spermií. K dalšímu vyšetření patří vyšetření erytrocytů v moči ve fázovém kontrastu.

6.1.3 Nekroptická laboratoř

Nekroptická laboratoř provádí histologické vyšetření vzorků odebraných při pitvě zemřelého k potvrzení klinické diagnózy.

6.1.4 Imunohistochemická laboratoř

Tato laboratoř provádí detekci tkáňových epitopů v histologických vzorcích, které jsou důležité pro konečnou diagnózu a informaci pro onkologickou léčbu.

6.1.5 Konzultační činnost laboratoře

Patologicko-anatomické oddělení spolupracuje s referenčními centry a vyššími odbornými pracovišti (konzultace patologa s patologem). Dodatečná vyšetření či konzultaci si mohou vyžádat telefonickou nebo písemnou formou ošetřující lékaři, a to ze vzorků archivovaných 5-10 let (vyšetření z parafinových bloků či konzultace z preparátů dle druhu požadovaného vyšetření).

Seznam smluvních laboratoří:

Ústav patologie 1 LFUK a VFN, Praha 2 - Nové Město

Bioptická laboratoř s.r.o., Plzeň

Patologické oddělení, České Budějovice

Šiklův patologicko – anatomický ústav, Plzeň [6].

7 Cíle práce

7.1 Přínos imunohistochemického vyšetření v rámci diferencovaně diagnosticky obtížných lézí prostaty

Imunohistochemické metody mají široké spektrum využití zejména v bioptické diagnostice. Původní histochemie vznikala od 30. let 20. století na hranici oborů histologie, analytické chemie a biochemie. Základem pro imunohistochemii byly kovalentní vazby molekul imunoglobulinů s jinými molekulami, což bylo hlavním předmětem výzkumu ve 30. letech. Ve 40. letech se podařil první průkaz antigenů v tkáni pomocí fluoresceinem značené protilátky (jedná se o přímou imunofluorescenční metodu). Od 50. let se tyto techniky dostávaly do patologické diagnostiky a postupně byla zlepšována specifita, senzitivita a dostupnost stále širšího spektra metod. Napomohl k tomu i rozvoj molekulárního, proteinového i genového inženýrství nezbytný pro produkci reagensů potřebné kvality a kvantity. První protilátky proti jednomu epitopu (antigenní determinantě), tzv. monoklonální protilátky, byly připraveny v 70. letech. Spojení enzymu s protilátkou, které se začalo

využívat ve stejné době, vyústilo v širší zavedení imunohistochemie do praxe. Do imunohistochemie patří všechny metody využívající monoklonální či polyklonální značené protilátky, kterými vizualizujeme a lokalizujeme příslušné tkáňové antigeny. Je využívána ke specifitějšímu průkazu látek v preparátech. Imunohistochemie je založena na principu vazby antigenu a protilátky. V současné době je role imunohistochemie v diagnostice prakticky nezastupitelná. [26,29].

7.1.1 Získávání protilátek pro imunohistochemii

Polyklonální protilátky

Jsou produktem mnoha aktivovaných B lymfocytů a jsou namířeny proti více epitopům určitého antigenu nebo směsi antigenů. Tyto protilátky se získávají imunizací laboratorních zvířat antigenem (nebo směsí antigenů). Při imunizaci dochází ke stimulaci B lymfocytů a jejich diferenciaci na plazmatické buňky. Po úspěšné imunizaci zvířete se mu odebere sérum obsahující protilátky proti původnímu imunogenu. Specifita protilátek závisí na tom, v jaké fázi imunitní odpovědi se protilátky ze zvířete odeberou. [26].

Monoklonální protilátky

Jsou produktem jednoho klonu B lymfocytů a jsou specifické proti jediné determinantě. Spojením B lymfocytů z imunizovaného zvířete a neoplastických myelomových buněk lze připravit tzv. hybridomy. To jsou klony buněk schopné produkce monoklonálních protilátek. Zatímco B lymfocyt je nositelem specifity produkované protilátky, myelomová buňka je nositelem vysokého proliferačního potenciálu. [26].

7.1.2 Základní typy imunohistochemických metod

- Přímá metoda
- Nepřímá metoda dvojstupňová
- Nepřímé trojstupňové metody:
 1. Metoda peroxidáza–anti–peroxidázového komplexu (PAP)
 2. Metoda avidin–biotin komplexu (ABC)

Přímá metoda

Je to nejjednodušší způsob lokalizace antigenu ve tkáni. Primární protilátka je přímo označena fluoresceinem, enzymem nebo kovem. Přímé metody lze využít, je-li

antigen v tkáni přítomen v dostatečně vysoké koncentraci. Tato metoda se využívá především v nativních řezech. Na parafinových řezech je tato metoda málo citlivá.

Nepřímá dvojstupňová metoda

Tato metoda je sice komplikovanější, ale mnohem citlivější. Na tkáňové řezy se aplikuje neoznačená protilátka, která je specifická proti prokazovanému antigenu a nazýváme jí primární protilátkou. Jako další krok se nanáší protilátka proti Fc–fragmentu imunoglobulinů od imunizovaného zvířete (dárce primární protilátky). Druhá (sekundární) protilátka je značena fluorochromem nebo enzymem váže se na primární protilátku.

Nepřímé trojstupňové metody

Jedná se o metody sloužící k zesílení signálu tehdy, když je množství antigenu v tkáni velmi nízké. Při první fázi reaguje primární antisérum s antigenem prokazovaným v tkáni. Při druhé fázi je aplikována neoznačená protilátka proti imunoglobulinům zvířete. Tato sekundární protilátka se nazývá spojovací a tvoří můstek. Ten je třeba přidávat v nadbytku, aby nebyla vysycena obě ramena (Fab fragmenty) jeho IgG molekuly, což by poskytlo falešně negativní výsledek. Při třetí fázi nanášíme značený komplex, například PAP (peroxidáza– anti– peroxidázou komplex). Když nahradíme peroxidázu alkalickou fosfatázou, dostaneme metodu APAAP (alkalická fosfatáza– anti– alkalická fosfatáza). Tato metoda je vhodná pro vyšetřování takových preparátů, kde je vysoká aktivita endogenní peroxidázy a nelze tak spolehlivě zaručit její úplnou inaktivaci. Další metodou je avidin– biotin komplex (ABC metoda). [26].

7.1.3 *Blokování endogenní aktivity enzymů*

Pro průkaz komplexu antigenu a protilátky se používají protilátky značené enzymem (peroxidázou či alkalickou fosfatázou). Tyto enzymy se vyskytují také ve zpracovávané tkáni a mohou do určité míry znehodnotit výsledek vyšetření jako falešně pozitivní reakce. Proto je potřeba blokovat endogenní aktivitu enzymů. [26].

7.1.4 *Blokování pozadí*

Pozitivitu může způsobit i nespecifická reakce pozadí. Příčiny falešně pozitivní reakce:

- kontaminace řezů nebo reagentů cizorodými látkami

- vazba primární protilátky na kolagen, laminin, elastin, proteoglykany, tukovou tkáň, keratin a jiné pojivové struktury
- vazby v důsledku elektrostatických interakcí
- poškození řezu
- reakce protilátky s podobnými epitopy na různých antigenech
- difuze antigenních struktur do okolní tkáně [26].

7.1.5 *Chromogen*

Vazba antigenu s protilátkou probíhá bez viditelné reakce. Abychom mohli preparát pozorovat v běžném světelném mikroskopu, musíme k vizualizaci použít dalších látek, tzv. chromogenů. [26].

7.1.6 *Artefakty*

Při mikroskopování je potřeba dávat pozor na možnou přítomnost artefaktů. Mezi nejčastější artefakty patří:

- bubliny vzduchu
- zuby po mikrotonovém noži
- špína
- sraženina barviva
- lomy v tkáni

7.1.7 *Kontroly*

Pro ověření validity se zařazují negativní a pozitivní kontroly. Jako negativní kontrola může být preparát, který neobsahuje prokazovaný antigen nebo preparát, který sice obsahuje prokazovaný antigen, ale v procesu imunohistochemické procedury se vynechá reakce s primární protilátkou. Jako pozitivní kontrolu používáme preparát, o němž víme s jistotou, že prokazovaný antigen obsahuje. [26].

