



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

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

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Porovnání tří histologických metod vedoucích k určení diagnózy

Vypracoval: Dolejší Lenka
Vedoucí práce: MUDr. Vítková Pavla

České Budějovice 2013/2014

Abstrakt

Cílem mé práce bylo porovnat tři histologické metody, jak na úrovni operačních postupů, tak i vzhledem k jejich podílu na určení výsledné diagnózy. Porovnávala jsem rychlou peroperační biopsii (RPB), barvení hematoxylin-eosin (HE) a imunohistochemické metody (IHC), konkrétně monoklonální protilátku Cytokeratin 7 (CK 7). Všechny tyto tři histologické metody se používají při vyšetření sentinelové uzliny (SN), která je odebrána pacientům s již diagnostikovaným karcinomem prsu.

První část své práce jsem věnovala teorii, popisu jednotlivých dílčích kroků u vybraných histologických metod. Také jsem zde nastínila problematiku vyšetřování uzlin u karcinomu prsu, výhody, které pacientům poskytuje v současné době velmi hojně používané vyšetření SN oproti dříve prováděné disekci axilárních uzlin. Disekce axilárních uzlin je prováděna dále, ale ne již v takovém měřítku, jako tomu bylo dříve. Před zavedením metody vyšetření SN byly automaticky u každého prokázaného karcinomu prsu odebrány pacientovi axilární uzliny. Tento celkem rozsáhlý zákrok pacientům přinášel další komplikace ve formě špatné hybnosti končetiny, otoků atd. Tím byla zhoršena i následná rekonvalescence a léčba pacienta. V současnosti se přistupuje k odběru axilárních uzlin jen při nálezů metastázy v sentinelové uzlině. Jak z mé práce vyplývá, mnohem více je nalezeno sentinelových uzlin bez metastázy, a proto je mnoho pacientů disekce axilárních uzlin ušetřeno. To je způsobeno včasným zachytem karcinomu.

Metodickou část mé práce jsem prováděla v patologické laboratoři Nemocnice České Budějovice a.s. (PAO NCB), kde jsem zaměstnána. Tato část je rozdělena na preanalytickou, analytickou a postanalytickou fázi. V preanalytické fázi zdůrazňuji, jak důležitý je správný odběr a transport vzorku do laboratoře. V analytické fázi se věnuji jednotlivým metodám samostatně. Představuji zde kroky, kterými musí každý vyšetřovaný vzorek projít, než je možné z něho provést diagnózu. Postanalytická fáze shrnuje samotnou diagnostiku.

V části výsledky jsem nejprve provedla statistické zhodnocení celkového počtu vyšetřených parafínových bloků a preparátů za období 2003 – 2013. Je zde také zachycen každoroční nárůst IHC, od vlastního zavedení metody IHC v roce 1998 až do roku 2013. Zmapovala jsem i postupnou změnu panelu primárních protilátek používaných na PAO NCB. A dále zhodnotila vlastní naměřené výsledky. Celkem jsem za období březen 2013 – březen 2014 zpracovala 142 SN, které byly odebrány k již prokázanému karcinomu prsu. Každá SN byla zpracována RPB, následně barvena HE a dovyšetřena pomocí IHC protilátkou CK 7. Rychlou peroperační biopsií bylo v SN nalezeno 22 metastáz karcinomu prsu, jejich dalším zpracováním a barvením HE bylo nalezeno dalších 16 pozitivních SN (celkem tedy již 38 pozitivních SN) a pomocí IHC protilátkou CK 7 ještě dalších 7 pozitivních SN. Dohromady jsme našly metastázu v 45 sentinelových uzlinách. 97 sentinelových uzlin bylo negativních. Z dosažených výsledků vyplývá, že největší záchyt metastáz v SN bylo pomocí IHC protilátkou CK 7. Touto metodou jsou zachyceny i tzv. ITC (izolované nádorové buňky). Mohou to být jednotlivé nádorové buňky nebo malé shluky, ne však větší než 0,2 mm nebo méně než 200 buněk v jednom histologickém řezu. Tyto submikrometastázy jsou nalezeny jen pomocí imunohistochemie. Také jsem se zabývala možností vlivu věku pacienta na přítomnosti metastázy v SN. Pacienty s vyšetřovanou SN jsem rozdělila do 5 věkových kategorií (graf 5, 6). Nejvíce nalezených pozitivních SN bylo ve věkové kategorii 61-70 let.

V diskuzi jsem kromě hodnocení naměřených výsledků popsala výrazné změny, hlavně ve formě automatizace, kterými si RPB, HE a IHC prošly během posledních let na oddělení PAO NCB. Některé tyto změny jsou zdokumentovány na fotografiích a uvedeny v Příloze 3, 4, 5 a 6.

Klíčová slova: rychlá peroperační biopsie, barvení hematoxylin-eosin, imunohistochemické metody, sentinelová uzlina, disekce axilárních uzlin.

Abstract

The main aim of this thesis was to compare three methods of histology from both the theoretical analysis to determine the final diagnosis and resulting the level of surgical procedures.

I compared the rapid intraoperative biopsy (RPB), dyeing of hematoxylin–eosin (HE) and immunostaining method (IHC) especially monoclonal antibody Cytokeratin 7 (CK 7). All of the three methods of histology are being used to examine the sentinel lymph node (SN). The SN is removed to the patients with diagnosed breast cancer.

I paid attention to describe individual procedures of the selected methods of histology in the first part of this thesis. I also pointed out the complications during detecting the nodes of the carcinom of breast. And I underlined the advantages of detecting SN, which is nowadays widely supplied to all patients compare to the method of axillary nodes dissection used before. Before the SN detecting method was implemented, there used to be an old method which primarily removed the axillary nodes from each patient after the carcinom of breast had been detected. This quite extensive action caused further complications regarding the deconditioning of the limbs dynamics and swelling. With this respect the patient's following treatment and recovery went worse. Currently the axillary nodes are being removed only if metastasis in sentinel lymph node was detected. My thesis shows that there were found many more sentinel nodes without metastasis and therefore, these days, there are many patients saved from the dissection of axillary nodes. This is mainly assured by an early detection of carcinoma.

The methodical part of my thesis was carried out in the hospital of České Budějovice in the pathological lab (PAO NCB), where I have been employed. This part is divided into pre-analytic, analytic and post-analytic phases. The pre-analytical phase emphasizes the importance of correct biopsy and trasport of its sample to the lab. The analytical phase pays attention to each method individually. I describe all the

procedures which each sample must go through before a diagnosis can be done. The post analytical phase summarizes the diagnose itself.

In the part of the thesis which is aimed at results, I show statistical evaluations of the whole amount of examined paraffine embedded tissues and sample forms within the period of 2003 – 2013. There is also intercepted annual grow of IHC since its implementation in 1998 until 2013. I analysed a continual change of primary antibodies used at PAO NCB. I also evaluated my own measured results. In the term from March 2013 to March 2014 I processed altogether 142 SN, which were removed from proved breast cancer. Each SN was processed through RPB, followed by dyeing through HE and examined with IHC antibody CK 7. There were found 22 metastasis of breast cancer in SN through the rapid intraoperative biopsy, other 16 metastasis were detected through HE staining and another 7 positive results in SN were detected through IHC antibody CK 7. We found altogether 45 positive metastasis in SN. 97 sentinel lymph nodes were negative. According to the processed results we proved that the biggest detection of metastasis in SN was through the method of IHC antibody CK 7. This method is used also for detection of isolated tumor cells (ITC). It can be just individual cells or a group of tumor cells not bigger than 0.2 mm or less than 200 cells in one histological sample. Such submicrometastasis can be detected only through immunostaining.

I also analysed the impact of patients' age regarding the metastasis in SN. I divided the patients into 5 categories according to the age (see graph 5, 6). The largest number of SN positive was in the category 61-70 years of age.

In the discussion part I described the evaluation of measured results and pointed out strong changes of RPB, HE and IHC methods which have been processed in the PAO NCB department within the past few years. Some of those changes mentioned above are shown in the pictures attached in the attachements 3, 4, 5, and 6.

Keywords: the rapid intraoperative biopsy, dyeing of hematoxylin–eosin, immunostaining method, the sentinel lymph node, the dissection of axillary nodes.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených 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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Lenka Dolejší

(jméno a příjmení)

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce a primáři Oddělení patologie Nemocnice České Budějovice a.s. MUDr. Pavle Vítkové za odborné vedení a poskytování informací. Dále děkuji spolupracovníkům v Laboratoři Patologického oddělení Nemocnice České Budějovice a.s. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu a trpělivost.

Obsah

Úvod.....	11
1. Teoretická část.....	13
1.1 Začátky oboru histologie.....	14
1.1.1 Současný stav.....	14
1.2 Histologické vyšetření.....	16
1.2.1 Histologické barvení hematoxylin-eosin	16
1.2.1.1 Odběr materiálu	16
1.2.1.2 Fixace materialu	17
1.2.1.3 Zalévání materiálu	18
1.2.1.4 Krájení řezů	19
1.2.1.5 Barvení řezů.....	20
1.2.1.6 Montování řezů.....	21
1.2.1.7 Výsledek barvení	22
1.3 Imunohistochemické metody (IHC).....	22
1.3.1 Odběr a fixace materiálu pro IHC.....	24
1.3.2 Zalévání a krájení materiálu pro IHC	25
1.3.3 Postup imunohistochemické reakce.....	25
1.3.3.1 Revitalizace antigenních struktur	25
1.3.3.2 Blokování endogenní aktivity enzymů	26
1.3.3.3 Blokování pozadí.....	26
1.3.3.4 Primární protilátka.....	27
1.3.3.5 Detekční systém.....	28
1.3.3.6 Chromogeny	28
1.3.3.7 Dobarvení jader a montování preparátu	28
1.3.4 Úskalí imunohistochemických metod.....	28
1.4 Peroperační vyšetření buněk a tkání (RPB)	29
1.4.1 Odběr a fixace materiálu.....	30
1.4.2 Krájení materiálu	30

1.4.3	Barvení a montování RPB	30
1.4.4	Výsledek barvení	30
2.	Cíl práce a předpokládané hypotézy	31
2.1	Cíl práce	31
2.2	Předpokládané hypotézy	31
3.	Metodika	32
3.1	Chemikálie, reagentie, přístroje a pomocná zařízení.....	32
3.1.1	Chemikálie a reagentie	32
3.1.2	Přístroje a pomocná zařízení.....	32
3.2	Preanalytická fáze	33
3.3	Analytická fáze.....	34
3.3.1	Metoda RPB.....	34
3.3.2	Další zpracování vzorků a barvení HE	35
3.3.3	Imunohistochemické metody	36
3.4	Postanalytická fáze.....	40
4.	Výsledky	41
4.1	Statisticky zhodnocené výsledky	41
4.2	Naměřené výsledky	44
4.3	Porovnání postupů histologických metod	45
4.4	Závislost mezi věkem pacienta a přítomností metastázy v SN	46
5.	Diskuze	48
5.1.1	<i>Barvení HE</i>	48
5.1.2	<i>Metoda RPB</i>	49
5.1.3	<i>Metoda IHC</i>	49
5.2	<i>Porovnání metod</i>	50
6.	Závěr	53
7.	Seznam použitých zdrojů.....	55
8.	Přílohy.....	59

Seznam použitých zkratk

CK 7 – cytokeratin 7

DAB - 3,3 diaminobenzidin

HE – hematoxylin-eosin

IHC - imunohistochemie

ITC - izolované nádorové buňky

NCB PAO SOP – Standartní operační postup patologického oddělení NCB

NIS – nemocniční informační systém

PAO NCB – Patologické oddělení Nemocnice České Budějovice

RPB – rychlá peroperační biopsie

SN – sentinelová uzlina

Úvod

V současnosti dochází ke stálému nárůstu výskytu novotvarů zhoubných (maligních) i nezhooubných (benigních). Benigní nádory rostou pomaleji, bývají ohraničené a opouzdržené. Jejich expanzivní (rozpínavý) růst stlačuje okolní buňky a tkáň. Maligní nádory rostou rychle, jsou neohraničené. Rostou infiltrativně a destruktivně. Pronikají do okolních tkání a šíří se do okolí, tvoří metastázy. Rozhraní mezi benigními a maligními nádory tvoří intermediální nádory. Tyto nádory mají lepší prognózu než maligní nádory, ale někdy recidivují a mohou i metastazovat (1).

Nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním žen je karcinom prsu. Přes neustále rostoucí četnost nádorů prsu je úmrtnost stále stejná. Důvodem je stále úspěšnější léčba a zejména zlepšení časné diagnostiky (2).

Při podezření na nádor musí být provedeno histologické ověření podezřelé tkáně. Patolog určí typ nádoru. Po potvrzení diagnózy patologem chirurg provede určitý zákrok. Všechn odebraný materiál jde opět na histologické vyšetření. Vyšetření patologem je tedy zcela základní a neopominutelné (2).

Současným standardem pro léčbu karcinomu prsu je úplné odstranění nádoru s histologicky negativními okraji. Součástí je i disekce axilárních uzlin (3).

Disekce axilárních uzlin má význam při určení přesného stádia onemocnění a následné terapie. Jejich odstranění je spojeno s řadou komplikací (lymfedem, poruchy hybnosti ramenního kloubu atd (4).

Alternativní metodou na axilární disekci je biopsie sentinelové uzliny (SN), která s velkou přesností určí stav postižení uzlin (5).

Axilární disekce vede následně k axilární lymfadenektomi. Dostupné důkazy naznačují, že je pro pacienty velmi zatěžující a její důsledky mohou vést až ke zvýšené mortalitě. Proto je trendem v současnosti, aby kompletní vyjmutí axilárních uzlin bylo provedeno jen u pacientů s metastázami do sentinelové uzliny (6,7).

Je známo, že až 80 % pacientů, kteří jsou zachyceni v časném stadiu onemocnění je bez metastáz v axile, a proto disekci uzlin podstupují zbytečně. Toto zjištění vede ke značnému zájmu o metodu sentinelové biopsie a k jejímu prosazování (8).

Technika "sentinelové biopsie" byla vyvinuta v roce 1992 Mortonem a spol. Sentinelová uzlina je zpracována celá. Pokud je uzlina větší než 3mm, je rozdělena v podélné ose na bloky o tloušťce maximálně 3mm, které se dále samostatně zpracovávají. Uzlina do velikosti 3mm je zpracována nepůlena (9).

Takto zpracovaná sentinelová uzlina je dále vyšetřována pomocí třech různých metod, kterými se zabývám ve své bakalářské práci. Rychlým peroperační vyšetření buněk a tkání (RPB), barvení hematoxylin-eosin (HE) a imunohistochemické vyšetření antigenů (IHC). Tyto metody se mimo jiných používají na Oddělení patologie v Nemocnici České Budějovice a.s. (PAO NCB)

Sentinelová uzlina se vyšetřuje zejména u karcinomu prsu, melanomu, při nádorech vulvy aj. Na základě histologického vyšetření sentinelové uzliny lze zjistit přítomnost metastáz (mikrometastáz). Přítomnost těchto mikrometastáz nám dá možnost zjistit stadium a rozsah onemocnění. Znalost stadia onemocnění lékařům pomáhá vybrat vhodný léčebný postup.

