



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

**Metoda imunohistochemie v patologii**

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Studijní program: **SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ/  
ZDRAVOTNÍ LABORANT**

**Autor:** Andrea Hrdinová

**Vedoucí práce:** MUDr. Ondřej Nikolov

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Metoda imunohistochemie v patologii 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 28. května 2020

.....

Andrea Hrdinová

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce MUDr. Ondřeji Nikolovovi a také celému kolektivu patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s. za pomoc a cenné rady při vypracovávání bakalářské práce. Velké díky patří také mé rodině za ohromnou trpělivost v průběhu celého studia na Zdravotně sociální fakultě, Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích.

# Metoda imunohistochemie v patologii

## Abstrakt

Bakalářská práce pojednává o využití imunohistochemických metod v diagnostice novotvarů v patologii. Popisuje využití spektra protilátek na oddělení patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.

Imunohistochemické metody jsou dnes významnou metodou používanou v patologii pro typizaci nádorů a v případě metastáz pro určení primárních nádorů. Doplňují standardní barvicí metody pro základní diagnostiku, jako např. Hematoxylin–Eosin, Van–Gieson, u kterých je nižší specifita. Tyto metody slouží zejména k barevnému odlišení základních buněčných složek a tkáňových komponent preparátu.

Metody imunohistochemie jsou založené na principu afinity speciální protilátky vůči danému antigenu a jsou rozděleny na přímé a nepřímé metody. U přímé metody se pro detekci antigenu použije protilátka značená např. enzymem, který po navázání vyvolává barevnou změnu, kterou pozorujeme pod mikroskopem. Nepřímá metoda (dvoustupňová i třístupňová) je metoda mnohem citlivější, je založena na principu neznačené primární protilátky, na kterou se naváže konjugovaná sekundární protilátka s enzymem nebo biotinem. U třístupňové metody pak využíváme afinity avidinu a biotinu, kdy se vytvoří komplex avidin–biotin–enzym (např. peroxidáza), který se znázorní a zvýrazní.

Podrobněji se bakalářská práce zabývá diagnostikou nádorů prsu a sentinelové lymfatické uzliny, jak v teoretické, tak v praktické části a dále incidencí těchto nádorů od zavedení imunohistochemické metody na oddělení patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s. V neposlední řadě je zde popsána i kazuistika jednotlivých zajímavých případů.

**Klíčová slova:** imunohistochemie; antigen; protilátka; sentinelová lymfatická uzlina; biopsie sentinelové uzliny; karcinom mléčné žlázy; parciální resekát; nádor prsu

# **Diagnostic of immunohistochemistry in pathology**

## **Abstract**

The bachelor thesis deals with the use of immunohistochemical methods in the diagnosis of neoplasms in pathology. Describes the use of antibody spectrum at the Department of Pathology, Český Krumlov Hospital, a.s.

Immunohistochemical methods are nowadays an important method used in pathology for tumor typing and metastasis for the determination of primary tumors. They complement the standard staining methods for basic diagnostics such as Hematoxylin–Eosin, Van–Gieson, which are less specific, these methods mainly serve to differentiate the basic cellular components and tissue components of the preparation.

Immunohistochemistry methods are based on the special antibody affinity principle and are divided into direct and indirect methods. For a direct method, an antibody labeled with, for example, an enzyme is used to detect the antigen and, upon binding, induces a color change observed under the microscope. Indirect method (two-stage, three-stage) is a more sensitive method, based on the principle of an unlabeled primary antibody to which a conjugated secondary antibody binds to an enzyme or biotin. In the three-stage, we use the affinity of avidin and biotin to form the avidin-biotin-enzyme complex (eg. peroxidase), which is shown and highlighted.

In more detail, the thesis deals with the diagnosis of breast and sentinel lymph node tumors, both in the theoretical and practical part, and the incidence of these tumors since the introduction of the immunohistochemical method at the Department of Pathology of the Český Krumlov Hospital. Last but not least, a case report of individual interesting cases is described.

**Key words:** Immunohistochemistry; antigen; antibody; sentinel lymph node; SLNB, cancer of mammary gland, partial resection; breast tumors;

## **Obsah**

<b>1. Úvod.....</b>	<b>9</b>
<b>2. Teoretická část.....</b>	<b>11</b>
<b>3. Rozdělení typů imunohistochemických metod .....</b>	<b>12</b>
3.1. Přímá metoda.....	12
3.2. Nepřímá metoda dvojstupňová.....	12
3.3. Nepřímá metoda trojstupňová .....	13
<b>4. Rozdělení protilátek .....</b>	<b>14</b>
4.1. Monoklonální protilátky.....	14
4.2. Polyklonální protilátky .....	14
<b>5. Patologie prsu .....</b>	<b>23</b>
5.1. Nenádorové léze prsu .....	24
5.2. Nádorové léze prsu.....	25
<b>6. Vyšetření karcinomu prsu a sentinelové uzliny.....</b>	<b>27</b>
<b>7. Incidence a mortalita novotvaru prsu .....</b>	<b>28</b>
<b>8. Postup imunohistochemického barvení IHC .....</b>	<b>29</b>
<b>9. Praktická část .....</b>	<b>33</b>
<b>10. Kazuistika .....</b>	<b>42</b>
10.1. Invazivní NST karcinom prsu u muže.....	42
10.2. Karcinom z Merkelových buněk .....	43
<b>11. Fotodokumentace .....</b>	<b>45</b>
<b>12. Diskuze .....</b>	<b>47</b>
<b>13. Závěr.....</b>	<b>49</b>
<b>14. Literatura.....</b>	<b>50</b>

## Seznam zkratek

ABC	Avidin–biotin komplex
$\alpha$ SMA	Hladkosvalový aktin
BAGE	Antigen spojený s melanomem
Ca	Karcinom
CD	Diferenciační znak
CD 45-LCA	Společný leukocytární antigen
CDK	Cyklin dependentní kináza
CK	Cytokeratin
CK 7	Cytokeratin 7
CK 20	Cytokeratin 20
CK PAN	Cytokeratin Coctail
CNS	Centrální nervový systém
CT	Počítačová tomografie
DAB	3,3 diaminobenzidín tetrahydrochlorid
DCS	Diagnostický systém
DCIS	Duktální karcinom in situ
DNA	Deoxiribonukleová kyselina
E-CAD	E kadherin
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
EHK	Externí hodnocení kvality
EMA	Epitel membránový antigen
Fab	Variabilní doména

Fc	Konstantní doména
GAGE	Antigen spojený s melanomem
GIT	Gastrointestinální trakt
HE	Barvení Hematoxylin-Eosin
IDC	Duktální infiltrující karcinom
Ig	Imunoglobuliny (A, G, M, E, D)
IHC	Imunohistochemie
ILC	Lobulární infiltrující karcinom
Ki 67	Jaderný protein
LCIS	Lobulární karcinom in situ
MAGE	Antigen spojený s melanomem
MART	Antigen spojený s melanomem
NIS	Nemocniční informační systém
NST	Duktální invazivní karcinom (no special type)
PAP	Peroxidáza-Antiperoxidáza
PAS	Barvení na mukopolysacharidy
PPT	Pracovní postup technický
Rb	Retinoblastom
RNA	Ribonukleová kyselina
SABC	Streptavidin biotin komplex
SLNB	Biopsie sentinelové uzliny
SP	Synaptic protein
TBS	Fosfátový pufr
TTF1	Transkripční thyreoidní faktor



## 1. Úvod

Imunohistochemické metody jsou poměrně mladé, využívají k detekci antigenních determinant vazby antigenu s protilátkou a umožňují za pomoci světelné mikroskopie blíže charakterizovat původ buněk a tkání, jejich proliferační aktivitu, eventuelně stav hormonálních receptorů. Toto vyšetření se stává rutinním v patologii, umožňuje onkologům zvolit optimální terapeutickou strategii. Bez imunohistochemického vyšetření nelze vůbec rozlišit např. jednotlivé typy lymfomů, kde je přítomnost některých povrchových antigenů pro některé nádory definující. U těchto typů nádorů je role imunohistochemie zcela nezastupitelná. Průkazem antigenních epitopů nádorových buněk lze odlišit epitelové buňky karcinomu od jiných nádorů, které karcinom mohou napodobit (některé sarkomy, melanom, lymfom, mezoteliom aj.). S ohledem na průkaz nádorově specifických molekul lze také u některých nádorů rozpoznat jejich původ. Příkladem je rozpoznání specifického prostatického antigenu (PSA), který tvoří buňky prostatického epitelu, lze tedy pomýšlet na karcinom prostaty. Tato vyšetření jsou vysoce přínosná zejména v případech, kdy vyšetřujeme metastatický nádor a místo primárního nádoru není zcela známo (Povýšil C., Speciální patologie, 2007).

Klinicko patologická korelace, tj. srovnání výsledků diagnostiky patologem s výsledky klinických a dalších laboratorních a zobrazovacích nálezů, přispívá k získání uceleného obrazu o onemocnění a někdy je významná i pro vlastní diagnostiku (Povýšil C., Speciální patologie, 2007).

## **Historie**

Základem pro imunohistochemické metody byla možnost kovalentní vazby molekul imunoglobulinů s jinými molekulami, což se stalo předmětem výzkumu již ve 30. letech 20. století. Ve 40. letech 20. století se podařilo prvně prokázat antigen v tkáni pomocí fluoresceinem značené protilátky (první imunofluorescenční metoda). Do patologie se tyto metody dostávaly od 50. let 20. století a postupně se zlepšovala jejich specifita, senzitivita a dostupnost. Ruku v ruce přicházely tyto metody s pomocí rozvoje molekulárního, proteinového a genetického inženýrství. V 70. letech 20. století byly připraveny protilátky proti jedné antigenní determinantě, tzv. monoklonální protilátky produkované tzv. hybridomy. Rovněž v těchto letech se začíná využívat spojení enzymu s protilátkou a širší zavedení imunohistochemických metod využívajících monoklonální a polyklonální protilátky do praxe (Lukáš Z., Imunohistochemické metody, 1997).

## **2. Teoretická část**

### **Nejdůležitější antigenní skupiny prokazované v praxi**

#### **Intermediární filamenta**

Cytokeratiny typické pro typy epitelových buněk, vimentin typický pro buňky mezenchymového původu, desmin typický pro svalovou tkáň, neurofilamenta typická pro CNS.

#### **Mikrofilamenta**

Mezi mikrofilamenta řadíme aktin a myosin.

#### **CD antigeny**

CD antigeny typické pro lymfoproliferativní choroby.

Je možnost prokazovat i jiné antigeny typické pro určité tkáně a diferenciační stupně jednotlivých tkání.

Specifické je využívání estrogenových a progesteronových markerů pro diferenciaální diagnostiku nádorů dělohy, ovárií a prsu (Hořejší I., Základy imunologie, 2009).

### **3. Rozdělení typů imunohistochemických metod**

přímá metoda

nepřímá metoda dvojstupňová

nepřímá metoda trojstupňová – PAP metoda (peroxidáza – antiperoxidáza komplex)

– ABC metoda (avidin – biotin komplex)

#### **3.1. Přímá metoda**

Jde o nejjednodušší způsob vyšetření antigenu ve tkáni. Primární protilátka je přímo značena fluoresceinem, kovem nebo enzymem a po zvýraznění jeho přítomnost ve tkáni hodnotíme. Tyto metody lze použít u vysokých koncentrací antigenů ve tkáních. Tyto protilátky jsou dostupné pro široké spektrum antigenů a využívají se zejména v nativních řezech. Pro použití na parafinových řezech je přímá metoda málo citlivá (Bartůňková J., Vyšetřovací metody v imunologii, 2011).

#### **3.2. Nepřímá metoda dvojstupňová**

Ve srovnání s přímou metodou je dvoustupňová metoda náročnější a komplikovanější, ale její výhodou je vyšší citlivost. V prvním kroku se na parafinové řezy naváže primární neoznačená protilátka (imunoglobulin) se specifickými vlastnostmi proti prokazovanému antigenu. Ve druhém kroku se navazuje protilátka sekundární proti Fc fragmentu imunoglobulinu zvířete, které bylo v prvním kroku dárce primární protilátky, tato sekundární protilátka je značena fluorochromem nebo enzymem. Imunologickou vazbou se naváže sekundární protilátka na primární protilátku (Bartůňková J., Vyšetřovací metody v imunologii, 2011).