Imunohistochemické vyšetření u nás provádíme od června roku 2004. Na našem oddělení vyšetřujeme 23 protilátek:

1. Anti – Estrogen Receptor	ER
2. Anti – Progesteron Receptor	PR
3. Anti – Ki 67	KI
4. Anti – c-erbB-2 Oncoprotein (HER2/neu)	HER
5. Anti – E- Cadherin	E-Cad

6. Anti – Cytokeratin (AE1/AE3)	CK (AE1/3)
7. Anti – Cytokaretin HMW- High Molecular Weight	CK HMW
8. Anti – S 100	S 100
9. Anti – CD 45, Leukocyte Common Antigen	CD 45 (LCA)
10. Anti – Melanosome (HMB 45)	ME (HMB 45)
11. Anti – Smooth Muscle Actin (Actin hladkosvalový)	SMA (Ac)
12. Anti – BCL2 Oncoprotein	Bcl2
13. Anti – Desmin	DES
14. Anti – Vimentin	VIM
15. Anti – Chromogranin A	CHRA
16. Anti – Prostate Specific Antigen	PSA
17. Anti – CD 34	CD 34
18. Anti – Cytokeratin 7	CK 7
19. Anti – Cytokeratin 20	CK 20
20. Anti – p16 protein	p16
21. Anti – Thyroid Transcription Factor	TTF-1
22. Anti – Helicobacter Pylori	HB
23. Anti – Podoplanin	POD

Na našem oddělení se na imunohistochemické vyšetření prostaty používají tyto protilátky: Prostatický specifický membránový antigen (Anti – Prostate Specific Antigen) a Cytokeratin, s vysokou molekulovou hmotností (Anti – Cytokeratin HMW). [5].

Prostatický specifický membránový antigen (PSMA)

Je glykoprotein aminokyseliny membránového typu s folatohydrolázovou a neuropeptidázovou aktivitou. PSMA je umístěn na krátkém rameni chromozomu 11 a bylo identifikováno mnoho dalších sestřihaných variant. PSMA je exprimován v normálním a maligním prostatickém epitelu a v subsetu neprostatických tkání. V karcinomu prostaty se prokázala korelace exprese PSMA s progresí nemoci, s nejvyššími úrovněmi exprese u hormonálně rezistentních a metastatické nemoci. Tato protilátka značí buňky exprimující PSMA v normálních a neoplastických tkáních a je užitečná při identifikaci adenokarcinomů prostaty. [4]

Cytokeratin, s vysokou molekulovou hmotností (CK HMW)

Je cytoskeletální protein intermediárních filament podstatný pro vývoj a diferenciaci epiteliálních buněk, které napomáhají odolávat mechanickému namáhání. Bylo identifikováno přibližně dvacet různých cytokeratinů, byly zaříděny a očíslovány podle molekulových hmotností a izoelektrických bodů. Obecně lze říci, že většina cytokeratinů s nízkou molekulovou hmotností se nachází v neskvamózním epitelu. Protilátka je užitečná při identifikaci bazálních buněk a skvamózního epitelu v různých tkáních. Pozitivní barvení napomáhá při rozlišení benigních žláz prostaty od adenokarcinomu. [4]

Imunohistochemické vyšetření děláme podle následujícího návodu:

1. Na speciální skla natáhneme vybraný parafinový řez
2. Skla sušíme při 60°C asi 20 minut v termostatu
3. Dalších 20 minut neparafinujeme skla v Xylenu
4. Oplachujeme v 96 % Etanolu
5. Oplachujeme v 80 % Etanolu
6. Oplachujeme v 70 % Etanolu
7. Oplachujeme v destilované vodě
8. Vaříme ve vodní lázni při 95–99°C v pufru o pH 9
9. Necháme 20 minut chladnout
10. V promývacím pufru pH 7,4–7,8 oplachujeme 1–5 minut

Před nanášením detekčního systému je nutné udělat kroužek kolem tkáně tužkou PAP–PEN, aby se zabránilo plýtvání a roztékání chemikálií.

11. Nakapeme duální enzymovou blokádu, kterou necháme působit 5–10 minut
12. Oplachujeme 1–5 minut v promývacím pufru
13. Nakapeme primární protilátku
14. Oplachujeme 1–5 minut v promývacím pufru
15. Nakapeme značený polymer (Roztok Anti-Mouse/Rabbit PolyDetector HRP Label)
16. Oplachujeme 1–5 minut v promývacím pufru
17. Nakapeme pracovní DAB Substrat – chromogen (DAB Buffer a DAB Chromogen)
18. Oplachujeme v destilované vodě
19. Nakapeme Harrisův hematoxylin a necháme 30 vteřin působit

- DAB pufr
- uchovávat v lednici v teplotním rozmezí 2°C – 8°C

Pracovní roztok DAB (Substrát- chromogen) – nutné naředit

- 1 ml DAB pufru a 1 kapka DAB chromogenu

Ředění protilátek: poměr 1:250 – napipetujeme 30 µl koncentrované protilátky

a doplníme 7,5 ml dilučního roztoku (Dako Antibody Diluent)

- pokud naředíme nový roztok, pro ověření jeho účinnosti použijeme vybraný kontrolní preparát, který je už vyšetřen metodou FISH

CINtec p16 INK4a Histology Kit

- Peroxidase Blocking Reagent
- Mouse anti - human p16 INK4a
- Visualization Reagent
- Negative Reagent Control
- DAB Buffered Substrate + DAB Chromogen – 2 ml DAB Buffered Substrate a 1 kapka (25 – 30 µl) DAB Chromogen (obarvení 5- ti tkáňových řezů)
- Eptop Retrieval Solution – 1:10 (za použití destilované vody)
 - naředěný nepoužitý roztok skladovat 1 měsíc při 2°C – 8°C
- Promývací pufr Wash Buffer – 1:10 (za použití destilované vody)

70% Etanol – 700 ml 96% Etanolu

- 300 ml destilované vody

80% Etanol – 800 ml 96% Etanolu

- 200 ml destilované vody [5]

7.2 Korelace mezi diagnostickými závěry z vyšetření vzorků punkčních a z radikálních prostatektomií

Punkční biopsie

Speciální punkční biopsií jsou odebrány velmi malé tkáňové částky. Vyšetření je prováděno za pomoci ultrazvukové sondy. Punkční biopsie jsou nedílnou součástí diagnostiky řady onemocnění.

Radikální prostatektomie

Tento chirurgický zákrok je indikován u zhoubného nádoru prostaty, který je zachycen v časném stádiu a ještě se nerozšířil do okolních orgánů. Jeho cílem je odstranění celé prostaty (včetně jejího pouzdra a semenných váčků). Operací může být nádor zcela odstraněn. Je prokázáno, že radikální prostatektomie prodlužuje u pacientů s lokalizovaným karcinomem život. [16].

7.2.1 Korelace mezi punkční biopsií a radikální prostatektomií

Zajímalo mě, zda existuje korelace mezi výsledky z punkčních biopsií prostaty a výsledky z radikální prostatektomie. Jako vzorek pro můj výzkum mi sloužil soubor pacientů Nemocnice Písek a.s. Na našem oddělení se výsledky obou vyšetření, u téhož pacienta, shodovaly. Dále jsem si všimla, jaká část prostaty je nejvíce postižena.

8 Metodika

8.1 Preanalytická fáze

Před vlastním zpracováním tkáně dochází k příjmu materiálu. Laborant dle denního rozpisu přijme tento materiál až po kontrole všech údajů na nádobce s primárním vzorkem a průvodním listem. Minimální identifikační údaje, kterými musí být nádobka se vzorkem opatřena pro přijetí do laboratoře:

1. Příjmení a jméno pacienta
2. Rok narození pacienta
3. Lokalizace (tkáňový původ vzorku)

Minimální identifikační údaje, kterými musí být žádanka opatřena pro přijetí do laboratoře jsou:

1. Příjmení a jméno pacienta
2. rodné číslo pacienta
3. kód zdravotní pojišťovny
4. lokalizace (tkáňový původ vzorku)

5. odebírající lékař/sestra, oddělení (razítko, podpis)

6. datum – u nativního materiálu čas [5].

Postupy při doručení vadných vzorků

Materiál je dodán bez průvodky – laborantka po předchozí domluvě s ošetřujícím lékařem odloží vzorek na místo v příjmové místnosti označený „Neshody“ a vyčká, dokud oddělení nepošle průvodku.

Průvodní list dodán bez vzorku – laborantka po předchozí domluvě s ošetřujícím lékařem odloží průvodní list na místo v příjmové místnosti označený „Neshody“ a vyčká, dokud oddělení nepošle vzorek.

Nádobka je otevřená, ale obsahuje odebraný materiál – laborantka dolije formaldehyd, materiál je běžně zpracován.

Materiál je malý a je vylitý mimo nádobku – nelze zpracovat! Odebírající lékař je informován. [5].

Důvody pro odmítnutí vzorků/žádanky pro vyšetření

Žádanka s biologickým materiálem neobsahuje (nebo jsou nečitelné) minimální údaje pro identifikaci pacienta nebo zadávajícího lékaře a není možné je doplnit telefonickým kontaktem.

Odběrové nádobky jsou nedostatečně označeny nebo identifikační údaje zcela chybí. Pokud se jedná o materiál nenahraditelný a po telefonickém kontaktu s ordinací lékaře (s oddělením) je přesto požadováno provedení vyšetření, přebírá za výsledné stanovení odpovědnost zadávající lékař. [6]

Pokud jsou údaje správné a kompletní, laborant označí nádobku a průvodní list stejným laboratorním číslem. Průvodní list označí razítkem s datem, časem příjmu a jménem laboranta, který daný materiál přijímal. Přijaté nádobky s primárním vzorkem se řadí vzestupnou řadou na stolek. Vzorky jsou dodávány v nádobkách či zkumavkách dostatečné velikosti s fixační tekutinou 10% formol. Tkáň se fixuje 24 – 48 hodin. Po příjmu materiálu s průvodním listem následuje zpracování (manipulace) primárních vzorků. Obvykle probíhá dvakrát denně (v dopoledních a odpoledních hodinách). [17].