Myslím si, že obor histologie hraje stále větší významnou roli, jak v určování diagnózy, stadia a rozsahu chorob, tak i při rozhodování, jak postupovat s následující léčbou pacienta. Má tedy i nadále velký a stále ještě nedoceněný přínos v klinických oborech.

1. Teoretická část

Histologie je vědní obor studující strukturu buněk a tkání mnohobuněčných organismů (10).

Histologii můžeme rozdělit na normální a patologickou. Dále ji pak dělíme na cytologii, ta se zabývá mikroskopickou a submikroskopickou stavbou buněk. Obecná histologie zabývající se mikroskopickou stavbou tkání a speciální histologie ta se zabývá mikroskopickou stavbou jednotlivých orgánů člověka (11).

Histologická technika nám osvětlí přípravu histologického preparátu. Histologický preparát musí být dostatečně tenký a pozoruje se ve světelném mikroskopu (12).

Musíme pamatovat na to, že i sebedokonalejší cytologický, histologický či histochemický preparát nám zachytí pouze okamžitý záznam (výseč) z jinak velmi dynamických intravitálních dějů, které probíhaly před zahájením fixace (13).

V poslední době dochází k rozvoji i dalších oborů navazujících na „klasickou“ histologii, jako je histochemie a imunohistochemie, zabývající se průkazem různých látek (např. bílkovin, lipidů, sacharidů, enzymů) v tkáních a orgánech (11).

V imunohistochemii detekujeme v histologických řezech afinitu antigenu, specifické protilátky a jejich vzájemnou vazbu. V současnosti imunohistochemie slouží zejména k diferenciální diagnostice nádorů (14).

Rychlá peroperační biopsie (RPB) je metoda, při které se zpracovává nativní vzorek tkáně, kterou chirurg odebere v průběhu operace. Další postup operace je zvolen až podle výsledku vyšetření.

Sentinelová uzlina je první (nejblíže k nádoru) lymfatická uzlina, kde se zachytí nádorová buňka a vytvoří metastázu (9).

Metastáza je přenesení nádorových buněk z primárního ložiska na jiné místo (sekundární ložisko). Známé jsou tři způsoby a to krevní cestou, lymfatickou cestou a porogeně (cestou dutých orgánů) (1).

1.1 Začátky oboru histologie

Obor histologie, jehož náplní je morfologické studium buněk, tkání a orgánů, procházel zajímavým historickým vývojem. Začátky histologie jsou spojeny s využitím světelného mikroskopu na počátku 18. stol., první dokumentace pozorovaných struktur byly zaznamenány v podobě kreseb. Rozlišovací schopnost světelného mikroskopu je limitujícím faktorem. Proto se další výzkum zaměřil na možnosti, jak proniknout hlouběji do struktury buněk. Ve 30. letech našeho století byl sestrojen elektronový mikroskop (15).

Prvopočátky imunohistochemie lze datovat od roku 1941, kdy poprvé provedli Coons a Kaplan průkaz antigenů ve tkáních pomocí fluoresceinem značené protilátky. Nevýhodou bylo, že vyšetřovaný materiál musel být nativní. To je problém hlavně v diagnostické praxi (14).

V roce 1976 Milstein a Köhler připravili protilátky proti jednomu epitopu antigenní molekuly – tzv. monoklonální protilátky. V 70. letech se podařilo spojit enzym s protilátkou. Metodika dovolila využití formolem fixované a do parafínu zalévané vzorky (16).

1.1.1 Současný stav

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným onemocněním žen na celém světě. Včasnou diagnostikou můžeme dosáhnout nejen úspěšné léčby, ale i snížit procento úmrtí na toto onemocnění. Čím dříve je nádorové onemocnění odhaleno, tím je zároveň i větší šance na jeho úplné vyléčení. Prognóza karcinomu prsu závisí nejvíce na rychlosti a míře generalizace (17).

Prs se skládá z laloků, které jsou tvořeny z menších lalůčků (lobulů) a mlékovodů (tubulů). Viz Příloha 1. Podle místa vzniku dělíme i karcinomy. Duktální karcinom vychází z buněk výstelky ductů je nejčastější cca 70–80%. Dalším typem je lobulární karcinom, vychází z buněk výstelky lobulů, tvoří druhou skupinu, výskyt je cca 10%. Zbytek tvoří ostatní vzácnější typy karcinomů jako tubulární, medulární (2,18).

Karcinom in situ to je karcinom, který nemá ještě porušenou bazální membránu, není tedy invazivní (nemetastazuje). Dělí se na lobulární karcinom in situ (CLIS) a duktální karcinom in situ (DCIS), oba tyto karcinomy se mohou následně změnit na invazivní. Metastazují do axilárních uzlin a dále do plic, kostí, mozku a jater (2,18).

Nádorové buňky se s největší pravděpodobností zachytí v první (sentinelové) lymfatické uzlině, která je metastáze v cestě. Viz Příloha 2. Na základě histologického vyšetření sentinelové uzliny lze zjistit přítomnost metastáz (mikrometastáz) a stanovit další léčebný postup (3).

Stadium onemocnění se značí čísly od 0 do IV. Kriteřiem zařazení do stadia (staging) je velikost nádoru, jeho šíření do lymfatických uzlin nebo dalších orgánů (9).

Další možnost určení rozsahu onemocnění pomocí TNM systému je také z velké části založeno na histologickém vyšetření. Je to soubor vyšetření, jejichž cílem je zařazení onemocnění do klinických stádií dle TNM systému. Kategorie T (tumor) zahrnuje velikost tumoru v prsu v největším průměru. Kategorie N (nodul-uzlina) počet postižených lymfatických uzlin v podpaží. Kategorie M (vzdálené metastázy) informace o případné přítomnosti metastáz ve vzdálenějších orgánech (2).

Dále je nutno určit histopatologický grading neboli stupeň buněčné diferenciaci (zralosti), jedná se o posouzení stupně malignity primárního nádoru dle určitých kritérií. Pro grading karcinomu prsu je nejvíce používána Nottinghamská klasifikace. Ta hodnotí procento objemu tumoru, ve kterém je zřetelná tvorba tubulů, jadernou polymorfii a počet mitóz. Výsledný grading je určen součtem hodnot (skóre) získaných pro jednotlivé položky (1).

Při rozhodování o léčbě je nutné znát ještě hladinu hormonálních receptorů a receptoru Her-2. Tyto receptory jsou nazývány prediktivními markery, protože nám umožňují předpovídat odpověď na určitou léčbu (9).

1.2 Histologické vyšetření

Histologické vyšetření slouží k potvrzení či vyvrácení diagnózy klinického lékaře (19). Histologické vyšetření tkání a orgánů prochází šesti etapami v dále uvedeném pořadí:

1. odběr materiálu
2. fixace materiálu
3. zalévání materiálu
4. krájení řezů
5. barvení řezů
6. montování řezů

Pořadí etap je závazné a všechny dohromady představují podstatu histologické techniky. Obarvený a do montovacího media uzavřený řez - histologický preparát - lékař hodnotí ve světelném mikroskopu (13).

1.2.1 Histologické barvení hematoxylin-eosin

Barvení hematoxylin-eosin je základní histologické barvení, kterým se barví všechny vyšetřované vzorky, které přichází do naší laboratoře.

1.2.1.1 Odběr materiálu

Odebraný materiál pro vyšetření může být buď získaný během operace z živého organismu (biopsie) nebo materiál odebraný během pitvy zemřelé osoby-mrtvého organismu (nekropsie) (19). Materiál musí být odebrán tak, aby představoval reprezentativní vzorek vyšetřovaného orgánu či patologicky změněné tkáně. Musí se uskutečnit v co nejkratším čase, aby autolytickými procesy nedošlo k destrukci tkáně a byla zachována struktura buněk. Proto odebranou tkáň ihned přeneseme do fixačního roztoku nebo zmrazovací směsi (20).

Druhy biopsie jsou:

- Probatorní excize – vynětí vzorku během chirurgického zákroku nebo při endoskopickém výkonu
- Probatorní punkce – nasátí buněk nebo řídké tkáně tlustou jehlou
- Kyretáž – seškrábnutí např. epidermis z povrchu kůže nebo výškrab sliznice u dutých orgánů
- Ektomie – odebrání části orgánu nebo celku

Odebraný materiál musí být pečlivě označen a odeslán do laboratoře s tzv. histologickou průvodkou obsahující základní identifikační údaje (jméno pacienta, rodné číslo, zdravotní pojišťovna, druh fixační tekutiny, orgán, požadované vyšetření, datum odběru, aj. (21).

1.2.1.2 Fixace materiálu

Po zástavě přísunu kyslíku tkáně a orgány rychle podléhají autolýze, ta je způsobena degradací buněčného obsahu uvolněnými enzymy. K zástavě autolýzy je určena fixace, jejíž podstatou je koagulace a denaturace bílkovin buněk a tkání (21).

Účelem fixace je zachovat strukturu buněk a tkání ve stavu nejpodobnějším tomu, jaký mají zaživa. Fixace může vyvolat celou řadu změn, některé jsou pro zamýšlené vyšetření výhodné, jiné nikoli. Fixaci proto volíme podle typu tkáně, kterou zpracováváme, a podle metod plánovaných pro další zpracování (20).

Fixace histologických vzorků se provádí pomocí fixačních prostředků, které jsou dvojího druhu: fyzikální a chemické (13).

Fixační prostředky musí splňovat tři hlavní podmínky:

1. zachovat co nejlépe strukturu tkáně
2. zachovat barvitelnost tkáně
3. rychle pronikat do tkáně (22)

Fyzikální fixace

V histologii se užívá rychlé zmrazení tkáně pomocí kyseliny uhličité („suchého ledu“) nebo kapalných plynů (např. dusíku). Touto metodou se fixují vzorky pro enzymovou histochemii, pro imunohistochemii, pro průkaz tuků nebo při RPB (19).

Další fyzikální fixační metodou je vysušení tkáně za nízké teploty (freezing-drying)(22).

Fixace pomocí mikrovlnné trouby (MW-fixace) (20).

Chemická fixace

Chemické fixační prostředky jsou roztoky anorganických nebo organických sloučenin, případně jejich různé kombinace nebo směsi (13,19,22).

Zásady správné fixace:

- vzorek se musí vložit do fixačního roztoku ihned po odběru
- objem fixační tekutiny musí převyšovat objem fixovaných vzorků, aby roztok mohl pronikat do vzorků ze všech stran (13,19,22)

Přehled chemických fixačních prostředků:

1. aldehydy – formaldehyd, glutaraldehyd
2. alkoholy – etanol, metanol
3. kyseliny – kyselina octová, trichloroctová, pikrová
4. soli těžkých kovů – chlorid rtuťnatý, oxid osmičelý, dvojchroman draselný (20)

1.2.1.3 Zalévání materiálu

Princip zalévání tkáně do parafínu závisí na prosycení odvodněné tkáně rozehrátým parafínem při teplotě 56 – 58°C. Parafín vyplní všechny mikroskopické štěrby v tkáni, takže se pak tkáň dá krájet v tenkých řezech (22).

Tento proces se skládá ze 4 částí:

1. odvodnění tkáně – provádí se stoupající řadou etanolů (70%, 80%, 96%)
2. prosycení tkáně tekutinou, která rozpouští parafin a je mísitelná s etanolem (tzv. projasnění) – benzen a xylen
3. prosycení tkáně parafinem – obvykle ve 3 lázních parafínu při teplotě 56°C
4. vlastní zalití do parafínu (13,22)

Odvodnění, prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafin a prosycení tkáně parafinem je v současnosti automatizováno pomocí tkáňového automatu – autotechnikonu.

Tkáňové bločky se zalévají do umělohmotných rámečků na zalévacím automatu, který obsahuje v zásobníku tekutý parafin. Součástí zalévacího automatu je chladicí modul pro rychlé tuhnutí parafinových bloků (19).

1.2.1.4 Krájení řezů

Z tkáňových bločků se zhotovují tenké histologické řezy, silné několik tisícín mm (μ). Tkáňové bločky zalité do parafínu se krájí na speciálních přístrojích, zvaných mikrotomy (22).

Rozlišuje se mikrotom sáňkový a rotační. U sáňkového mikrotomu se pohybuje nůž a bloček je proti němu vysouván o nastavený počet mikrometrů.

Rotační mikrotom pracuje na opačném principu – proti pevně uchycenému noži se pohybuje blok upevněný na posuvné tyči (13,22).

Ukrojené histologické řezy se přenesou na hladinu teplé destilované vody s trochou želatiny vyhřívané na teplotu kolem 50°C, aby došlo k narovnání a vypnutí řezů. Pak se řezy zachytí na podložní sklo (13,22).

Podložní sklo s nataženými parafinovými řezy se vloží ve stojánek do termostatu nebo na vyhřívanou ploténku, kde se řezy suší, aby nedocházelo k jejich ztrátě při dalším zpracování (19).

1.2.1.5 Barvení řezů

Jednotlivé složky tkání se téměř neliší lomivostí světla, musí se obarvit, aby je bylo možné v mikroskopu vzájemně odlišit. Cílem barvení je zvýraznit ve tkáních a buňkách ty struktury, které chceme studovat, případně odlišit několik tkáňových součástí tím, že se zvýrazní různými barvivy (13).

Barviva používaná v histologii dělíme na barviva zásaditá (bazická) a na barviva kyselá (22).

Zatímco kyselé komponenty buněk a tkání (např. jádro) vážou bazická barviva a označují se jako bazofilní struktury, zásadité složky (např. cytoplazma) reagují s barvivy kyselými a označují se struktury acidofilní (eozinofilní). Struktury, které mají afinitu k oběma druhům barviv, se značí polychromatofilní nebo heterofilní. Podle výsledku se rozlišuje metachromatické barvení, při němž se struktura barví odlišně než je tón použitého barviva a ortochromatické, jestliže je zbarvena stejně jako použité barvivo (21).

Nejpoužívanější a nejzákladnější histologické barvení je metoda barvení hematoxylin-eozin. Hematoxylin je zásadité barvivo a eozin kyselé barvivo (22).

Barvicí metody se rozdělují na přehledné – hlavní zástupce je barvení hematoxylin-eosin nebo barvení podle Weigerta-van Giensona a speciální. Mezi speciální barvení se zařazují např. metody k odlišení pojivových vláken, barvení na lipidy (21).

