



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Hodnocení a význam tumor budding v kolorektálním karcinomu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Autor: Monika Juríčková

Vedoucí práce: MUDr. Jiří Lenz, Ph.D.

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Hodnocení a význam tumor budding v kolorektálním karcinomu*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 24.07. 2023

.....

Monika Juričková

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat svému vedoucímu práce, MUDr. Jiřímu Lenzovi, Ph.D., za jeho cenné rady, shovívavost a především trpělivost, se kterou ke mně přistupoval. Dále bych ráda poděkovala laborantkám z Patologicko-anatomického oddělení Nemocnice Znojmo za veškerou pomoc při praktické části mé práce. A v neposlední řadě svým pracovním kolegům, zejména Ing. Sylvii Skaličkové, Ph.D., za trpělivost, pomoc, mnoho praktických rad a pochopení.

Hodnocení a význam tumor budding v kolorektálním karcinomu

Abstrakt

Úvod: Kolorektální karcinom patří k jedné z nejčastějších malignit jak ve světě, tak i v České republice. Včasnou diagnostikou, tedy prevencí a screeningem, lze kolorektální karcinom podchytit v začátcích onemocnění, a tím docílit lepší prognózy onemocnění.

Cíle: Bakalářská práce se zabývala analýzou tumor buddingu ve tkáni kolorektálního karcinomu srovnáním jeho hodnocení mezi preparáty barvenými hematoxylin eosinomem a preparáty barvenými imunohistochemicky pomocí protilátky cytokeratin 20. Dalším cílem bylo poukázat na potenciální prognostický význam tumor buddingu na základě jeho korelace s tumor grade.

Materiály a metody: Studovaný soubor zahrnoval 50 případů resekabilního kolorektálního adenokarcinomu. V oblasti invazivní fronty každého vzorku byl hodnocen tumor budding dvojím způsobem. Jednak ze základního barvení hematoxylin a eosin a jednak z imunohistochemického barvení s protilátkou proti cytokeratinu 20. Veškerá imunohistochemická analýza byla provedena na automatizovaném barvicím automatu Ventana Benchmark Ultra. Následně jsme porovnali stupeň tumor buddingu se stupněm nádorové diferenciaci (tumor grade).

Výsledky: Z naší studie vyplynulo, že ve tkáni kolorektálního karcinomu byla při hodnocení tumor buddingu mezi preparáty barvenými hematoxylinem a eosinem a preparáty barvenými imunohistochemicky 87,5% shoda. Stupeň tumor buddingu koreloval se stupněm nádorové diferenciaci u 86 % případů kolorektálního adenokarcinomu.

Závěr: Naše studie zjistila ve vztahu k hodnocení tumor buddingu ve tkáni kolorektálního adenokarcinomu téměř rovnocenné postavení barvení hematoxylin a eosin s imunohistochemickým barvením s protilátkou proti cytokeratinu 20. Dále jsme v tomto typu nádorové tkáně zjistili pozitivní korelaci tumor buddingu s tumor grade.

Klíčová slova: Tlusté střevo; Kolorektální karcinom; Tumor budding; Hematoxylin a eosin; Imunohistochemie

Evaluation and significance of tumor budding in colorectal cancer

Abstract

Introduction: Colorectal cancer is one of the most common diagnoses both in the world and in the Czech Republic. By early diagnosis, which prevention and screening, colorectal cancer can be detected in the early stages of the disease and thus a better prognosis can be achieved.

Objectives: The bachelor's thesis focused on the analysis of tumor budding in colorectal carcinoma tissue comparing its assessment between hematoxylin and eosin stained preparations and immunohistochemically stained preparations using cytokeratin 20 antibody. Another objective was to highlight the potential prognostic significance of tumor budding based on its correlation with tumor grade.

Materials and methods: The study cohort consisted of 50 cases of resectable colorectal adenocarcinoma. In the invasive front area of each sample, tumor budding was assessed in two ways - firstly, using the basic hematoxylin and eosin staining, and secondly, using immunohistochemical staining with cytokeratin 20 antibody. All immunohistochemical analysis was performed on an automated staining system, Ventana Benchmark Ultra. Subsequently, we compared the degree of tumor budding with the tumor grade, representing the level of tumor differentiation.

Results: From our study, it was found that there was an 87,5 % agreement in tumor budding assessment between hematoxylin and eosin stained preparations and immunohistochemically stained preparations in colorectal cancer tissue. The degree of tumor budding correlated with the tumor grade in 86 % of colorectal adenocarcinoma cases.

Conclusion: Our study found that hematoxylin and eosin staining had comparable efficacy to immunohistochemical staining with cytokeratin 20 antibody in assessing tumor budding in colorectal adenocarcinoma tissue. Furthermore, we observed a positive correlation between tumor budding and tumor grade in this type of tumor tissue.

Key Words: Colon; Colorectal carcinoma; Tumor budding; Hematoxylin and eosin; Immunohistochemistry

Obsah

Úvod.....	7
1.1 Tlusté střevo	8
1.1.1 Anatomie tlustého střeva	8
1.1.2 Fyziologie	10
1.2 Histologie	10
1.3 Kolorektální karcinom	12
1.3.1 Úvod do kolorektálního karcinomu	12
1.3.2 Etiologie a patogeneze CRC	13
1.3.3 Epidemiologie	14
1.3.4 Rizikové faktory	17
1.3.5 Druhy CRC	19
1.3.6 Růst a šíření kolorektálního karcinomu	21
1.4 Tumor budding	24
1.5 Imunohistochemie	26
2 Cíl práce.....	28
3 Metodika.....	29
3.1 Odběr a zpracování vzorků.....	29
3.2 Imunohistochemie (IHC).....	32
3.3 Metodický postup při hodnocení TB hematoxylinem a eosinem	32
3.4 Metodický postup při hodnocení TB imunohistochemicky	33
4 Výsledky.....	35
4.1 Analyzovaná data	35
5 Diskuse	41
6 Závěr.....	44
7 Seznam literatury.....	46
8 Seznam tabulek a obrázků.....	49
9 Seznam příloh.....	50
10 Seznam zkratk.....	51

Úvod

Tématem bakalářské práce je „Hodnocení a význam tumor budding v kolorektálním karcinomu“. Ve své práci se zaměřuji jak na teoretické základy znalosti tlustého střeva a kolorektálního karcinomu, tak i na metodiku zpracování histopatologického materiálu a metodiku hodnocení tumor buddingu v tomto typu nádorové tkáně.

Kolorektální karcinom je skupina maligních nádorů, které vznikají ve tkáni tlustého střeva a konečníku. Tak jako jiná nádorová onemocnění se i kolorektální karcinomy vyznačují nekontrolovatelným růstem nádorových buněk, které v pokročilejších stádiích mohou prorůstat nebo metastázovat do jiných orgánů. Vůbec nejčastějším karcinomem tlustého střeva je tzv. adenokarcinom, který vzniká ze žláзовého epitelu Lieberkühnových krypt.

Problematiku kolorektálního adenokarcinomu jsem si vybrala z důvodu jeho velmi vysokého výskytu v populaci. Jedná se o jednu z nejčastěji diagnostikovaných malignit jak ve světě, tak v České republice. V roce 2021 bylo diagnostikováno 1,9 milionů případů kolorektálního karcinomu, v důsledku, kterého zemřelo více než 935 000 pacientů. Nejvíce ohroženou skupinou pacientů jsou lidé ve věku nad 50 let, ale není výjimkou ani výskyt u mladších pacientů. Nepochybně stále zvyšující se prevence a screening by mohly časem vést ke snížení výskytu tohoto onemocnění.

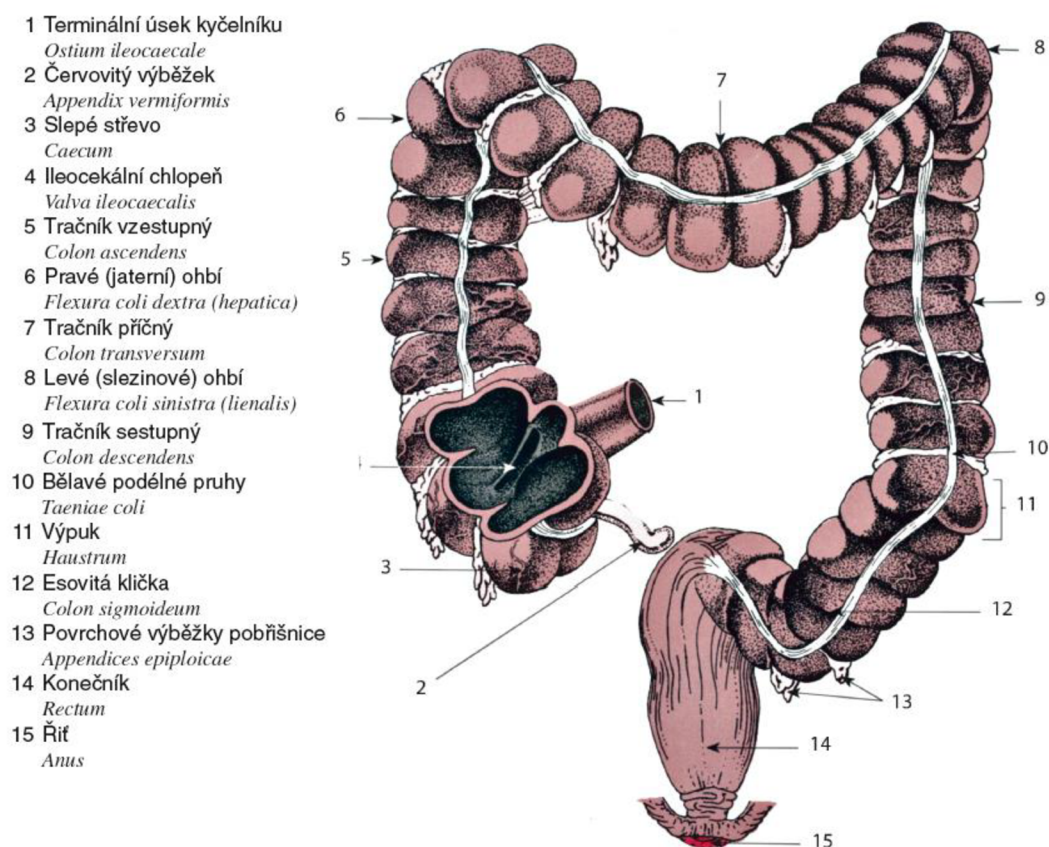
Bakalářská práce se zaměřuje na téma, které je velmi aktuální. Mojí snahou je zde představit základní principy hodnocení tumor buddingu a poukázat na jeho potenciální prognostický význam jeho korelace s tumor grade ve tkáni kolorektálního karcinomu. Také jsem porovnála preparáty, které byly barveny hematoxylinem a eosinem, s těmi, které byly barveny imunohistochemickou technikou s použitím protilátky proti cytokeratinu 20 za účelem hodnocení tumor buddingu v kolorektálním karcinomu.

1.1 Tlusté střevo

1.1.1 Anatomie tlustého střeva

Znalost anatomie tlustého střeva a rekta je klíčová pro správnou diagnostiku, plánování léčby a dosažení co nejlepších výsledků při léčbě kolorektálního karcinomu.

Tlusté střevo a konečník patří do trávicí soustavy. Jednotlivé části tlustého střeva jsou znázorněny na obr. č. 1.



Obrázek č. 1: Tlusté střevo – *intestinum crassum* (Zdroj: www.is.muni.cz)

Konečnou částí zažívacího traktu je tlusté střevo (*intestinum crassum*). Jeho délka je přibližně 1,5 m a šířka 5-7 cm. V distálním úseku se šířka tlustého střeva zmenšuje na přibližně 4 cm (Hemza, 2006). V tlustém střevě se vstřebávají živiny mnohem méně než v tenkém střevě. Tato skutečnost je dána nepřítomností klků, které v tenkém střevě zvětšují vstřebávací plochu povrchu střeva. V čínské medicíně je tlusté střevo považováno za „správce nad stokami“, jelikož do něj vstupuje to, co tenké střevo

nenatrávilo a konečník označují jako „bránou odpadků“ (Celostnímedicina, © 2001-2022). Fyziologie tlustého střeva je dále popsána v kapitole 1.1.2.