### 3.3. Nepřímá metoda trojstupňová

Tuto metodu také nazýváme amplifikační, zesílení signálu nastane v případě, že množství antigenu ve tkáni je nízké. První krok je reakce primárního specifického antiséra s antigenem, který chceme ve tkáni prokázat. Druhý krok navazujeme neznačenou specifickou sekundární protilátkou proti imunoglobulinům zvířete, které poskytlo protilátky pro první a třetí krok. Této sekundární protilátce také říkáme spojovací, vznikne tzv. můstek. Můstek je nutné nakapat v nadbytečném množství, protože často dochází k vysycení Fab fragmentů, na nichž je antigeně specifická oblast a tento efekt pak dává falešně negativní reakci. Třetím krokem je poté nanesení značeného komplexu např. PAP (peroxidáza–antiperoxidázový komplex). Tato metoda je časově náročná a vysoce citlivá (Bartůňková J., Vyšetřovací metody v imunologii, 2011).

U metody ABC (avidin–biotin komplex), použijeme avidin získaný z bakterie *Streptomyces avidiny*, někdy se můžeme setkat s označením SABC (streptavidin–biotin komplex). Vytváří se pevná nespecifická vazba glykoproteinu bílku avidinu s vitamínem biotinem. Principem metody je označení sekundární protilátky biotinem a jeho další vazba se streptavidin–biotinovým komplexem označeným peroxidázou. Místa v preparátu, kde došlo ke specifické reakci, jsou indikována enzymatickou aktivitou peroxidázy (Bartůňková J., Vyšetřovací metody v imunologii, 2011).

## **4. Rozdělení protilátek**

### **4.1. Monoklonální protilátky**

Jsou produktem jednoho klonu B lymfocytů. Hybridom vzniká fúzí B lymfocytů imunizovaného zvířete s neoplastickými buňkami myelomu a je schopen produkovat monoklonální protilátky namířené proti jedné antigenní determinantě. Tuto vlastnost zdědí hybridom po aktivovaném B lymfocytu a vlastnost nesmrtelnosti, nepřetržitého neoplastického růstu, zdědí po myelomové buňce (Hořejší I., Základy imunologie, 2009).

### **4.2. Polyklonální protilátky**

Jsou produktem mnoha klonů B lymfocytů a jsou to tzv. směsi protilátek. Narozdíl od monoklonálních protilátek nejsou homogenní a nemají definovanou jasnou specifitu. Získáváme je od imunizovaných laboratorních zvířat antigenem nebo jejich směsí. Při imunizaci organismu se různé B lymfocyty stimulují a následně diferencují v plazmatické buňky. Tím je produkováno široké spektrum protilátek proti různým epitopům příslušné bílkoviny, které mají odlišnou schopnost vazby na tuto bílkovinu (Hořejší I., Základy imunologie, 2009).

## **Typy primárních protilátek používaných na oddělení patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.**

### ***anti $\alpha$ -SMA (Smooth Muscle Actin)***

název: Monoclonal Mouse Anti Alpha-Smooth Muscle Actin, clone I A4, (výrobce DCS Innovative Diagnostic-Systeme, Hamburg)

immunogen: Mouse IgG 2 kappa

specifikace: Aktin je jednou z hlavních složek cytoskeletu a je přítomen téměř v každé buňce. Protilátka proti aktinu hladkého svalstva rozpoznává protein exprimovaný normálními hladkými, kosterními a srdečními svalovými buňkami. Hladkosvalový aktin se nachází ve stěnách cév, střevní sliznici, muscularis propria orgánů zažívacího traktu a ve stromatech různých tkání. Imunohistochemická detekce hladkosvalového aktinu se používá k identifikaci myogenních složek nebo myogenního původu nádorů, např. leiomyomů, leiomyosarkomů a pleomorfních adenomů.

kontrolní tkáň: appendix (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti CD 45-LCA (Leucocyte Common Antigen)***

název: Monoclonal Mouse Anti Leucocyte Common Antigen (Anti-LCA, CD 45), clone 2B11 PD7/26, (výrobce DCS Innovative Diagnostic-Systeme, Hamburg)

immunogen: Mouse IgG1 kappa

specifikace: antiCD 45 je monoklonální protilátka používaná k diferenciální diagnostice nediferencovaných novotvarů, kdykoliv je podezření na maligní lymfom (morfologicky nebo klinicky). Jedná se o vysoce specifickou protilátku, proto je pozitivní výsledek velmi příznačný pro lymfoidní nebo myeloidní původ. Některé typy lymfoidních novotvarů mohou postrádat CD 45 (Hodgkinova choroba, některé T-lymfomy a některé leukémie), takže její nepřítomnost nevyklučuje hematolymfoidní

nádor. Tato protilátka je exprimována výhradně buňkami hematopoetické linie a je přítomna ve většině benigních a maligních lymfocytů a prekurzorech plazmatických buněk.

kontrolní tkáň: appendix (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti Chromogranin A***

název: antichromogranin A, clone SP12, (výrobce DCS Innovative Diagnostic–Systeme, Hamburg)

immunogen: Králík IgG, Rekombinantní protein odpovídající lidskému chromogranin A

specifikace: Lidský chromogranin A je protein sestávající z 439 aminokyselin (68 kDa). Příslušný gen je lokalizován na 17. chromozomu. Chromogranin A je exprimován neuroendokrinními buňkami celého těla, v intestinálních neuroendokrinních buňkách, ve dřeni nadledvin, v pankreatických buňkách, v předním laloku hypofýzy, parafolikulárních C-thyreoidních buňkách, jakož i v nádorech z nich odvozených. V imunohistochemii tato protilátka barví peptidy obsahující neurosekreční granula neuroendokrinních buněk. Tato protilátka se uplatňuje při diagnostice neuroblastomů, metastáz malobuněčných karcinomů plic a karcinoidů. Společně se synaptofyzinem je chromogranin A jedním z nejdůležitějších markerů neuroendokrinních nádorů.

kontrolní tkáň: appendix (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti Cytokeratin 7***

název: Monoclonal Mouse Anti Cytokeratin 7, clone OV–TL 12/30, (výrobce DCS Innovative Diagnostic–Systeme, Hamburg)

immunogen: Mouse IgG1 kappa

specifikace: Protilátka CK7 reaguje s proteiny, které se nachází v duktálních a žlazových epitelech, přechodném epitelu močových cest a epiteliálních buňkách žlučovodu. CK7 rozlišuje plicní a prsní epitelové buňky, ty barví pozitivně. Epiteliální



buňky tlustého střeva a prostaty nebarví. Tato protilátka také reaguje s mnoha benigními a maligními epiteliálními lézemi, např. adenokarcinom vaječníku, prsu a plic. Přechodné buněčné karcinomy jsou pozitivní a karcinomy prostaty negativní. Tato protilátka nerozpozná meziproductové proteiny.

kontrolní tkáň: mandle (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti Cytokeratin 20***

název: Antibody cytokeratin20, clone SP 33 (výrobce DCS Innovative Diagnostic–Systeme, Hamburg)

immunogen: Rabbit IgG, Rekombinantní protein odpovídající lidskému proteinu CK20.

specifikace: CK20 o molekulové hmotnosti 46kDa, se nejčastěji používá jako marker pro buňky epiteliálního původu. CK20 je exprimován epiteliálními buňkami žaludku, tenkého a tlustého střeva, urotelu a v Merkelových buňkách kůže. Také CK20 bývá detekován na většině adenokarcinomů tlustého střeva a močového měchýře, stejně jako u mucinózních nádorů vaječníku, karcinomů žaludku, žlučového systému a nádorů pankreatu. Jen zřídka jsou pozitivita nalezené u karcinomu plic. Adenokarcinomy vaječníku a prsu, jakož i nemucinózní karcinomy vaječníků, lymfomy, nádory hlavy a krku, renální buňky, karcinomy prostaty a štítné žlázy, stejně jako malobuněčné nádory plic, melanomy a sarkomy neexprimují CK20. V kombinaci s CK7 se CK20 používá k odlišení karcinomů tlustého střeva, vaječníku, plic a prsu.

kontrolní tkáň: appendix (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti Cytokeratin PAN (Cocktail AE1/AE3)***

název: Monoclonal Antibody Cytokeratin Cocktail PAN, clone AE1/AE3, (výrobce DCS Innovative Diagnostic–Systeme, Hamburg)

immunogen: Mouse IgG1 kappa

specifikace: Anti PAN cytokeratin je koktejl dvou monoklonálních myších protilátek AE1/AE3. Je vhodný k rozlišení epiteliálního karcinomu od neepiteliálních malignit a slouží k podpoře klasifikace epiteliálních nádorů. Tato protilátka byla použita pro studium buněk obsahujících keratin v epiteliích během normálního vývoje a během vývoje epiteliálních novotvarů. Protilátka Anti PAN cytokeratin Cocktail zbarvuje cytokeratiny přítomné v normálních a abnormálních lidských tkáních a vykazuje vysokou citlivost v rozpoznání epiteliálních buněk a karcinomů.

kontrolní tkáň: mandle (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti E–Cadherin***

název: Purifikovaná protilátka Anti E–Cadherin, clone EP700Y, (výrobce DCS Innovative Diagnostic–Systeme, Hamburg)

immunogen: Rabbit IgG

specifikace: E–Cadherin L–CAM, Uvomorulin je buněčná adhezivní molekula závislá na vápníku, která je exprimována převážně na epiteliálních buňkách. E–Cadherin hraje důležitou roli v buněčném růstu při udržování integrity tkání prostřednictvím buněčných spojů. Je možnost prokázat, že ztráta exprese E–Cadherinu v nádorových buňkách je spojena se zvýšeným potenciálem těchto buněk pro invazi a metastázu.

V diagnostice se jedná o stěžejní protilátku k odlišení NST karcinomu prsu = duktálního od karcinomu lobulárního. Duktální karcinom prsu vykazuje expresi E–cadherinu, lobulární karcinom je zcela negativní.

kontrolní tkáň: mandle (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti Ki-67 (Proliferating Cell Antigen)***

název: Antibody Ki-67, clone SP 6, (výrobce DCS Innovative Diagnostic-Systeme, Hamburg)

immunogen: Rabbit IgG 1

specifikace: Ki-67 je jaderný protein, který je exprimován v proliferujících buňkách. Ki-67 je přednostně exprimován během pozdních fází G 1, S, M a G 2 buněčného cyklu, zatímco buňky ve fázi G 0 (klidové) jsou pro tuto protilátku negativní. Ačkoliv byl antigen také asociován s transkripcí RNA, je silně spojen s buněčnou proliferací, a je tedy indikován jako účinný marker při hodnocení rychlosti proliferace nádorů (např. mozku, prsu, děložního čípku, prostaty, melanomu atd.).

kontrolní tkáň: mandle, appendix (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti MART-1 (Melan-A)***

název: Antibody Melan-A (MART-1), clone A103, (výrobce DCS Innovative Diagnostic-Systeme, Hamburg)

immunogen: Mouse IgG1, Rekombinantní prokaryotický protein

specifikace: Melan-A (MART-1) je diferenciační antigen melanocytů, který je rozpoznáván autologními cytotoxickými T-lymfocyty. Je produktem genu MART-1 a je specifický pro melanocyty a melanom, dále pro buněčné linie pocházející z melanomu. Další antigeny spojené s melanomem, které jsou také rozpoznány autologními cytotoxickými T-lymfocyty, jsou MAGE-1, MAGE-3, tyrosinasa, gp100, gp75, BAGE-1 a GAGE-1. Analýza těchto molekul a jejich vzorce exprese u různých melanomů může pomoci objasnit relativní důležitost v rozvoji a diferenciaci nádoru. Melan-A je zjištěn v melanomu na 80–100 %. Analýza exprese Melan-A u jednotlivých melanomů je mimo jiné důležitá pro předpověď odpovědi na nádorovou terapii.