Obecný postup při barvení:

1. Příprava roztoků potřebných k barvení
2. Odparafinování – k barvení řezů používáme většinou vodných roztoků barviv, a proto musíme řezy nejprve zbavit parafínu. K odparafinování používáme xylen. Protože se ani xylen ve vodě nerozpouští, musíme po rozpuštění parafínu převést preparáty sestupnou alkoholovou řadou do vody (22).
3. Vlastní barvení
4. Montování obarvených řezů

- *Příprava roztoků hematoxylinu a eosinu.*

Hematoxylin je nažloutlý krystalický prášek. Roztok hematoxylinu sám o sobě nebarví, teprve po oxidaci v hematein. Oxidace může probíhat samovolně tzv. zrání hematoxylinu, to trvá příliš dlouho. Proto oxidaci urychlujeme přidáním různých oxidačních činidel, nejčastěji jodičnanu sodného nebo draselného (22).

Oxidační produkt hematoxylinu dále moříme kamencem (kamenec železitý nebo draselný), aby se získal barevný lak. Mořením se zprostředkuje vazba hemateinu na tkáňové elementy. Druhy hematoxylinu rozdělujeme podle povahy mořidla. Kamencový hematoxylin Mayerův, Harrisův a železitý hematoxylin Weigertův (13).

Eosin. Vyrábí se několik druhů eosinů, liší se svým chemickým složením, barvou a rozpustností. První skupinu tvoří bromeosiny (eosin žlutý, červený) a eosin rozpustný v alkoholu. Druhou skupinu tvoří jodeosiny zvané erytrosiny (22).

- *Odparafínování řezů* s použitím lázní xylenu. A následuje sestupná řada alkoholů

- *Vlastní barvení HE.*

Nejprve řezy barvíme hematoxylinem. Tímto barvivem se celá tkáň přebarví a potom se musí provést tzv. diferencování, při kterém se odbarví ty součásti, které znázorněny být nemají. Dosáhneme obarvení žádaných struktur. K diferenciaci se používá kyselý alkohol. Následuje oplach pod tekoucí vodou. Alkalické prostředí vyvolá změnu barvy jader – zmodrání. Pak se barví roztokem eosinu.

1.2.1.6 Montování řezů

Obarvený řez zabezpečíme proti vyschnutí a poškození tak, že řez převrstvíme kapkou inertního tuhacího média a překryjeme krycím sklíčkem, tzv. montování (21).

K tomu se používá montovací médium, to je látka dokonale průhledná, nesmí poškozovat zbarvení tkáně a musí mít vysoký index lomu (22).

Obarvené řezy nemůžeme montovat do těchto látek přímo, musíme je nejprve odvodnit vzestupnou řadou alkoholů, prosytit je xylenem a teprve potom můžeme provést vlastní zamontování. Montovací media zde používaná se nemísí s vodou, ale rozpouštějí se v xylenu. Patří sem kanadský balzám a syntetické komerční pryskyřice (22).

1.2.1.7 Výsledek barvení

Díky barvení hematoxylin - eosin jsou odlišena jádra buněk šedomodře, cytoplazma buněk červeně, kolagenní vazivo růžově, svalstvo červeně a chrupavka modře (22).

1.3 Imunohistochemické metody (IHC)

Imunohistochemické vyšetření je v současnosti hojně využíváné, doplňuje a zpřesňuje diagnózu a zásadně zvyšuje diagnostickou jistotu závěru při diferenciaci nádorů (8,14).

Imunohistochemické metody jsou doplňkem pro rutinní diagnostiku přehledně nebo speciálně barvených preparátů (23).

Imunohistochemie využívá značené protilátky k lokalizaci specifických buněčných a tkáňových antigenů. Patří mezi nejcitlivější a nejspecifičtější histochemické metody (24).

Antigen (Ag) je každá látka či substance přirozeného nebo syntetického původu, kterou imunitní systém rozpozná jako cizí. Součástí Ag jsou antigenní determinanty – epitopy, jsou uloženy na povrchu Ag (16).

Pokud je antigenní determinanta, proti níž je specifická protilátka namířena, ve tkáni přítomna, protilátka se na ni naváže. Tuto vazbu či navázanou protilátku je možno znázornit řadou způsobů, jak bude uvedeno dále (23).

Protilátky jsou bílkoviny nazývané též imunoglobulíny. Slouží k rozpoznání cizích molekul. Jsou produkovány plasmatickými buňkami. Skládají se ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců.

Těžké řetězce – 5 typů – určují druh protilátky IgA, IgD, IgE, IgG a IgM

Lehké řetězce – 2 typy – kappa, lambda (19)

Protilátky se v praxi získávají imunizací laboratorních zvířat. Takto získáme tzv. polyklonální protilátky, protože získané sérum obsahuje protilátky proti více epitopům antigenu (16).

Protilátky specifické pro jediný epitop, které jsou produkovány jediným klonem, se nazývají monoklonální protilátky. Obvykle jsou získávány od myši. Lymfocyty ze sleziny myši, které byl podán Ag, jsou smíšeny s buňkami myelomu (nádorovými buňkami lymfocytárního původu) za podmínek, které vyvolají fúzi lymfocytů a buněk myelomu. Každá výsledná buňka hybridomu je schopna produkovat monoklonální protilátku (24).

Rozdělení imunohistochemických metod

1. *Přímá metoda* – nejjednodušší způsob průkazu antigenu ve tkáni. Primární protilátka je značena fluoresceinem, enzymem nebo kovem. Použití zejména v elektronové mikroskopii a nativních řezech. Při použití na parafinových řezech je tato metoda málo citlivá (14).

2. *Nepřímá dvoustupňová metoda* – tkáň obsahující cílový Ag se inkubuje v roztoku neznačené primární protilátky. Následně inkubujeme se značenou sekundární protilátkou, která je protilátkou proti primární protilátce. Na primární protilátku se váže několik molekul sekundární protilátky. Tím se na místo antigenu akumuluje více značených protilátek; ve srovnání s metodou přímou je tato metoda citlivější (24).

3. *Nepřímá trojstupňová metoda* – do této skupiny lze zařadit metodiku označovanou jako PAP (peroxidáza-anti-peroxidáza). V první fázi reaguje primární specifické antisérum s Ag prokazovaným ve tkáni. Ve druhé fázi je aplikována protilátka (označována též jako protilátka spojovací, můstek) proti Ig zvířete, jehož protilátky se používají v první a třetí fázi. Ve třetí fázi pak nanášíme PAP komplex (14).

Při nahrazení peroxidázy alkalickou fosfatázou dostaneme metodu APAAP (alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza) (16).

Další nepřímou trojstupňovou metodou je technika avidin-biotin komplexu, označovaná též jako ABC metoda. Využívá schopnost neimunologické vazby vaječného bílkovinného proteinu avidinu s vitamínem biotinem. Avidin má schopnost vázat čtyři molekuly biotinu. Některá vazebná místa jsou volná a některá vyplněná komplexem biotin-peroxidáza, resp. Biotin - alkalická fosfatáza. Volná místa jsou připravena pro navázání biotinilované protilátkové molekuly (můstku) a následně chromogenní komplex. Při použití avidinu získaného z bakterie *Streptomyces avidini*, který dává lepší reakci, nazýváme tento komplex SABC (streptavidin-biotin-komplex). V současnosti jsou k dispozici velmi citlivé detekční soupravy (KITy). ABC a SABC metody jsou v současnosti nejcitlivější a nejvíce používané (14).

Rozdělení imunohistochemických metod podle použité značky (markeru) protilátky:

1. Imunoflorescenční metody – značení fluorochromy, nejčastěji fluorescein
 2. Imunometalické metody – ke značení se používají feritin, koloidní zlato (zejména v elektronové mikroskopii)
 3. Imunoenzymové metody – značení konjugací s enzymy (křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza, acetylcholinesteráza)
 4. Radioimunohistochemické metody – značení radioizotopy (radioaktivní jod)
- (13)

1.3.1 Odběr a fixace materiálu pro IHC

Odběr materiálu je podrobně popsán v kapitole 1.2.1.1 Odběr materiálu

Protože imunohistochemie je běžně používanou metodou v patologii, byla metodika modifikována pro tento účel a přizpůsobena fixaci ve formolu. Formol tvorbou methylenových můstků tvoří ve tkáni prostorovou síť, která brání průniku protilátky k epitopu. Pak je potřeba obnažit antigenní součásti molekuly. Postupy k revitalizaci antigenních struktur jsou podrobněji probrány v kapitole 1.3.3.1 (20).

1.3.2 Zalévání a krájení materiálu pro IHC

Postup zalévání materiálu je shodný s postupem pro HE, je tedy popsán již v kapitole 1.2.1.3 Zalévání materiálu.

Krájení materiálu pro IHC je obdobné jako krájení materiálu popsané v kapitole 1.2.1.4 Krájení řezů. Jisté odlišnosti postupu při krájení řezů specifikují dále v Tabulce 2: Porovnání vlastních postupů histologických metod a v metodice.

1.3.3 Postup imunohistochemické reakce

Řezy důkladně odparafinujeme v lázních xylenu, rehydratujeme sestupnou řadou alkoholů a zakončíme vložením do destilované vody (16).

Jako oplach mezi jednotlivými kroky používáme pufr. Mezi nepoužívanější patří TRIS pufr, roztok TRIS (trishydroxymethylaminometan) a 1M HCl nebo PBS fosfátový pufr slaný (14).

1.3.3.1 Revitalizace antigenních struktur

V průběhu fixace i dalšího zpracování tkáňových bloků dochází ke změnám (maskování) epitopů nebo i zablokování antigenních determinant, což vede ke zkreslení výsledků imunohistochemického vyšetření. K demaskování zablokovaných epitopů slouží zejména digesce proteolytickými enzymy a mikrovlnná trouba (23).

Ošetření řezů natrávením

Řada nežádoucích vazeb se uvolní působením proteolytických enzymů. Nejčastěji používanou proteázou je trypsin a pepsin (23).

Při natrávení tkáňové řezy ztrácejí přilnavost ke sklíčku. Zabráníme tomu potahováním sklíček speciálními médii nebo zakoupením prefabrikovaných skel (14).

Použití mikrovlnného záření

Do procesu revitalizace antigenních struktur vstupuje při použití mikrovln tepelný efekt, který urychluje difuzi (zpracování), podporuje vznik chemické reakce (barvení)

a stabilizuje proteiny (fixace). Tím se podstatně mění názor, že nadměrně vysoká teplota nepříznivě ovlivňuje tkáň z důvodu denaturace bílkovin. Na použití mikrovln je závislá účinnost řady komerčně dostupných protilátek. Řídíme se především instrukcemi výrobce protilátek (14).

1.3.3.2 Blokování endogenní aktivity enzymů

Protílátky značené enzymem (např. Peroxidázou, alkalickou fosfatázou) se běžně využívají pro důkaz vazby antigen – protilátka. Protože se tyto enzymy vyskytují přirozeně v tkáni, mohou do značné míry znehodnotit výsledek vyšetření ve smyslu falešně pozitivní reakce. Proto je potřeba blokovat endogenní aktivity enzymů. V případě použití peroxidázy použijeme jako substrát 1-3% roztok peroxidu vodíku. V případě použití alkalické fosfatázy použijeme levamizol. Pro blokování endogenního avidinu a biotinu lze použít roztok 0,1-0,01% avidinu a následně 0,01-0,001% roztok biotinu (16).

Pro správný výsledek vyšetření je zcela nezbytná volba správné metodiky, která umožní potlačit endogenní aktivitu enzymů (14).

Endogenní peroxidázovou aktivitu běžně vykazují hemoproteiny, jako hemoglobin (erytrocyty), myoglobin (svalová vlákna), cytochromy (granulocyty, monocyty) a katalázy (játra, ledviny).

Endogenní alkalická fosfatáza se vyskytuje v kosti, ledvinách, játrech a leukocytech.

Avidin obsahuje asi 10% sacharidů, biotin je přítomen v řadě tkání jako játra, ledviny (23).

1.3.3.3 Blokování pozadí

Pozitivní zbarvení řezů nemusí být jen výsledkem reakce Ag-Ab. Pozitivní zbarvení může též způsobit nespecifická reakce pozadí. Nejčastějším důvodem je vazba primární protilátky na kolagen a jiné pojivové struktury. Příčin nespecifické reakce pozadí je několik.

Hydrofobní interakce – hydrofobicita je přirozená síla, která určuje stabilitu terciální struktury peptidů. Tkáňové proteiny jsou více hydrofobní po fixaci s fixační tekutinou obsahující aldehydy. Zamezení vazby tkáňových proteinů napomáhá optimalizace fixace jako čas, teplota a pH. Hydrofobicita je též ovlivněna přítomností iontů v pufrch (na snížení hydrofobní vazby mají vliv fosfáty, sírany, chloridy, dusičnany, NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+}). Mezi tkáně, které mají tendenci zvýšeného pozadí následkem hydrofobicity nebo ionové interakce, patří: pojivová tkáň (kolagen, laminin, elastin, proteoglykany), tukové pojivo a epitelie (např. keratin). Ke snížení hydrofobie je aplikován blokuující roztok proteinů v pufru.

- Elektrostatická vazba – vzniká setkáním proteinů s opačným nábojem.

Eliminujeme použitím pufrů s vyšší iontovou silou nebo přidáním 0,1 až 0,5M NaCl.

- Endogenní aktivita enzymů – enzymová aktivita se odstraní blokováním příslušným substrátem. Viz výše kapitola 1.3.3.2 Blokování endogenní aktivity enzymů.
- Křížová reakce – křížová reakce protilátky s podobnými epitopy na různých Ag
- Kontaminované reagensie
- Difuze antigenu – např. difuze tyreoglobulinu z epitelu do okolní tkáně (16)

1.3.3.4 Primární protilátka

Při imunohistochemické detekci antigenů je nutné se řídit návody výrobců a firem, které patříčné protilátky distribuují (23).

Primární protilátka může mít monoklonální či polyklonální charakter. Viz kapitola 1.3 Imunohistochemické metody. Také se můžeme rozhodnout, zda použijeme koncentrát protilátky, který před použitím vyžaduje naředění na doporučenou a vyzkoušenou koncentraci, nebo tzv. RTU (ready to use), kdy protilátka je již od výrobce naředěna a připravena k použití.

1.3.3.5 Detekční systém

Na PAO NCB používáme detekční systém N-Histofine, který pracuje dle pracovního postupu nazvaným metoda Universálního Immuno-enzymového Polymeru (UIP). Komplex antigen/protilátka/univerzální imuno-peroxidázový polymer vzniká vazbou UIP na primární protilátky navázané na antigeny řezu tkáně. Enzymatická aktivita tohoto komplexu závisí na množství barviva a poloze antigenu (25).

1.3.3.6 Chromogeny

Samotná vazba antigenu s protilátkou ve tkáni není viditelná. K vizualizaci reakce musíme použít další látku tzv. chromogen. Když použijeme detekční komplex značený peroxidázou (např. PAP), tak jako chromogen používáme 3,3 diaminobenzidin (DAB). Při této reakci křenová peroxidáza reaguje se substrátem H_2O_2 v inkubačním roztoku, oxidací DABu vzniká stabilní hnědý produkt. Další chromogen je karmínově červené barvy 3-amino-9-etylkarbazol (AEC). V případě použití systému značeného alkalickou fosfatázou používáme jako substrát Fast red nebo Fast blue (14).