Tlusté střevo má několik oddílů:

- Slepé střevo (*intestinum caecum*) se nachází v kapse pravé jámy kyčelní, do které zleva ústí kyčelník (*ileum*) kyčelníkovým ústím (*ostium ileocoecale*). V ústí se nachází Bauhínská chlopeč (*valva ileocoecalis*), která zabraňuje, aby se obsah střeva dostal zpět ze slepého střeva do kyčelníku. Zespod slepého střeva vystupuje červovitý výběžek (*appendix vermiformis*), který je slepě zakončen. Délka červovitého výběžku činí 5-10 cm a je variabilní, co se týče polohy vůči slepému střevu. Appendix může mít různé anatomické polohy. V oblasti appendixu je velké množství lymfatické tkáně (Hemza, 2006).
- Vzestupný tračník (*colon ascendens*) navazuje na slepé střevo. Dosahuje délky přibližně 16 cm. Vzestupný tračník přechází v příčný tračník (*colon transversum*) v místě, které nazýváme pravé ohbí (*flexura coli dextra*).
- Příčný tračník (*colon transversum*) je dlouhý téměř 60 cm a je kaudálně prohnutý (Čihák, 2016).
- Sestupný tračník (*colon descendens*) jehož šířka je 4 cm a délka 22-30 cm. Prochází od dolní části levé ledviny téměř vertikálně do levé jámy kyčelní. Právě v tomto místě přechází do esovité kličky (Čihák, 2016).
- Esovitá klička (*colon sigmoideum*) s délkou asi 40 cm a průměrem 3,7 cm, se stává nejužším oddílem tlustého střeva. Závěs esovité kličky (*mezocolon sigmoideum*) má tvar písmene N. Esovitá klička vede do středu malé pánve (Čihák, 2016).
- Konečník (*rectum*) je poslední částí tlustého střeva a zároveň i trávicí soustavy. Jeho délka se pohybuje okolo 12-16 cm a šířka 4 cm. Je uložen v malé pánvi. Rektum má dvě hlavní části – *ampula recti* – v této části je konečník rozšířen v prostornou ampulu, jejíž délka je 10-12 cm. Dále přechází v řitní kanál (*canalis analis*) jehož délka je 2,5 – 3,8 cm. Řitní kanál ústí v řitní otvor (*anus*), který vede ven z těla (Hemza, 2006).

1.1.2 Fyziologie

K základním funkcím trávicí soustavy patří:

- Trávení
- Vstřebávání
- Vylučování

V tlustém střevě již neprobíhá žádné mechanické ani chemické trávení. Dochází zde ke zpětné resorpci vody a tvorbě stolice, což jsou jeho nejdůležitější funkce. Nestravitelné a odpadní látky se ve tlustém střevě posouvají pomocí peristaltických kontrakcí. V tlustém střevě se ze střevního obsahu vstřebává voda, cukry a minerály jako např. sodík, draslík a chlorid (Simon et al., 1986). Absorbováním vody se trávenina zahušťuje a vzniká stolice, která odchází konečníkem z těla ven. Stolicí netvoří jen zbytek natráveniny, ale i odloupené buňky střevní sliznice a mrtvé bakterie, které střevní mikrobiom nebyl schopen rozložit. V tlustém střevě se nachází řada významných kmenů mikroorganismů. Důležité je zmínit, že v tlustém střevě dochází ke vstřebávání vitamínu K, který je produkován anaerobními bakteriemi, které osídlují tlusté střevo (Wang et al., 2022). Mikroflóra tlustého střeva hraje důležitou roli ve fyziologii trávení a významně přispívá k homeostáze tlustého střeva (Hemza, 2006).

1.2 Histologie

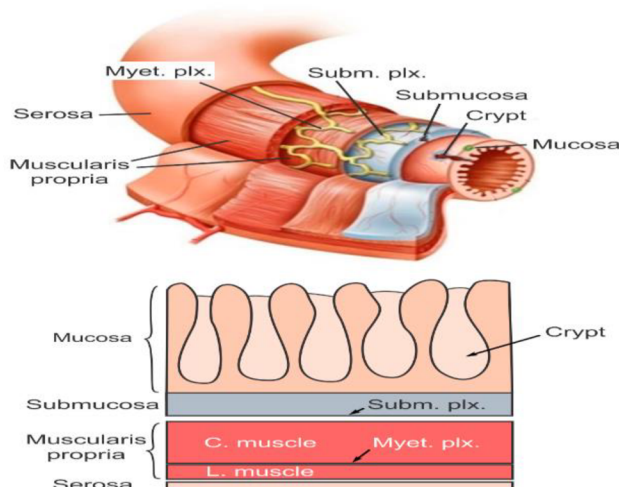
Stěna tlustého střeva se dělí do čtyř anatomicky odlišných vrstev: sliznice (*tunica mucosa*), podslizniční vazivo (*tunica submucosa*), svalová vrstva (*muscularis propria*) a povrchová vrstva (*tunica serosa*) (Čihák, 2016).

Vnitřní výstelku tlustého střeva a konečníku tvoří sliznice, která se skládá z tenké vrstvy epitelu, vrstvy pojivové tkáně (*lamina propria*) a tenké vrstvy svaloviny (*muscularis mucosae*). Protože se v tlustém střevě nevstřebávají živiny, nejsou ve sliznici přítomny klky. Epitel se prohlubuje do velkých cylindrických struktur, tzv. Lieberkühnových krypt, které zasahují přes lamina propria k muscularis mucosae. Tyto krypty jsou znázorněny na obr. č. 2, kde je ukázána struktura střeva včetně výše zmíněných krypt. Díky rozšířené ploše krypt je epitel v tlustém střevě největší epiteliální bariérou těla (Shamsuddin et al., 1982). Lieberkühnovy krypty mají důležitou funkci při produkci a obnově střevních buněk. Bylo zjištěno, že poruchy v normální funkci těchto krypt mohou přispět ke vzniku kolorektálního karcinomu (Holzer and Holzer-Petsche, 1997).

Submukóza je vláknitá vrstva pojivové tkáně, která obklopuje sliznici. Submukóza je bohatě prokrvená a zajišťuje výživu a dodávání kyslíku do sliznice střeva. Obsahuje velké množství lymfocytů, fibroblastů a žírných buněk. Kromě toho se v submukóze nachází submukózní plexus, známý také jako Meissnerův plexus. Tento plexus má důležitou roli v regulaci peristaltiky stěny střeva, řídí sekreci žláz, mění transport elektrolytů a vody a reguluje místní průtok krve (Siri et al., 2020).

Muscularis propria se skládá ze dvou vrstev hladké svaloviny: vnitřní cirkulární svalové vrstvy a vnější podélné (longitudinální) svalové vrstvy. Mezi těmito dvěma vrstvami je myenterický plexus neboli Auerbachův plexus, obsahující jak parasymptická, tak sympatická vlákna autonomního nervového systému. Sympatická vlákna způsobují kontrakce hladké svaloviny a zvyšují peristaltiku, zatímco parasymptická vlákna mají opačný účinek, tedy snižují svalovou kontrakci (Furness, 2012). Cirkulární svalová vrstva má silnější nervová zakončení. Oproti tomu v podélné svalové vrstvě není téměř žádná sensorická inervace (Spencer et al., 2014).

Seróza je poslední vrstva střevní stěny a je složena ze souvislé vrstvy mezoteliálních buněk a vrstvy vaziva. Představuje rozšíření viscerální podbřišnice a mezenteria, protože obaluje střevo (Maier et al., 2021). Přestože má seróza významný obsah kolagenových vláken, je nepravděpodobné, že by měla hlavní nosnou funkci kvůli své tenké tloušťce ve srovnání s celkovou tloušťkou střevní stěny (Watters, Smith, 2005). Stejně jako podélná svalová vrstva, i serosa postrádá významnou sensorickou inervaci (Spencer et al., 2014).

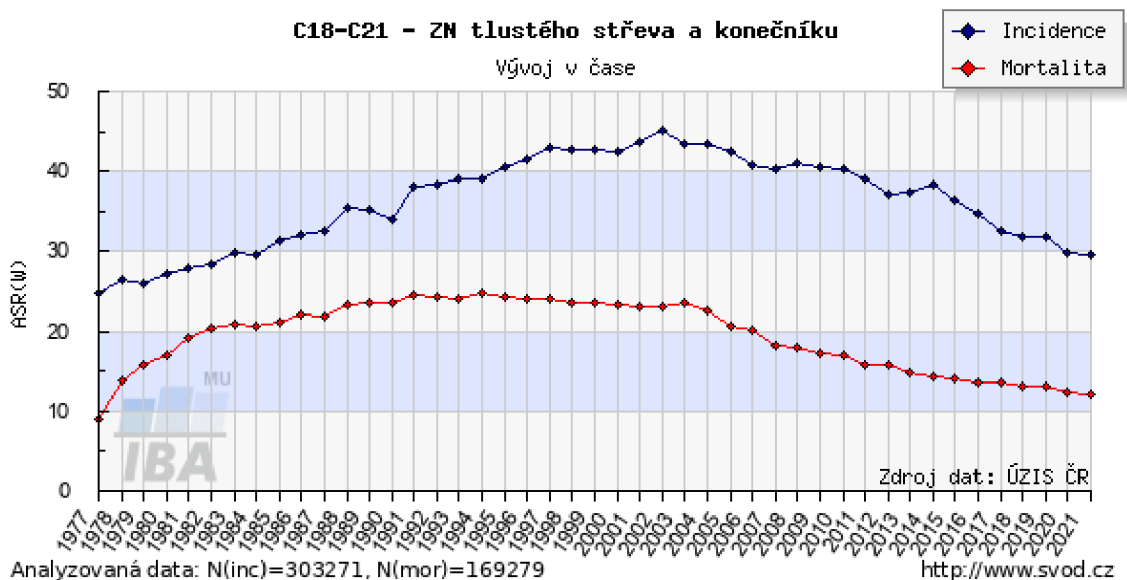


Obrázek č. 2: Struktura tlustého střeva (Zdroj: www.mdpi.com)

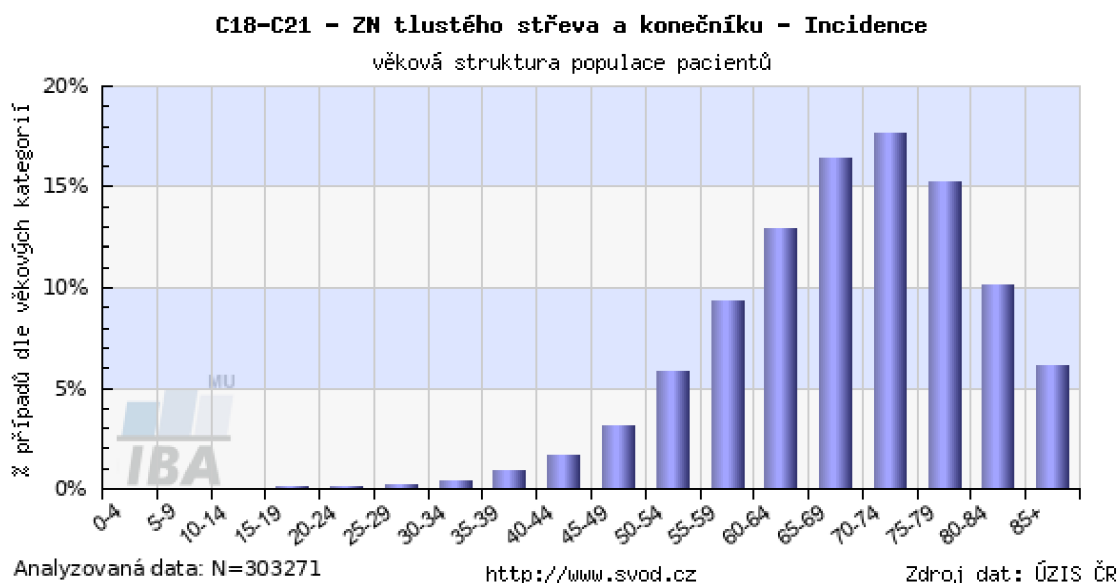
1.3 Kolorektální karcinom

1.3.1 Úvod do kolorektálního karcinomu

Kolorektální karcinom (CRC) je třetí celosvětově nejčastěji diagnostikovanou malignitou a druhým nejsmrteľnějším zhoubným onemocněním jak pro ženy tak i pro muže (Rawla et al., 2019). CRC má silné enviromentální asociace a genetické rizikové faktory. Pravděpodobně v souvislosti s nárůstem screeningového vyšetření a lepšími možnostmi léčby, mortalita mírně klesá, jak dokládá obr. č. 3. Ačkoliv je karcinom tlustého střeva a rektá diagnostikován převážně lidem nad 50 let, nejsou výjimkou ani mladší pacienti (obr. č. 4). Přibližně 5 % všech CRC je připisováno dvěma dědičným syndromům, kterými jsou familiární adenomatózní polypóza (FAP) a Lynchův syndrom (Siegel et al., 2020).