kontrolní tkáň: KE melanomu (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti p16***

název: Monoclonal Antibody p16, clone R 19–D, (DB Biotech, a.s., Košice)

immunogen: syntetický peptid derivovaný z C–koncové sekvence lidské p16

specifikace: Protein p16 je inhibitor CDK, který hraje důležitou regulační úlohu v buněčném cyklu. Kontrolováním přechodu mezi fázemi G1 a S fází prostřednictvím regulace proteinu Rb p16 zpomaluje buněčnou eretenci a působí proto jako supresor nádoru, což z něj činí klíčový marker u několika lidských novotvarů, s výjimkou např. melanomů, gliomů, karcinomu jícnu, pankreatických karcinomů, plicních karcinomů a močových karcinomů a některých typů leukémie. Nadměrná exprese proteinu p16 byla klinicky spojena s karcinomem děložního hrdla epitelu žlázového i dlaždicového, protože onkoprotein E7 z lidského papilomaviru HPV inaktivuje retinoblastom Rb, čímž interferuje s regulací buněčného cyklu a vede ke zvýšeným hladinám p16 v prekancerózních a nádorových tkáních. P16 se proto používá jako imunohistochemický marker v gynekologické patologii.

kontrolní tkáň: poz. děložní čípek (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti p53***

název: Antibody p53, clone D 07, (výrobce DCS Innovative Diagnostic–Systeme, Hamburg)

immunogen: Mouse IgG 2a–Rekombinantní protein kódující lidský p53

specifikace: Tumor supresorový gen p53 je exprimován v mnoha tkáních a podílí se na regulaci buněčného růstu, replikaci a programované buněčné smrti (apoptóze). Mutace v genu p53 vedou k vytvoření proteinu, který má abnormální strukturu, sníženou vazbu na DNA a prodlouženou životnost. Zvýšená nestabilita proteinu vede k akumulaci mutantního p53, která může být detekována u mnoha maligních nádorů, včetně nádorů prsu, karcinomů vaječníku, močového měchýře, tlustého střeva, plic a kůže. Je to prognostický marker řady nádorových onemocnění.

kontrolní tkáň: mandle, appendix (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti p63***

název: Antibody p63, clone SFI-6, (výrobce DCS, Hamburg)

immunogen: Mouse IgG1, Syntetický peptid odpovídající lidskému p63

specifikace: Lidský p63 je homologem p53, kóduje různé izotopy schopné buď transaktivovat report geny p53 (TA p63), nebo působit jako p53 negativní dominanta. P63 je detekován v bazálních buňkách prostatických žlázek, je však negativní u maligních nádorů prostaty. Protilátka p63 je dále klíčový marker pro dlaždicobuněčnou diferenciaci. Zároveň barvením p63 může být pozorována příčně pruhovaná svalovina.

kontrolní tkáň: mandle, placenta (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti S-100 Protein***

název: Antibody S-100 protein, clone 4C4.9, (výrobce DCS, Hamburg)

immunogen: Mouse IgG 2a

specifikace: S-100 se vyskytuje u normálních melanocytů, v Langerhansových buňkách, histiocytech, chondrocytech, tukových buňkách, kosterních a srdečních svalových buňkách, Schwannových buňkách, stejně jako v epitelálních a myoepitelálních buňkách slinných a potních žláz, dále v prsu a v gliových buňkách. Nádory odvozené z těchto buněk dobře exprimují S-100. Téměř veškeré případy maligního melanomu a případy histiocytózy jsou S-100 pozitivní. Navzdory skutečnosti, že S-100 protein je všudypřítomný, je jeho detekce velmi přínosná při identifikaci novotvarů, zejména melanomů.

kontrolní tkáň: appendix (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti Synaptophysin***

název: Antibody Synaptophysin, clone SP11, (výrobce DCS Innovative Diagnostic–Systeme, Hamburg)

immunogen: Rabbit IgG, Syntetický peptid odpovídající C–konci proteinu lidského synaptophysinu

specifikace: Synaptophysin je protein o molekulové hmotnosti 38kDa. Vyskytuje se v presynaptických váčcích všech neuronů v neuroendokrinních buňkách. Dále je lokalizován v buňkách dřeně nadledvin, hypofýzy, štítné žlázy, slinivce břišní, na sliznici GIT a v plicích. Neurony v mozku a sítnici se též barví touto protilátkou. V kombinaci s protilátkou proti chromograninu je velmi důležitým markerem v diagnostice neuroendokrinních a adrenokortikálních neoplazmat.

kontrolní tkáň: appendix (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### ***anti Thyroid Transcription Faktor (TTF–1)***

název: Antibody TTF–1, clone 8G7G3–1, (výrobce DCS Innovative Diagnostic–Systeme, Hamburg)

immunogen: Mouse IgG1 kappa

specifikace: Anti TTF–1 se používá při diferenciální diagnostice primárních adenokarcinomů plic, metastazujících prsních karcinomů, maligních mezotheliomů, karcinomů štítné žlázy. Dále se anti TTF–1 používá k rozlišení malobuněčného karcinomu plic od lymfoidních infiltrátů.

kontrolní tkáň: plíce (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

## **5. Patologie prsu**

Maligní nádory prsu představují v ČR nejčastější zhoubné nádory u žen, jejich incidence stále stoupá, způsobují každé páté úmrtí žen na zhoubný nádor. Výskyt karcinomu mléčné žlázy je v ženské populaci rok od roku vyšší. V roce 2015 bylo více než 7000 nových případů rakoviny prsu, což je 8,3% všech zhoubných nádorů. 10% žen bylo mladších 45 let. (Dušek L., Epidemiologie zhoubných nádorů v ČR, 2005)

Z hlediska anatomického a dle WHO klasifikace lze benigní a maligní nádory prsu rozdělit na:

### **Kožní nádory**

Výrazně se morfologicky a diagnosticky neodlišují od kožních nádorů ostatních částí lidského těla.

### **Nádory bradavky a dvorce**

V této oblasti se charakter epitelu liší od ostatní kůže, v místech bradavky a dvorce se nachází epitel vrstevnatý dlaždicový nerohovějící, tedy epitel od okolní kůže méně odolný a více náchylný k výskytu patologických změn. Vznikají zde traumata, eroze, záněty, nádory.

Z benigních nádorů je uveden většinou adenom např. syringomatozní adenom lokálně rostoucí, tvořený nepravidelnými žlazovými formacemi s diferenciací k potním žlázám.

Speciální malignitou je „Pagetova nemoc“, tento nádor bývá povětšinou spojen s invazivním NST karcinomem = duktálním, který vychází z velkých vývodů mléčné žlázy (Lakhani R.S., WHO klasifikace, 2012).

## **Mezenchymové a neuroektodermové nádory z měkké tkáně prsu**

K nim řadíme hyperplázie, např. pseudoangiomatozní stromální hyperplázii, kdy jde o benigní lézi. Další ze vzácných je fibromatóza prsu, která lokálně agresivně roste, ale nemá metastatický potenciál. A další vzácný nádor je zánětlivý myofibroblastový tumor, zde je obtížné diferencovat, zda se jedná o reaktivní změnu nebo už pravý nádor, při recidivách tohoto nádoru vzniká angiomatóza (Lakhani R.S., WHO klasifikace, 2012).

### **Benigní nádory**

Do oblasti benigních nádorů patří např. lipomy, angiolipomy, fibromy, neurofibromy, leiomyomy, hemangiomy, schwannomy.

### **Maligní nádory**

Do oblasti maligních nádorů patří např. maligní lymfomy, liposarkomy, angiosarkomy, leiomyosarkomy (Lakhani R.S., WHO klasifikace, 2012).

## **5.1. Nenádorové léze prsu**

### **Reaktivní změny**

Mezi reaktivní změny patří např. tuková a hemoragická nekróza, infarkt prsu při intenzivní hyperplázii žlázy v těhotenství, galaktokéla je cysta s tekutinou podobnou mléku, duktální ektázie a diabetická mastopatie (Lakhani R.S., WHO klasifikace, 2012).

### **Záněty**

Mezi záněty patří např. puerperální mastitida, plazmocytární mastitida, granulomatozní lobulární mastitida či mastitida vyvolaná plísněmi a parazity.

Fibrózní a fibroepitelové nenádorové léze – fibrózní a fibrocystická mastopatie (Lakhani R.S., WHO klasifikace, 2012).



## **Epitelové nenádorové léze**

Epitelové nenádorové léze jsou např. cysty, epiteliózy např. juvenilní papilomatóza. K dalším lobulárním hyperpláziím řadíme **adenózy** zmnožení lobulů s hyperplázií stromální složky a myoepitelové vrstvy. Druhy adenóz jsou floridní, sklerozující, mikroglandulární a duktální (Lakhani R.S., WHO klasifikace, 2012).

## **Benigní epitelové nádory**

Benigní epitelové nádory jsou např. intraduktální a intracystický papilom, tubulární adenom, laktující adenom, apokrinní adenom, pleomorfní adenom a duktální adenom (Lakhani R.S., WHO klasifikace, 2012).

## **5.2. Nádorové léze prsu**

### **Intraduktální proliferující léze a lobulární neoplazie**

Velmi častý progresivní potenciál směrem k invazivním a metastazujícím karcinomům měčné žlázy. Diagnostika se mnohem více zpřesňuje. Řadíme sem atypickou hyperplázií, duktální karcinom in situ a lobulární karcinom in situ (Lakhani R.S., WHO klasifikace, 2012).

### **Maligní epitelové nádory**

Dva nejčastější typy invazivní NST karcinom = duktální a lobulární invazivní karcinom, další invazivní karcinomy jsou tubulární, papilární, mikropapilární, medulární, metaplastický, malobuněčný, cystický, apokrinní, kribriformní a onkocytární (Lakhani R.S., WHO klasifikace, 2012).

## **Myoepitelové léze**

Myoepitelové léze jsou tvořeny bazálními buňkami s aktinem, mají kontrakční schopnosti, tzv. myoepiteliemi. Z těchto lézí vznikají hyperplázie smíšené nebo čistě myoepiteliové novotvary. Např. adenomyoepitelová hyperplázie, adenomyoepiteliom, myoepiteliom, myoepitelový karcinom (Lakhani R.S.,WHO klasifikace,2012).

## **Mezenchymové nádory**

Mezenchymové nádory nejsou až tak časté uvnitř mléčné žlázy. Z benigních nádorů je to např. fibrózní tumor, myofibroblastom, leiomyom, hamartom, myxom, lipom a hemangiom. Nejčastějšími maligními mezenchymovými nádory jsou sarkomy, leiomyosarkomy, liposarkomy, fibrosarkomy. Dále lymfomy (Lakhani R.S.,WHO klasifikace,2012).

## **Smíšené nádory**

Smíšené nádory oproti mezenchymových jsou velmi časté. Nalézají se u mladých žen. Jedná se o komplexní fibroadenomy, uvádějí se dva typy perikanalikulární fibroadenom a intrakanalikulární fibroadenom. Objevují se epitelové sekreční změny, které vedou k rychlému růstu nádoru, jako např. při graviditě nebo laktaci a svádí k falešně pozitivní diagnostice a podezření na karcinom. Dalším typem smíšeného nádoru je „phyllodes“ nádor. Má potenciál pro recidivy a metastazování. Zde stroma může mít až maligní charakter a je nutné odlišit od sarkomu. Většina phyllodes nádorů se chová benigně, jen malá skupina těchto nádorů malignizuje (Lakhani R.S.,WHO klasifikace,2012).

## **Léze mužského prsu**

Mezi patologické změny mužského prsu patří **gynekomastie**, projevující se proliferací vývodů v souvislosti se zvýšenou hladinou estrogenů při hormonální terapii nebo jaterní cirhóze. Typické bývá chybění lobulů. Velmi vzácný a raritní je **karcinom prsní žlázy**. U mužské populace ve srovnání s ženskou populací je 100krát menší pravděpodobnost jeho výskytu (Lakhani R.S.,WHO klasifikace,2012).

## 6. Vyšetření karcinomu prsu a sentinelové uzliny

Tradičním terapeutickým postupem bylo ve 20. století odoperování celého prsu a kompletní disekce axilárních lymfatických uzlin. Vedlo k tomu přesvědčení o nutnosti radikální lokoregionální terapie (Pecha V., Biopsie sentinelové uzliny, 2011).