1.3.3.7 Dobarvení jader a montování preparátu

Po imunohistochemickém barvení následuje dobarvení jaderných struktur v preparátu hematoxylinem, následně odvodnění a zamontování preparátu (16).

1.3.4 Úskalí imunohistochemických metod

Výsledek IHC je ovlivněn řadou faktorů, které mohou vést až k falešné pozitivitě či negativitě vyšetření. Správný laboratorní postup se neobejde bez kontrolních vyšetření. Tkáňové řezy, které prokazatelně obsahují zjišťované antigenní struktury, nám poslouží jako pozitivní kontrola správné účinnosti protilátek a nastavení metody. Jako negativní kontrolu volíme známé tkáňové struktury bez příslušných antigenů (14).

Příčinou negativní nebo příliš slabé reakce pozitivních kontrol může být:

- příliš krátká doba inkubace protilátky

- kontaminace protilátky cizorodým materiálem
- nesprávné ředění protilátky
- nevhodný pufr či pH
- vyschnutí tkáňových řezů v průběhu zpracování
- nutnost enzymatické digesce či ošetření tkáně mikrovlnami
- špatně zvolený detekční systém (14)

Nadměrné barvení pozadí může mít za příčinu:

- vynechání bloku nespecifickým sérem
- endogenní aktivita peroxidázy, avidinu či biotinu
- difuze tkáňových antigenů
- málo důkladný oplach řezů
- dlouhá inkubace
- silný DAB
- vysoká koncentrace protilátky
- nekróza tkáně (16)

1.4 Peroperační vyšetření buněk a tkání (RPB)

RPB poskytuje lékařům rychlou informaci nutnou pro optimální pokračování probíhající operace. Výsledek histologického vyšetření může značně ovlivnit charakter operace. Vyšetření rozhoduje mezi benigním a maligním procesem. Pokud se jedná o benigní proces, může být operace ukončena prostou excizí. Při maligním procesu potřebuje chirurg vědět, zda byl tumor excidován celý a operace pokračuje např. lobektomií a excizí uzlin (22).

1.4.1 Odběr a fixace materiálu

Odebraný materiál musí být urychleně doručen do laboratoře. Tkáň pro nedostatek času nelze zalévat ani fixovat, takže je nutno ji krájet čerstvou po zmrazení (20).

1.4.2 Krájení materiálu

Ke krájení nezalité tkáně se používá speciální zařízení – kryostat. Kryostat je rotační mikrotom vložený do mrazicího boxu s teplotou kolem -20°C . Lze na něm krájet nativní i fixovaný materiál (13,20).

Mikrotomový nůž i bloček jsou chlazeny. Správné vystižení konzistence tkáně je zárukou zdařilého krájení. Tkáň nesmí být přemrazena ani nedostatečně zmrazena. Tkáň, která přemrzne je příliš tvrdá, řezy se tříští na střepiny, může dojít i k odtržení celého bločku. Naopak při krájení nedostatečně zmrazené tkáně se řezy mačkají v kaši. Ukrojené řezy nám ulpí na noži a následně je přichytíme na podložní sklo (22,26).

1.4.3 Barvení a montování RPB

Na PAO NCB barvíme RPB 1% toluidínovou modří. Postup barvení bude podrobně popsán v metodice. Preparát montujeme do montovacího média mísícího se s vodou. Obarvené řezy montujeme přímo bez odvodňování. Tato montovací média se používají, když nesmí vyšetřovaná tkáň přijít do styku s organickými rozpouštědly (alkoholem a xylenem) např. při průkazu lipidů nebo při RPB. Patří sem glycerín, glycerínová želatina. Preparáty nejsou trvalé, proto nejsou vhodné k archivování (22).

1.4.4 Výsledek barvení

Celá metoda RPB, od předání excidovaného materiálu do laboratoře, následné úpravy vzorku a jeho zpracování, trvá 15-20 min. Lékař po zhodnocení preparátu a určení peroperační diagnózy telefonuje výsledek přímo na operační sál, kde zákrok probíhá. Dle výsledku RPB operatér pokračuje v operaci určitým směrem (26).

2. Cíl práce a předpokládané hypotézy

2.1 Cíl práce

Cílem mé práce je porovnat histologické metody barvení HE, RPB a IHC. Porovnání provedu jak na úrovni operačních postupů, tak i s ohledem na přínos k určení konečné, definitivní diagnózy. Dále chci poukázat na vývoj těchto metod během posledních let na PAO NCB. A také zmapovat celkový nárůst všech vyšetření na PAO NCB.

2.2 Předpokládané hypotézy

Hypotéza 1: Počet IHC na PAO NCB se každoročně zvyšuje.

Hypotéza 2: Pomocí IHC je zachycen větší počet metastáz než RPB a HE.

Hypotéza 3: Metoda vyšetření SN je pro pacienta výhodnější než vyšetření uzlin z axilární disekce.

Hypotéza 4: Čím vyšší je věk pacienta, tím větší je pravděpodobnost nalezení metastázy v SN.

3. Metodika

Vyšetření jsem prováděla v Laboratoři patologického oddělení Nemocnice České Budějovice a.s. od března 2013 do března 2014. Vyšetření bylo prováděno na sentinelových uzlinách, které byly odebrány u potvrzeného maligního nálezu v prsu. SN přišla do laboratoře vždy v nativním stavu. Nejdříve byla provedena rychlá peroperační biopsie dle standartního operačního postupu NCB PAO SOP 12 002 Peroperační vyšetření buněk a tkání a diagnostika. Po prohlédnutí preparátu RPB lékařem byl oznámen výsledek RPB na operační sál. Pokud je zachycena metastáza v SN již při vyšetření RPB, následuje disekce axilárních uzlin, které jsou doneseny také na vyšetření do laboratoře. Tkáň je fixována 4% neutrálním formolem a následně zpracována dle standartního operačního postupu NCB PAO SOP 12 001 Histologické vyšetření tkání a diagnostika a barveno hematoxylin-eosin. Vzorek ze SN určený lékařem je dále zpracován imunohistochemicky pomocí protilátky Cytokeratin 7 (CK 7) dle standartního operačního postupu NCB PAO SOP 12 004 Imunohistochemická vyšetření antigenů a pracovního postupu CK 7.

3.1 Chemikálie, reagensie, přístroje a pomocná zařízení

3.1.1 Chemikálie a reagensie

Médium na připevnění tkání v kryostatu-Cryomatrix, toluidinová modř, glycerin, formaldehyd, parafín, hematoxylin, eosin, želatina, HCl, etanol, aceton, xylen, fenol, trometanol, kyselina citronová, peroxidáza, proteináza, citrátový pufr, pertex, detekční systémy na IHC, protilátky na IHC, APES (3-aminopropylethoxysilan).

3.1.2 Přístroje a pomocná zařízení

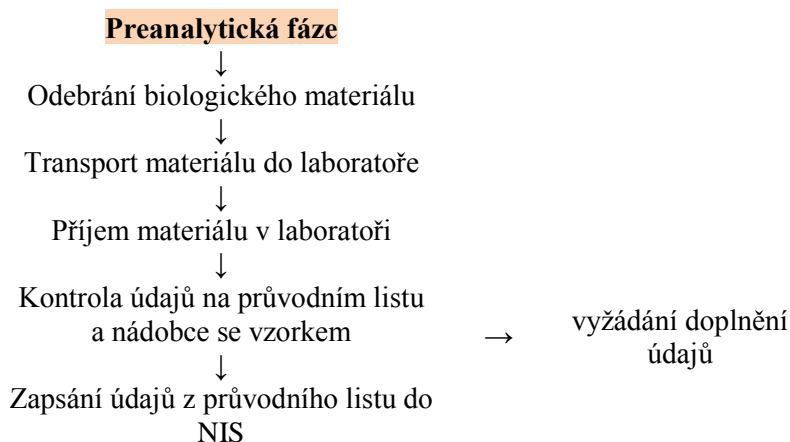
Stůl přikrajovací, Kryostat Cryostar NX70 a Microm HM505N, tkáňový procesor Tissue Processor TPC15, linka parafínová zalévací Leica EG1160 a TES 99, mikrotom sáňkový, chladicí deska, vodní lázeň, termostat, barvicí automat Leica AutoStainer XL,

automat na montování sklíček, barvicí automat pro IHC IntelliPATH FLX, Histoprocessor mikrovlnný RHS-1 Milestone, pH metr, mikroskop.

3.2 Preanalytická fáze

Preanalytická fáze zahrnuje odběr, přípravu a zpracování vzorku biologického materiálu před zahájením vlastního laboratorního vyšetřování. Tato fáze může výrazně ovlivnit výsledek vyšetření. Je z velké části prováděna mimo laboratoř, zahrnuje přípravu pacienta, odběr vzorku a jeho transport. Správný odběr materiálu a jeho rychlý transport na PAO NCB je zvláště důležitý při RPB a histochemii, kdy jde skoro o minuty. Na RPB je přijata pouze nádobka s nefixovanou tkání a průvodním listem k histologickému vyšetření. Ostatní biologický materiál určený na histologické vyšetření musí být dodán ve fixační tekutině (4% neutrální formaldehyd).

V laboratoři je materiál přijat, zkontrolují se údaje na nádobce se vzorkem s údaji na průvodním listu. Průvodní list k histologickému vyšetření musí obsahovat: Jméno a příjmení pacienta, rodné číslo pacienta, pojišťovnu, druh vyšetřovaného materiálu, písemně diagnózu, kód diagnózy, předchozí vyšetření, datum a čas odběru vzorku, požadující oddělení, IČP a kód odbornosti, jméno a razítko lékaře, podpis lékaře. Na nádobce se vzorkem musí být jméno a příjmení pacienta, jeho rodné číslo a oddělení. Po zkontrolování údajů je průvodní list i nádobka označena evidenčním číslem vzorku. Na průvodní list je ještě zaznamenáno datum a čas příjmu vzorku (pouze u nativních vzorků). Poté je materiál neprodleně předán ke zpracování – přikrojení lékařem. Mezitím jsou údaje z průvodního listu zadány do Nemocničního informačního systému (NIS).



Zdroj: Autor

Obrázek 1: Schéma preanalytické fáze biologického vzorku.

3.3 Analytická fáze

3.3.1 Metoda RPB

Po příjmu nativního vzorku na RPB lékař nejprve vzorek změří a makroskopicky popíše. Potom lékař vyhledá podezřelá místa a z těchto suspektních ložisek přikrojí vzorek o velikosti optimálně 1 cm³, který je určen ke zpracování RPB. Dále přikrojí další materiál pro následné zpracování v parafínu (26).

Pokud je vzorkem sentinelová uzlina, je překrojena a v podélné ose dále přikrajována na 3-4 mm silné bločky. Takto jsou sentinelové uzliny zpracovány a dány celé k vyšetření (9).

Přikrojený vzorek určený ke zpracování RPB se zmrazí v kryostatu a nakrájí se z něho řezy, které se přichytí na podložní sklo a barví se 30 sec v 1% toluidinovou modří. Následně se obarvené řezy krátce opláchnou v kyvetách s pramenitou vodou a zamontují se do glycerínu. Hotový preparát se spolu s průvodním listem ihned odnese lékaři, který vzorek přikrajoval.

Lékař určí diagnózu, kterou telefonicky oznámí operujícímu lékaři na sále. Na průvodní list zaznamená jméno lékaře, kterému diagnózu sdělil, čas sdělení a její popis. Pokud z předloženého materiálu není možné diagnózu určit, lékař si určí další blok ke zpracování RPB a pokračuje se v diagnostice (26).

Doba od příjmu vzorku po oznámení diagnózy na operační sál by neměla být delší než 20 min.

3.3.2 Další zpracování vzorků a barvení HE

Bločky, které byly zmrazené a zpracované RPB, se přidají k ostatním bločkům přikrojeným z téhož vzorku a vloží se do kazetek označených evidenčním číslem vzorku. Fixují se 4% neutrálním formaldehydem. Potom jsou vloženy do autotechnikonu Tissue Processor TPC 15 Medite od firmy Bamed s.r.o. V autotechnikonu dochází k dofixování v 4% neutrálním formaldehydu, odvodnění v 5 lázních ethanolu, pak dochází k prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín tj. aceton 1 lázeň, xylen 2 lázně a prosycení tkáně v 2 lázních parafínu vyhřáté na 56°C. Procesem v autotechnikonu vzorky procházejí přes noc.

Ráno se vzorky zalévají na zalévací parafinové lince Leica EG 1160 od firmy Micro Writer a lince TES 99 Medite od firmy Bamed s.r.o. (viz Příloha 3) do parafínu a nechají se zchladnout na chladicí desce, která je součástí parafinové linky. Po zalití všech zpracovaných vzorků jsou bločky seřazeny podle evidenčních čísel a zkontrolovány počty.

Krájení parafinových bloků je prováděno na sáňkových mikrotomech Microm HM 400 od firmy Bamed s.r.o. Jsou krájeny řezy tenké 4-5 μm . Řezy se položí na hladinu vodní lázně se želatinou temperovanou na cca 50°C, zde se na řezech vypnou případné sklady, provede se selekce ukrojených řezů a nejkvalitnější jsou nataženy na podložní sklo. Každé sklo s řezem je označeno nalepením štítku s evidenčním číslem vzorku, dále symbolem barvení a parafou laboranta, který bloček krájel. U sentinelové uzliny jsou z každého bloku zhotoveny celkem tři řezy krájené s rozstupem 5-10 μm . Tyto tři řezy jsou barveny HE. Posléze lékař vybere blok, ze kterého je ukrojen jeden řez na

IHC (9). Následně se skládají do stojánků a suší v horkovzdušné troubě 40 min při 56°C. Po usušení se preparáty odparafinují v lázních xylenu a zavodní sestupnou řadou etanolů 96%, 80%, 70% až do vody (27).

Preparáty, které jsou určeny na barvení HE, vkládáme do barvicího automatu Leica AutoStainer XL od firmy Micro s.r.o., ostatní preparáty na speciální barvení jsou barveny ručně dle pracovních postupů. Postup barvení HE: preparáty se nejdříve barví Weigertovým hematoxylinem 5 min, oplachují pramenitou vodou, následuje diferenciací jader, která probíhá v kyselém alkoholu (15ml koncentrované HCl a 985ml 70% etanolu). Při diferenciaci dochází k odbarvení přibarvených složek. Preparáty se znovu oplachují pramenitou vodou, barví se eozinem žlutavým 7 min, oplachují ve třech lázních etanolu, projasnění v karbol-xylenu 5 min a xylenu (28). Preparáty jsou z barvicího automatu vyjmuty a předány do automatu na montování sklíček Automatic Coverslipping Machine Medite Meisei od firmy Bamed s.r.o. a zde je na obarvené řezy kápnuto montovací médium Pertex od firmy Bamed s.r.o. a přilepeno krycí sklo.