Obrázek č. 3: Časový vývoj incidence a mortality (Zdroj: www.uzis.cz)



Obrázek č. 4: Věková struktura populace pacientů (Zdroj: www.svod.cz)

1.3.2 Etiologie a patogeneze CRC

Existuje řada faktorů, které hrají důležitou roli v původu a vývoji CRC. Tyto faktory mohou být rozděleny na 2 kategorie: enviromentální (vnější) a endogenní (vnitřní). Je také známo, že v kolorektální karcinomu má významnou úlohu i genetika. Jak již bylo zmíněno, CRC se vyskytuje jak ve sporadické formě, tak i ve formě dědičné. Pro hereditární formu je charakteristický vyšší genetický sklon pro vznik CRC než u běžné populace. Avšak výrazně dominuje výskyt sporadického karcinomu, kde hlavní roli hrají zejména vnější faktory (Bartoňková, 2002).

Patogeneze CRC je multifaktoriální a zahrnuje interakci genetických, molekulárních a enviromentálních faktorů, které jsou popsány v kap. 1.3.4.

Mezi genetické a molekulární faktory způsobující vznik karcinomu patří např.:

- Gen *APC* (adenomatózní střevní polypózy) hraje důležitou roli v sekvenci adenom-karcinom a je často mutován u lidí s výskytem CRC. Funkce genu *APC* je potlačovat bujení buněk a regulovat Wnt signální dráhu, která je důležitá pro buněčnou proliferaci a diferenciaci. Mutace genu *APC* vedou ke ztrátě supresorové aktivity a k nadměrné a trvalé aktivaci Wnt signální dráhy, což vede k abnormální buněčné proliferaci a tvorbě adenomů, které se mohou dále rozvinout v CRC (Siegel et al., 2020).

- *KRAS* gen je jedním z genů spojených se vznikem a progresí kolorektálního karcinomu. *KRAS* je onkogen, který kóduje protein Ras, jenž je důležitým regulátorem buněčného růstu a diferenciace. Mutace v genu *KRAS* způsobují trvalou aktivaci Ras signální dráhy, což vede k nekontrolovatelnému buněčnému růstu a přežívání nádorových buněk. Aktivace tohoto genu je spojena s agresivnějším biologickým chováním, rezistencí vůči některým léčivům a horší prognózou u pacientů s CRC. Vzhledem k významné roli genu *KRAS* v patogenezi CRC, se tento gen stal důležitou součástí prediktivního vyšetření ve vztahu k následné léčbě. Identifikace mutací v tomto genu pomáhá určit, kterým pacientům budou prospěšné cílené terapie, jako jsou inhibitory epidermálního růstového faktoru (EGFR). Varianty mutací RAS (*HRAS*, *KRAS*, *NRAS*) se nacházejí v 50 % případů CRC (Kolodner et al., 1999).
- *TP53* gen je jedním z nejdůležitějších tumor supresorových genů v lidském těle. Mutace *TP53* jsou spojeny s několika druhy nádorů, včetně CRC. Tyto mutace mohou způsobit ztrátu nebo snížení funkce proteinu p53, čímž se naruší jeho schopnost regulovat buněčný cyklus a inhibovat nádorový růst. Mutace *TP53* jsou často pozorovány v pokročilých stádiích CRC a jsou tudíž spojeny s horší prognózou (Gonzalez-Pons, Cruz-Correa, 2015).
- Mikrosatelitová nestabilita (MSI): MSI je důsledkem defektů v opravném mechanismu DNA známého jako mismatch repair (MMR). Tato nestabilita se vyskytuje u přibližně 15 % CRC. Může být způsobena mutacemi genů opravy DNA, jako jsou *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* a *PMS2*. MSI je spojena s lepší prognózou u některých pacientů a může predikovat odpověď na určité léčebné metody, jako je imunoterapie (Kolodner et al., 1999).
- Chromozomální nestabilita (CIN): CIN je další důležitý mechanismus uplatňující se v patogenezi CRC. Tento druh nestability je charakterizován ztrátou nebo získáním celých částí chromozomů, vyskytuje se u přibližně 85 % CRC. CIN může vést ke ztrátě funkce genů nebo amplifikaci onkogenů, což přispívá k maligní transformaci buněk (Siegel et al., 2020).

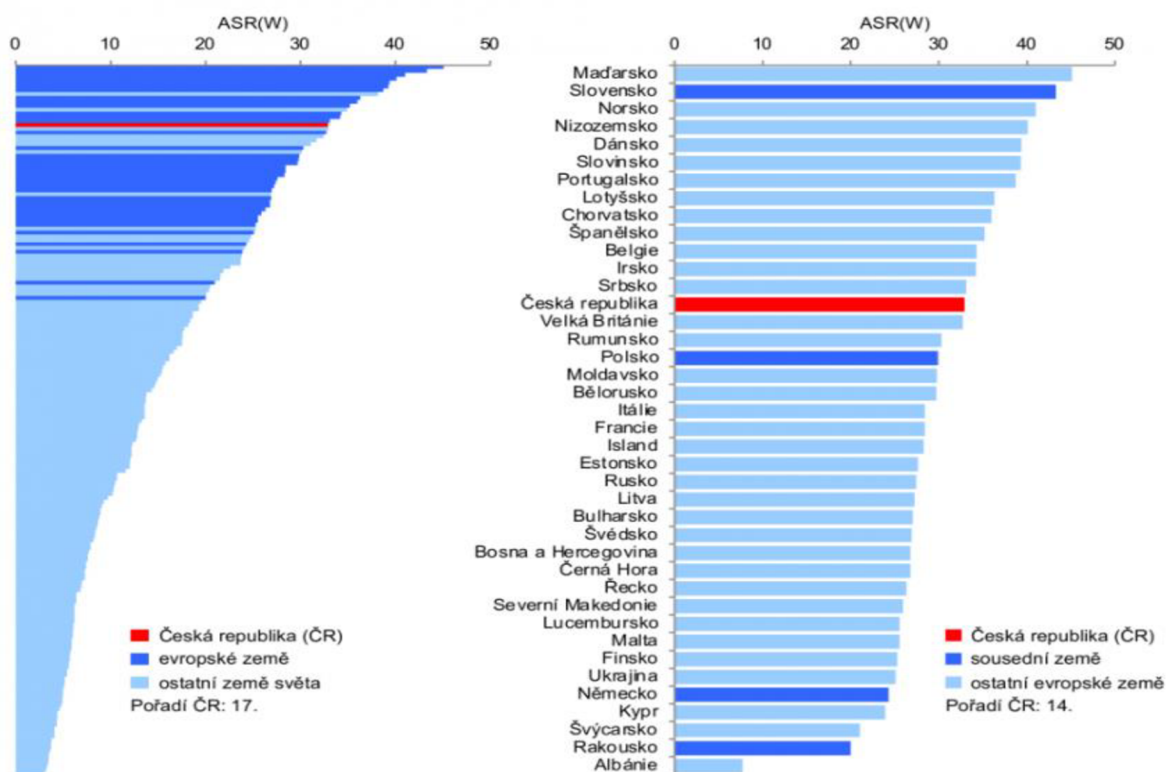
1.3.3 Epidemiologie

V roce 2020 byla diagnóza CRC stanovena odhadem u 1 931 590 lidí ve světě a 519 820 lidí v Evropě. V rozvinutých a průmyslově vyspělých zemích, např. v Evropě a

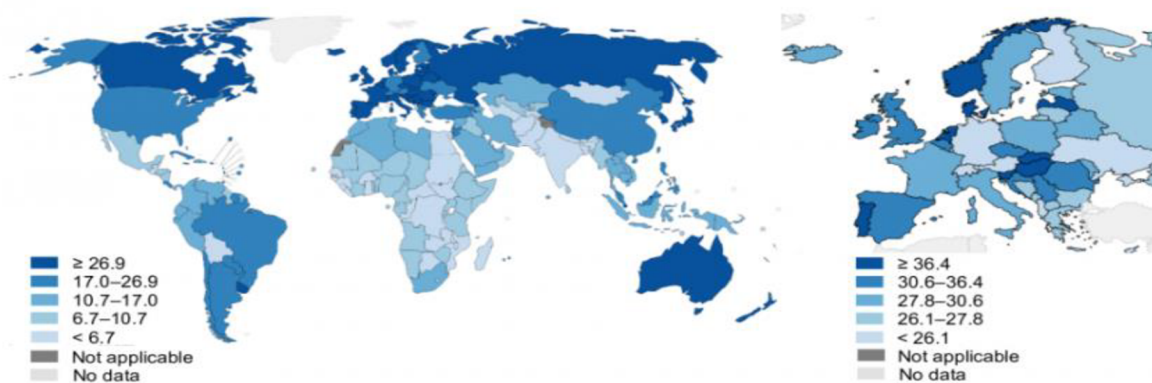
Japonsku, je výskyt CRC vyšší než v zemích méně rozvinutých, jako je například Indie a Afrika. Větší výskyt u mladých lidí můžeme pozorovat v Austrálii, Kanadě a v USA. Odhadem zemřelo na CRC v roce 2020 ve světě 935 173 pacientů, z toho v Evropě bylo odhadnuto 244 824 úmrtí. Počet pacientů, kteří žijí do 5 let od diagnózy byl odhadnut v roce 2020 na 5 253 335, z toho v Evropě na 1 536 168 případů (Ferlay et al., 2021)

Česká republika je státem významně zatíženým výskytem CRC, zejména u mužské populace. V incidenci si čeští muži stojí na 13. místě ve světě a na 12. místě v Evropě. U žen je incidence CRC nižší. Na světovém žebříčku jsou ženy na 21. místě a na evropském žebříčku obsazují ženy 14. místo v pořadí. Ke státům, které dlouhodobě vykazují nejvyšší mortalitu i incidenci, patří státy střední a západní Evropy. Nejvyšší incidenci lze zaznamenat v Maďarsku, Slovensku a Norsku (Ferlay et al., 2021). Kompletní přehled výskytu CRC ve světě je zobrazen na obr. č. 5.

Incidence zhoubných nádorů tlustého střeva a konečníku (C18–C21) u obou pohlaví v mezinárodním srovnání.
 ASR(W) – počet nově diagnostikovaných nádorů na 100 000 osob věkově standardizovaný na světový věkový standard.



Zdroj: Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed on 23 February 2021.