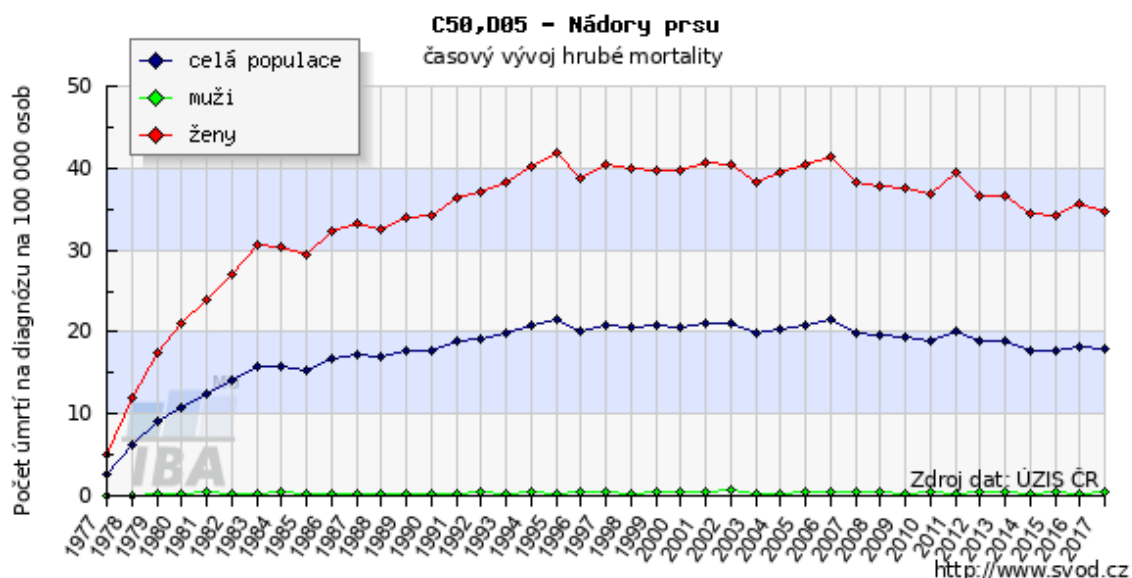
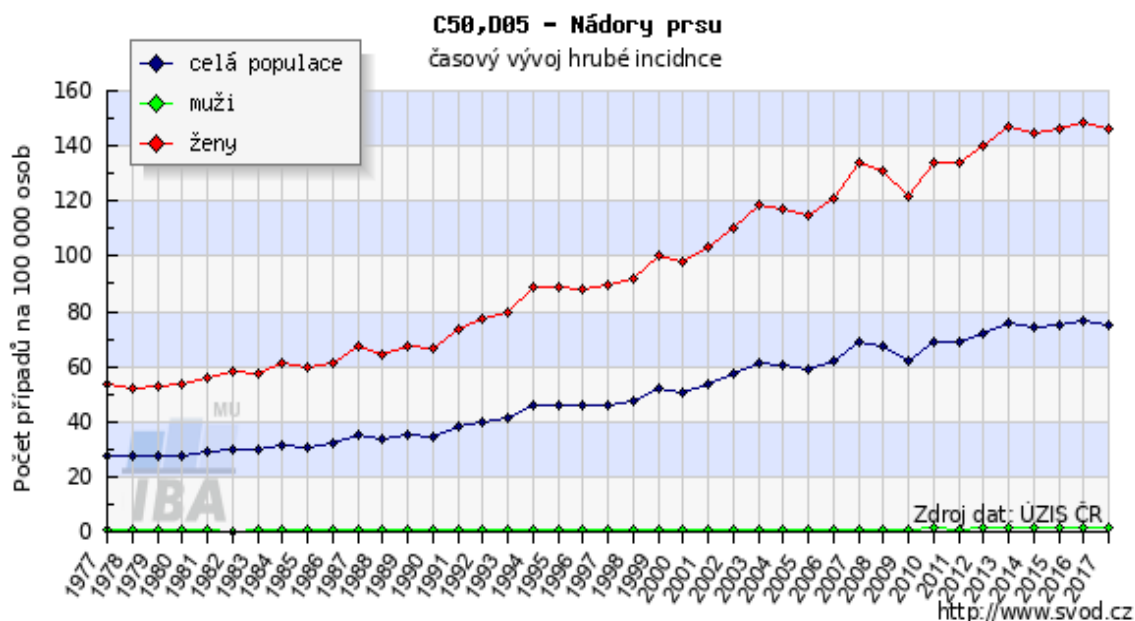
V současnosti se přístup k léčbě diametrálně změnil, přesto, že není pochybnosti o primární systémové povaze prsních malignit. Ablace jsou ve většině případů nahrazeny šetrnějšími konzervativními výkony, parciálními resekce s následnou radioterapií (Pecha V., Biopsie sentinelové uzliny, 2011).

Parciální resekáty prsu jsou podle zvyklostí konkrétního pracoviště značeny operátorem např. stehy dle ciferníku hodin. Vzhledem k doporučení standardu Společnosti českých patologů je nezbytné parciální resekáty prsu na resekčních plochách nabarvit např. tuší. V resekátech vždy popisujeme vzdálenost tumoru od jednotlivých resekčních linií.

V chirurgii axilární lymfatické uzliny je velkým trendem peroperační vyšetření sentinelové uzliny (sentinel lymf node biopsy SLNB). Důležitým prognostickým faktorem je stav mízních lymfatických uzlin a zejména té sentinelové. V axilární oblasti je sentinelová uzlina tzv. strážcová, je to uzlina, která přijímá jako první lymfatickou drenáž primárního nádoru a značí místo šíření nádoru. Koncepce sentinelové lymfatické uzliny vychází z předpokladu, že primární nádor metastazuje lymfatickými cestami postupně a podle určitého řádu. Do sentinelové uzliny přichází lymfa přímo z primárního nádoru a je tudíž první, do které se dostávají nádorové buňky. Následně metastázy jdou až do dalších spádových uzlin. Výsledek histologického vyšetření pak rozhodne, zda je nebo není nutné provést lymfadenektomii spádových uzlin a v případě pozitivního nálezu je indikována následná disekce přítomných uzlin. Významně toto rozhoduje o dalším postupu v systémové léčbě novotvaru prsu (Pecha V., Biopsie sentinelové uzliny, 2011).

## 7. Incidence a mortalita novotvaru prsu

Výskyt a úmrtnost novotvaru prsu jsou údaje ke kterým má lékař, pacient a veřejnost v ČR přístup díky serveru o datech z Národního onkologického registru ČR. Tyto velmi cenné informace byly tedy zpřístupněny širokému spektru zájemců. Epidemiologické analýzy jsou přístupné podle jednotlivých druhů nádorů.



Časový vývoj hrubé incidence a mortality novotvaru prsu u žen a mužů.

## **8. Postup imunohistochemického barvení IHC**

### **Fixace tkáně**

Odebraný materiál fixujeme vzhledem k zachování morfologických struktur, antigenicity a pro minimalizaci vzniku artefaktů. Tkáň však nesmí být přefixována. Fixace se provádí buď zmražením tkáně nebo použitím fixačních roztoků, nejčastěji užívaný je neutrální vodný roztok formaldehydu nebo Bouinova tekutina (formaldehyd s kyselinou pikrovou a kyselinou octovou). Vzhledem k rychlému vzniku artefaktů se snažíme vyhnout alkoholovým a acetonovým fixačním tekutinám (Litzman J., *Základy vyšetření v klinické imunologii*, 2011).

### **Zalítí tkáně**

Provádí se klasicky zalítí tkáně do parafínu–paraplastu. Nutná je správná orientace tkáně a přesné rychlé zalítí parafínem o teplotě 56°C. Parafínový blok necháme chladnout na chladicí desce (Litzman J., *Základy vyšetření v klinické imunologii*, 2011).

### **Krájení a napínání tkáně**

Krájení se provádí s pomocí sáňkového mikrotomu, na minimální tloušťku řezu 6 µm (u většiny tkání je při této tloušťce zachycena přibližně jedna vrstva buněk). Napínání řezů je prováděno na hladině destilované vody při teplotě 52°C, natahování na speciální adhezivní, pozitivně nabitá skla, která tkáň udrží i za varu ve vodní lázni při odmaskování antigenů (Litzman J., *Základy vyšetření v klinické imunologii*, 2011).

### **Odmaskování antigenů**

Za použití správného fixačního roztoku je morfologická struktura tkáně plně zachována. Čím lépe je zachována, tím bývá prokazování původních antigenů obtížnější. Nepříznivé vlivy fixace lze minimalizovat, tedy ošetřit tkáňové řezy před dalším zpracováním, aby lépe odmaskovaly a ukázaly antigeny primární protilátce. Děje se tak s pomocí proteáz (např. pepsin, trypsin), nebo povařením preparátů v citrátovém pufru

a EDTH9 pufru za použití mikrovlnného záření nebo vodní lázně. (max. 20 min.) (Litzman J., Základy vyšetření v klinické imunologii, 2011).

### **Blokace peroxidázy**

Vzhledem ke skutečnosti, že protilátky jsou značeny enzymy, které se přirozeně vyskytují ve zpracovávané tkáni a mohly by do značné míry ovlivnit výsledek IHC vyšetření, je nutné tyto enzymy blokovat. V případě použití protilátek značených peroxidázou použijeme jako substrát pro blokaci 3% roztok peroxidu vodíku v destilované vodě (Litzman J., Základy vyšetření v klinické imunologii, 2011).

### **Vazba protilátek a detekčního systému**

Reakci antigenu s primární protilátkou provedeme nakapáním vlastní monoklonální primární protilátky na řez ve vlhké komůrce, necháme inkubovat podle datasheetu. Po oplachu v TBS pufru (pH 7,4) následuje podle metodiky reakce se sekundární protilátkou, opět inkubace ve vlhké komůrce. V místě, kde došlo k navázání sekundární protilátky na primární protilátku vznikne chromogen, který je nutné dále zvýraznit (Litzman J., Základy vyšetření v klinické imunologii, 2011).

### **Zvýraznění chromogenu**

Samotná vazba protilátek s antigenem se na řezech barevně neprojeví (řezy jsou bezbarvé), vznik chromogenu je nutné dále zvýraznit, abychom ho mohli pozorovat ve světelném mikroskopu. Jeli používaný detekční komplex značen peroxidázou (metoda PAP, SABC nebo ABC), použijeme jako chromogen dvousložkový kit DAB. Peroxidáza enzymaticky mění DAB na hnědý precipitát, který je nerozpustný v alkoholu. Vždy je nutné připravovat čerstvý pracovní roztok DAB, nebo zpracovat nejlépe do 4 hod. od smíchání obou složek kitu (pufru + chromogenu). Pracovní roztok DAB a necháme ve vlhké komůrce inkubovat (Litzman J., Základy vyšetření v klinické imunologii, 2011).

## **Dobarvení pozadí**

U IHC technik je nutné také dobarvit pozadí preparátu, vzhledem k lepší orientaci při pozorování v mikroskopu. Nejvíce se využívá dobarvení jader pomocí Mayerova hematoxylinu. Po obarvení vypereme přebytečné barvivo destilovanou vodou a necháme jádra modrat v teplé vodě (Litzman J., Základy vyšetření v klinické imunologii, 2011).

## **Odvodnění a montování preparátů**

Po vypírání v teplé vodě následuje odvodnění preparátů vzestupnou řadou alkoholů (70%, 80%, 96%) a převedení preparátů do xylenu přes roztok alkohol-xylenu. Poslední fáze je montování, kdy zavíráme preparát krycím sklem s pomocí synteticky vyráběných pryskyřic na bázi kanadského balzámu. Na řez kápneme kapku např. Pertexu a zakryjeme krycím sklem. Necháme zaschnout. Následuje prohlížení preparátu pod optickým mikroskopem (Litzman J., Základy vyšetření v klinické imunologii, 2011).

### **Barvicí protokol pro manuální imunohistochemické techniky**

1. Odparafinované a zavodněné řezy vložit do destilované vody..... 1 min.
2. Vložit řezy do pufru pro demaskování antigenu
3. Inkubovat preparáty v předepsaném pufru ve vodní lázni při 95 °C ..... 20 min.
4. Nechat preparáty s řezy chladnout v pufru ..... 20 min.
5. Oplachovat v destilované vodě ..... 3 x 2 min.
6. Inkubovat v roztoku 3% peroxidu vodíku ..... 5–10 min.
7. Oplachovat v promývacím TBS pufru ..... 3×2 min.
8. Otřít sklo kolem řezu, udělat imunopenem kruh a nakapat příslušnou protilátku
9. Inkubovat s protilátkou ve vlhké komůrce..... 30 min.
10. Oplachovat v promývacím TBS pufru ..... 3x2 min.
11. Otřít sklo kolem řezu a nakapat N Histofine – sekundární protilátku
12. Inkubovat s N Histofinem ve vlhké komůrce ..... 30 min.
13. Oplachovat v promývacím TBS pufru ..... 3x2 min.
14. Otřít sklo kolem řezu a nakapat pracovní roztok DAB
15. Inkubovat s DAB pracovním roztokem ve vlhké komůrce ..... 5 min.
16. Oplachovat v destilované vodě ..... 3×2 min.
17. Skla s řezy ponořit do roztoku Mayerova haematoxylinu ..... 2 min.
18. Oplachovat v teplé pramenité vodě do zmodrání jader ..... 1–2 min.
19. Skla s řezy vložit do roztoků 70% – 96% alkoholu ..... 5 min.
20. Skla s řezy vložit do roztoku s alkohol – xylenem ..... 5 min.
21. Skla s řezy vložit do roztoku xylenu ..... 5 min.
22. Zamontovat – na preparát kápnout kapku montovacího média a přikrýt krycím sklem. (PPT, patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.)