Dle průvodních listů jsou obarvené řezy řazeny do desek a odneseny lékařům ke stanovení diagnózy.(viz 3.4 Postanalytická fáze)

3.3.3 Imunohistochemické metody

Vzorky, u kterých si lékař vyžádal IHC, jsou krájeny na sáňkovém mikrotomu Microm HM 400 od firmy Bamed s.r.o. Ukrojené řezy tenké 4 µm jsou pokládány na hladinu temperované destilované vody na 50°C, zde se nepoužívá želatina jako u HE. Želatina by nám dávala ve výsledcích falešnou pozitivitu. Nejlepší řez je natažen na speciální silanizované podložní sklo. Silanizaci skel si provádíme sami. Používáme 2% roztok APES - (3-aminopropylethoxysilan) od firmy Sigma-Aldrich v acetonu, do tohoto roztoku ponoříme skla (která jsme si předem odmastili 24 hod v 96% etanolu) na 20 s, následuje aceton 10 s, dále destilovaná voda 20 s, znovu aceton 10 s a nakonec destilovaná voda 20 s a poté skla vložíme do termostatu při 37°C na 1-2 dny.

odmaštěná skla 96% ethanol 24hod	APES 20 s	Aceton 10 s	Dest.voda 20 s	Aceton 10 s	Dest.voda 20 s	termostat 37°C 1 - 2 dny
-------------------------------------	--------------	----------------	-------------------	----------------	-------------------	-----------------------------

Zdroj: Autor

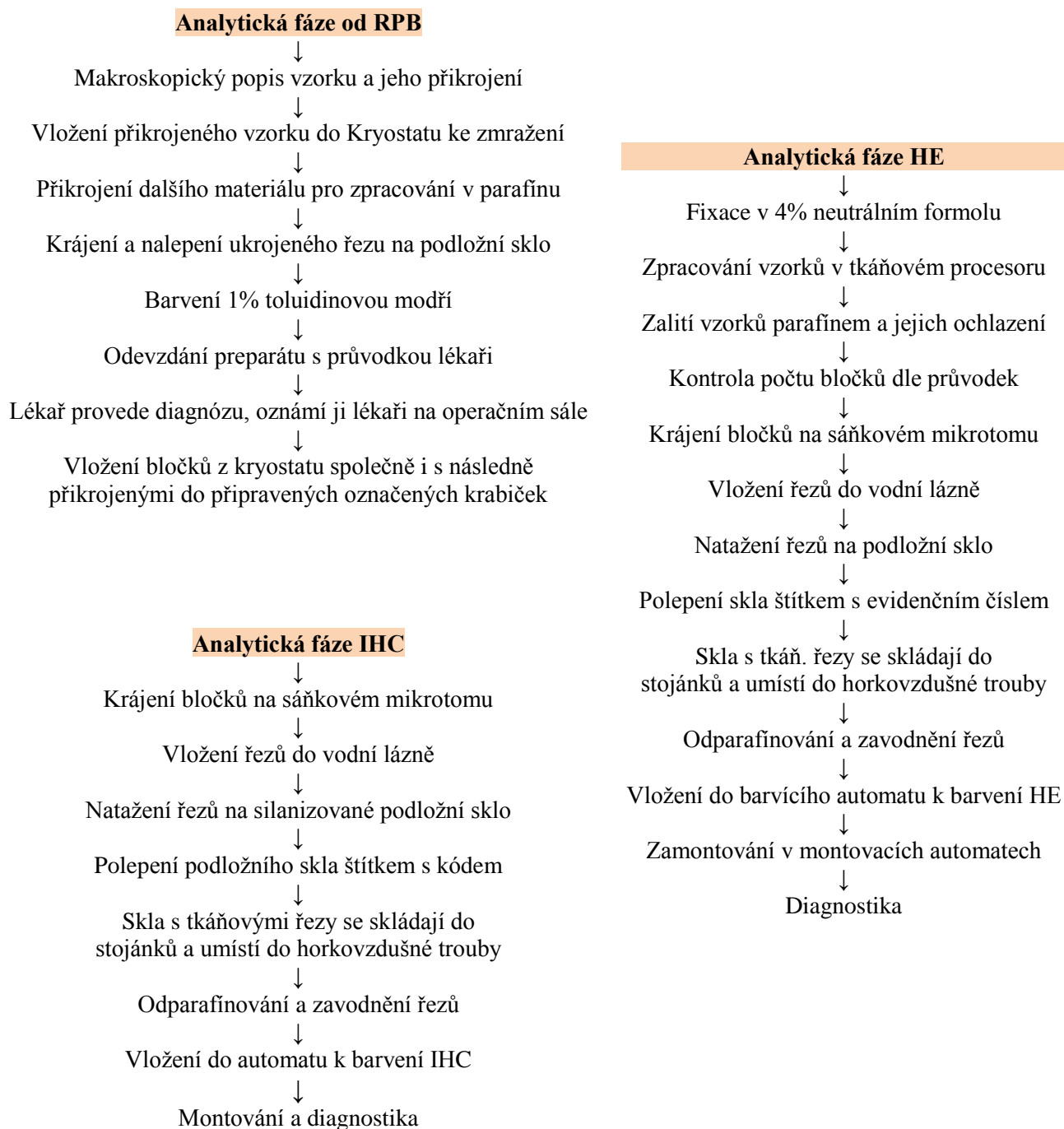
Obrázek 2: Schéma postupu silanizace skel na PAO NCB

Silanizované sklo s nataženým tkáňovým řezem je polepeno evidenčním štítkem s kódem a vloženo do termostatu s teplotou 56°C, kde se suší 1-2 dny. Po usušení jsou vloženy do xylenu na 20 min, kde probíhá odparafinování, a následně do zavodňovací řady etanolů (96%, 80%, 70%) a do destilované vody. Zde jsou preparáty rozděleny podle doporučeného typu demaskování zablokovaných epitopů. Tyto zásadní informace jsou vždy uvedeny v Data Sheetu, který je dodáván pro každou konkrétní protilátku. Každý tkáňový řez je orámován speciálním perem PAP-Pen, které obsahuje lipoidní substance. Orámování zabráňuje stékání reagentů z tkáňového řezu. Pokud je doporučeno demaskování pomocí mikrovlnného záření, jsou preparáty vloženy do nádoby s pufrům o pH 9 nebo pH 6-6,4. Pufr je zvolen podle doporučení výrobce protilátky. Jako pufr o pH 6-6,4 používáme citrátový pufr, který nám dodává lékárna NCB. Pufr pH 9 – Tris-EDTA Retrieval Buffer od firmy DBS (25ml Tris-EDTA + 250ml destilované vody). Nádoba s pufrům a preparáty je vložena do Microwave Vacuum Histoprocessor Milestone RHS-1 od firmy Bamed s.r.o. A zde dochází k demaskování epitopů při teplotě 120°C 15 min. Pak je nádoba chlazená 20 min tekoucí vodou. Po zchlazení jsou tyto preparáty spolu s ostatními vloženy do barvicího automatu pro imunohistochemická vyšetření od firmy Bamed s.r.o. IntelliPATH FLX viz Příloha 6. Dalším druhem demaskování epitopů je natrávení pomocí proteolytických enzymů. U těchto preparátů jejich natrávení proběhne v automatu IntelliPATH FLX pomocí proteinázy K od firmy Dako 5 min. Mezi jednotlivými kroky dochází k oplachování řezů promývacím pufrům o pH 7,4 – 7,8. Velmi důležitá je každodenní kontrola pH všech používaných pufrů, kterou provádíme vždy před začátkem IHC. Dalším krokem je zablokování endogenní peroxidázy nanesením Peroxidase-Blocking Solution od firmy Dako na 10 min. Oplachujeme promývacím pufrům. Na řezy je

nakapána primární protilátka dle jejich určení, inkubace trvá 30 min. Po inkubaci oplachujeme promývacím pufrem. Následuje inkubace s detekčním systémem N-Histofine od firmy Exbio po dobu 30 min. Znovu oplachujeme promývacím pufrem. Dalším krokem je vizualizace reakce pomocí chromogenu Liquid DAB+Substrate Chromogen Systém od firmy Dako 5 min. Potom se preparáty oplachují destilovanou vodou a dobarvují se jádra pomocí Mayerova hematoxylinu 2 min. Oplachujeme pramenitou vodou. Tímto krokem IntelliPATH FLX končí. Preparáty jsou vyjmuty a přeneseny do odvodňovací řady etanolů (70%, 80%, 96%), potom se projasňují v karbol-xylenu 5 min, xylen a následuje montování do Pertexu v montovacím automatu.

Při vyšetření sentinelové uzliny používáme protilátku Cytokeratin 7 (CK7) od firmy DBS (Diagnostic BioSystem). Tuto primární protilátku CK7 jsme začali používat v roce 2009, zakupujeme ji ve formě koncentrátu, který si před použitím ředíme. Od dodavatele je doporučeno ředění 1:25-1:100, k finální koncentraci ředění dojdeme použitím různých ředění na ukrojené řezy s pozitivní a negativní kontrolou. Tkáně, které je možno použít na pozitivní a negativní kontrolu, jsou doporučeny výrobcem v Data Sheetu. Koncentraci znovu prověřujeme při každém dodání protilátky. U CK7 je jako pozitivní tkáň použita kůže. Výsledné ředění protilátky je na PAO NCB 1:50. K ředění používáme Antibody Diluent with Background Reducing Components od firmy Dako. K demaskování epitopů je doporučeno natrávení pomocí proteolytických enzymů (30). Obarvené preparáty jsou spolu s průvodními listy odneseny lékaři ke stanovení diagnózy.

Obecně lze hodnotit preparáty IHC tak, že pokud byl v tkáňovém řezu přítomen prokazovaný antigen, je výsledkem hnědé zbarvení imunokomplexů s modře zbarvenými jádry buněk. CK 7 je používán k diagnostice adenokarcinomů prsu, plic, endometria a vaječnicků, karcinomu urotelu. Je také používán k diagnostice epitelálních buněk a nádorů z nich odvozených (30).



Zdroj: Autor

Obrázek 3. Schéma analytických fází metod RPB, HE, IHC

3.4 Postanalytická fáze

Postanalytická fáze je převážně tvořena diagnostikou, kterou provádí lékař. Dále zapsáním výsledků a jejich následné odeslání na příslušná oddělení. Součástí této fáze je také archivace preparátů a parafinových bloků. Histologické preparáty se archivují 5 let a parafinové bloky 10 let. Průvodní listy jsou také archivovány.

Diagnostiku lékař provádí na mikroskopu. Na PAO NCB mají lékaři k dispozici mikroskopy od firmy Leika.

Na začátku histologického nálezu je vždy uveden makroskopický popis vzorku (velikost, vzhled – barva, konzistence, zda tumor makroskopicky dosahuje k okrajům excize atd.), dále je uvedeno, jestli byla SN rozpůlena či zpracována celá v jednom bloku. Následuje část, ve které je vlastní popis mikroskopického obrazu léze vycházející z příslušných diagnostických a barvicích metod.

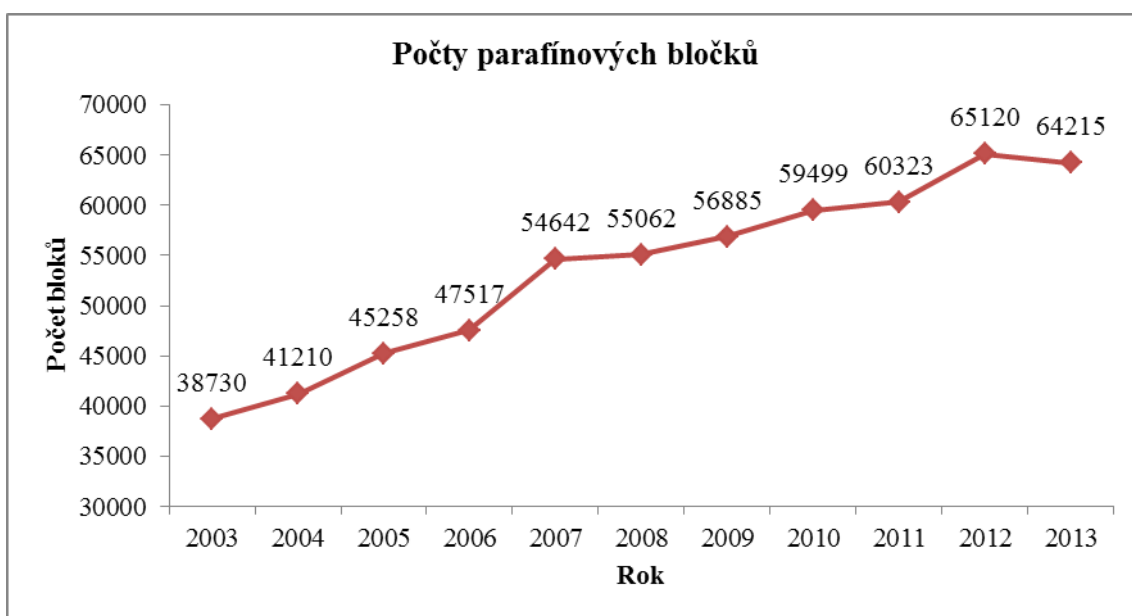
Popis zahrnuje pTNM klasifikace, pT – hodnocení primárního nádoru spolu s mikroinvazivním šířením, pN – hodnocení uzliny: zde došlo díky metodě SU k vytvoření nového označení, protože již nenacházíme jen typické metastázy, ale i tzv. ITC (izolované nádorové buňky, isolated tumor cells). Tyto shluky izolovaných nádorových buněk jsou také označovány jako mikrometastázy. Mohou to být jednotlivé nádorové buňky nebo malé shluky, nejsou však větší než 0,2 mm nebo je jich méně než 200 buněk v jednom histologickém řezu (31).