Obrázek č. 5: Incidence zhoubných nádorů kolorekta pro obě pohlaví v mezinárodním srovnání (Zdroj: kolorectum.cz)

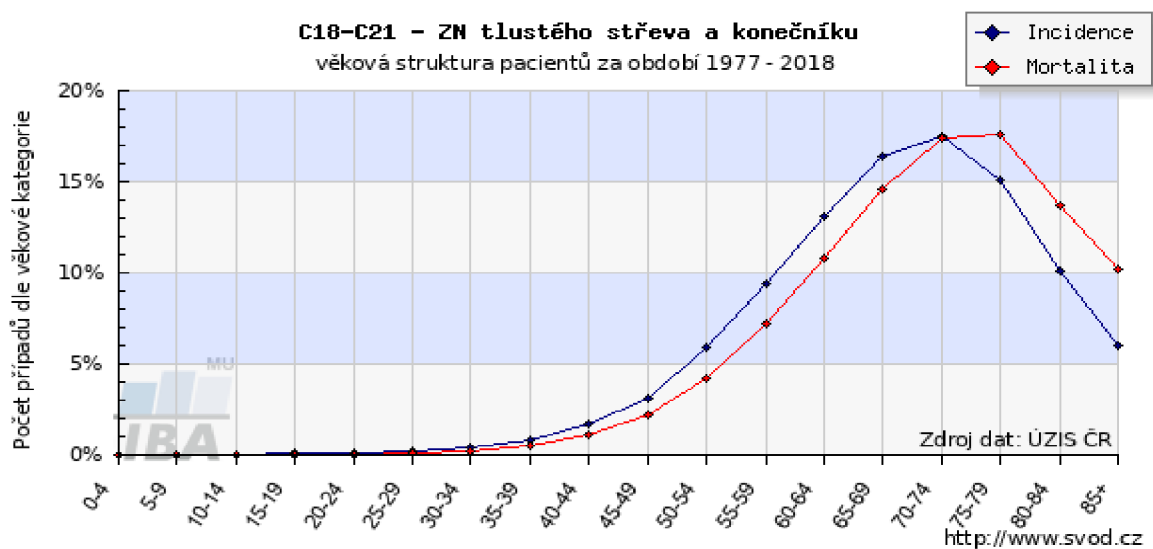
1.3.4 Rizikové faktory

Etiologie vzniku CRC zahrnují jak neovlivnitelné, tak ovlivnitelné faktory.

K neovlivnitelným rizikovým faktorům patří zejména:

- Věk
- Genetická predispozice
- Mužské pohlaví

Věk patří k nejzásadnějším faktorům, který ovlivňuje vznik CRC. Z grafu na obr. č. 6 je zřejmé, že incidence CRC narůstá u lidí starších 50 let. K nejvíce ohroženým skupinám patří lidé kolem 70 let věku. Důvodem, proč je právě věk nejzásadnější faktor je zřejmě hromadění jiných ovlivnitelných faktorů v průběhu života (Kolorektální-karcinom, © 2023).



Obrázek č. 6: Rozložení věkových kategorií u kolorektálního karcinomu (Zdroj: www.uzis.cz)

Významným faktorem v iniciaci onemocnění jsou rovněž genetické predispozice. Dosud bylo popsáno několik dědičných poruch, které zvyšují riziko vzniku CRC. Jsou to zejména:

- Familiární adenomatózní polypóza – jedná se o poruchu popsanou v kapitole 1.3.2
- Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom neboli Lynchův syndrom – je dědičné autozomálně dominantní onemocnění. Jeho projevem jsou vznikající mnohočetné nádory. Tyto nádory velmi často vznikají z buněk sliznic tlustého

střeva, dělohy a z mazových žlázek v kůži. Syndrom může postihovat další orgány, jako jsou vaječníky, žaludek, tenké střevo, játra, žlučové cesty, horní močový trakt, mozek a prostatu. Lynchův syndrom postihuje osoby v mladém a středním věku (Lynchův syndrom, © 2023).

- CRC spojený s idiopatickými střevními záněty – idiopatická proktokolitida (IPK) – tyto záněty vznikají z doposud neznámých příčin. Pravděpodobně se jedná o autoimunitní onemocnění, pod které spadá Crohnova choroba a ulcerózní kolitida. Imunitní systém postižených pacientů idiopatickými záněty iniciuje v zažívacím traktu imunitní odpověď, čímž indukuje dlouhotrvající zánět. Důsledkem je poškození střevní stěny. Byla prokázána spojitost chronických zánětů s progresí CRC (Gibson et al., 2008). Zatímco ulcerózní kolitida postihuje převážně tlusté střevo, Crohnova choroba způsobuje zánět v jakékoliv části zažívacího traktu, přičemž nejčastěji postižnou lokalitou je terminální ileum. Zpočátku se lze omezit pouze na malou část traktu, ale později je Crohnova choroba schopna rozšířit se do velké části střeva. Crohnova choroba a ulcerózní kolitida se nejvíce diagnostikují lidem mezi 15. – 35. rokem (Crohnova choroba, © 2023).

K ovlivnitelným rizikovým faktorům patří zejména:

- Špatné stravovací návyky
- Špatný životní styl

Nedávno bylo Veetilem a spolupracovníky publikováno rozsáhlé review, ve kterém byly popsány výsledky celkem 45 studií zabývajících se významem stravy ve vztahu k incidenci CRC. Ze závěrů tohoto review vyplynulo, že dodržování nutričních zásad má příznivý vliv na snížení rizika vzniku CRC u běžné populace. Mezi výživová doporučení, které byly v jednotlivých studiích sledovány, patří: zvýšený příjem vlákniny, vápníku, zakysaných mléčných výrobků a snížení příjmu červeného masa a alkoholu. Podle některých autorů mají větší predispozici ke vzniku CRC lidé, kteří konzumují velké množství živočišných tuků, soli, vysoko-energetických a zpracovaných potravin, dále nadměrně konzumují červené maso a jednoduché cukry (Veettil et al., 2021). Tyto faktory spolu se špatným životním stylem, kam můžeme zařadit kouření a požívání alkoholu, mohou kromě CRC vést ke vzniku dalších civilizačních chorob, jako je např. diabetes mellitus 2. typu. Výzkumy naznačují, že

existuje spojitost mezi diabetem mellitem 2. typu a vyšším rizikem vzniku některých nádorových onemocnění, zejména CRC. Přesné patofyziologické vysvětlení, proč u pacientů s diabetem mellitem dochází ke zvýšenému výskytu CRC, zatím nebylo ve vědecké literatuře popsáno. Významným faktorem pro vznik CRC u těchto pacientů může být užívání inzulínu. Vyšší riziko vzniku karcinomu má nejspíš za následek inzulinová rezistence. Inzulín kromě jiných funkcí také snižuje schopnost apoptózy a podněcuje množení nádorových buněk (Rames et al., 2007).

Na druhé straně existují protektivní faktory CRC, jako je fyzická aktivita, strava (dostatek ovoce a zeleniny, vláknina, rezistentní škrob, ryby), vitamínové doplňky (kyselina listová, pyridoxin B6, vápník, vitamín D, hořčik), česnek a káva, ale i med (Rames, Bencko and Valenta, 2007). Nové výzkumy se rovněž zabývají vztahem mezi složením střevního mikrobiomu a incidencí CRC. Bylo zjištěno, že některé bakteriální kmeny mohou přispívat ke vzniku CRC (Cornut, Fortin and Soulières, 2008). Chen s kolegy se domnívají, že lidé s CRC vykazují nižší množství bakterií a nižší diverzitu ve srovnání se zdravými jedinci (Chen et al., 2012). Uvádí se, že *Streptococcus bovis*, *Fusobacterium nucleatum* a *Enterococcus faecalis* úzce souvisejí s patogenezí CRC (Cheng et al., 2020). Mechanismus spojený s mikroorganismy v karcinogenezi CRC je velmi složitý, včetně biofilmu, genotoxinů, patogenních bakterií a zánětu. (Wong et al., 2019). Nicméně většina výsledků mikrobiomových studií zdůrazňuje protektivní vliv mikrobioty. Mezi mechanismy, které se zde uplatňují, patří: schopnost vazby střevních bakterií s potenciálními mutageny, syntetizovat vitamíny, příznivě ovlivňovat produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem, zejména butyrátu a působit pozitivně na sliznici střeva (Cornut et al., 2008).

1.3.5 Druhy CRC

Adenokarcinom

Je nejčastějším typem CRC. Tvoří asi 90 % všech malignit postihujících tlusté střevo. Jedná se o karcinom, který vychází z buněk žlázového epitelu Lieberkühnových krypt. Jeho definujícím rysem je invaze přes muscularis mucosae do submukózy (Nagtegaal et al., 2020)

Ačkoli je většina případů diagnostikována jako adenokarcinom blíže nespecifikovaný (not other specified, NOS), lze rozlišit několik histopatologických podtypů se

specifickými klinickými a molekulárními charakteristikami. Některé z nich krátce popíšeme.

- Mucinózní adenokarcinom

Tento subtyp CRC je z více než 50 % tvořen extracelulárními hlenovými jezírky (mucinem), které obsahují trsy, pruhy nebo izolované nádorových epitelie včetně buněk pečetního prstene (signet-ring cell). Jedná se o nejčastěji diagnostikovaný subtyp CRC, jehož prevalence osciluje v rozmezí 5 až 20 %. Z prognostického hlediska se mucinózní adenokarcinom neliší od adenokarcinomu NOS. Pokud mucinózní komponenta ve tkáni CRC nedosahuje 50 %, případ je klasifikován jako adenokarcinom s mucinózní komponentou (Nagtegaal et al., 2020).

- Karcinom z prstenčitých buněk

V případě, kdy buňky pečetního prstene tvoří více jak 50 % všech nádorových epitelí, je CRC klasifikován jako karcinom z prstenčitých buněk. Tyto buňky jsou důsledkem intracytoplazmatických depozit hlenu, které odtlačují buněčné jádro na periferii. Prevalence tohoto subtypu CRC je nízká, dosahuje přibližně 1 %. Karcinom z prstenčitých buněk predilekčně postihuje pravostranné úseky tlustého střeva. Tyto tumory jsou často diagnostikovány v pokročilých stádiích, ve srovnání s adenokarcinomy NOS a mucinózními karcinomy je jejich prognóza horší. V případě, že množství prstenčitých buněk nedosahuje 50 %, je CRC klasifikován jako adenokarcinom s komponentou buněk pečetního prstene (Nagtegaal et al., 2020).

- Medulární karcinom

Pro medulární karcinom jsou charakteristické nádorové buňky s vezikulárními jádry, prominentními jádérky a hojnou eosinofilní cytoplazmou a také denzní infiltrát tvořený lymfocyty a neutrofilny. Prevalence medulárního karcinomu dosahuje podle literárních údajů 4 %. Jeho prognóza je všeobecně dobrá. Medulární karcinom disponuje aberantními imunohistochemickými rysy, neboť vykazuje ztrátu exprese CDX2 a CK20 (Nagtegaal et al., 2020).

- Nediferencovaný karcinom

Tento subtyp CRC postrádá konkrétní morfologické, imunohistochemické a molekulárně-genetické rysy. Ve tkáni nediferencovaného karcinomu je průkazná pouze

epiteliální histogeneze (například prostřednictvím imunopozitivity pancytokeratinu AE1/AE3). Svými rysy může napodobovat medulární karcinom, na rozdíl od něj však postrádá syncytiální charakter růstu a prominentní lymfocytární infiltrát (Nagtegaal et al., 2020).

- Serrated adenokarcinom

Serrated adenokarcinom sdílí tytéž morfologické rysy jako pilovité (serrated) polypy. Přítomny mohou být také oblasti s mucinózní komponentou. Pro nádorové buňky je typický nízký nukleocytoplazmatický poměr. Přibližně 10–15 % všech CRC lze klasifikovat jako serrated adenokarcinom (Mäkinen, 2007).

Dalšími rozeznávanými subtypy CRC jsou mikropapilární karcinom, adenoma-like adenokarcinom, adenoskvamózní karcinom a karcinom se sarkomatoidní komponentou.

1.3.6 Růst a šíření kolorektálního karcinomu

Staging

Staging je proces klasifikace a určování rozsahu a pokročilosti nádorového onemocnění, v tomto případě CRC. Cílem stagingu je poskytnout lékařům a pacientům informace o velikosti primárního nádoru, přítomnosti a rozšíření metastáz a dalších faktorech, které jsou důležité pro stanovení léčby a prognózy (Chapuis, Chan and Dent, 2011).