8.2 Analytická fáze

Dopolední zpracování vzorků provádějí laboranti. Jedná se o drobné primární vzorky, jako jsou třeba částky tkáně z gastroenterologie, částky tkáně z drobných excizi cervixu, punkce prsu a prostat nebo cytoblok. Laborant znovu zkontroluje údaje na nádobce s údaji na příslušném průvodním listu a je informován o typu materiálu, jeho lokalizaci a klinické diagnóze pacienta. Materiál z nádoby se vyndá, popíše, změří a to vše zaznamenává na originální průvodní list spolupracující laborant. Všechn odebraný materiál se dále uloží do vhodné krabičky podle velikosti, opatří se štítkem s laboratorním číslem přiřazeným při příjmu a dalšími informacemi potřebnými pro následné zpracování (typ barvení, počet částí tkáně). Veškeré vzorky se vloží do kovového košíku, tento košík se přenesse do nádoby s vodou, odpoledne se obsah košíku propere pod tekoucí vodou a dále zpracovává.

Odpolední přikrajování tkáně probíhá s lékařem. Lékař zkontroluje údaje na nádobce s materiálem a průvodním listem, laborant předčítá potřebné informace z průvodního listu pro následné zpracování (např. lokalizace materiálu, klinickou diagnózu, ...). Již ve fázi odběru bioptického materiálu mohou nastat chyby. [17].

Nejčastější jsou:

Nesprávný či chybný odběr vzorku.

Mechanické zhmoždění tkáně nešetrnou manipulací.

Odběr nedostatečného množství vzorku.

Nevhodně zvolená transportní nádoba (velký objem vzorku v malé transportní nádobě).

Nevhodně zvolená fixační tekutina (vede k nevratnému poškození tkáně).

Vzorek není ihned po odběru vložen do fixační tekutiny.

Nedostatečné množství fixační tekutiny (20x až 50x více než je objem tkáně).

Nenatažení plošných orgánů na korkovou destičku pomocí bodců.

Fixační tekutina nemá dostatečný přístup ze všech stran.

Špatné uzavření transportní nádoby.

Překročena doba fixace – prefixovaný vzorek – vliv na kvalitu imunohistochemického vyšetření antigenů.

Nedostatečná doba fixace (vede k nevratnému poškození tkáně).

Nedodrženy podmínky transportu vzorku u nativního materiálu.

Nedodržení času transportu vzorku do laboratoře u nativních vzorků.

Nedostačující údaje na žádance.

Špatné zabezpečení žádanky při transportu (potřísněna fixační tekutinou během převozu).

Špatné označení vzorku stehy a jinými značkami určujícími topografii.

Zaslání různých topografických odběrů v jedné nádobce. [5].

Pokud je vše v pořádku, lékař tkáň popíše, změří, ukrojí z tkáně morfologicky abnormální části a vybere následný typ vyšetření nezbytný pro určení klinické diagnózy. Laborant vše zaznamená na průvodní list. Pokud není vzorek dostatečně fixovaný, po úvaze ho zalije 10% formolem a nechá dofixovat do druhého dne. Vzorek, který není zpracován celý, je umístěn do digestoře. Ukrojené části tkáně vloží lékař do umělohmotné nádoby a laborant jí opatří štítkem s pořadovým číslem, druhem barvení a počtem částí tkáně. Laborant předá nádobku s tkání a průvodním listem druhému laborantovi k následnému zpracování. Druhý laborant vloží tkáň do krabičky a následně do košíku. Po ukončení přikrajování se košík umístí do tkáňového automatu. Průvodní listy se přijímají do NISu. V tkáňovém automatu projdou vzorky předem nastaveným programem. [17].

Přehled lázní:

- 96 % Alkohol 7 krát
- Xylen 3 krát
- Parafin 7 krát

Celý proces trvá 14 hodin. Aby se mohla tkáň dobře krájet, musí nejprve dojít k odvodnění a prosycení tkáně rozehřátým parafinem. Parafin vyplní všechny mikroskopické štěrbiny v tkáni, takže se pak dá tkáň krájet v tenkých řezech (silných několik tisícín milimetru). Pozorujeme-li neobarvený preparát v obyčejném světelném mikroskopu, nerozeznáme jednotlivé složky tkáně, z tohoto důvodu barvíme řezy vhodnými barvivy.

Další pracovní den se košík s tkáněmi vyndá z automatu. K zalévání parafinem prosycené tkáně se používá parafinová zalévací linka, která je rozčleněna na tři části – ohřívací, zalévací a chladicí. Používáme speciální kovové mističky, do kterých se vkládá prosycená tkáň, zalije se parafinem a nechá se vychladit. Z dobře vychlazených tkáňových bločků se zhotovují na sáňkovém mikrotomu tenké histologické řezy, silné několik tisícín milimetru. Ke krájení používáme žiletkové nože. Ukrojené parafinové řezy napínáme na teplé vodní lázni (roztok vody a želatiny) a nabíráme na podložní

sklo se souhlasným číslem. Takto připravené preparáty vložíme do stojánku a vkládáme do barvicího automatu. [17].

8.2.1 *Barvení preparátů*

Cílem standardního barvení je zviditelnit nejdůležitější struktury tkání tak, aby mohly být od sebe snáze odlišeny. Využívá se různé afinity barviv k určitým složkám tkání. Barvení probíhá díky elektrostatické interakci mezi barvivem a složkou tkáně:

- Kyselá = aniontová barviva (-) se vážou na kationtové složky (+), např. různé cytoplasmatické proteiny, hemoglobin, mitochondrie, některá střídací a sekreční granula. Ty se pak označují jako acidofilní nebo eosiofilní.
- Bazická = kationtová barviva (+) se vážou na aniontové složky (-), např. DNA, RNA, sulfatované glykosaminoglykany, které se označují jako bazofilní.

Kyselá barviva se používají především k barvení cytoplazmy. Nejčastějším kyselým barvivem je eosin. Ke stejnému účelu jsou i kyselá barviva azokarmín, kyselý fuchsin nebo kyselina pikrová.

Bazická barviva se používají především k barvení jader. Nejčastějším bazickým barvivem je hematoxylin. Jiná bazická barviva (methylenová modř, azur) jsou užívána ve směsích a následně pro barvení hematologických preparátů (Pappenheimovo barvení) nebo pro řezy lymfatickou tkání (Giemsovo barvení). V neuroanatomii slouží některá k Nisslovu barvení (kresylviolet, toluidinová modř). Toluidinová modř a alcianová modř se užívají pro histochemický průkaz silně aniontových substancí. Během různých barvení se zdůrazní buď hlavně jádra (železitý hematoxylin) nebo jádra a cytoplazmu (hematoxylin – eosin). Na našem oddělení barvíme preparáty v barvicím automatu. Nejčastěji používáme základní barvení hematoxylin – eosin. [7,30].

Barvení probíhá podle následujícího postupu:

Sušení v peci při 65°C	15 minut
Namáčení v xylenu	21 minut
Namáčení v 96% alkoholu	90 sekund
Namáčení ve vodě	30 sekund
Namáčení v hematoxylinu	2 minuty
Namáčení ve vodě	4 minuty
Namáčení v eosinu	2 minuty

Namáčení v 96% alkoholu	1 minuta
Namáčení v acetonu	15 sekund
Namáčení v aceton – xylenu	15 sekund
Namáčení v xylenu	15 sekund

Při barvení Hematoxylinem – eosinem se jádra buněk barví tmavě modře, svalstvo červeně, kolagenní vazivo růžově a chrupavka modře. [10].

K průkazu polysacharidů, glykoproteinů, mucinu a glykolipidů se používá barvení PAS. PAS znamená periodic acid – Schiff. Základem tohoto barvení je kyselina jodistá a Schiffovo reagens (bezbarvá kyselina fuchsin – sířičitá). Na našem oddělení barvíme metodou PAL. K základní kombinaci kyseliny jodisté a Schiffovo reagens přidáváme alciánovou modř. Tuto metodu používáme u vzorků z gastroenterologie (především u tkání odebraných ze žaludku a z jícnu, dále pak u nádorových tkání ze střev a jiných orgánů). [7].