4. Výsledky

4.1 Statisticky zhodnocené výsledky

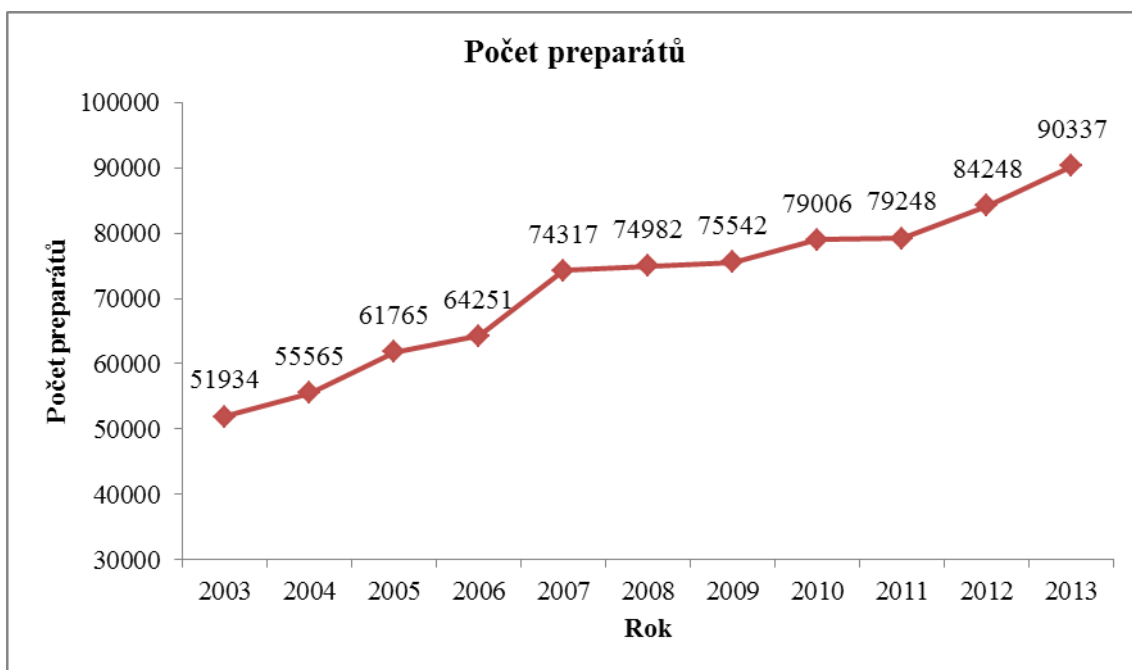
Statistické zhodnocení počtu vyšetření prováděném na PAO NCB jsem provedla za období od roku 2003 až do roku 2013 pomocí NIS. V případě IHC jsem vyhledávala v evidenčních knihách pro IHC a to od roku 1998 až do roku 2013. Vše probíhalo s dovolením primáře oddělení MUDr. Pavly Vítkové.

Jak je z následujícího Grafu 1 a 2 patrné, dochází na PAO NCB k neustálému nárůstu celkového počtu parafinových bloků i preparátů.



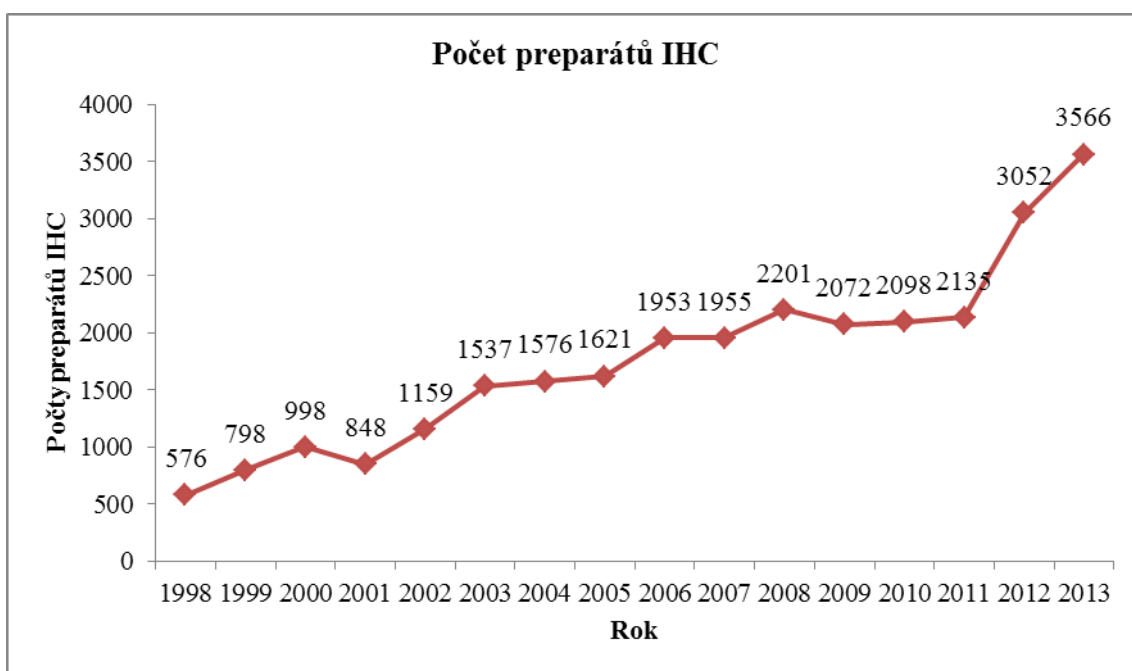
Zdroj: Autor

Graf 1: Znázornění počtu parafinových bloků v letech 2003-2013 na PAO NCB



Zdroj: Autor

Graf 2: Znázornění počtu histologických preparátů obarvených HE na PAO NCB



Zdroj: Autor

Graf 3. Znázornění počtu IHC na PAO NCB od zavedení metody

U metody IHC jsem ještě zmapovala změny v nejčastěji používaných primárních protilátkách. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 1.

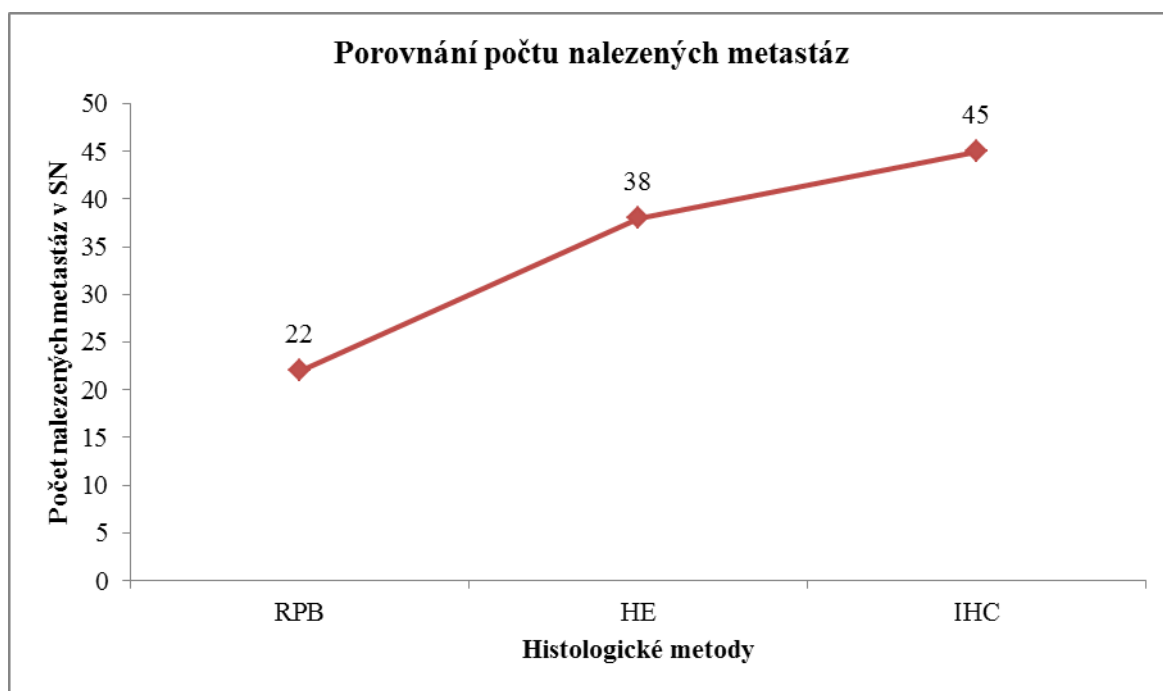
Tabulka 1: Mapování nejčastěji používaných protilátek na PAO NCB

druh vyšetření	rok		
	1999	2008	2013
hormonální receptory	414	664	
vimentin	23	39	53
desmin	10	14	22
S100	25	84	152
HMB45	20	22	
PSA	4	25	63
HMW	2	26	203
Chromogranin	3	51	108
Synaptofisin		48	108
Actin	12	22	33
Bcl-2	32	3	
AE1/AE3	26	131	232
CAM 5,2	26	131	232
Hemoglobin		29	32
F VIII		8	42
Thyreoglobulin		16	19
KI67		44	101
CD15		11	14
CD20	33	139	164
CD23		49	49
CD30	9	14	16
CD34	9	49	69
CD45LCA	36	31	57
CD45RO	32	270	
CD68	7	20	61
CD138		85	103
Kappa	18	53	77
Lambda	18	53	77
CK 7			389

Zdroj: Autor

4.2 Naměřené výsledky

Všechna histologická vyšetření jsem prováděla v Patologické laboratoři Nemocnice České Budějovice a.s., a to v období: březen 2013 - březen 2014. Všechny vzorky byly zpracovány za stejných analytických podmínek. Použila jsem stejné přístroje a chemikálie. Všechny vyšetřené sentinelové uzliny byly dodány bez fixace. Nejprve byly zpracovány RPB a následně barvením HE a IHC protilátkou CK 7. Celkem jsem takto zpracovala 142 sentinelových uzlin, které byly odebrány k již prokázanému karcinomu prsu. Metastáza v SN byla prokázána metodou RPB v 22 vzorcích, barvením HE byla metastáza nalezena ještě v dalších 16 vzorcích, celkem v 38 vzorcích. Pomocí IHC protilátkou CK 7 byla metastáza nalezena ještě v dalších 7 vzorcích, z toho dvě byly hodnoceny jako ITC, celkem v 45 vzorcích. V 97 sentinelových uzlinách nebyla nalezena žádná metastáza a jsou považovány za negativní. Výsledky jsou názorně zobrazeny v Grafu 4.



Zdroj: Autor

Graf 4. Znázornění počtu nalezených metastáz v SN pomocí různých histologických metod

Nalezené výsledky jsem ještě shrnula do Tabulky 2. Výsledky vyšetření SN a úspěšnost metod při zachycení metastázy. Je zde uvedena úplná specifikace výsledků a procentuálně vyjádřená úspěšnost zachycení metastázy v SN u každé metody. Vycházela jsem z toho, že metodou IHC jsem zachytila 100 % metastáz.

Tabulka 2. Výsledky vyšetření SN a úspěšnost metod při zachycení metastázy

Druh vyšetření	Pozitivní nález	Negativní nález	Počet vzorků	Úspěšnost
RPB	22	120	142	49%
HE	38	104	142	84%
IHC	45(2 ITC)	97	142	100%

Zdroj: Autor

4.3 Porovnání postupů histologických metod

Postupy metod se od sebe v jistých krocích liší. Zásadní odlišnosti jsou u RPB, zejména ve zpracování materiálu, ale i v době zpracování. U RPB je výsledek znám již cca po 15 min od doručení materiálu do laboratoře. Tento výsledek je prvotní, za definitivní je považován až po potvrzení stejného výsledku z barvení HE. Zde už může vyšetření končit, nebo pokud je výsledná diagnóza stále nejistá, je doděláno ještě IHC, které diagnózu zpřesní a dodá jí jistotu.

Porovnání postupů jednotlivých histologických metod používaných k vyšetření SN je uvedeno v Tabulce 3: Porovnání vlastních postupů histologických metod.

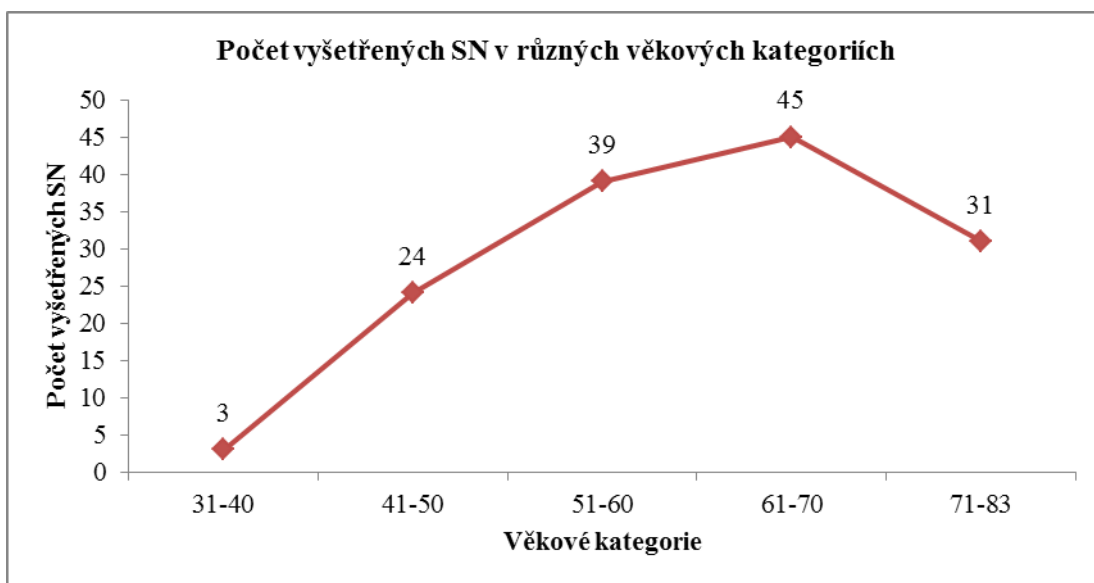
Tabulka 3: Porovnání vlastních postupů histologických metod

	barvení HE	IHC	RPB
odběr	excize punkce kyretáž	excize punkce kyretáž	excize
fixace	fyzikální chemická	fyzikální chemická	bez fixace
zalévání	odvodnění tkáně prosycení tkáně parafínem vlastní zalití	odvodnění tkáně prosycení tkáně parafínem vlastní zalití	
krájení	sáňkový mikrotom řezy přenášíme na lázeň destilované vody s želatinou natahujeme na podložní skla	sáňkový mikrotom řezy přenášíme na lázeň pouze destilované vody!! natahujeme na speciálně upravená podložní skla	krájíme na kryostatu řezy lepíme přímo na podložní sklo
barvení	odparafinování, zavodnění doba barvení HE cca 15min	odparafinování, zavodnění metoda doba dle použité protilátky cca 100-180min	vlastní barvení cca 30sec
montování	odvodnění, montování do médií nemísitelného s vodou	odvodnění, montování do médií nemísitelných s vodou	montujeme rovnou z vody do media mísitelného s vodou

Zdroj: Autor

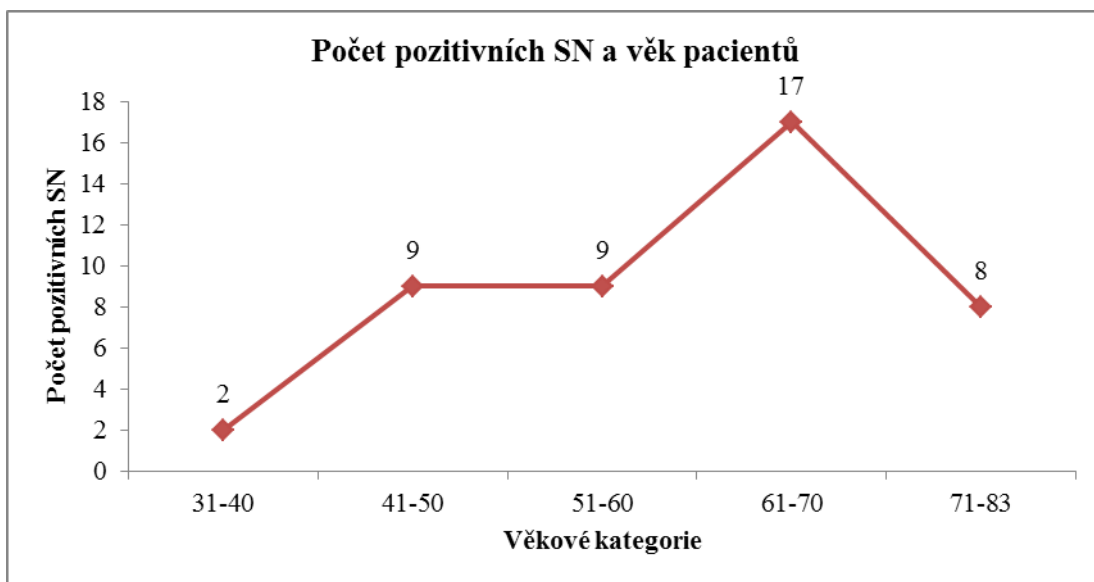
4.4 Závislost mezi věkem pacienta a přítomností metastázy v SN

Provedla jsem studii, na mém vzorku zpracovaných SN, zda je možné tvrdit, že s narůstajícím věkem pacienta se i zvyšuje pravděpodobnost tvorby metastázy v SN. Zpracováno bylo celkem 142 SN. Nejstarší pacient - 83 let. Nejmladší pacient – 31 let. Výsledky jsou znázorněny v Grafu 5. Bylo nalezeno 45 pozitivních SN. Z toho 2 pozitivní SN byly nalezeny ve věkové kategorii 31-40 let, v kategorii 41-50 let jich bylo nalezeno 9. V kategorii 51-60 let bylo celkem 9 pozitivních SN, v kategorii 61-70 let 17 pozitivních SN a v kategorii 71-83 let bylo 8 pozitivních SN. Tyto výsledky jsou znázorněny v Grafu 6.