TNM staging

Pro staging CRC se nejčastěji používá systém TNM, který zahrnuje 3 hlavní prvky:

TUMOR (T) – popisuje velikost primárního nádoru a jeho rozšíření do okolních tkání. Označení T1-T4 se používá k určení rozsahu invaze nádorů. Přesná klasifikace T stagingu se provádí na základě různých faktorů, včetně histologie nádoru a hloubky proniknutí do stěny tlustého střeva nebo konečníku (Brierley, Gospodarowicz and Wittekind, 2017).

Tabulka č. 1: Vyhodnocení tumor (T)

T	Vyhodnocení
TX	Primární nádor nelze vyhodnotit.
T0	Neexistuje žádný důkaz rakoviny tlustého střeva a konečníku.
Tis	Týká se karcinomu in situ. Rakovinové buňky se nacházejí pouze v epitelu nebo v lamina propria.
T1	Nádor prorostl do submukózy.
T2	Nádor prorostl do muscularis propria.
T3	Nádor prorostl přes muscularis propria až do subserosy nebo prorostl do tkání obklopující tlusté střevo nebo konečník.
T4a	Nádor prorostl do povrchu viscerálního peritonea, což znamená, že prorostl všemi vrstvami.
T4b	Nádor prorostl do jiných orgánů nebo struktur nebo se k nim připojil.

(dle TNM klasifikace zhoubných novotvarů 8.vydání)

NODE (N) – se týká postižení lymfatických uzlin v blízkosti primárního nádoru. N0 znamená, že nejsou postiženy žádné lymfatické uzliny, zatímco označení N1-N3 se označuje různé stupně postižení uzlin (Goldstraw et al., 2007).

Tabulka č. 2: Vyhodnocení Node (N)

N	Vyhodnocení
NX	Regionální lymfatické uzliny nelze hodnotit.
N0	Nedochází k šíření do regionálních lymfatických uzlin.
N1a	V 1 regionální lymfatické uzlině se nacházejí nádorové buňky.
N1b	Nádorové buňky se nacházejí ve 2 nebo ve 3 regionálních lymfatických uzlinách.
N1c	Existují uzliny tvořené nádorovými buňkami nalezenými ve strukturách blízko tlustého střeva, které nevypadají jako lymfatické uzliny.
N2a	Nádorové buňky se nacházejí ve 4 až 6 regionálních lymfatických uzlinách.
N2b	Nádorové buňky se nacházejí v 7 a více regionálních lymfatických uzlinách.

(dle TNM klasifikace zhoubných novotvarů 8.vydání)

METASTASIS (M) – se vztahuje k přítomnosti metastáz, což jsou nádorové buňky, které se šíří na vzdálenější místa v těle. M0 značí, že nejsou přítomny žádné metastázy, zatímco M1 označuje přítomnost metastáz. Přítomnost metastáz může ovlivnit prognózu pacienta a může být brána v úvahu při výběru léčebného plánu, včetně chirurgického odstranění nádoru, chemoterapie, radioterapie a dalších terapeutických přístupů (Chapuis, Chan and Dent, 2011).

Tabulka č. 3: Vyhodnocení Metastasis (M)

M	Vyhodnocení
M0	Rakovina se nerozšířila do jiných částí těla.
M1a	Rakovina se rozšířila do 1 další části těla mimo tlusté střevo a konečník.
M1b	Rakovina se rozšířila do více než jedné části těla mimo tlusté střevo a konečník.
M1c	Rakovina se rozšířila na peritoneální povrch.

(dle TNM klasifikace zhoubných novotvarů 8.vydání)

Na základě kombinace hodnot T, N a M je přiřazován konkrétní stupeň nebo fáze CRC. Správné určení stagingu CRC je důležité pro stanovení nejvhodnějšího léčebného plánu a prognózy pacienta. Lékaři používají klinické vyšetření, obrazové metody (např. CT, MRI) a patologickou analýzu tumoru k posouzení stagingu a určení správného léčebného přístupu.

GRADE (G) – stupňování G se týká histologického hodnocení malignity nebo diferenciac buněk v primárním nádoru. Grade určuje, jak se nádorové buňky ve tkáni odlišují od normálních buněk a může poskytnout informace o agresivitě nádoru, riziku metastáz a reakci na léčbu. Grade se obvykle klasifikuje do 4 stupňů. Každý stupeň malignity má specifické charakteristiky, které pomáhají posoudit stav buněčné diferenciac a jejich změn (Brierley, Gospodarowicz and Wittekind, 2017).

Tabulka č. 4: Vyhodnocení Grade (G)

G	Vyhodnocení
GX	Stupeň nádoru nelze identifikovat
G1	Nízký stupeň malignity: Buněčné změny jsou dobře diferencované, což znamená, že se podobají normálním buněčným typům ve tkáních. Mají dobrou strukturu a organizaci a mírně zvýšenou míru buněčné proliferace.
G2	Střední stupeň malignity: Buněčné změny jsou středně diferencované. Mají mírně odlišnou morfolonii od normálních buněčných typů a vyšší míru buněčné proliferace. Jejich organizace je méně strukturovaná než u G1.
G3	Vysoký stupeň malignity: Buněčné změny jsou špatně diferencované. Mají výrazně odlišnou morfolonii od normálních buněk, včetně nepravidelných tvarů a velikostí buněk. Mají vysokou míru buněčné proliferace a narušenou organizaci tkáně.
G4	Velmi vysoký stupeň malignity: Buněčné změny jsou zcela nediferencované. Mají výrazně odlišnou morfolonii od normálních buněčných typů a velmi vysokou míru buněčné proliferace. Organizace tkáně je silně narušená a nádorové buňky mohou být velmi nepravidelné a anaplastické.

(dle TNM klasifikace zhoubných novotvarů 8.vydání)

Výběr správného stupně nádorové diferenciaci je důležitý pro stanovení prognózy pacienta a určení nejvhodnější léčebné strategie. Pacienti s nízkým stupněm malignity mají obvykle lepší prognózu a reagují lépe na léčbu, zatímco pacienti s vysokým nebo velmi vysokým stupněm malignity mají obvykle horší prognózu a vyšší riziko metastáz.

1.4 Tumor budding

Tumor budding (TB) je etablovaný prognostický faktor u CRC. Tato metoda přitahuje zájem patologů, kliniků a výzkumníků od doby, kdy byl TB poprvé popsán v 50. letech 20. století (Imai, 1954). Od té doby se podařilo získat velké množství důkazů, které pevně potvrdily, že TB je silným a nezávislým prediktorem metastáz v lymfatických uzlinách, recidivy onemocnění a úmrtí v souvislosti s CRC (Zlobec et al., 2020). Navzdory velkým rozdílům v kritériích, metodách a systémech hodnocení TB v různých studiích, se TB ukázal jako pozoruhodně spolehlivý prediktor nepříznivého výsledku CRC. Donedávna však absence standardizovaného skórovacího systému ztěžovala zavedení metody TB do rutinní histopatologické praxe. To přimělo skupinu odborníků, aby se v roce 2016 sešli ve švýcarském Bernu na Mezinárodní konsenzuální konferenci (International Tumor Budding Consensus Conference, ITBCC) s cílem dosáhnout shody na jednotné, na důkazech založené, metodě hodnocení TB u CRC. Od zveřejnění

konsenzuálních doporučení ITBCC v roce 2017 byl TB začleněn jako další prognostický faktor do klasifikace nádorů (Kakar et al., 2020).

TB je definován jako jedna nádorová buňka (bud) nebo shluk sestávající z maximálně čtyř nádorových buněk (buds) (Lugli et al., 2017). Tyto shluky nádorových buněk se nacházejí v invazivní frontě tumoru a jsou často obklopeny desmoplastickou reakcí. Podle konsenzuálního doporučení Lugliho et al. (2017) byl upřednostněn třístupňový systém hodnocení TB (Bd1, Bd2, Bd3) před dvoustupňovým systémem (nízký vs. vysoký), protože třístupňový systém je lépe reprodukovatelný ve vztahu k prognóze CRC. Stupnice hodnocení TB je tedy následující, Bd1 (0 – 4 shluky), Bd2 (5 – 9 shluků) a Bd3 (10 a více shluků). Přesný popis metodiky hodnocení TB je popsán v kap. 3.3.

Hodnocení TB lze provádět z preparátů barvených hematoxylinem a eosinem, ale také z preparátů barvených imunohistochemicky. Podle doporučení Lugliho a kolegů lze TB velmi dobře stanovit pouze ze vzorků barvených hematoxylinem a eosinem. V některých případech je použití imunohistochemie lepší variantou, a to z toho důvodu, že shluky nádorových buněk mohou být překryty peritumorálním zánětlivým infiltrátem, což ztěžuje jejich identifikaci v preparátech barvených hematoxylinem a eosinem (Horcic et al., 2013). Při použití imunohistochemického barvení jsou ve vztahu k TB používány cytokeratiny (CK). Cytokeratiny představují skupinu přibližně 20 cytoskeletálních strukturálních proteinů přítomných v normálních epitelích a jejich exprese se udržuje i během maligní transformace (Moll et al., 1982). Protože exprese cytokeratinů je v neoplastických buňkách obvykle zachována, má použití specifických protilátek význam zejména při prokázání původu metastatických karcinomů. V patologicky nezměněné tkáni je CK7 exprimován například ve žlázovém epitelu prsu nebo plic, dále také v mezotelu nebo urotelu močového měchýře. CK20 je hlavním buněčným proteinem adultních enterocytů a pohárkových buněk ve střevním traktu. Bylo zjištěno, že relativní exprese CK20 a CK7 se u různých epitelálních nádorů liší a tyto markery se v současné době používají jako diagnostické nástroje, které pomáhají určit místo původu metastatických karcinomů. Imunofenotyp CK20+/CK7- je považován za charakteristický pro CRC a používá se k jeho odlišení od adenokarcinomů jiného původu, jako jsou např. adenokarcinomy plic, jater nebo prsou. Ale ne všechny CRC postrádají expresi CK7, různé studie ukázaly, že míra positivity se

může lišit v rozmezí 0-22 % (Hernandez et al., 2005). Expres CK7 ve tkáni CRC je podle některých studií asociována s horší prognózou (Hrudka et al., 2021).

Přesné mechanismy, které vedou ke vzniku shluků nádorových buněk, nejsou zcela známy, ale některé důkazy naznačují, že TB může být viditelným korelátem procesu souvisejícího s epiteliálně-mezenchymální tranzicí (EMT) v nádorovém mikroprostředí CRC. EMT je proces, při kterém se buňky epitelového typu mění na buňky s mezenchymálními vlastnostmi. Během EMT dochází ke ztrátě adhezivních molekul a polarizaci buněk, což umožňuje buňkám získat invazivní potenciál a schopnost migrovat z primárního nádoru do jiných tkání a orgánů. To je klíčový krok při vzniku metastáz, které jsou hlavní příčinou morbidit a mortality u pacientů s CRC (Kirchner, Brabletz, 2000).

U CRC je TNM staging nejdůležitější faktorem při určování stádia onemocnění, od kterého se odvíjí léčba pacienta (Sobin et al., 2010). Odlišné biologické chování různých typů CRC může vysvětlovat značné rozdíly mezi karcinomy stejného stádia. Při hledání potenciálních ukazatelů v CRC se ukázal TB jako obzvláště slibný kandidát. U endoskopicky resekabilního pT1 CRC bylo zjištěno, že TB je silným a nezávislým prediktorem metastáz do lymfatických uzlin (Bosch et al., 2013).

1.5 Imunohistochemie

IHC je diagnostická metoda, která umožňuje identifikaci a lokalizaci specifických proteinů v tkáních pomocí použití protilátek. Tato metoda často poskytuje dodatečné informace o buněčných a tkáňových změnách. Také slouží k identifikaci přítomných infekčních agens (Hořejší and Bartůňková, 2009).

Při imunohistochemické analýze se používají primární protilátky, specifické pro antigen analyzované tkáně, které jsou navázány na tkáňové řezy. Tyto protilátky se poté detekují pomocí sekundárních protilátek, které jsou konjugovány s enzymem nebo fluorescenčním barvivem. IHC je tedy užitečným nástrojem pro zobrazování specifických proteinů v tkáních a může být použita k diagnostice nádorů a infekcí (De Matos et al., 2010).