Barvení probíhá podle následujícího postupu:

Sušení v peci při 65°C	15 minut
Namáčení v xylenu	21 minut
Namáčení v 96% alkoholu	90 sekund
Namáčení ve vodě	30 sekund
Namáčení v alciánové modři	20 minut
Namáčení ve vodě	4 minuty
Namáčení v 0,6% kyselině jodisté	10 minut
Namáčení ve vodě	1 minuta
Namáčení v Schiffovo reagens	20 minut
Namáčení ve vodě	8 minut
Namáčení v 96% alkoholu	1 minuta
Namáčení v acetonu	15 sekund
Namáčení v aceton – xylenu	15 sekund
Namáčení v xylenu	15 sekund

Pro barvení materiálu z dutiny děložní se používá metoda HAC. K základnímu barvení Hematoxylin – eosin se přidává ještě barvení alciánovou modří. Používá se k průkazu kyselých polysacharidů. [10].

Barvení probíhá podle následujícího postupu:

Sušení v peci při 65°C	15 minut
Namáčení v xylenu	21 minut
Namáčení v 96% alkoholu	90 sekund
Namáčení ve vodě	30 sekund
Namáčení v alcianové modři	15 minut
Namáčení ve vodě	4 minuty
Namáčení v hematoxylinu	2 minuty
Namáčení ve vodě	4 minuty
Namáčení v eosinu	2 minuty
Namáčení v 96% alkoholu	1 minuta
Namáčení v acetonu	15 sekund
Namáčení v aceton – xylenu	15 sekund
Namáčení v xylenu	15 sekund

Obarvené preparáty se montují pomocí vhodně zvoleného montovacího média, v tomto případě Entellanu NEU. Preparáty montujeme z xylenu. Sklo vytáhneme ze stojánku 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. Na obarvených, zamontovaných preparátech se zvýrazní laboratorní číslo nesmývatelným fixem a dochází ke kompletaci s průvodním listem. Laborant předá zkompletované průvodní listy a preparáty k vyhodnocení lékařům. [5].

8.3 Postanalytická část

Mikroskopování využívají jednak laboranti ke kontrole postupu barvení histologických preparátů a jednak lékaři k diagnostice. Diagnostika je založena na komparaci zjištěných morfologických změn – nejčastěji buněk či tkání a odborných zkušeností, které získal lékař – patolog v rámci celého svého dosavadního vzdělávání v oboru patologické anatomie. Zjištěné nálezy včetně diagnos jsou posléze cestou diktátu zaznamenány administrativní pracovníci do výsledkového listu. Ten je finálně zkontrolován lékařem, parafován a se všemi náležitostmi odeslán zpět klinickým lékařům. Pokud požaduje lékař provedení dodatečného vyšetření, provede o tom zápis do Evidence dodatečných vyšetření. Laborant provádějící úkony na barvicí laboratoři podle požadavku lékaře provede dodatečné vyšetření a vše zaznamená. K určení nebo potvrzení diagnózy může lékař požadovat imunohistochemické vyšetření. [5].

8.3.1 *Nebezpečné chemikálie*

V laboratoři pracujeme se spoustou nebezpečných chemikálií.

Formaldehyd

Je to bezbarvá až bíle zbarvená kapalina štiplavého zápachu. Hodnota pH se pohybuje mezi 6,7 – 7,1. Může vyvolat maligní nádorové bujení. Je toxický při vdechování, při styku s kůží, při požití. Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Může vyvolat alergickou reakci. Způsobuje poškození orgánů. Je toxický pro vodní organismy, žravý i ve zředěném stavu. Pokud se dostane ve velkém množství do půdy nebo vody, může ohrozit zdroje pitné vody.

Ethanolum benzino denaturatum

Je to bezbarvá kapalina alkoholového zápachu. Hodnota pH se pohybuje mezi 7,2 – 8,0. Vysoce hořlavá kapalina a páry. Při požití a vniknutí do dýchacích cest může způsobit smrt. Dráždí kůži. Může způsobit ospalost a závratě. Při prodloužené nebo opakované expozici může způsobit poškození orgánů. Toxický pro vodní organismy.

Eosin Y

Je to červenohnědá látka pevného skupenství. Bez zápachu. Hodnota pH je 9,2. Způsobuje vážné poškození očí a kůže.

Entellan

Je to bezbarvá hořlavá kapalina. Zapáchá po xylenu. Zdraví škodlivý při styku s kůží a při vdechování. Toxický pro vodní organismy.

Aceton

Je to bezbarvá tekutina charakteristického zápachu. Vysoce hořlavá kapalina a páry. Způsobuje vážné podráždění očí. Může způsobit ospalost nebo závratě. Opakovaná expozice může způsobit vysušení nebo popraskání kůže.

Xylen – směs izomerů

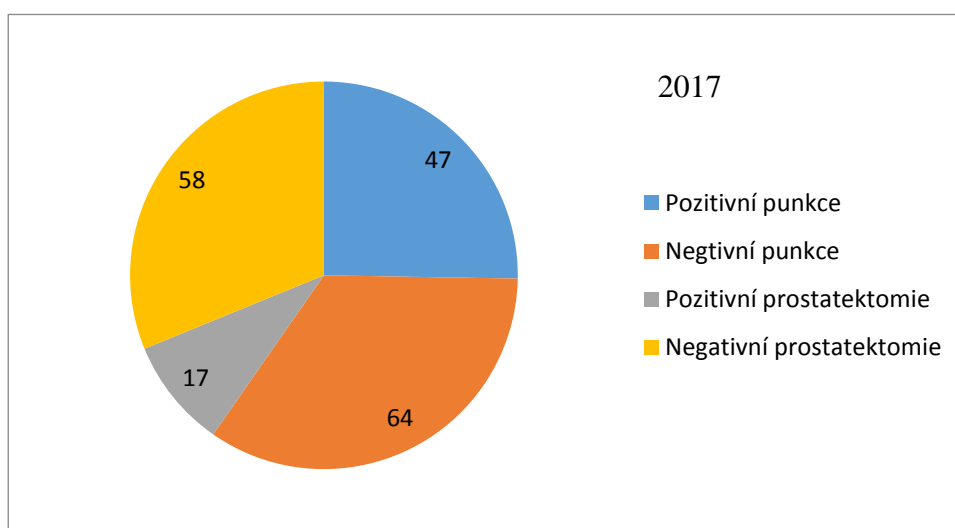
Je to bezbarvá tekutina aromatické vůně. Vysoce hořlavá kapalina a páry. Zdraví škodlivý při vdechování a při styku s kůží.

Haematoxylin

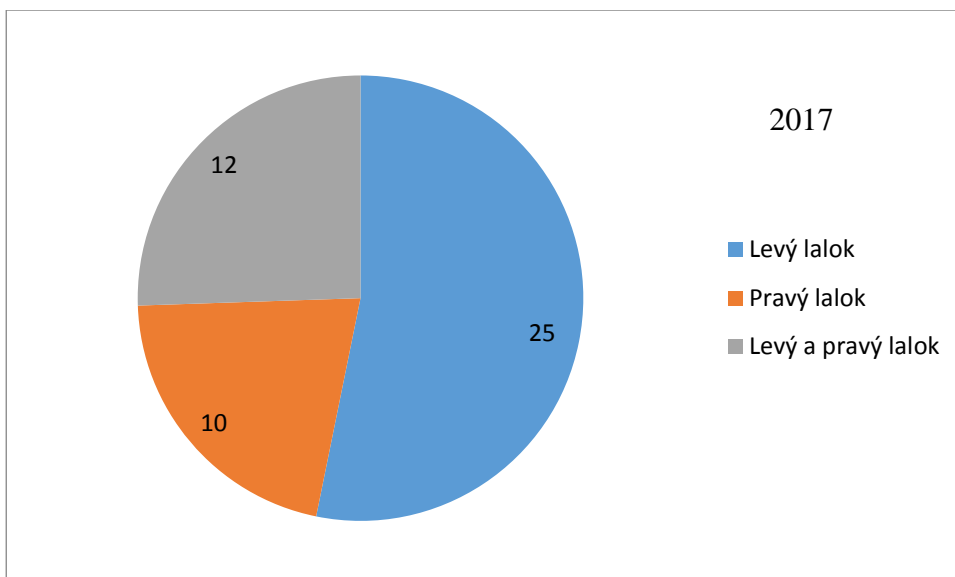
Je to světle hnědá látka pevného skupenství bez zápachu. Hodnota pH je v rozmezí 5 – 6. Způsobuje vážné podráždění očí a kůže. Může způsobit podráždění dýchacích cest. [18].

9 Výsledky

Oddělení Patologicko – anatomické přijímá vzorky tkání přímo z Nemocnice Písek, z prachatické nemocnice a z některých soukromých laboratoří v okolí. V roce 2017 zpracovala laboratoř 7 273 vzorků. Z toho bylo 430 případů, u kterých se použilo imunohistochemické vyšetření. Punkčních biopsií prostaty bylo provedeno 111 a prostatektomií 75.