## **9. Praktická část**

Na oddělení patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s. je k diagnostice používáno 15 primárních protilátek pro manuální IHC techniku. Volba primární protilátky je rozhodující pro správné stanovení diagnózy, která také závisí na správném IHC barvení. U všech protilátek je testována jejich spolehlivost a senzitivita. Je nutné také dodržet doporučenou metodu odmaskování antigenu. Všechny primární protilátky, které jsou používány na oddělení patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s., jsou vyvinuty pro reakci s lidským antigenem. Tyto a další informace jsou uvedeny v datových listech k jednotlivým protilátkám.

### **Cíl práce**

Při variabilitě tumorů a jejich schopnosti mutování jsou v patologii v dnešní době imunohistochemické metody na prvním místě v přesném určení původu nádoru a také odhalení mikrometastáz, které jsou při běžném histopatologickém barvení neviditelné. Cílem bakalářské práce je odhalení původu nádoru, stejně tak jako odhalení zmiňovaných mikrometastáz karcinomu mléčné žlázy se zaměřením na poukázání důležitosti imunohistochemického vyšetření k detekci nádorových buněk v sentinelových uzlinách pro rychlou diagnostiku, která zajistí pacientům včasnou onkologickou léčbu a lepší prognózu. Dále odhalení a grafické vyhodnocení nádorů kůže, gynekologických nádorů, nádorů prostaty a trávicího traktu.

V praktické části jsou uvedena a statisticky zpracována data imunohistochemických vyšetření. Množství odebraných vzorků, jednotlivé protilátky a jednotlivá nádorová onemocnění od zavedení metody 10/2017 do 12/2019. Data byla získána na pracovišti patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.

Metoda imunohistochemie zde byla zavedena v druhé polovině roku 2017. Od té doby bylo imunohistochemické vyšetření provedeno celkem u 240 pacientů.

Z celkového počtu zpracovaných biopsií můžeme rozdělit imunohistochemická vyšetření na benigní a maligní varianty nádorů prsu u žen i u muže, benigní a maligní varianty kožních lézí (z nich je nejčastěji zastoupen maligní melanom), benigní a maligní léze gynekologického traktu, maligní nádory zažívacího traktu a maligní nádory prostaty.

### **Maligní a benigní nádory prsu byly celkem vyšetřeny u 67 pacientů**

(imunohistochemické vyšetření a použité protilátky pro tuto lokalizaci: CK7, E-CAD,  $\alpha$ -SMA)

Pohlaví	Počet
Muž	1
Žena	66
Celkem	67

Tabulka č.1: Počet pacientů s nádorem prsu podle pohlaví (zdroj vlastní)

### ***Maligní léze***

Duktální invazivní karcinom – NST byl prokázán u 41 pacientů, z toho u 40 žen a 1 muže (podrobněji popsán v části kazuistika)

Mikrometastáza NST v sentinelové uzlině byla prokázána u 6 pacientek

Lobulární invazivní karcinom byl prokázán u 6 pacientek

DCIS byl prokázán u 5 pacientek

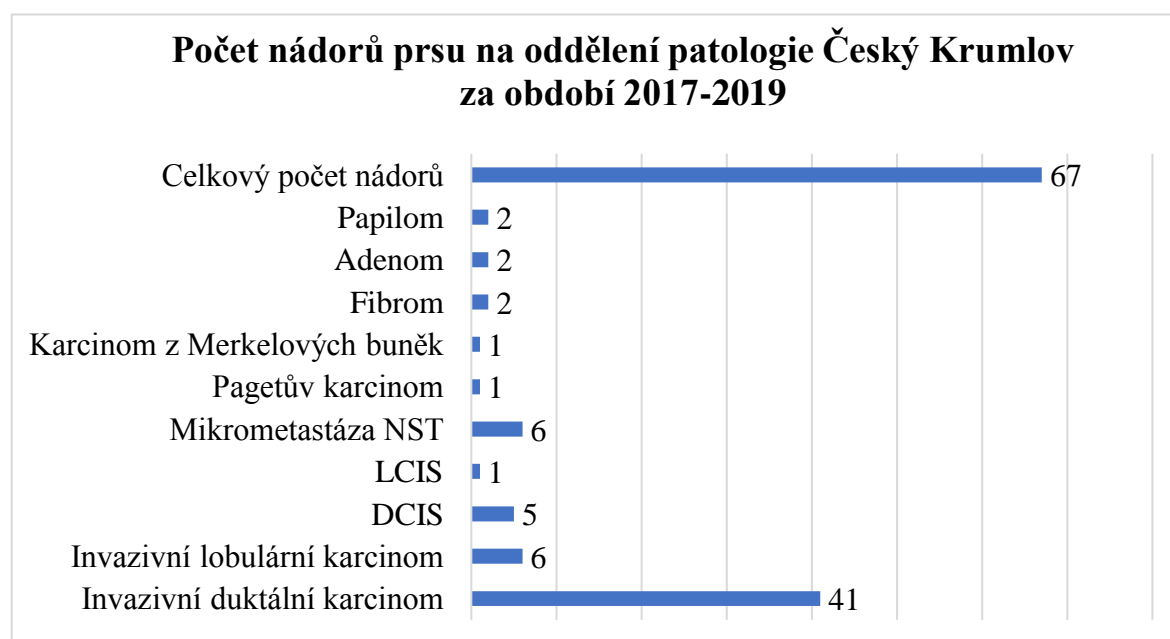
LCIS byl prokázán u 1 pacientky

Pagetův karcinom bradavky byl prokázán u 1 pacientky

Kožní karcinom z Merkelových buněk u 1 pacientky (podrobněji popsán v části kazuistika).

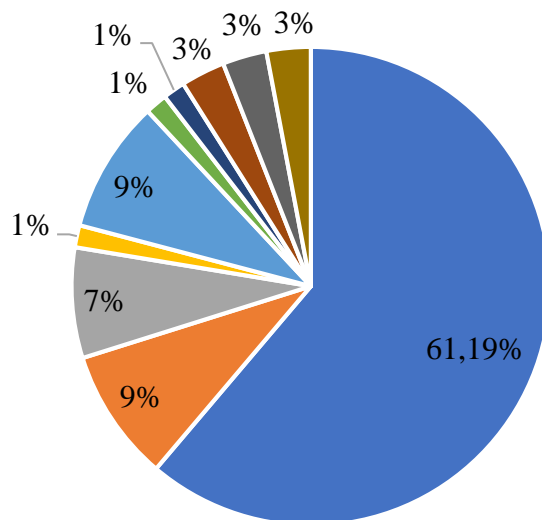
### ***Benigní léze***

Tubulární adenom u 2 pacientek, duktální papilom u 2 pacientek, fibrom u 2 pacientek.



Graf č.1: Počet nádorů prsu na oddělení patologie Český Krumlov (zdroj vlastní)

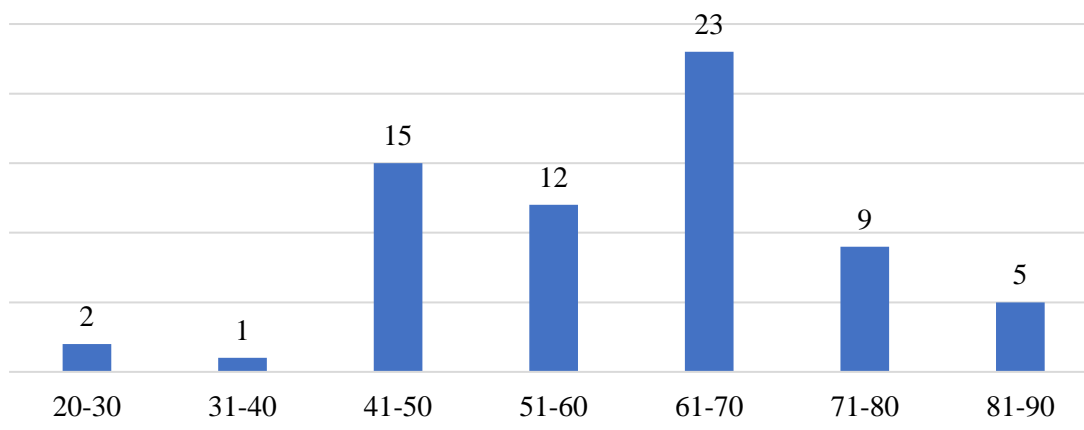
### Počet nádorů prsu v % na oddělení patologie Český Krumlov



- Invasivní duktální karcinom
- DCIS
- Mikrometastáza NST
- Karcinom z Merkelových buněk
- Adenom
- Invasivní lobulární karcinom
- LCIS
- Pagetův karcinom
- Fibrom
- Papilom

Graf č.2: Nádory prsu v % na oddělení patologie Český Krumlov (zdroj vlastní)

### Věkové rozložení u nádorů prsu



Grafč.3: Věkové rozložení u nádorů prsu (zdroj vlastní)

## Kožní maligní a benigní léze byly celkem vyšetřeny u 52 pacientů

(imunohistochemické vyšetření a použité protilátky pro tuto lokalizaci: Ki67, Mart-1 melan A, S100, p53, CD45, CK20)

Pohlaví	Počet
Muž	19
Žena	33
Celkem	52

Tabulka č.2: Počet pacientů s nádorem kůže podle pohlaví (zdroj vlastní)

### *Maligní léze*

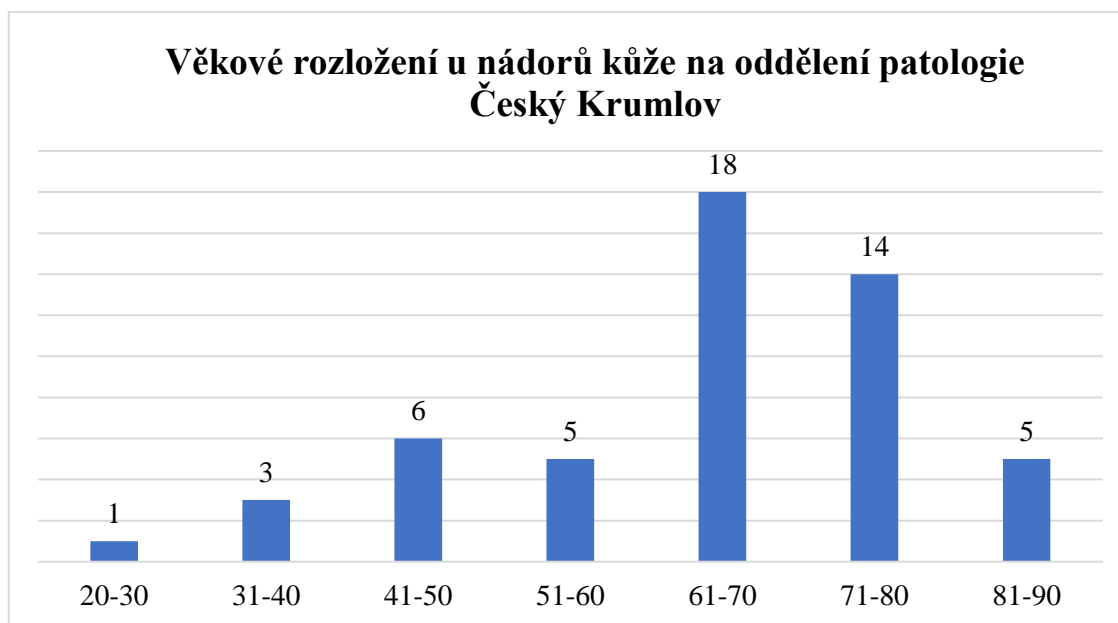
Maligní melanom prokázán u 31 pacientů, Lentigo maligna u 1 pacienta, Spinocelulární karcinom prokázán u 3 pacientů.