Imunochemické barvení je složeno z více kroků. Buď je možné celé barvení provést manuálně, lze vidět i poloautomatický proces, kdy je nutné ručně odparafinovat a

odmaskovat epitopy, ale zbytek postupu je prováděn automatem, nebo celý proces imunohistochemického barvení provede automat sám.

2 Cíl práce

Cílem bakalářské byla analýza TB ve tkáni CRC. TB byl hodnocen u 50 pacientů s CRC. V naší práci jsme TB hodnotili dvojím způsobem, a to jednak na preparátech barvených hematoxylinem a eosinem, a jednak na preparátech barvených imunohistochemicky s využitím protilátky proti CK20 na automatizovaném barvicím automatu Ventana Benchmark Ultra. Obě tyto metody jsme následně porovnali. Na závěr naší studie jsme provedli korelaci mezi TB a stupněm nádorové diference (tj. grade), čímž jsme poukázali na prognostický význam TB.

3 Metodika

3.1 Odběr a zpracování vzorků

1. Odběr a fixace

1. Klinik odebral materiál, v případě naší studie resekát tlustého střeva.
2. Resekát kolorekta se vložil do nádoby s fixačním médiem, kterým byl 10% neutrální formaldehyd. Použili jsme dostatečně velkou nádobu, aby byl odebraný materiál zcela ponořen a všechny tkáně byly zfixovány. Tento proces byl proveden, aby se zabránilo autolýze odebrané tkáně.
3. Fixovaný materiál byl transportován na oddělení patologie v pevně uzavřených nádobách.
4. Materiál byl podle velikosti odebraného vzorku tkáně fixován po dobu 24 – 48 hodin.

Před přijetím vzorku do laboratoře jsme se ujistili, že je ke vzorku přiložena řádně vyplněná žádanka.

2. Krájení vzorků do bloků

Po 24–48hodinové fixaci probíhalo zpracování vzorku, což zahrnovalo makroskopický popis resekátu patologem a jeho přikrojení do bloků (blokování). Velikost přikrojeného materiálu byla u každého resekátu okolo 1 cm. Po přikrojení do bloků byl zbytek resekátu vložen do roztoku methacarnu, který sloužil ke zvýraznění lymfatických uzlin. Druhý den bylo možné v resekátu detekovat lymfatické uzliny díky tomuto zviditelnění. Pro úplnost uvádíme složení methacarnu: methanol (6 dílů), chloroform (3 díly), konc. kyselina octová (1 díl).

3. Zalévání do parafínu

Aby mohl být vzorek zafixován v parafínu, byla nezbytná jeho lázeň v alkoholu. Dnešní tkáňové automaty pracují na jiném principu než klasická alkoholová lázeň ve zvyšující se koncentraci alkoholu. V naší analýze jsme pracovali s tkáňovým automatem Intelsint RVG1, který využívá vakuum.

Postup:

1. Vzorky se vloží do autotechnikonu, kde probíhá ještě další fixace ve formalínu. Tento krok slouží k zachování struktury a stabilitě tkání.
2. Po fixaci ve formalínu následuje proces vymytí fixativa pomocí vody. Cílem tohoto kroku je odstranit přebytečný formalín ze vzorků.
3. Dalším krokem je postupné odvodnění v 5 lázních alkoholu. Alkohol je použit k odstranění vody, aby do nich mohl prostoupit xylen.
4. Vzorky jsou následně vystaveny 3 lázním xylenu, a to z toho důvodu, že parafín se v alkoholu nerozpouští, tudíž vzorky by se neprosytily následně parafínem.
5. Po procesu s xylenem následují 4 lázně s parafínem.

Vzorky přes noc postupně prošly těmito procesy a ráno jsme vytáhli prosycené vzorky, které se zalívaly zkvalitněným parafínem do tkáňových bločků. My jsme použili HistoFor Plus.

4. Krájení

Po zalití vzorků bylo nutné jejich zchlazení na ledu po dobu cca 10 min. Zalitím vzorku parafínem je blok téměř nachystán. Poté byly tyto vzorky krájeny na mikrotomu. Lze nastavit na krájení řezů různé tloušťky, ale většina tkání je krájena přibližně na 5 μ m. Po ukrojení byly řezy vloženy nejprve do studené vody, poté se řezy nabraly na podložní skla a přenesly do teplé vody, kde došlo k natažení řezů. Dále lze využít vyhřívaná ploténka, která umožní dokonalé přilnutí řezů na podložní skla.

Identifikace tkáňových bloků musí být jednoznačná a shodná s označením na podložním skle, aby se předešlo záměně materiálu.

5. Barvení

Po krájení následovalo barvení řezů na podložních sklech. V naší studii byly všechny vzorky obarveny základním barvením hematoxylinem a eosinem, které je dnes ve většině laboratoří barveno v barvicím automatu. Většina zkoumaných buněk je průhledná a bez obarvení se jeví téměř bezbarvá. Barviva, nejčastěji hematoxylin a eosin (H&E), se používají k zajištění kontrastu tkáňových řezů, díky čemuž jsou tkáňové struktury viditelnější a snadněji hodnotitelné. Hematoxylin a eosin je základní barvicí laboratorní metoda používaná k vyšetření vzorků tkáně pro rutinní diagnostiku. Tato technika barvení bazofilních a acidofilních struktur pomocí hematoxylinu a eosinu umožňuje patologům pozorovat funkční a morfologické detaily buněk. Mechanismus barvení hematoxylinu a eosinu je založen na chemické interakci mezi tkání a barvivem. Hematoxylin dodává modrofialový kontrast bazofilním strukturám, zejména těm, které obsahují molekuly nukleové kyseliny, jako je chromatin, ribozomy a cytoplazmatické oblasti bohaté na RNA. Růžové až červené zbarvení je dáno kyselým eosinem bazickým materiálům, jako jsou červené krvinky, cytoplazma, svaly a kolagen. Na tkáň se pak působí kyselým roztokem, který odstraní bazické barvivo z cytoplazmy a ponechá je v jádrech. Tkáň je poté obarvena eosinem, kyselým barvivem, které základní struktury, jako je cytoplazma a extracelulární matrix, barví do růžova. Ve srovnání s jinými barvicími histologickými metodami, jako je imunohistochemie, je barvení hematoxylinem a eosinem jednodušší, rychlejší a levnější. V dnešní době je naprostým standardem provádět barvení na automatickém barvicím automatu. Naproti tomu histochemické barvení, které například zahrnuje barvení alciánovou modří sloužící ke zvýraznění mukopolysacharidů nebo kombinované barvení PAS-Alcián k průkazu PAS-pozitivních substancí, neutrálních mukopolysacharidů a kyselých mukopolysacharidů, se barví stále manuálně. Po obarvení se na vzorek tkáně připevní krycí sklíčko pomocí optického lepidla, které pomáhá vzorek chránit.

Ne vždy může barvení hematoxylinem a eosinem poskytnout všechny informace, které patolog během diagnostického procesu potřebuje. Z tohoto důvodu je nutné sáhnout po jiné barvicí technice, kterou je např. imunohistochemie.

3.2 *Imunohistochemie (IHC)*

Pro imunohistochemickou detekci jsme použili barvicí automat Ultra Ventana firmy BenchMark (imunostainer). Tento automat umožňuje rychlou a spolehlivou analýzu proteinové exprese v nádorových tkáních.

Pro naši studii jsme použili primární protilátku proti CK20. Primární protilátky byly vizualizovány za použití substrátu peroxidu vodíku a chromogenu 3,3'-diaminobenzidín-tetrahydrochloridu (DAB) (ultraView Universal DAB Detection Kit).

Pro imunohistochemii byla použita skla TOMO, jedná se o skla s vysokou přilnavostí speciálně vyrobená pro IHC analýzu. Po vložení do imunostaineru probíhalo sušení a odparafinování řezů. Následovalo kondicionování buněk, tedy odmaskování antigenu, v EDTA pufru při 95 °C po dobu 64 min. Tkáňové vzorky byly inkubovány s protilátkou proti CK20 po dobu 16 min. Každé sklo s analyzovaným vzorkem obsahovalo současně kontrolní tkáň pro verifikaci IHC reakce. Jako pozitivní externí kontrola byla použita tkáň lidského apendixu.

3.3 *Metodický postup při hodnocení TB hematoxylinem a eosinem*

1. U každého případu CRC jsme v preparátech barvených hematoxylinem a eosinem vybrali takový preparát, který v oblasti invazivní fronty obsahoval TB nejvyššího stupně.
2. V tomto preparátu jsme při 10násobném zvětšení analyzovali celkem 10 oblastí invazivní fronty, ze kterých jsme vybrali tu oblast, která obsahovala nejvyšší počet buds (tj. „hotspot“).
3. V této oblasti invazivní fronty jsme zjišťovali přesný počet buds při 20násobném zvětšení na ploše 0,785 mm².
4. TB jsme finálně kategorizovali jako: Bd1 (nízký), 0-4 buds, Bd2 (střední), 5-9 buds, Bd3 (vysoký), ≥10 buds (tab. 5 a obr. 7).

Tabulka č. 5: Hodnocení TB

Stupeň TB	Stupeň	Počet buds	per 0,785 mm ²
Bd1	low	0-4	
Bd2	intermediate	5-9	
Bd3	high	≥10	

(Zdroj: vlastní zpracování)

3.4 Metodický postup při hodnocení TB imunohistochemicky

Pro posouzení TB imunohistochemickým barvením bylo nutné vybrané sklíčko, které bylo hodnoceno hematoxylinem a eosinem obarvit imunohistochemicky s protilátkou proti CK20. Při hodnocení TB imunohistochemickým barvením se postupovalo stejně jako u preparátů barvených hematoxylinem a eosinem, pouze s tím rozdílem, že už se nevyhledávala invazivní fronta tumoru, ale zaměřovali jsme se pouze na oblast hotspotu, ze které je TB hodnocen, dle zadaných kritérií z tab. č. 5.

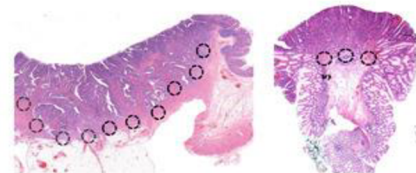
- 1 Define the field (specimen) area for the 20x objective lens of your microscope based on the eyepiece field number (FN) diameter

Objective magnification: 20		
Eyepiece FN Diameter (mm)	Specimen Area (mm ²)	Normalization Factor
18	0.636	0.810
19	0.709	0.903
20	0.785	1.000
21	0.866	1.103
22	0.950	1.210
23	1.039	1.323
24	1.131	1.440
25	1.227	1.563
26	1.327	1.690

- 2 Select the H&E slide with greatest degree of budding at the invasive front



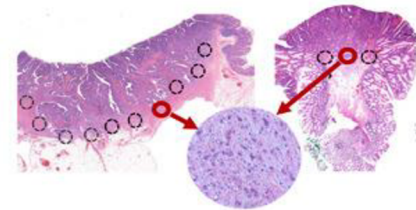
- 3 Scan 10 individual fields at medium power (10x objective) to identify the "hotspot" at the invasive front



For surgical resection specimens, scan 10 fields

For pT1 endoscopic resections (usually <10 fields available), scan all

- 4 Count tumor buds in the selected "hotspot" (20x objective)



Selected hotspot indicated in red

- 5 Divide the bud count by the normalization factor (figure 2) to determine the tumor bud count per 0.785mm²

Select the budding [Bd] category based on bud count and indicate the absolute count per 0.785mm² (see reporting example)

$$\text{Tumor bud count per } 0.785 \text{ mm}^2 = \frac{\text{Bud count (20x objective)}}{\text{Normalization factor}^*}$$

Bd1 (low):	0-4 buds	} per 0.785 mm ²
Bd2 (intermediate):	5-9 buds	
Bd3 (high):	≥10 buds	

Reporting example:

Tumor budding: Bd3 (high), count 14 (per 0.785 mm²)

Obrázek č. 7: Popis vyhodnocení TB (Zdroj: studie Lugli et al., 2017)

4 Výsledky

V bakalářské práci jsem použila standardní popisnou statistiku. Data jsou prezentována pomocí počtu pacientů a procentuálního zastoupení jednotlivých kategorií. Byl medián a 5.- 95. percentil.