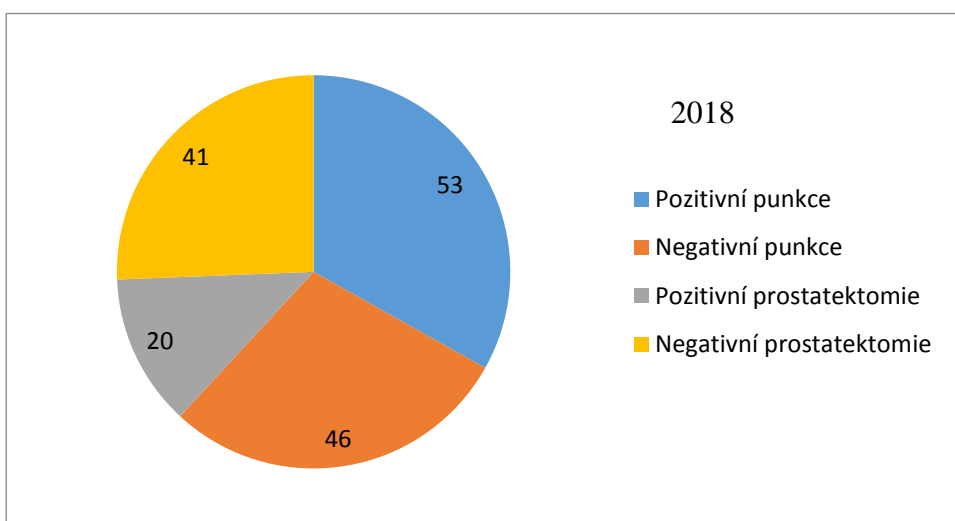


Graf č. 1. Počet vyšetření za rok 2017

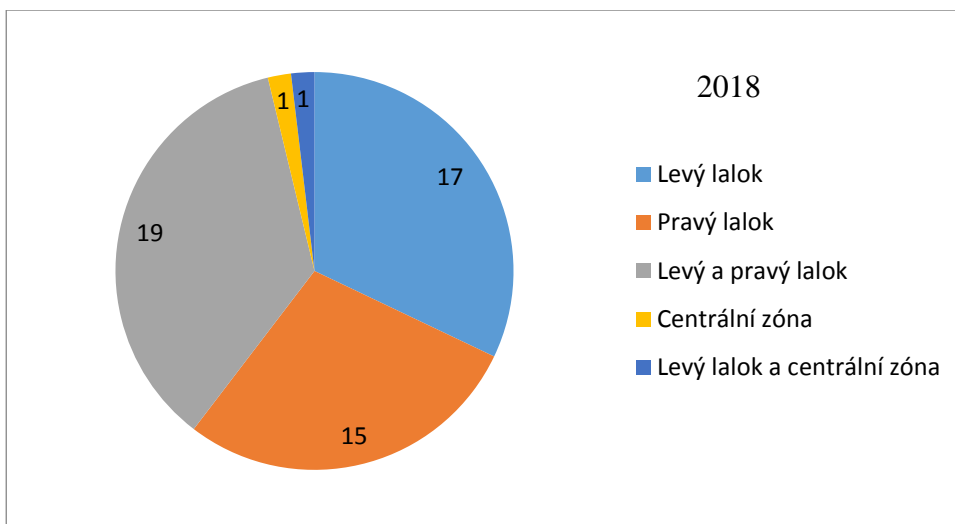


Graf č. 2 Lokalizace pozitivní punkční biopsie za rok 2017

V roce 2018 zpracovala laboratoř 7 429 vzorků. Z toho bylo 542, u kterých se použilo imunohistochemické vyšetření. Punkčních biopsií prostaty bylo provedeno 99 a prostatektomií 61.

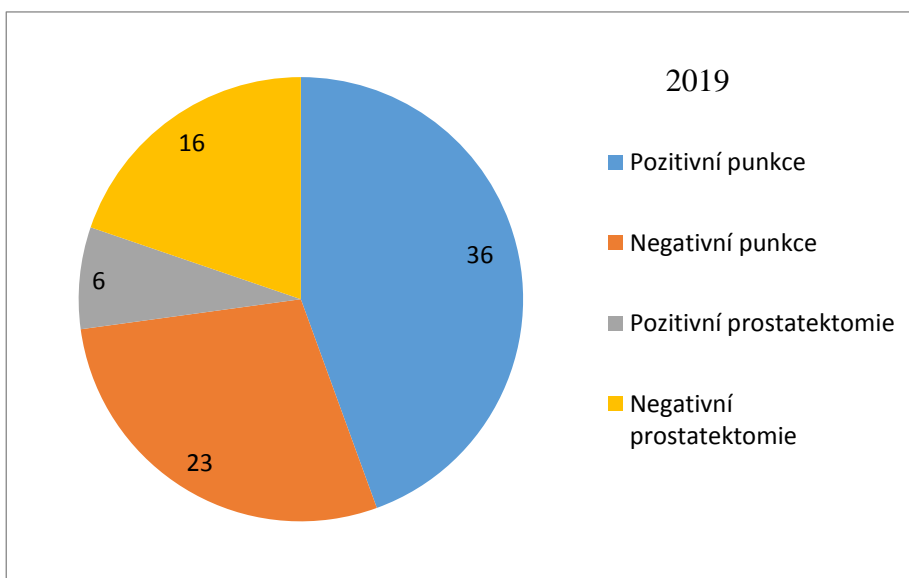


Graf č. 3 Počet vyšetření z rok 2018

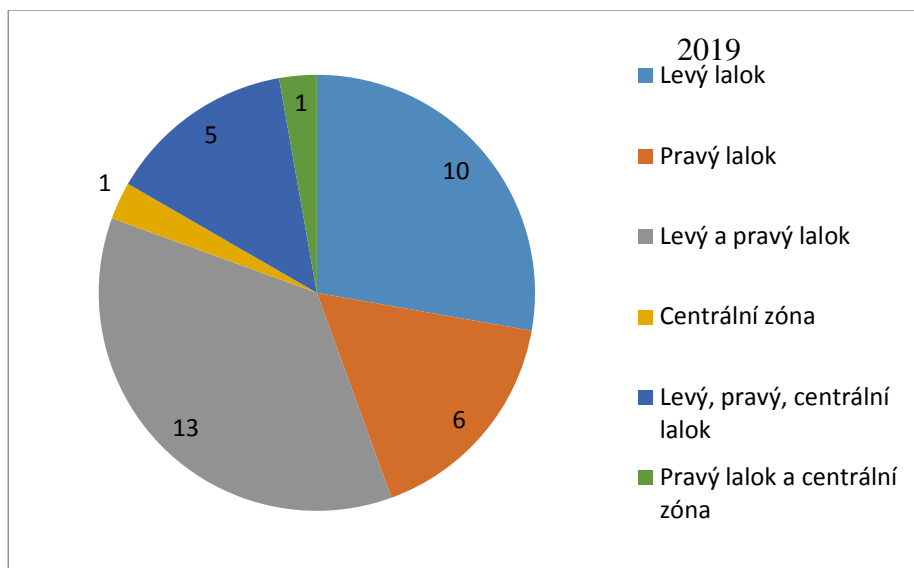


Graf č. 4 Lokalizace pozitivní punkční biopsie za rok 2018

V roce 2019 zpracovala laboratoř 7 311 vzorků. Z toho bylo 554, u kterých se použilo imunohistochemické vyšetření. Punkčních biopsií prostaty bylo provedeno 59 a prostatektomií 22.



Graf č. 5 Počet vyšetření za rok 2019



Graf č. 6 Lokalizace pozitivní punkční biopsie za rok 2019

10 Diskuze

V bakalářské práci se zaměřuji na imunohistochemické vyšetření při diagnostice karcinomu prostaty. Zkušený patolog pozná karcinom už ze základního barvení Hematoxylin – eosinem. Pro potvrzení diagnózy nebo u nejasných případů je lepší udělat imunohistochemické vyšetření. Jako další protilátky se mohou používat např. racemáza (AMACR), což je mitochondriální enzym exprimovaný v buňkách prostatických žlázek nebo GATA3, který slouží k odlišení uroteliálního karcinomu od karcinomu prostaty.

Imunohistochemické vyšetření se na Oddělení patologicko – anatomickém Nemocnice Písek a.s. dělá ručně. Provádí ho zkušená laborantka a správnost metody je kontrolována externími kontrolami. V dnešní době už na mnoha pracovištích používají automatické přístroje na imunohistochemické barvení. Na našem oddělení se zatím nedělá tolik vyšetření, aby se to ekonomicky vyplatilo, i když podle statistiky má počet imunohistochemického vyšetření vzestupnou tendenci. Počet vyšetření prostaty ale momentálně klesá, což je hlavně způsobeno změnami v personálním obsazení na Urologickém oddělení, Nemocnice Písek a.s. Je potřeba vyvíjet další protilátky, protože i onemocnění se stále vyvíjí.

Jako další cíl práce jsem si určila srovnání mezi diagnostickými závěry z punkčních biopsií prostaty a z radikální prostatektomie. U punkčních biopsií prostaty velmi záleží na zkušenostech klinického lékaře, který zákrok provádí. Odběry se

provádí pod ultrazvukem a ložiska bývají velmi malá. Může se stát, že odebírající lékař správně nenapíchnou postiženou tkáň. V případě mnou zkoumaného souboru pacientů se vždy podařilo odebrat změněnou tkáň, což se následně potvrdilo při radikální prostatektomie u téhož pacienta.