Zdroj: Autor

Graf 5. Znáznornění počtu vyšetřených SN v různých věkových kategoriích



Zdroj: Autor

Graf 6. Znáznornění počtu nalezených pozitivních SN v různých věkových kategoriích

5. Diskuze

Cílem mé práce bylo zmapovat vývoj vybraných histologických metod na PAO NCB a jejich porovnání. Všechny tři zmiňované metody prošly během posledních let významnými změnami, nejdůležitější z nich bych chtěla zmínit. Tyto změny vedly nejen ke zkvalitnění a standardizaci výsledků, ale ještě také ve velké míře zkvalitnily pracovní prostředí v laboratořích.

Základní postupy zpracování materiálu se dočkaly výrazného zautomatizování. Zpracování (tj. dofíxování, odvodnění, prosycení tkáně) se děje přes noc v Autotechnikonu Tissue Processor TPC 15 Medite od firmy Bamed s.r.o. Zde materiál končí v lázni parafínu vyhřívané na 56°C a je připraven na zalévání do parafínu. Zde je vidět také velký pokrok. Zatímco dříve laborantky rozehřívaly parafín v termostatu a pak malými kádinkami zalévaly tkáně vložené do kovových L forem, což bylo velmi pracné, protože parafín rychle tuhl, dnes máme zalévací parafínové linky, které mají v sobě zabudované vyhřívané lázně pro parafín, který vytéká pod stálou teplotou, tím dostáváme možnost s tkání během zalévání ještě manipulovat. Součástí zalévací linky je i chladicí modul, kam se zalité bločky odkládají a zde dokonale ztuhnou. Viz Příloha 3.

5.1.1 Barvení HE

K barvení HE používáme barvicí automat Leica AutoStainer XL od firmy Micro spol. s.r.o. Viz Příloha 4. Barvicí automat provede kompletní barvení HE a i následné odvodnění a projasnění preparátů. Poté se preparáty vloží do montovacího automatu Automatic Coverslipping Machine Meisei od firmy Bamed s.r.o. Zde je na obarvené řezy kápnuto montovací médium (Pertex) a řezy jsou překryty krycím sklíčkem (27). Tento krok velmi pomohl laborantkám. Protože k odvodnění a projasnění preparátů se v histologii používá xylen a karbol-xylen, oba tyto roztoky jsou považovány za karcinogeny. Dříve laborantky jejich výpary vdechovaly (musely pracovat přímo nad těmito roztoky). Dnes je celý proces uzavřen a výpary odsávány do digestoře.

Z Grafu 1 a 2 vyplývá, jak dochází na PAO NCB k neustálému nárůstu celkového počtu parafinových bloků i preparátů. Pouze v roce 2013 je znát mírný pokles, což bylo způsobeno snížením počtu pitev a odebíráním méně vzorků z pitev vykonaných.

5.1.2 *Metoda RPB*

Dříve se krájel materiál na RPB pomocí zmrazovacího mikrotomu, který se skládal z kovového stolečku s otvory, určeného pro tkáňový bloček. Stoleček byl spojen hadicí s bombou CO². Otevřením bomby a ventilu u stolečku unikající CO² tvořil na tkáňovém bločku bílý sníh a tkáň nám tímto zmrazil. Manipulace s bombami a zároveň i s tímto přístrojem byla velmi náročná a při současném počtu RPB těžko proveditelná. V současné době má PAO NCB kryostat Microm HM 505 N od firmy Bamed s.r.o., který sám udržuje stálou teplotu (-22°C). Je možno v něm zmrazovat i více tkáňových bločků najednou. Viz Příloha 5.

5.1.3 *Metoda IHC*

Začátek zavedení IHC na PAO NCB byl v roce 1998, kdy byl celý pracovní postup prováděn ručně. V roce 2009 nám byl zakoupen z dotace Evropské unie barvicí automat pro imunohistochemická vyšetření od firmy Bamed s.r.o. IntelliPATH FLX. Viz Příloha 6. IntelliPATH FLX je přístroj, který nám umožnil metody IHC standardizovat. Je možno v něm zpracovat až 50 skel v jednom cyklu. IntelliPATH FLX je otevřený systém, to nám dovoluje volný výběr protilátek a detekčních systémů od různých dodavatelů (28). Vkládáme do něho skla s ukrojenými vyšetřovanými preparáty označenými štítky s čárovými kódy, na kterých je evidenční číslo biopsie a informace o požadované IHC metodě. IntelliPATH FLX metodu podle předepsaného protokolu sám provede.

V Grafu 3 je patrné, že počty preparátů IHC každoročně stoupají. I když se mírně mění druhy primárních protilátek zakupované na naše oddělení, viz Tabulka 1: Mapování nejčastěji používaných protilátek na PAO NCB. Tím byla potvrzena má Hypotéza 1: Počet IHC na PAO NCB se každoročně zvyšuje.

5.2 Porovnání metod

V období od března 2013 do března 2014 bylo zpracováno 142 SN, které byly odebrány pacientům s již dříve diagnostikovaným karcinomem prsu. Před zavedením metody vyšetření SN by u všech těchto pacientů byla provedena i následná disekce axilárních uzlin. Právě tato disekce axilárních uzlin vede k vážným pooperačním i dlouhodobým komplikacím v podobě lymfademů, poruchy hybnosti končetiny atd. Přibližně u 1/3 – 2/3 pacientů se při vyšetření axilárních uzlin zjistilo, že nejsou dále postiženy, tudíž komplikace s tímto odběrem byly úplně zbytečné (32). Po zavedení vyšetřování SN jsou pacienti s negativním nálezem tohoto zákroku ušetřeni. Negativní nález v sentinelové uzlině vyloučí postižení dalších axilárních uzlin a tím je rekonvalescence pacientů snadnější. Proto je toto vyšetření velkým přínosem nejen v diagnostice, ale i léčbě karcinomu prsu.

Hlavně vzhledem k výše uvedeným okolnostem mohu tvrdit, že má Hypotéza 3: Metoda vyšetření SN je pro pacienta výhodnější než vyšetření uzlin z axilární disekce, byla potvrzena.

Hlavně díky zavedení mamárního screeningu (časné vyhledávání zhoubného nádoru prsu) v roce 2002, mají ženy ve věku od 45 let pravidelně každé dva roky podstoupit mamografické vyšetření, které hradí zdravotní pojišťovny. Součástí prevence je také doporučení pro ženy po 20. roku života provádět pravidelně týden po menses samovyšetřování prsů. Právě v důsledku této osvěty jsou častěji operováni pacienti s raným, neinvazivním stadiem. Proto velký počet sentinelových uzlin není již karcinomem zasažen, nebo jsou nalezeny netypické metastázy tzv. "minimální formy nádorového postižení" izolované nádorové buňky ITC (31). Nyní se nabízí otázka, zda je nutné provádět následnou disekci axilárních uzlin i při nálezech ITC a mikrometastáz v SN. Klinický přínos ještě není dostatečně zmapován, protože před zavedením vyšetření SN pomocí HE + IHC nebyly tyto minimální formy nádorového postižení nalézány (32). Je uváděno v řadě prací, že cca u 1/2 - 2/3 pacientů, u kterých byla následně po zjištění pozitivní SN provedena disekce axilárních uzlin, nebyla již další metastáza nalezena (33). Proto je navrhováno zohledňovat před plánovanou disekcí

axily nejen nádorové postižení SN, ale i charakteristiku primárního nádoru: jeho velikost, angioinvasze a lymfangioinvasze, multicentricita atd. (34).

Z námi vyšetřených 142 sentinelových uzlin byla metastáza nalezena již metodou RPB v 22 případech, dalším zpracováním a následným barvením HE bylo nalezeno dalších 16 pozitivních SN, celkem tedy 38, a konečným vyšetřením pomocí IHC protilátkou CK 7 bylo nalezeno ještě 7 pozitivně reagujících SN (z toho dvě byly hodnoceny jako ITC), celkem tedy 45. Znázorněno v Grafu 4 a Tabulce 2. Metodou IHC bylo nalezeno o 23 pozitivních SN více než pomocí RPB. Zde byla potvrzena má Hypotéza 2: Pomocí IHC je zachycen větší počet metastáz než RPB a HE.

I když metoda RPB není tak spolehlivá v nalezení metastáz, stále je její hlavní výhodou možnost znát okamžitý výsledek, a proto provést disekci axilárních uzlin v jeden čas. Při nalezení metastázy v SN až v dalších krocích vyšetření musí být disekce uzlin provedena v druhé době.

97 sentinelových uzlin bylo negativních. Dá se tedy říci, že 97 pacientů bylo ušetřeno následného vyjmutí axilárních uzlin a tedy i komplikací s tím spojených.

Stav SN je považován za prognostický faktor, velmi přesně nám určí stav regionálních uzlin. Pravděpodobnost pozitivního nálezu v SN přímo souvisí s velikostí primárního tumoru. U primárních tumorů velikosti nad 3 cm někde je uváděno 5 cm bývá doporučováno provést disekci axilárních uzlin i při minimálním nálezu v SN.(35) Proto můžeme tvrdit, že věk pacienta není spjat s přítomností metastáz v SN. Hlavní úlohu zde má primární tumor - nejvíce typ nádoru, jeho agresivita, schopnost invaze do okolí, velikost, diferenciace. V Grafu 6. Znázornění počtu nalezených pozitivních SN v různých věkových kategoriích je patrné, že u věkové kategorie 61-70 let bylo nalezeno nejvíce pozitivních SN. Avšak ve věkové kategorii 71-83 let je zaznamenán pokles. Tento pokles je ale již znatelný i při počtu celkových vyšetřených SN. Proto nemohu zcela potvrdit, zda by bylo nalezeno méně pozitivních SN i při vyšším počtu vyšetřených SN. Je možné, že u této věkové kategorie byl přítomen primární tumor o větší velikosti, nebo bylo již patrné prorůstání tumoru do okolních tkání a do

lymfatických cév. Proto byl při operaci tento fakt zohledněn a byla provedena axilární disekce bez zaslání SN na RPB.

Tímto Hypotéza 4: Čím vyšší je věk pacienta, tím větší je pravděpodobnost nalezení metastázy v SN nebyla potvrzena.

6. Závěr

Cílem mé práce bylo porovnat histologické metody HE, RPB, IHC a zmapovat jejich modernizaci a částečnou automatizaci na PAO NCB. Porovnání jsem provedla v období 2003 – 2013. Jak z mé porovnávací studie vyplývá, modernizace a automatizace v histologické laboratoři vedla k možnosti zpracovávat denně větší množství vzorků, než tomu bylo dříve při ručním zpracování. Je také umožněna standardizace metod, na kterou je dnes kladen velký důraz. Standardizací je míněno zachování stejné teploty (parafín, vodní lázeň u krájení, při krájení v kryostatu, při barvení v automatech), stejné časy působení barviv a reagensů (v barvicích automatech na HE i IHC). V IntelliPATH FLX je při IHC zachován nejen časový interval působení barviv a reagensů, ale i jejich množství, které je na preparát pipetováno. Je zde také udržována vlhkost, aby nedošlo k vyschnutí řezů mezi jednotlivými kroky metody. Další zlepšení je hlavně ve snížení rizik a nebezpečí při práci v laboratoři. Došlo ke snížení přímého styku laborantů s karcinogeny, veškerá práce s nimi je prováděna v odsávaných boxech.

Každoročně vzrůstá i počet vzorků vyšetřených pomocí IHC, tím byla potvrzena má první hypotéza.

Dalším úkolem mé práce bylo zamyslet se, zda je při diagnostikovaném karcinomu prsu pro pacienta výhodnější odběr a vyšetření SN, nebo odběr a vyšetření uzlin z axilární disekce. Po prostudování řady literárních zdrojů a po konzultaci s chirurgem MUDr. Chromým jsem dospěla k závěru, že zdaleka výhodnější je pro pacienta odběr a vyšetření SN, tím byla potvrzena má třetí hypotéza.

Na PAO NCB jsem v období od března 2013 do března 2014 zpracovala celkem 142 sentinelových uzlin, které byly zpracovány nejprve RPB, následně barvením HE a IHC protilátkou CK 7. Pomocí RPB byla zachycena metastáza karcinomu prsu v 22 případech, barvením HE jsme zachytili metastázu v 38 případech a imunohistochemicky protilátkou CK 7 byla metastáza nalezena v 45 případech. Tím byla potvrzena má druhá hypotéza.

Věkové rozmezí pacientů, u kterých byla vyšetřena SN, činí 31 – 83 let. Metastáza karcinomu prsu byla zachycena nejčastěji ve věkovém rozmezí 61 – 70 let. V poslední věkové kategorii 71 – 83 let byl zaznamenán pokles počtu nalezených metastáz v SN. Vzhledem k tomu a ještě dalším okolnostem musím konstatovat, že má čtvrtá hypotéza nebyla potvrzena.