4.1 Analyzovaná data

Celkem bylo do této studie zařazeno 50 pacientů s diagnózou CRC. Všichni pacienti podstoupili odběr vzorku formou resekce. Pacienti byli vybráni v letech 2017-2022 v Nemocnici Znojmo a materiál byl zpracován na Patologicko - anatomickém oddělení v téže nemocnici.

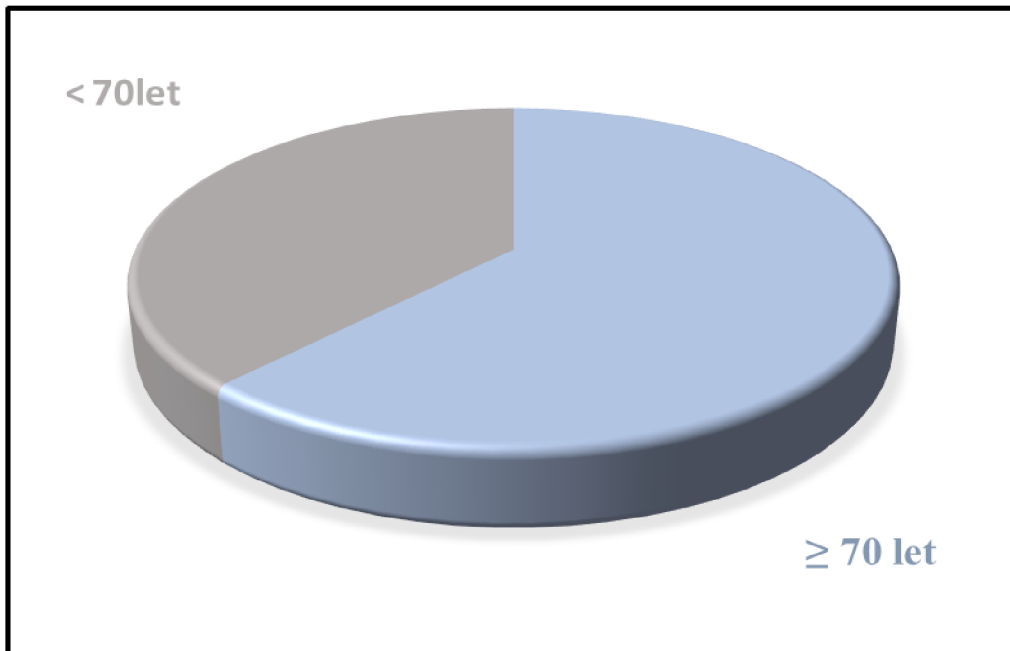
Hodnocený soubor obsahoval 28 mužů a 22 žen v průměrném věku 68 let; věkové rozpětí 37–90 let.

Tabulka č. 6: Vyhodnocení výsledků

Charakteristika (N=50)		Medián Percentil (5.-95.) / N(%)
Věk		68 (51-85 let)
	≤70	31 (62 %)
	>70	19 (38 %)
Pohlaví	F	22 (44 %)
	M	28 (56 %)
Grade	1	18 (36 %)
	2	28 (56 %)
	3	4 (8 %)
T	1	12 (24 %)
	2	17 (34 %)
	3	20 (40 %)
	4	1 (2 %)
N	0	41 (82 %)
	1	8 (16 %)
	2	1 (2 %)
M	0	49 (98 %)
	1	1 (2 %)
TB	Bd1	23 (46 %)
	Bd2	23 (46 %)
	Bd3	2 (4 %)
	Nelze	2 (4 %)
Shoda G/TB		86 %

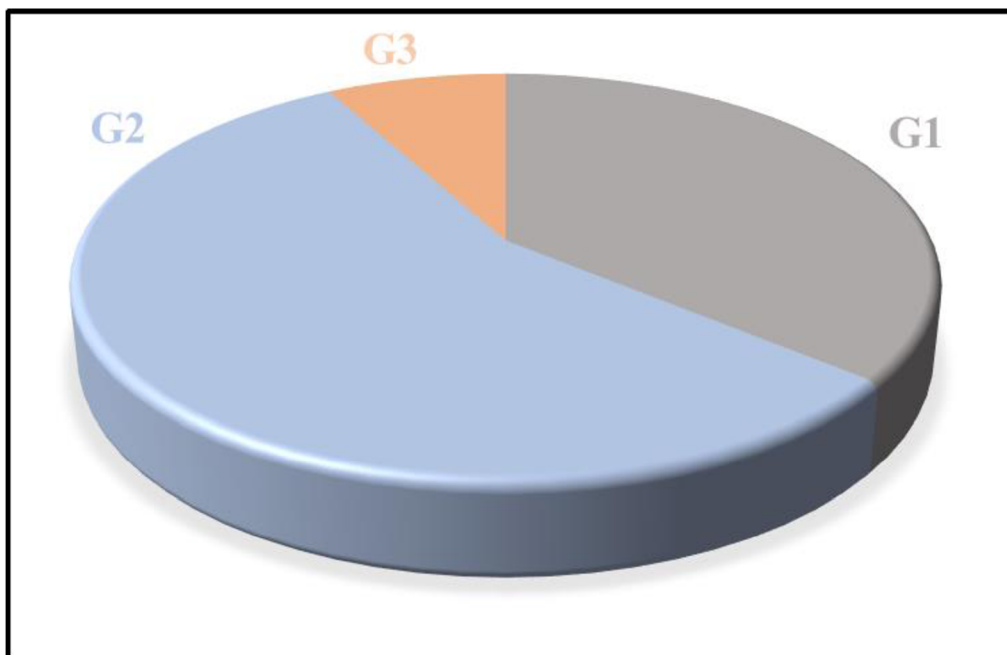
(Zdroj: vlastní zpracování)

V závislosti na věku lze vidět, že CRC se častěji vyskytuje u starších lidí. Během naší studie jsem porovnávala procentuální zastoupení pacientů nad a pod 70 let. Věkovou skupinu ≥ 70 let zastupovala populace 31 osob, což bylo 68 %. Skupinu < 70 let zastupovalo 19 osob (32 %), viz graf č.1.



Graf č. 1: Porovnání věkové skupiny, (Zdroj: vlastní zpracování)

Dobře diferencovaný karcinom (G1) byl diagnostikován u 18 pacientů (36 %). U většiny pacientů byl diagnostikován středně diferencovaný karcinom (G2), konkrétně u 28 pacientů (56 %). Pouze 4 (8 %) pacienti měli diagnostikovaný nízké diferencovaný karcinom (G3), viz graf č.2.



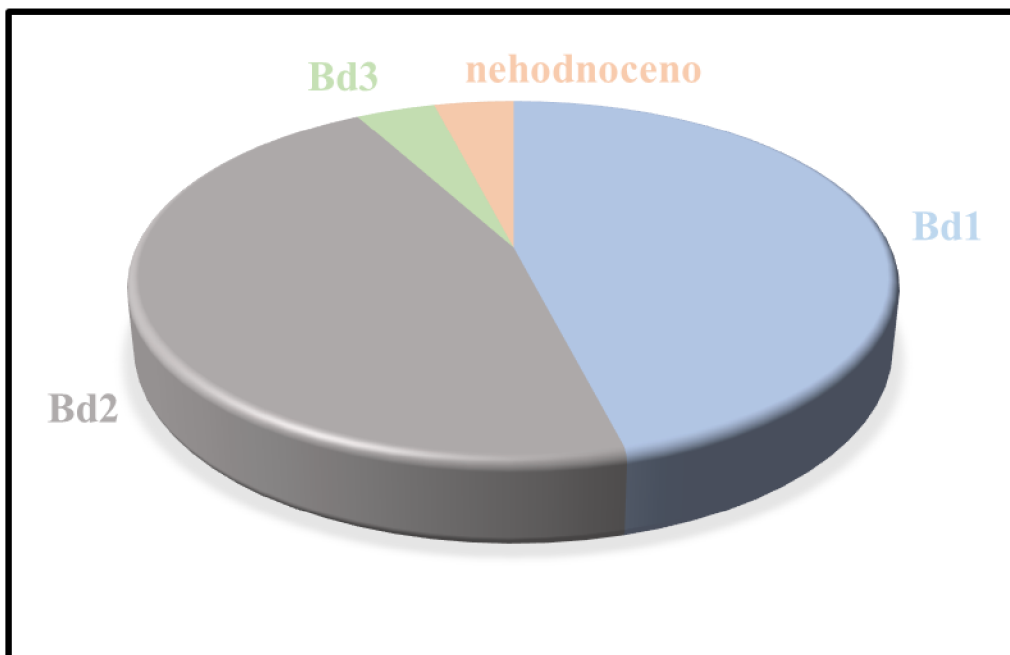
Graf č. 2: Rozdělení grade podle procentuálního zastoupení, (Zdroj: vlastní zpracování)

Z popisovaného souborů pacientů bylo zhodnoceno, že CRC ve stadiu T1 byl diagnostikován u 12 osob (24 %), status T2 u 17 pacientů (34 %), status T3 u 20 pacientů (40 %) a pouze u 1 pacienta (2 %) byl přítomen T4.

V souboru vyšetřovaných pacientů s CRC byl status N2 hodnocen pouze u 1 pacienta (2 %). Osm pacientů (16 %) mělo status N1 a u zbývajících částí, tedy u 41 pacientů (82 %) nebyly postiženy lymfatické uzliny, což je status N0.

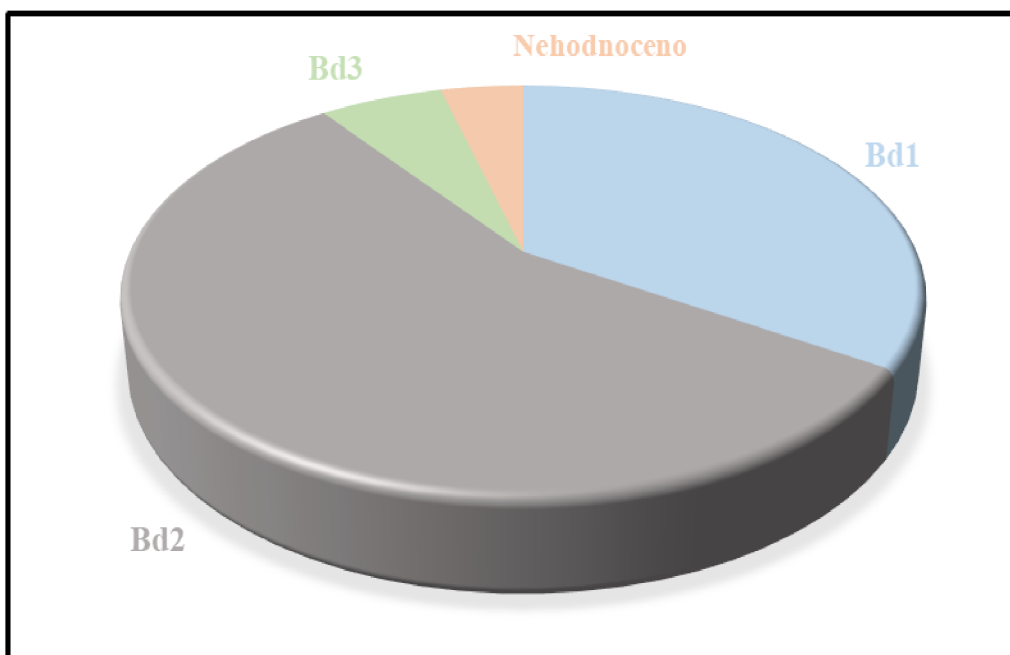
V analyzovaném souboru se nacházel pouze 1 pacient (2 %) s přítomností vzdálených metastáz, tedy statusem M1. Ostatním 49 pacientům (98 %) nebyla diagnostikována žádná vzdálená metastáze, tedy status M0.