11 Závěr

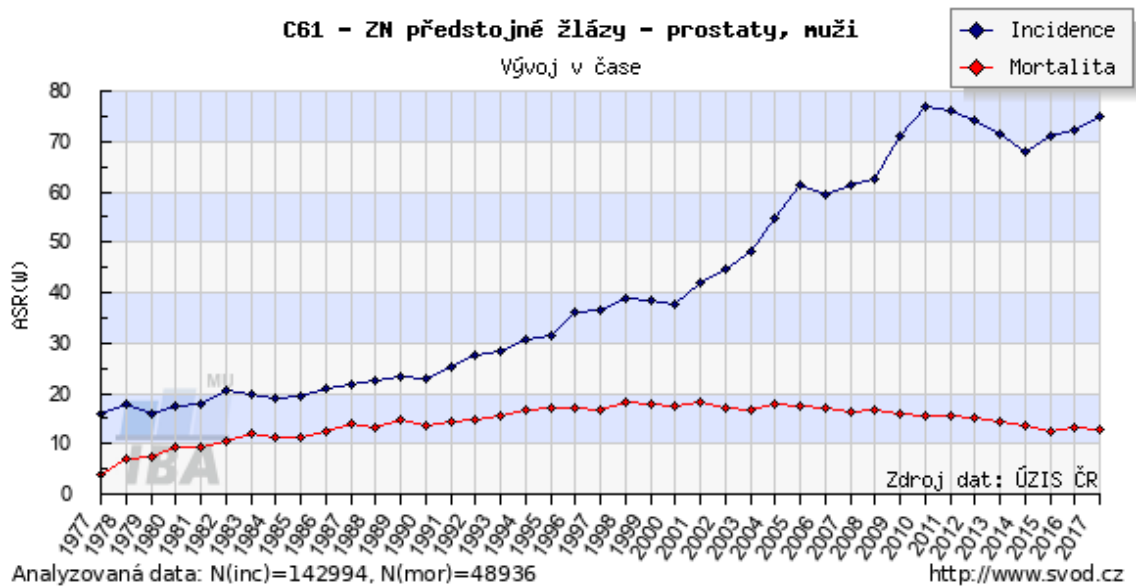
V bakalářské práci jsem se zamyslela nad rolí histologického laboranta a chtěla jsem přiblížit jeho důležitou úlohu v diagnostickém procesu. Široká veřejnost nemá stále velké povědomí o práci histologického laboranta. Imunohistochemické vyšetření je velmi důležitou součástí správné diagnózy.

Na Oddělení patologicko – anatomickém, Nemocnice Písek a.s. bylo mezi roky 2017 – 2019 vyšetřeno 259 vzorků z punkčních biopsií prostaty a 158 vzorků z radikálních prostatektomií. Imunohistochemické vyšetření bylo provedeno u 136 vzorků punkčních biopsií a u 43 vzorků z radikální prostatektomie. Naše laboratoř dělá imunohistochemické vyšetření u všech pozitivních vzorků. Díky tomu může patolog stanovit přesnější diagnózu a pacient dostane účinnější léčbu. Výsledky vyšetření z punkčních biopsií a z vyšetření z radikálních prostatektomií se u téhož pacienta shodovaly. Nejvíce postiženou částí byly levý a pravý lalok prostaty. Centrální zóna byla postižena minimálně, přesně tak, jak uvádí literatura.

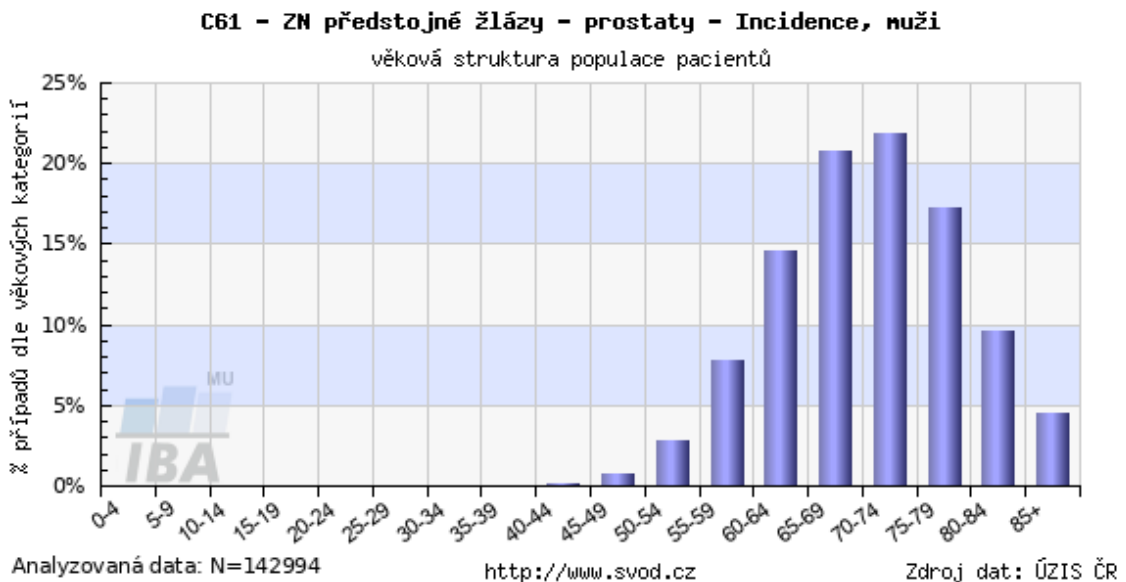
12 Použité zkratky

CK HMW	Cytokeratin s vysokou molekulovou hmotností
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
GATA3	Transkripční faktor
GG	Gleasonův grading
HE	Hematoxylin eosin
LFUK	Lékařská fakulta Univerzity Karlovy
NIS	Nemocniční informační systém
PSA	Prostatický specifický antigen
PSMA	Prostatický membránový antigen
RNA	Ribonukleová kyselina
TNM	Klasifikace zhoubných novotvarů
VFN	Všeobecná fakultní nemocnice

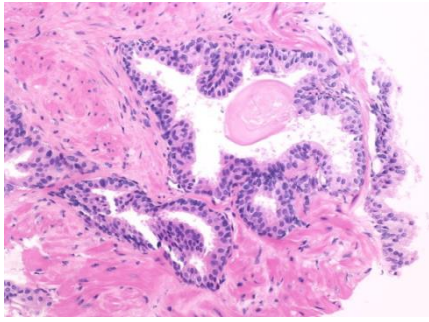
13 Přílohy



Graf č. 7 Vývoj incidence a mortality u karcinomu prostaty

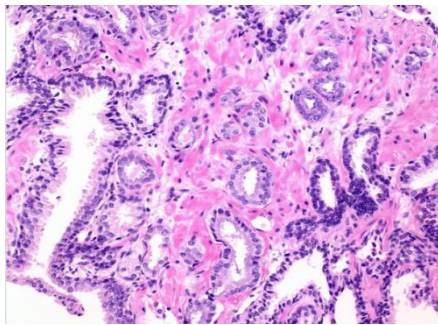


Graf č. 8 Věková struktura pacientů s karcinomem prostaty



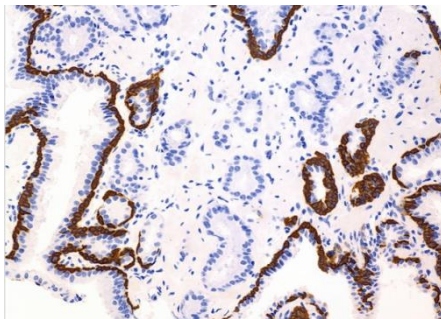
Obrázek č. 2 - prostata - benigní žlázy s corpus amylaceum

barvení HE, 10x zvětšení



Obrázek č. 3 - adenokarcinom prostaty

barvení HE, 10x zvětšení

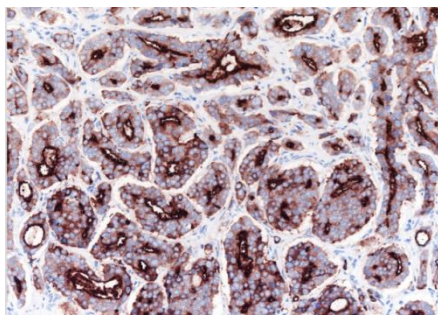


Obrázek č. 4 - adenokarcinomu prostaty

IHCH, 10x zvětšení

CK (HMW)