### *Benigní léze*

Lichen sclerosus u 7 pacientů, Fibroxantom u 1 pacienta, Clarkův névus u 3 pacientů, Neurofibrom u 3 pacientů, Hemangiom u 1 pacienta, Névus Spitzové u 2 pacientů.



Graf č.4: Počet imunohistochemicky vyšetřených kožních lézí (zdroj vlastní)



Graf č.5: Věkové rozložení u nádorů kůže (zdroj vlastní)

**Maligní a benigní nádory gynekologického traktu celkem vyšetřeny  
u 87 pacientek**

(imunohistochemické vyšetření a použité protilátky pro tuto lokalizaci: Ki67, p16, p53, CKPAN, S100)

***Maligní léze***

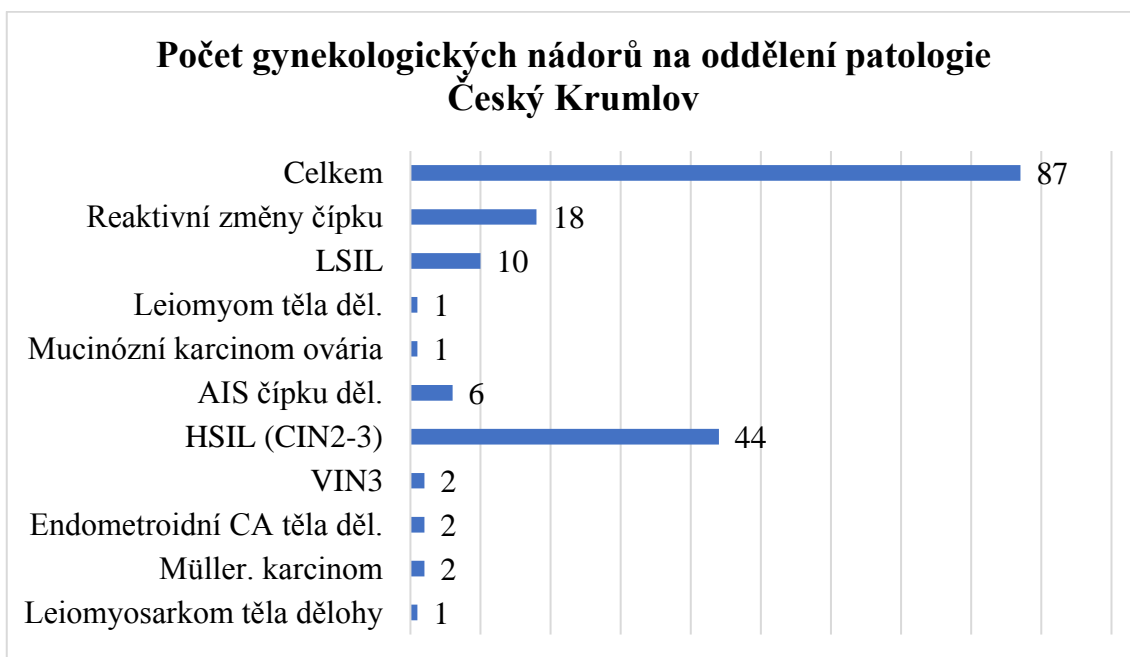
VIN 3 u 2 pacientek, CIN 2–3, CIN 3 a HSIL u 44 pacientek

Mucinózní adenokarcinom ovária s mikroinvazí u 1 pacientky, endometroidní karcinom u 2 pacientek

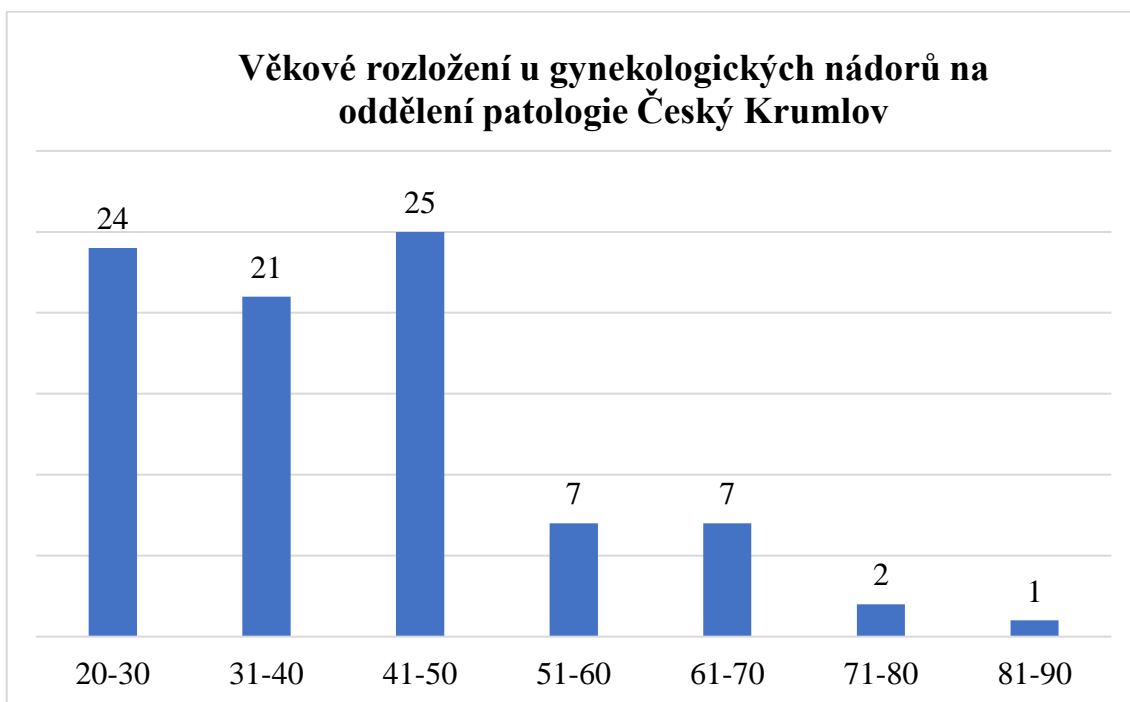
Leiomyosarkom u 1 pacientky, AIS cervixu dělohy u 6 pacientek, karcinom z Müllerových vývodů u 2 pacientek.

***Benigní léze***

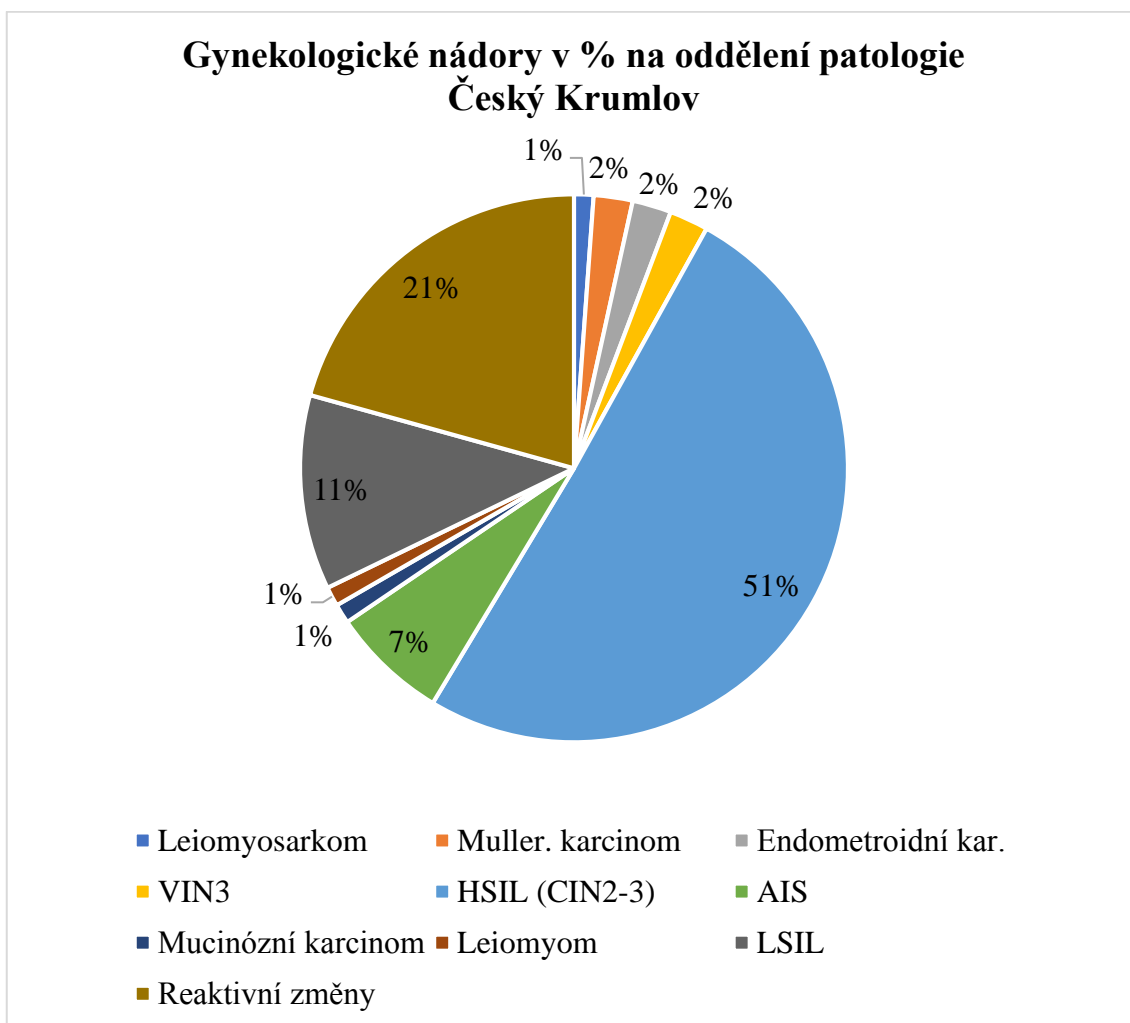
Reaktivní změny u 18 pacientek, L-SIL u 10 pacientek, leiomyom u 1 pacientky



Graf č.6: Počet gynekologických nádorů na oddělení patologie ČK (zdroj vlastní)



Graf č.7: Věkové rozložení u gynekologických nádorů (zdroj vlastní)



Graf č.8: Gynekologické nádory v % na oddělení patologie ČK (zdroj vlastní)

### **Nádory zažívacího traktu celkem vyšetřeny u 10 pacientů**

(imunohistochemické vyšetření a použité protilátky pro tuto lokalizaci: CK7, CK20,  $\alpha$ SMA, Ki67, chromogranin A, synaptofyzin)

#### ***Maligní***

Metastáza adenokarcinomu tlustého střeva do krční LU a do jater u 1 pacientky,

karcinom žlučníku u 2 pacientek, karcinom žaludku u 1 pacienta, neuroendokrinní karcinom střeva u 6 pacientů.



**Nádory prostaty celkem vyšetřeny u 24 pacientů**

(imunohistochemické vyšetření a použité protilátky pro tuto lokalizaci: p63)

***Maligní***

Acinární adenokarcinom prostaty prokázán u 24 pacientů.

## 10. Kazuistika

### 10.1. Invazivní NST karcinom prsu u muže

64 - letý muž, bez významné rodinné anamnézy, v osobní anamnéze bez vážnějších onemocnění, pozoroval po dobu cca 2 let rezistenci v levém prsu, která byla verifikována ultrasonografií. Vzhledem ke zvětšení rezistence a bolestivosti byl pacient opětovně přešetřen a byla mu provedena punkční biopsie.

Z punkční biopsie léze levého prsu byl popsán invazivní NST karcinom. Mammárním týmem bylo indikováno operační řešení (09/2017).

Makroskopicky: do laboratoře byl dodán preparát levého prsu velikosti 11 x 7 x 3 cm, s mírně vtaženou bradavkou. V hloubce preparátu 1 cm pod bradavkou byl zastižen tuhý bělavý tumor velikosti 1,4 x 0,8 x 1,2 cm, který byl vzdálený od kožního krytu 1 cm, od resekční spodiny 1,5 cm a od dolního resekčního okraje 3 cm. V blízkosti tumoru byl patrný prokrváčený punkční kanál. Dále byla dodána béžová lymfatická uzlina velikosti 1,6 x 1 x 0,7 cm, která se zpracovala kompletně dle standardu jako sentinelová uzlina. Spolu s levým prsem byla také dodána tuková tkáň velikosti 2 x 1 x 0,3 cm s jednou lymfatickou uzlinou velikosti 1,5 x 1 x 0,7 cm.