7. Seznam použitých zdrojů

1. MAČÁK J., MAČÁKOVÁ J. *Patologie*. Praha: Grada, 2004. ISBN 80-247-0785-3.
2. ABRAHÁMOVÁ J. et al. *Co byste měli vědět o rakovině prsu*. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3063-9.
3. BORGSTEIN P.J., MEIJER S. *Guidelines for sentinel node biopsy and lymphatic mapping of patients with breast cancer*. *Ann Surg* 228: 720-723, 1998.
4. KRAG D. *Why perform randomised clinical trials for sentinel node biopsy for breast cancer?*. *Am J Surg* 182: 411-413, 2001.
5. BASS S.S., LYMAN G.H., McCANN C.R., KU N.N., BERMAN C., DURAND K., BOLANO M., COX S., SALUD C., REINTGEN D.S., COX C.E. *Lymphatic Mapping and Sentinel Lymph Node Biopsy*. *Breast J* 5: 288-295, 1999.
6. RAO R., EUHUS D., MAZO H.G., BALCH C. *Axillary node interventions in breast cancer: a systematic review*. *Jama* 310(13): 1385-1394, 2013.
7. MARRAZZO A., TAORMINA P., GEBBIAB V., DAVID M., RIILI I., LO GERFO D., CASA L., NOTO A. *Is sentinel lymph node biopsy more accurate than axillary dissection for staging nodal involvement in breast cancer patients?*. *Chir Ital* 59(5): 693-699, 2007.
8. FAIT V., CHRENKO V., PAPÍRKOVÁ D. *Biopsie sentinelové uzliny v diagnostice a léčbě zhoubných nádorů*. *Lékařské listy* 46: 20-25, 2001.
9. RYŠKA A., NENUTIL R., KOLÁŘ Z. *Doporučený postup pro histologické vyšetření karcinomu prsu*. Společnost českých patologů. On-line dostupné z: <http://www.patologie.info/standardy>.

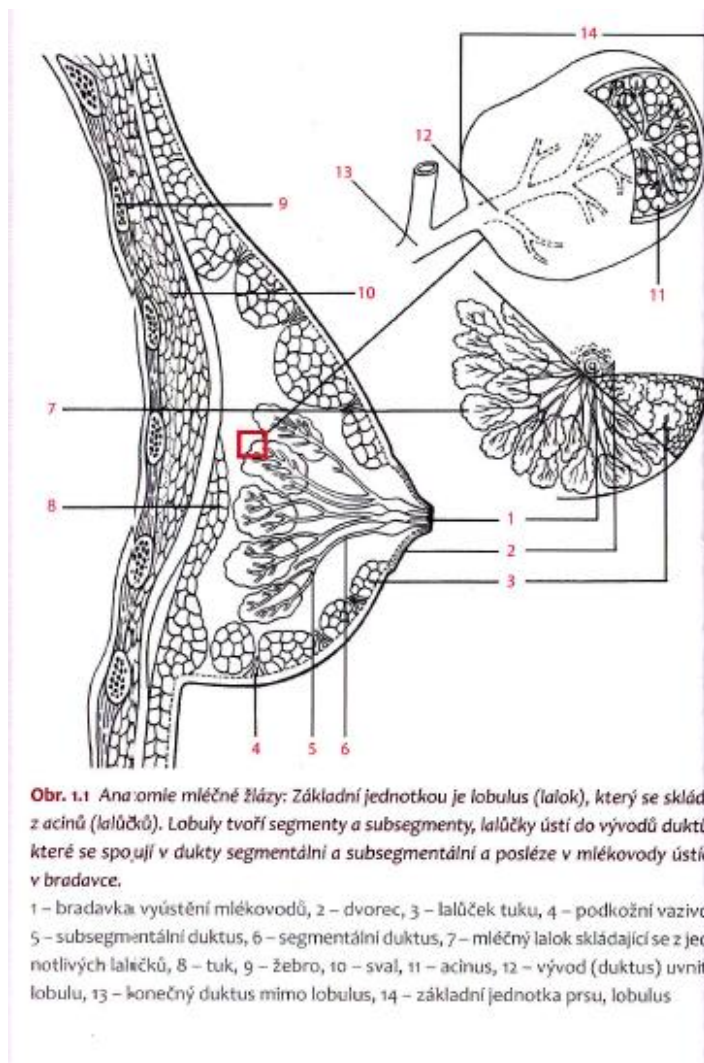
10. KONRÁDOVÁ V., VAJNER L., UHLÍK J. *Histologie přednášky pro bakalářské studium*. Praha: Nakladatelství H & H, 2005. ISBN 80-7319-009-5.
11. LICHNOVSKÝ V. et al. *Základy histologie pro bakaláře*. Olomouc: Universita Palackého v Olomouci, 2002. ISBN 80-244-0439-7.
12. VACEK Z. *Histologie a histologická technika: Histologie I.část*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-201-9.
13. Kolektiv autorů. *Histologická praktika a metody vyšetřování tkání a orgánů*. Brno: Vydavatelství MU, 1998. ISBN 80-210-1774-0.
14. TOUPALÍK P. *Imunohistochemické diagnostické metody v soudnělékařské praxi*. Praha: Karolinum, 2001. ISBN 80-246-0163-X.
15. JARKOVSKÁ D., MARTÍNEK J. *Histologie I*. Praha: Karolinum, 1997. ISBN 80-7184-388-1.
16. GOMOLČÁK P. *Základy imunohistochemie v patologii*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1997. ISBN 80-7013-239-6.
17. FAKAN F. *Přehled patologie pro bakalářské zdravotnické obory*. Praha: Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1054-X.
18. STŘÍTESKÝ J. *Patologie*. Olomouc: Epava, 2001. ISBN 80-86297-06-3.
19. JIRKOVSKÁ M. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-263-3.
20. MAŇÁKOVÁ E., SEICHERTOVÁ A. *Metody v histologii*. Praha: Karolinum, 2002. ISBN 80-0230-X.

21. ČECH S., HORKÝ D. *Přehled obecné histologie*. Brno: Vydavatelství MU, 2005. ISBN 80-210-3854-3.
22. VACEK Z. *Histologie a histologická technika: Histologická technika II.část*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-202-7.
23. LUKÁŠ Z., DRÁBEROVÁ E., FEIT J., VOJTĚŠEK B. *Imunohistochemické metody v biologii a v biotické diagnostice*. Brno: Masarykova universita v Brně, 1997. ISBN 80-210-0620-X.
24. DOUGLAS F.P. *Histologie a buněčná biologie*. Praha: Nakladatelství H & H, 2004. ISBN 80-7319-024-9.
25. Materiál N-HISTOFINE Simple Stain
26. NCB PAO SOP 12 002. *Peroperační vyšetření buněk a tkání a diagnostika*. Laboratoř Patologického oddělení, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.
27. NCB PAO SOP 12 001. *Histologické vyšetření tkání a diagnostika*. Laboratoř Patologického oddělení, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.
28. NCB PAO PP 12 004. *Barvení hematoxylin-eosin*. Laboratoř Patologického oddělení, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.
29. NCB PAO SOP 12 004. *Imunohistochemická vyšetření antigenů*. Laboratoř Patologického oddělení, Nemocnice České Budějovice a.s., 2012.
30. DATA SHEET protilátky CK 7 od firmy DBS. On-line dostupné z Diagnostic BioSystems: <http://www.dbiosys.com/>

31. SOBIN L.H., Gospodarowicz M.K., Wittekind CH. *TNM klasifikace zhoubných novotvarů*. Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky, 2011. ISBN 978-80-904259-6-5.
32. COUFAL O., VRTELOVA P., KRSICKA P. *Operace mízních uzlin u karcinomů prsu - současný pohled*. Postgraduální medicína 4/2012. On-line dostupné z www.zdravi.e15.cz.
33. LYMAN G.H., GIULIANO A.E., SOMERFIELD M.R., et al. *American society of clinical oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer*. J Clin Oncol 23: 7703-7720, 2005.
34. COUFAL O. *Biopsie sentinelové uzliny u multifokálních a multicentrických karcinomů prsů*. Klinická onkologie 20: 283-286, 2007.
35. FAIT V. *Sentinelová biopsie a možnosti využití v současné onkochirurgii*. Klinická onkologie 21: 5-19, 2008.
36. BIOCARE MEDICAL. *Automated Slide Stainer Intelli PATH FLX*. On-line dostupné z <http://www.slidestainer.com/>

8. Přílohy

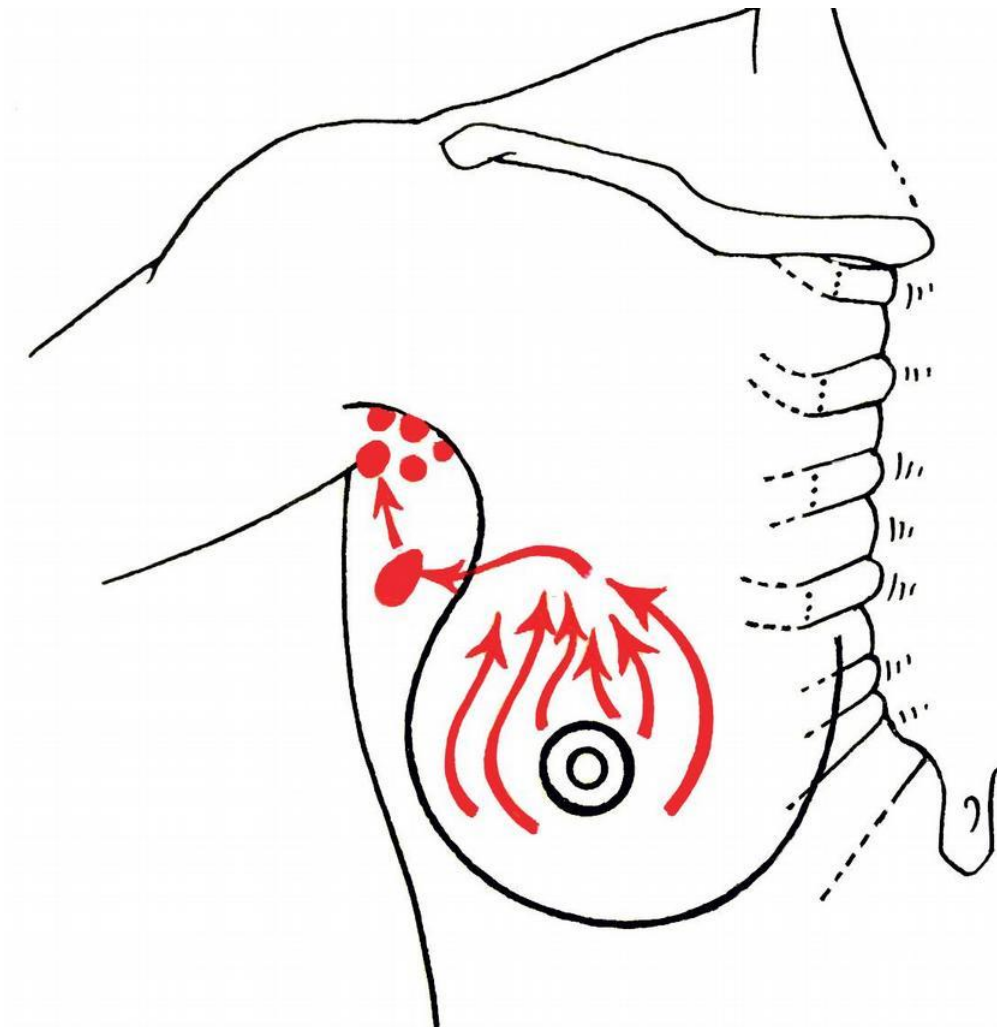
Příloha 1



Zdroj: Abrahámová J. et al. 2009

Obr. 1: Anatomie prsu

Příloha 2



Zdroj: Postgraduální medicína 4/2012

Obr. 2: Lymfatický odtok z prsu: lymfatické cévy směřují do zevního horního kvadrantu, sentinelová uzlina (jedna nebo několik uzlin), další, nesentinelové uzliny vyšších řádů

Příloha 3: Zalévání tkáňových vzorků do parafínu dříve a současnost.



Zdroj: Autor

Obr. 3: Zalévací parafínová linka Leica EG 1160



Zdroj: Autor

Obr. 4: Kovové L formy používané, které se používaly při zalévání vzorků dřívě

Příloha 4: Barvení HE dříve a současnost.



Zdroj: Autor

Obr. 5: Barvicí automat Leica AutoStainer XL na barvení HE



Zdroj: Autor

Obr. 6: Barvicí řada pro ruční barvení

Příloha 5: Krájení vzorku na rychlou peroperační biopsii dříve a současnost.



Zdroj: Autor

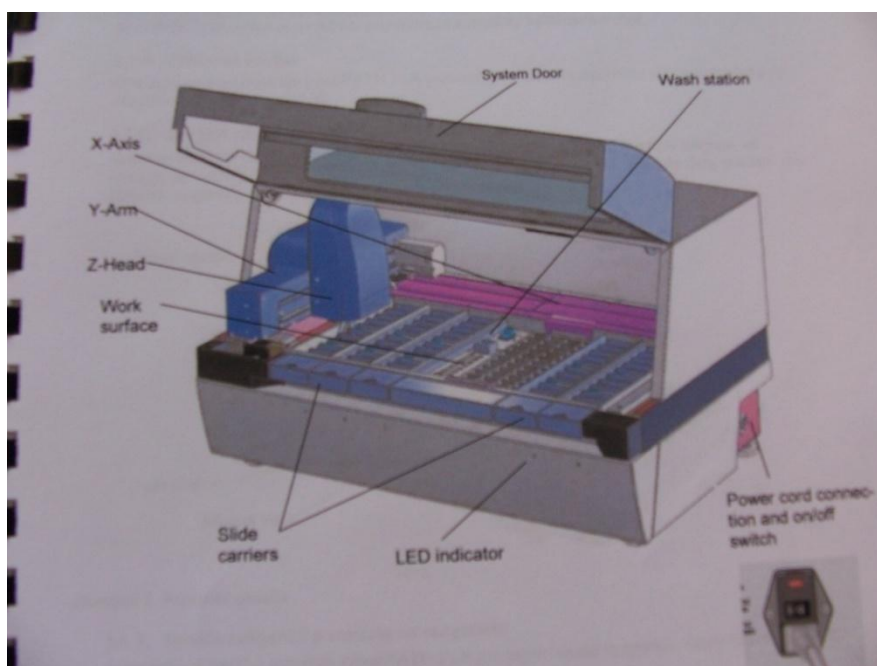
Obr. 7: Kryostat Microm HM 505 N



Zdroj: Autor

Obr. 8: Zmrazovací mikrotom používaný na RPB před Kryostatem

Příloha 6: Barvení IHC ručně a barvicí automat.



Zdroj: Bio Care Návod k přístroji (36)

Obr. 9: Barvicí automat IntelliPATH FLX



Zdroj: Autor

Obr. 10: Vlhká komůrka používaná při manuálním provedení IHC