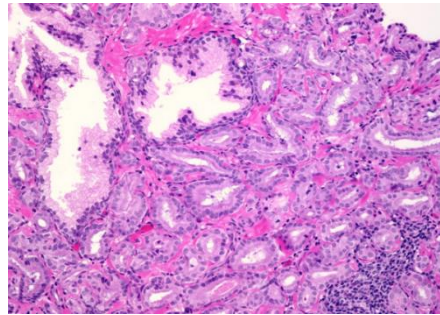
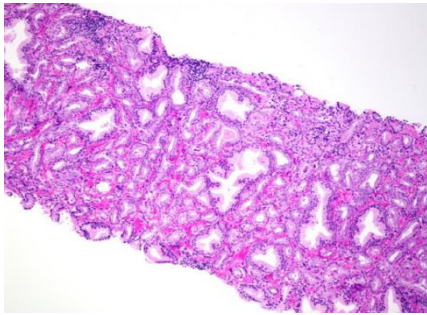
benigní žlázy konturované, nádorové žlázy se nebarví



Obrázek č. 5 - adenokarcinom prostaty

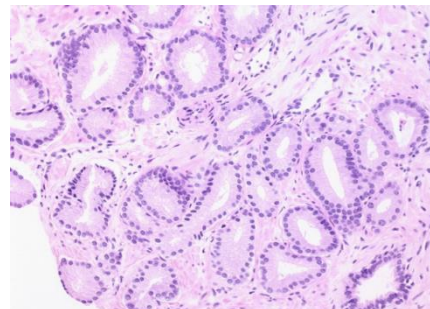
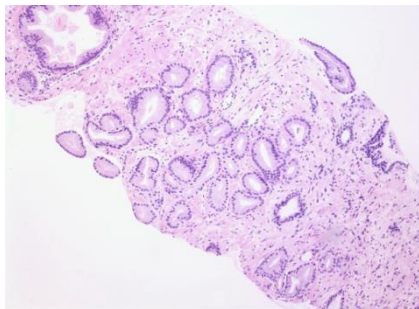
IHCH, 10x zvětšení

PSA



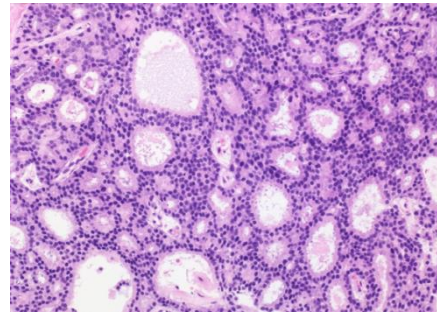
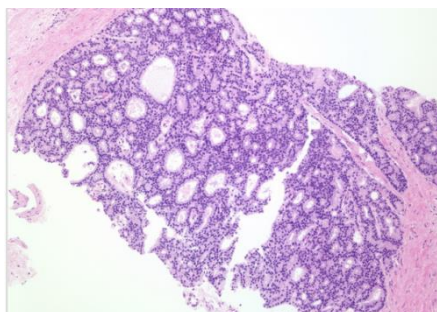
Obrázek č. 6 - adenokarcinom prostaty - Gleason skóre 3+3, barvení HE, 10x a 20x zvětšení

tubulární architektura nádorových žlázek, zavzaté benigní žlázy s komplexním větvením lumen



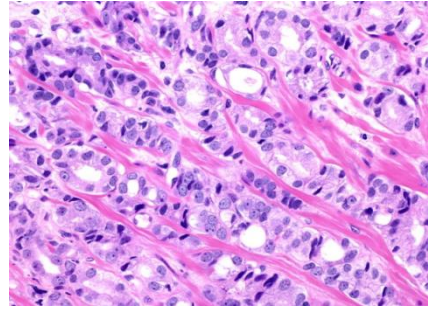
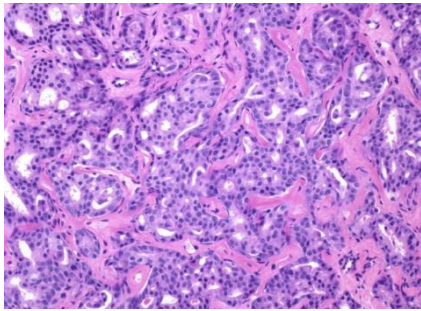
Obrázek č. 7 - adenokarcinom prostaty - Gleason skóre 3+2, barvení HE, 10x a 20x zvětšení

relativně uniformní tubulární architektura nádorových žlázek



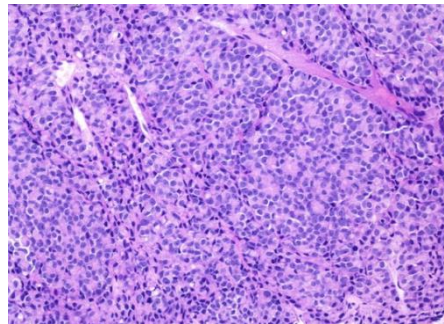
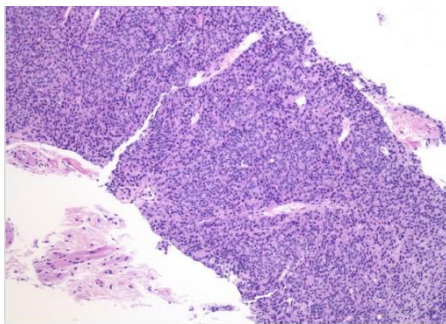
Obrázek č. 8 - adenokarcinom prostaty - Gleason skóre 4+4, barvení HE, 10x a 20x zvětšení

kribriformní architektura nádorových žlázek s patrnými luminy



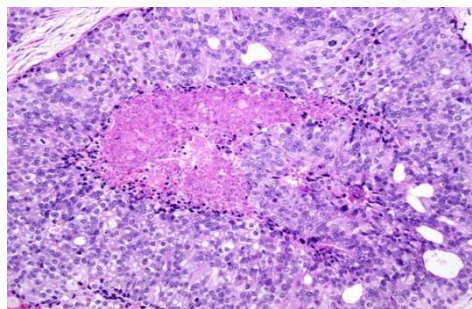
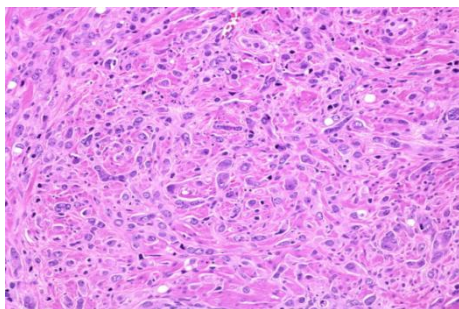
Obrázek č. 9 - adenokarcinom prostaty - Gleason skóre 4+4, barvení HE, 10x a 20x zvětšení

fúzně glandulární, trabekulární architektonika nádorových žlázek s patrnými luminy



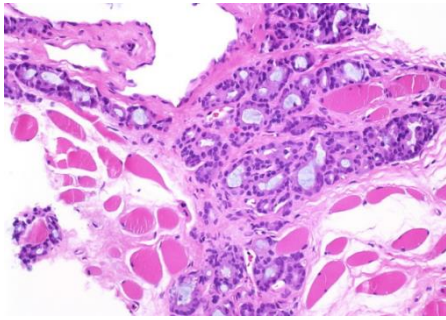
Obrázek č. 10 - adenokarcinom prostaty - Gleason skóre 5+5, barvení HE, 10x a 20x zvětšení

solidní architektonika nádorových žlázek s jen rudimentární glandulární úpravou



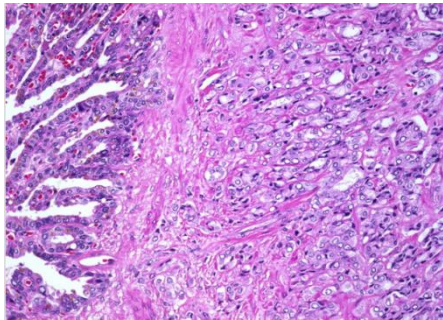
Obrázek č. 11 - adenokarcinom prostaty - Gleason skóre 5+5, barvení HE, 10x a 20x zvětšení

infiltrativní růst disociovaných nádorových buněk do stromatu, přítomnost nekrotéz



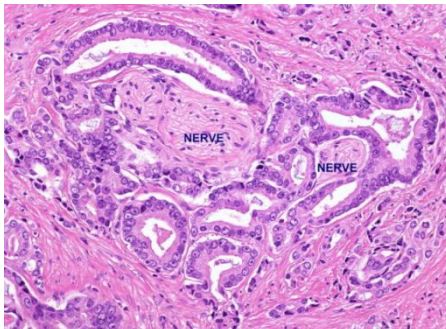
Obrázek č. 12 - adenokarcinom prostaty - invaze mezi snopce příčně pruhované svaloviny

barvení HE, 10x zvětšení



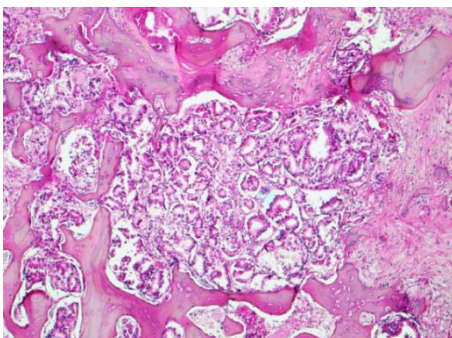
Obrázek č. 13 - adenokarcinom prostaty - invaze do svalové stěny semenných váčků

barvení HE, 10x zvětšení



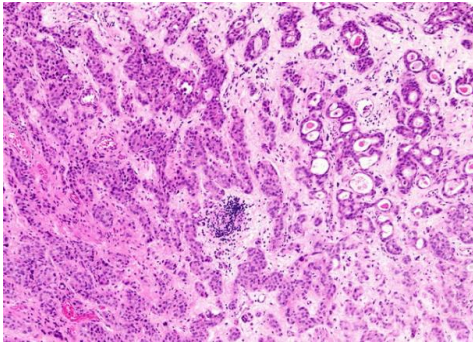
Obrázek č 14 - adenokarcinom prostaty - perineurální invaze

barvení HE, 10x zvětšení



Obrázek č. 15 - metastáza adenokarcinomu prostaty do skeletu (femuru)