Mikroskopicky: preparát levého prsu se strukturami invazivního duktálního karcinomu = NST; (M-8500/32), grade 2 totožný s Nottinghamskou klasifikací – 6 bodů: žlázové formace 3 body, pleomorfie jader 2 body, mitózová aktivita 1 bod), velikosti 1,4 x 0,8 x 1,2 cm, bez jednoznačných známek angioinvasze, nedosahujícího do resekčních linií preparátu, vzdálenosti uvedeny v makropopisu, neprorůstajícího do bradavky. Lymfatické uzliny s reaktivní histiocytózou dilatovaných splavů, bez metastatických struktur.

Imunohistochemické vyšetření provedeno ze tří parafinových bloků:

E-cadherin: pozitivní v nádorových strukturách

CK7 k verifikaci metastatických struktur: negativní

Po operaci pacient bolesti prsu či jiné obtíže nepozoroval, vpravo prs bez nálezu, vlevo klidná jizva po mastektomii, bez retence, jizva v levé axile s fibrózní reakcí, palpačně citlivá.

UZV a RTG každých 7 měsíců při potížích i dříve.

Dnes se již u pacienta neprokazují známky malignity, játra jsou nezvětšená, bez ložisek.

(LIS, Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

### **10.2. Karcinom z Merkelových buněk**

88 - letá pacientka odeslána 05/2019 k excizi kožní léze na pravém prsu pro rychlý růst, dle pacientky afekce vznikla před měsícem, doprovodný efekt otok pravé horní končetiny a lymfadenopatie pravé axily.

Makroskopicky: do laboratoře byla odeslána kožní excize o velikosti 2,5 x 1,3 x 0,2 cm, na povrchu s vystouplou bělavou afekcí 1 x 1 x 0,2 cm, vzdálenou 0,1 cm od bližšího okraje a 0,5 cm od bližšího cípu.

Mikroskopicky: kožní excize se zvředovatělým povrchem. Korium a částečně i podkožní tuková tkáň infiltrovány maligními nádorovými strukturami, které vykazují známky angioinvaze. Nádorové struktury jsou fokálně nekrotické, tvořené elementy s nepatrným množstvím cytoplazmy a pleomorfními jádry se zrnitým chromatinem. Mitózová aktivita je velmi vysoká až 13 mitóz/1 zorné pole/zvětšení 400x. Speciální barvení alciánovou modří neprokazuje hlenotvorbu v nádorových elementech, metodou PAS neprokázány PAS pozitivní substance. Maligní nádorové struktury nedosahují k laterálním okrajům, cípům ani spodině kožní excize.

Imunohistochemické vyšetření provedeno ze dvou parafinových bloků:

Index proliferační aktivity Ki67: proliferační aktivita v 70% jader nádorových elementů  
CKAE1/3, CK20, chromogranin A, synaptophysin: pozitivní v nádorových strukturách  
CK7, TTF-1, melan A, S 100: negativní v nádorových strukturách

Závěr: Karcinom z Merkelových buněk (M-8247/3), který nedosahuje k laterálním okrajům, cípům a spodně kožní excize.

Jedná se o vysoce agresivní neuroendokrinní kožní tumor, který velmi rychle roste a často recidivuje, záhy metastazuje do regionálních lymfatických uzlin a zakládá vzdálené metastázy hematogenní i lymfogenní cestou.

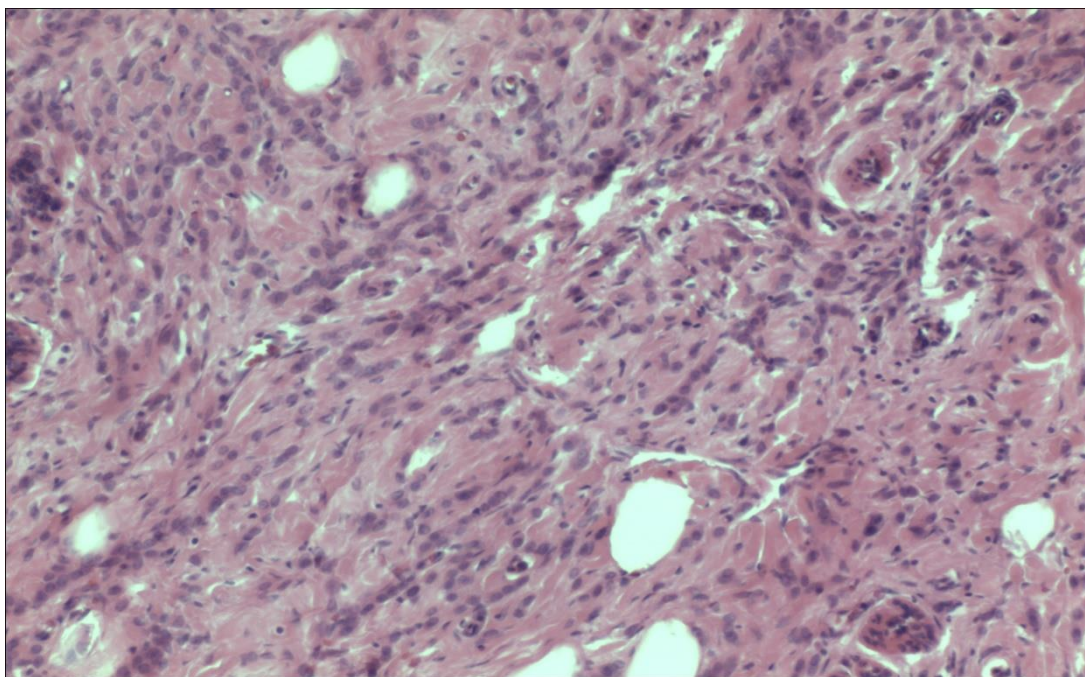
Vzhledem k dg. doplněno u pacientky v 07/2019 celotělové CT vyšetření, které prokázalo kulovité ložisko charakteru metastázy v mozku frontobazálně vlevo, infiltrované lymfatické uzliny v pravé axile, v dutině břišní a pravém třísele, metastázy v játrech, jedno metastatické ložisko v pankreatu.

U pacientky vzhledem ke generalizaci nádoru indikována pouze symptomatická terapie.

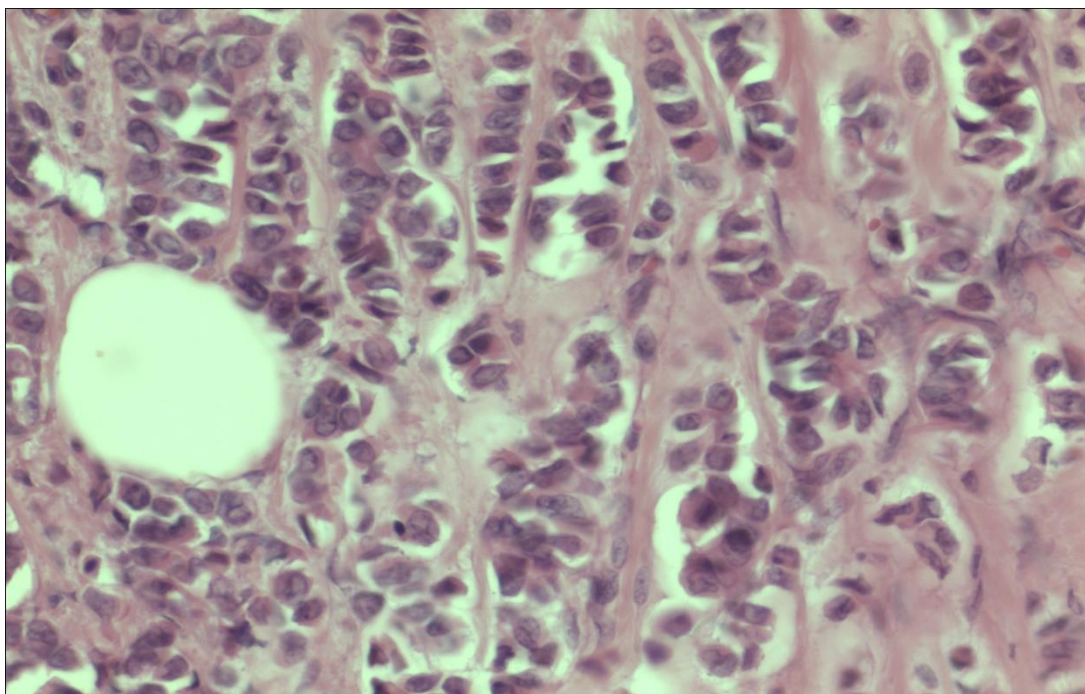
Pacientka 5 měsíců od diagnostiky novotvaru zemřela.

(LIS, Nemocnice Český Krumlov, a.s.)

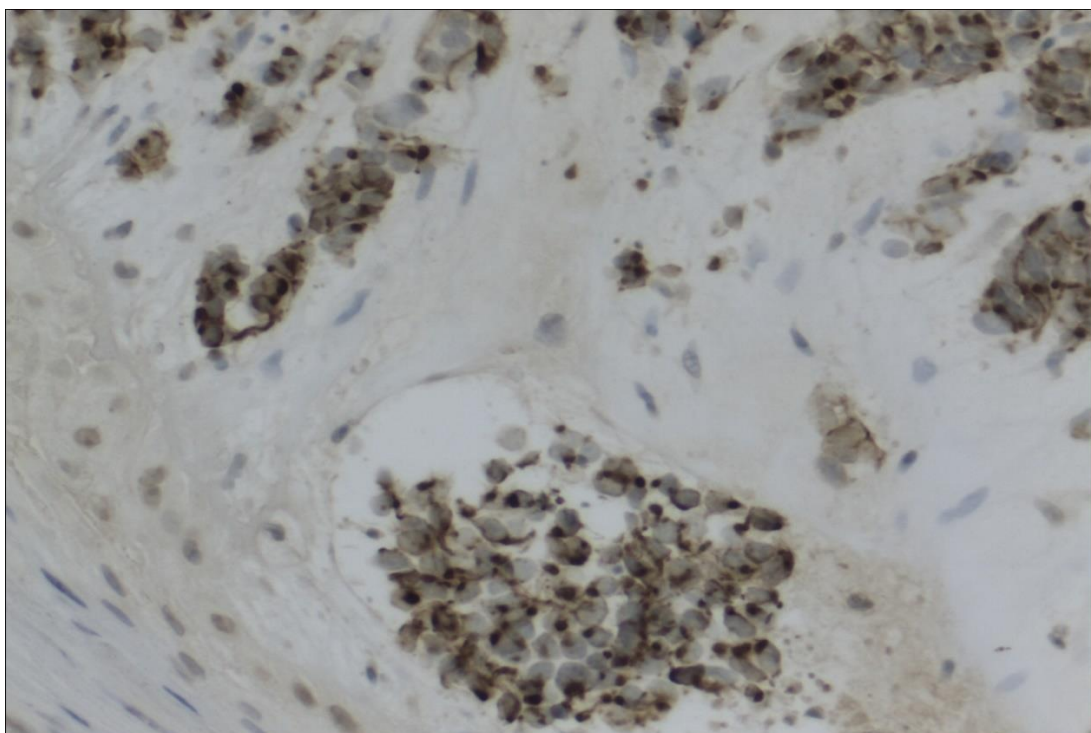
## 11. Fotodokumentace



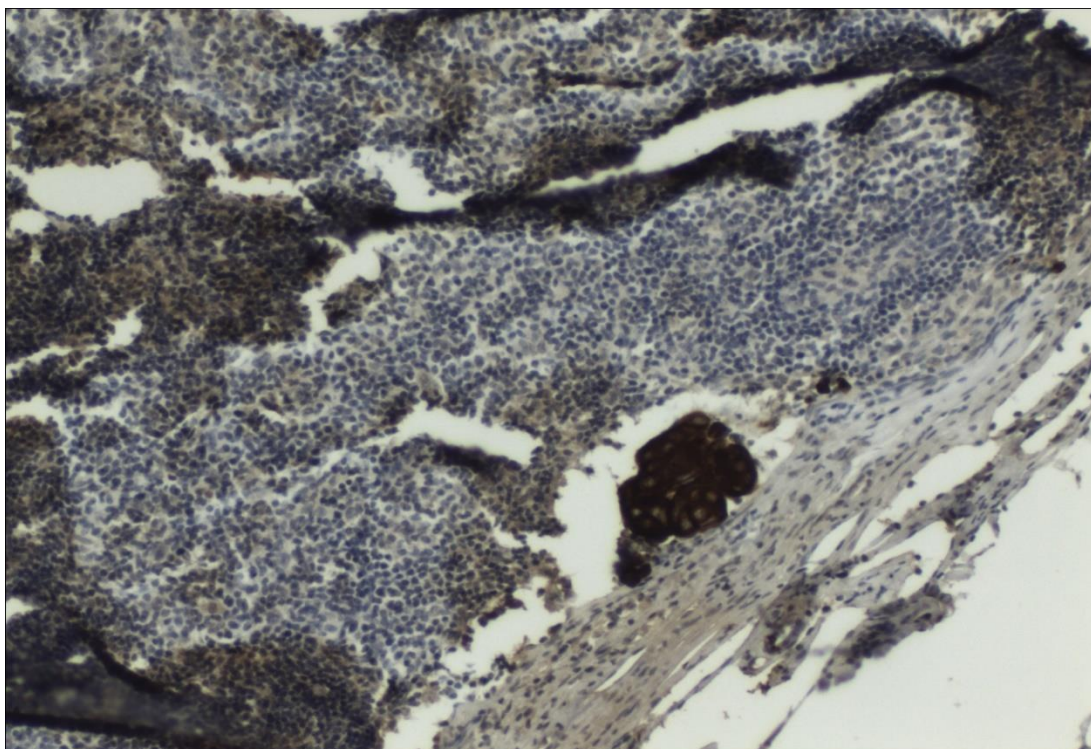
Obrázek č.1: Duktální karcinom (zdroj vlastní, zvětšení 200x)



Obrázek č.2: Lobulární karcinom (zdroj vlastní, zvětšení 400x)



Obrázek č.3: Merkelův Ca, tečkovitá pozitivita CK20 (zdroj vlastní, zvětšení 400x)



Obrázek č.4: Mikrometastáza IDC v sentinelové uzlině (zdroj vlastní, zvětšení 200x)

## 12. Diskuze

Cílem bakalářské práce bylo odhalení původu nádorů a mikrometastáz tumoru mléčné žlázy se zaměřením na poukázání důležitosti imunohistochemického vyšetření k detekci nádorových buněk v sentinelových uzlinách pro rychlou diagnózu a zahájení včasné léčby pacientů, která zajistí jejich lepší prognózu. Dále odhalení a grafické vyhodnocení nádorů kůže, gynekologických nádorů, nádorů trávicího traktu a nádorů prostaty.

Jednotlivé nádory byly zachyceny za období od 10/2017 do 12/2019 na oddělení patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s.

Při diagnostice je velice důležité dodržení pracovních postupů, čistoty prostředí a laboratorních pomůcek i laboratorního skla, pH pufrů, nesmí dojít např. k vyschnutí řezů. V imunohistochemických metodách je nutná především preciznost, přesnost i pečlivost laborantek, pracuje se s velmi malými objemy při ředění primárních protilátek a jejich pořizovací cena je vysoká. Velmi důležité je při aplikaci primární, sekundární protilátky a detekčního systému použití vhodného množství reagentů, tak aby tkáňový řez byl dostatečně pokrytý a nedošlo ke stékání protilátek mimo řez; k tomuto účelu je možno použít speciální imunopen, který přesně ohraničí místo aplikace. Aby se minimalizovalo denaturování antigenů, nesmí být tkáň vystavena nadměrné teplotě. IHC barvení závisí také na manipulaci a procesech, kterými tkáň prošla před barvením. Nevhodná fixace, zmrazení, rozmrazení, promytí, osušení, zahřátí nebo řezání může vést k nesprávným nebo špatným výsledkům. Nesprávné výsledky barvení mohou vzniknout z důvodu vazby na nespecifické proteiny.

### **Jednotlivé problémy a jejich řešení:**

*Nedošlo k zbarvení nebo pouze slabému zbarvení u pozitivní kontroly a neznámého vzorku.*

Nesmí dojít k vyschnutí vzorků (nutnost použití vlhké komůrky); došlo k použití nevhodného média pro zalití do bloku, nebo k nedostatečnému odstranění parafinu

z bloku (použijte vhodné médium a odstraňte parafín ze vzorku); v pufru byl přítomen azid sodný, který inaktivoval peroxidázu (použijte pufr bez  $\text{NaN}_3$ ); došlo k neadekvátní inkubaci enzymu a protilátky (vyměňte starý chromogenní substrát a dodržte správné inkubační časy).

*Neznámý vzorek není zbarven a pozitivní kontrola ano.*

Antigen byl denaturován nebo zamaskován během fixace nebo zalévání (zkrátte dobu fixace, někdy je nutná trypsin příprava pro odmaskování antigenů); antigen byl zničen autolýzou (použijte tkáň fixované neutrálním formolem, získané biopsií nebo chirurgicky); na řezu je přítomno málo antigenů (prodlužte dobu inkubace).

*Došlo k intenzivnímu přebarvení pozadí na všech sklíčkách.*

Nebyla celkově zablokována enzymatická aktivita (ujistěte se, že proces inaktivace endogenních peroxidáz proběhl správně); došlo k tvorbě nespecifických vazeb (před nakapáním primární protilátky použijte 10% kozí sérum); nebyla správně vymyta protilátka (vícekrát pečlivě vymyjte protilátku z řezů); vysoká teplota v laboratoři urychlila enzymatickou reakci (udržujte teplotu v laboratoři do max.  $24^\circ\text{C}$ ).

*Během barvení došlo ke spadnutí řezů od podložního skla.*

Některé antigeny vyžadují delší čas pro tepelné odhalení, což může vést k snadnému odloupení řezu od podložního skla (řezy natahujte na adhezivní skla potažená silanem, nebo pozitivně nabitá skla).



### **13. Závěr**

Díky imunohistochemickému vyšetření bylo rozlišeno a diagnosticky upřesněno na oddělení patologie Nemocnice Český Krumlov, a.s. celkem 240 maligních a benigních nádorů, z toho 67 nádorů mléčné žlázy (včetně 6 mikrometastáz tumoru mléčné žlázy), 52 kožních nádorů, 87 gynekologických nádorů, 24 nádorů prostaty a 10 nádorů zažívacího traktu.

I přes výrazný rozvoj molekulární diagnostiky v dnešní době imunohistochemie stále zaujímá přední místo v patologii při diagnostice tumorů. Pro zjištění mikrometastáz je IHC barvení jedinečné a nezbytné. V normálním běžném histopatologickém barvení nejsou mikrometastázy viditelné. Imunohistochemické techniky se uplatňují při hledání buněčných a tkáňových antigenů a napomáhají k přesnému stanovení histopatologických diagnóz, zejména napomáhají určit primární místo malignity, zkoumají prognostické faktory a terapeutické indikace jednotlivých nemocí.

V bakalářské práci jsem zúročila několikaletou praxi na oddělení patologie a vědomosti získané studiem tohoto oboru. Stanovené cíle bakalářské práce byly z mého pohledu splněny.

## 14. Literatura

- ABRAHÁMOVÁ, J., aj. 2000. *Atlas nádorů prsu*. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-7169-771-0.
- BARTŮŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. a kol. 2011. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-3533-7.
- BRYCHTOVÁ, S., HLOBILKOVÁ, A. 2008. *Histopatologický atlas*. Praha: Grada Publishing. 112s. ISBN 978-80-247-1650-3.
- BUSKOMBE, J., PAGANELLI, G., BURAK, ZE., WADDINGTON, W., MAUBLANT, J., PRATS, E., PALMEDO, H., SCHILLACI, O., MAFFIOLI, L., LASSMANN, M., CHIESA, C., BOMBARDIERI, E., CHITI, A. 2007. *Sentinel node in breast cancer procedural guidelines*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. Dec; 34 (12): 2154-9
- DABBS, D. 2010. *Diagnostic immunohistochemistry theranostic and genomic applications*. Third edition. Philadelphia: Saunders Elsevir. 941s. ISBN 978-1-4160-5766-6.
- DUŠEK, L., MUŽÍK, J., aj. 2005. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]*. Masarykova univerzita. Dostupné na World Wide Web: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802-8861.
- FEIT, J., JEDLIČKOVÁ, H., MATYSKA, L., DVOŘÁK, K., HABANEC, B. 2001. *Multimediální atlas kožní patologie*. *ČS patologie*, vol. 37, pp. 23-27.
- HOŘEJŠÍ, I., BARTŮŇKOVÁ, J. 2009. *Základy imunologie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.
- JAFFE, ES., HARRIS, NL., STEIN, H., VARDIMAN, JW. 2001 *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue*. World Health Organization Classification of Tumours. 1<sup>th</sup> ed. Lyon: IARC, 351s.
- JANSA, P. 1997. *Repetitorium speciální patologie*. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-7169-438-X.

- KOLÁŘ, Z. a kolektiv. 2003. *Molekulární patologie nádorů*. Olomouc: Epava. ISBN 80-86297-15-2.
- KONOPÁSEK, B., PETRUŽELKA, L. 1997. *Karcinom prs*. Praha: Galén. ISBN 80-85824-66-3.
- KUMAR, V., CONTRAN, RS., ROBBINS, SL. 2003. *Robbins Basic Pathology*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W. B. Saunders Company. 873s.
- LAKHANI, S. R., ELLIS, I. O., SCHNITT, S. J., IAN, P. H., VAN DE VIJVER, M. J., 2012. *Who classification of tumors of the breast*. Lyon: IARC. 240s. ISBN 978-92-832-2433-4.
- LITZMAN, J., aj. 2011. *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-4227-8.
- LYMAN, G.H., GIULIANO, A.E., SOMERFIELD, M.R., BENSON, A.B., BODURKA, D.C., BURSTEIN, H.J. et al., 2005. *American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer*. J Clin Oncol; 23: 7703-20.
- LUKÁŠ, Z., DRÁBEROVÁ, E., FEIT, J., VOJTĚŠEK, B. 1997. *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-0620-X.
- MacFARLANE, PS., REID, R., CALLANDER, R. *Pathology illustrated*. 5<sup>th</sup> ed. Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St. Louis, Sydney, Toronto: Churchill Livingstone, 2000, 684s.
- MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J. 2004. *Patologie*. Praha: Grada Publishing. ISBN 80-247-0785-3
- MARTÍNEK, J., VACEK, Z. 2009. *Histologický atlas*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-247-2393-8.

- MOTLÍK, K., ŽIVNÝ, J. 2001. *Patologie v ženském lékařství*. 1.vyd., Praha: Grada Publishing. 550s. ISBN 80-7169-460-6.
- PECHA, V., KOLAŘÍK, D., KOZLONÍKOVÁ, R. et al. 2011. *Sentinel lymph node biopsy in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy*. *Cancer*, 117(20):4606-16. doi: 10.1126/cncr.26102. PMID 21437896.
- POVÝŠIL, C., aj. 2007. *Speciální patologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-494-2.
- POVÝŠIL, C., ŠTEINER, I. et al. 2007. *Speciální patologie 2*. doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén. 430s. ISBN 978-80-7262-497-2.
- PRAT, A., PARKERS, J.S., KARGINOVA, O., et al. 2010. *Phenotypic and molecular characterization of the claudin – low intrinsic subtype of breast cancer*. *Breast cancer research*. Dostupné na World Wide Web: <http://breast-cancer-research.com/>
- PRAUSOVÁ, J. 2010. *Karcinom prsu – problém i v 21. století*. *Interní medicína pro praxi*. roč.12, č.1, s.26-32.
- RYŠKA, A., NENUTIL, R., KOLÁŘ, Z. 2009. *Doporučený postup pro histologické vyšetření karcinomu prsu*. Dostupné na World Wide Web: <http://www.patologie.info/soubor/standardy/13-Prs.pdf>
- RYŠKA, A. *Co přinesla analýza dat z histologického registru MAGISTER?* *Breast Cancer News: časopis pro odborníky ve zdravotnictví*. květen 2013, roč. 3, č. 1, s. 4-7.
- SOKOL, L. 2000. *Biopsia mammy I a II*. HIS-Dg s.r.o., 378s.
- TAVASSOLI, F. A., DEVILLE, P. 2003. *Pathology and Genetics of Tumours of Breast and Female Genital Organs*. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press, 2003, ISBN 928-32-2412-4.