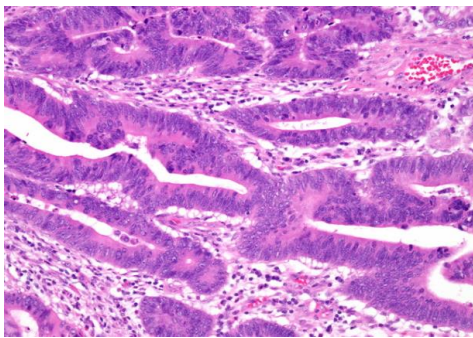
barvení HE, 10x zvětšení



Obrázek č. 16 - infiltrativně rostoucí uroteliální karcinom s ložiskovou glandulární diferenciací

barvení HE , 10x zvětšení

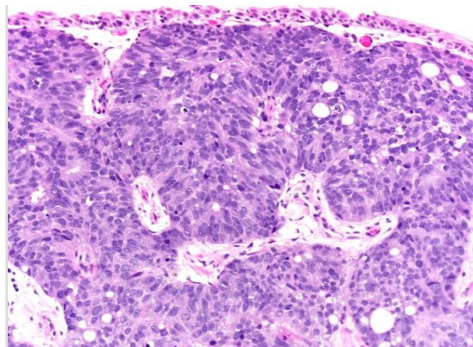
IHCH - PSA negativní



Obrázek č. 17 - infiltrativně rostoucí kolorektální karcinom tubulárního uspořádání

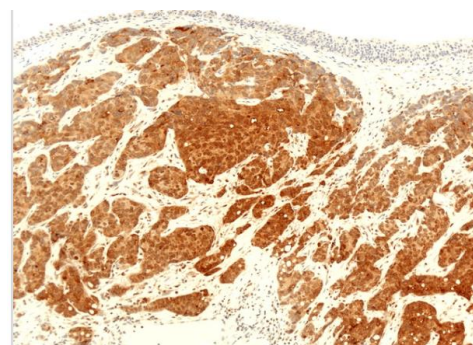
barvení HE , 20x zvětšení

IHCH - PSA negativní



Obrázek č. 18 - adenokarcinom prostaty infiltrující močový měchýř

barvení HE , 10x zvětšení



Obrázek č. 19 - adenokarcinom prostaty infiltrující močový měchýř

IHCH - PSA pozitivní

14 Seznam literatury

1. Čihák R. *Anatomie 2*, Praha: Grada Publishing, 2013, 512 s., ISBN 978-80-247-4788-0
2. Platzer W. *Atlas topografické anatomie*, Praha: Grada Publishing, 1996, 300 s., ISBN 978-80-7169-214-0
3. Pabst R., Putz R. *Sobottův atlas anatomie člověka*, Praha: Grada Publishing, 2007, 928 s., ISBN 978-80-247-1870-5
4. Materiály firmy Dako
5. Standardní operační postup – Oddělení patologicko – anatomické, Nemocnice Písek a.s.
6. Laboratorní příručka Oddělení patologicko-anatomické, Nemocnice Písek, a.s.
Dostupné z:
https://www.nemopisek.cz/media/ke_stazeni/PATLaborPrir201811.pdf
[cit. 2020-04-12].
7. Lullmann – Rauch R. *Histologie*, Praha: Grada Publishing, 576 s., 2012, ISBN 978-80-247-3729-4
8. Kawaciuk I. *Urologie*, Praha: Galén, 2009, 531 s., ISBN 978-80-7262-627-7
9. Fiala R., Zát'ura F., Ženíšek J. *Adenokarcinom prostaty od PSA k terapii*, Praha: StudiaGeo s.r.o, 2001, 144 s., ISSN 1211-00795

10. Vacek Z. *Histologie a histologická technika: Histologická technika II. část.*, Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1995, 184 s., ISBN 80-7013-202-7
11. Rosai, J., 2011. *Rosai and Ackermans Surgical Pathology*, Mosby, 2892 s. ISBN 9780323069694
12. Fletcher, CH. D. M., 2013. *Diagnostic Histopathology of Tumours*. Elsevier – Health Science Division, 2296 s., ISBN 9781437715347
13. Dabbs, D. J., 2018. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*. Elsevier, 944 s., ISBN 9780323477321
14. Konrádová V., Uhlík J., Vajner L. *Funkční histologie.*, Jinočany: HaH Vyšehradská s.r.o., 2000. 291 s. ISBN 80-86022-80-3
15. Stříteský J. *Patologie*. Olomouc: Epava, 2001, 338 s. ISBN 80-862- 9706-3.
16. Grepl, M., *Radikální prostatektomie* [online]. *Onkologie* 2010 č. 4: 72–74 s. Dostupné z <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/02/04.pdf> [cit. 2020-04-22].
17. Pracovní instrukce – Oddělení patologicko – anatomické, Nemocnice Písek a.s.
18. Bezpečnostní list – PENTA s.r.o.
19. Zanoni L., Nanni C., Fanti S., *Anatomy, physiology and pathology of the prostate* [online]. *Eanm Tech Guide* 2018, 14 – 19 s. Dostupné z https://www.eanm.org/content-eanm/uploads/2018/10/EANM_2018_TechGuide_ONLINE.pdf [cit. 2020-03-15].

20. Hradil David, Vladimír Študent, Milan Král a Vladimír Študent. *Diagnostika a staging karcinomu prostaty*. [online]. Onkologie. 2014, 8(1), 15-18. ISSN 1802-4475. Dostupné z <https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2014/01/04.pdf> [cit. 2020-03-20].
21. KURFÜRSTOVÁ, Daniela a Milan KRÁL. *Adenokarcinom prostaty a hodnocení stupně jeho diferenciaci: změny v hodnocení Gleasonova skóre od jeho vzniku po současnost a jeho význam pro praxi patologa a urologa*. [online]. Urologie pro praxi. 2013, 14(4), 157-159. ISSN 1213-1768. Dostupné z <https://www.urologiepropraxi.cz/pdfs/uro/2013/04/03.pdf> [cit. 2020-04-10].
22. Gordetsky, Jennifer a Jonathan Epstein. *Grading of prostatic adenocarcinoma: current state and prognostic implications*. [online]. Diagnostic Pathology. 2016, 11(1). DOI: 10.1186/s13000-016-0478-2. ISSN 1746-1596. Dostupné z <https://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13000-016-0478-2> [cit. 2020-02-26].
23. Osunkoya, Adeboye O. *Mucinous and secondary tumors of the prostate*. [online]. Modern Pathology. 2018, 31(S1), 80-95. DOI: 10.1038/modpathol.2017.132. ISSN 0893-3952. Dostupné z <https://www.nature.com/articles/modpathol2017132> [cit. 2020-03-10].
24. Grozescu T, and Popa F. *Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy*. [online]. J Med Life. 2017;10(1):5–12. PMID:28255369 PMCID: PMC5304372. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5304372/> [cit. 2020-01-22].
25. Humphrey, Peter A; Moch, Holger; Cubilla, Antonio L; Ulbright, Thomas M; Reuter, Victor E (2016). *The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs-Part B: Prostate and Bladder Tumours*. [online]. European Urology:1-14. Dostupné z : <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028> [cit. 2020-01-13].

26. Beranová, M., Tonar, Z., *Principy a příklady imunohistochemie*, [online]. Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni, 2002. Dostupné z http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc_hi_res.pdf [cit. 2020-01-06].
27. Martínek J., Vacek Z., *Histologický atlas*, Praha: Grada Publishing, 2008, 136 s., ISBN 978-80-247-2393-8
28. Kittnar O. a kol., *Lékařská fyziologie*, Praha: Grada Publishing, 2011, 800 s., ISBN 978-80-247-3068-4
29. Čížková K., *Základy histochemických metod*, Olomouc, Univerzita Palackého, 2018, 50 s., ISBN 9788024453675
30. Balko J., Tonar Z., Varga I. a kol., *Memorix histologie*, Triton, 2017, 584 s., ISBN 978-80-7553-249-7