Z analyzovaného souborů pacientů s diagnostikovaným CRC u preparátů barvených hematoxylinem a eosinem mělo 23 z nich (46 %) status Bd1, 23 z nich (46 %) Bd2 a 2 pacienti (4 %) byli hodnoceni Bd3. U 2 pacientů (4 %) nebylo možné TB v důsledku abundančních extracelulárních hlenových jezírek zcela validně stanovit, viz graf č. 3.



Graf č. 3: TB v procentuálním zastoupení, barvení hematoxylinem a eosinem (Zdroj: vlastní zpracování)

U preparátů barvených imunohistochemicky s protilátkou proti CK20 mělo status Bd1 17 pacientů (34 %), 28 z nich (56 %) mělo Bd2 a 3 pacienti byli hodnoceni Bd3 (6 %). U 2 pacientů nemohl být TB hodnocen, jak bylo zmíněno výše. Výsledky jsou zaznamenány do grafu č.4.



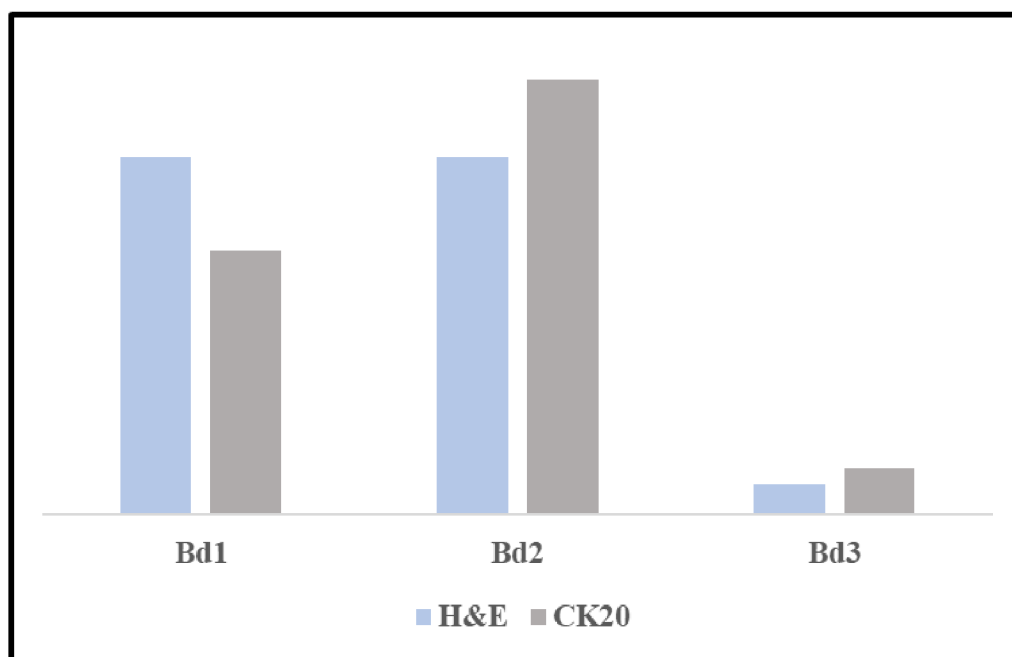
Graf č. 4 Graf č. 4: TB v procentuálním zastoupení, imunohistochemické barvení (Zdroj: vlastní zpracování)

V tabulce č. 7 lze vidět, jak se shodovalo hodnocení TB u imunohistochemického barvení a barvení hematoxylinem a eosinem. Shoda hodnocení mezi těmito druhy barvení byla 87,5 %.

Tabulka č. 7 *Tabulka č. 7: Shoda hodnocení TB mezi imunohistochemickým barvením a barvením hematoxylinem a eosinem*

	H&E	CK20	shoda
Bd1	23	17	17
Bd2	23	28	23
Bd3	2	3	2
shoda (%)			87,5

(Zdroj: vlastní zpracování)



Graf č. 5: *Shoda hodnocení TB mezi imunohistochemickým barvením a barvením hematoxylinem a eosinem (Zdroj: vlastní zpracování)*

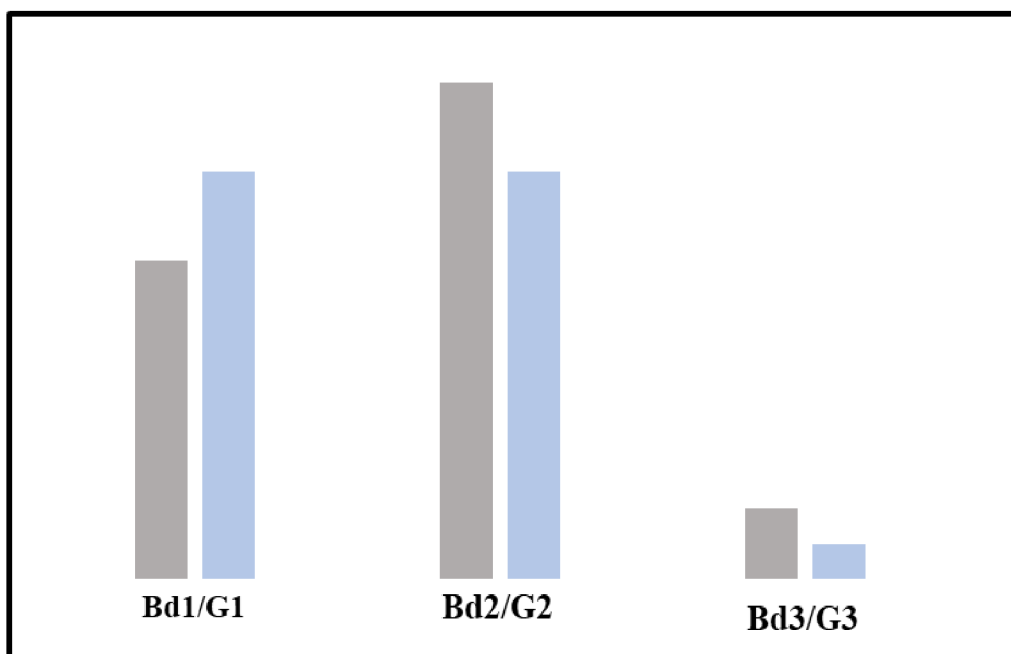
Dle studie Lugliho a kolegů jsme pro korelaci mezi TB a tumor gradem hodnotili TB z preparátů barvených hematoxylinem a eosinem. Nejprve byl patologem stanoven tumor grade pomocí standardního systému hodnocení, tedy TNM klasifikace. Poté byla posouzena shoda mezi TB a tumor gradem. Dobře diferencovaný adenokarcinom (G1) s Bd1 se shodoval v 18 případech (36 %), středně diferencovaný adenokarcinom (G2) s Bd2 v 23 případech (46 %) a níže diferencovaný adenokarcinom (G3) s Bd3

dosahoval shody u 2 pacientů (4 %). Tumor grade tedy koreloval s TB u 86 % pacientů. Zobrazení shody mezi TB a tumor gradem lze vidět v tab. č. 8 a grafu č. 6.

Tabulka č. 8: Hodnocení a shoda tumor gradu a TB

Grade	Počet pacientů	TB	Počet pacientů	Shoda
G1	18	Bd1	23	18 (36 %)
G2	28	Bd2	23	23 (46 %)
G3	4	Bd3	2	2 (4 %)
shoda (%)				86

(Zdroj: vlastní zpracování)



Graf č. 6: Shoda mezi TB a tumor gradem (G) (Zdroj: vlastní zpracování)

5 Diskuse

V této bakalářské práci jsme se věnovali hodnocení TB ve tkáni CRC, a to z preparátů barvených hematoxylinem a eosinem a z preparátů barvených imunohistochemicky. Oba způsoby hodnocení TB jsme následně porovnávali. Dále jsme se zaměřili na porovnání TB s nádorovým grade, konkrétně jsme zjišťovali, v jakém procentu se oba tyto histopatologické parametry u jednotlivých případů CRC shodují.

Na základě analýzy 50 pacientů s CRC jsme zjistili, že 18 z nich (36 %) mělo diagnostikovaný dobře diferencovaný karcinom (G1), středně diferencovaný karcinom (G2) byl klasifikován u většiny pacientů, konkrétně u 28 z nich (56 %). Pouze 4 pacienti (8 %) měli diagnostikovaný nízce diferencovaný karcinom (G3). Tyto výsledky ukazují na převahu středně diferencovaného karcinomu (G2) v našem souboru pacientů, což je v souladu s literárními údaji. Pokud se zaměříme na hodnocení TB, zjistili jsme, že 23 pacientů (46 %) mělo hodnocení Bd1, u 23 pacientů (46 %) byl hodnocen TB jako Bd2, pouze u 2 pacientů (4 %) byl přítomen Bd3. U dvou případů mucinózního karcinomu (4 %) nebylo možné TB spolehlivě hodnotit kvůli přítomnosti velkého množství extracelulárního hlenu. Podle studie Karamitopoulouvé a kolegů z roku 2018, do které bylo zahrnuto celkem 117 pacientů s CRC, byl dobře diferencovaný (G1) karcinom přítomen u 16 pacientů, středně diferencovaný karcinom (G2) u 55 pacientů a nízce diferencovaný karcinom (G3) byl diagnostikován u 46 pacientů. V této studii byl TB hodnocen nezávisle 2 patology. První z nich vyhodnotil Bd1 u 18 pacientů, Bd2 u 32 pacientů a Bd3 u 60 pacientů. Druhý patolog měl při hodnocení TB mírně odlišné výsledky, konkrétně byl Bd1 stanoven u 24 pacientů, Bd2 u 35 pacientů a Bd3 u 51 pacientů. Z výsledků této studie vyplývá, že zatímco první patolog měl shodu mezi TB a stupněm nádorové diferenciace (grade) 72 %, u druhého patologa byla shoda mezi oběma analyzovanými parametry vyšší, konkrétně dosahovala 84 %. Oba patologové tak měli vysoký stupeň shody mezi TB a nádorovým grade. K podobným výsledkům dospěla také naše studie, zjistili jsme 86% shodu mezi TB a nádorovým grade.

Ze všeobecného hlediska existuje více faktorů, které mají vliv na korelaci mezi TB a nádorovým grade, jedná se zejména o zkušenosti patologa.

V naší studii jsme při hodnocení TB vycházeli z konsensuálního doporučení Lugliho a kolegů z roku 2017. Podle těchto doporučení je TB nezávislým prediktorem prognózy u CRC. Bylo zjištěno, že vyšší stupeň TB je ve tkáni CRC asociován s nepříznivými

(agresivními) histopatologickými rysy a klinickým chováním. Tento významný vztah mezi TB a prognózou byl potvrzen v různých klinických a histopatologických studiích (Qu et al., 2023). Diskuse se tak soustřeďuje na důležitost a metodiku hodnocení TB, a to jak ve vztahu k jeho kvantifikaci, tak k jeho interpretaci (Lugli et al., 2017).

Stejně jako v konsenzuálních doporučení Lugliho a kolegů, navrhuje i Zlobec s kolegy analyzovat celkem 10 zorných polí invazivní fronty nádoru při 10násobném zvětšení. Tímto způsobem je vybrána oblast („hot spots“) s nejvyšším TB. Na rozdíl od Lugliho a kolegů navrhuje Zlobec s kolegy hodnotit TB vždy z preparátů barvených jak hematoxylinem a eosinem, tak z preparátů barvených imunohistochemicky (podle Lugliho doporučení je barvení hematoxylin a eosin pro validní hodnocení TB dostačující). Nutné je zmínit, že studie Zlobece a kolegů předcházela konsenzuálnímu doporučení Lugliho a kolegů, jednalo se tak o jednu z mnoha studií, na základě kterých se doporučení pro hodnocení TB utvářela (Zlobec byl jedním z podílejících se členů). Naše zkušenosti v souladu s Lugliho doporučením však poukazují na významnou roli imunohistochemie při hodnocení TB v určitých situacích, kterou je například velké množství zánětlivého infiltrátu v oblasti invazivní fronty nádoru.

Jedním z hlavních důvodů, proč byla zavedena standardizace hodnocení TB podle konsenzuálního doporučení Lugliho a kolegů (2017), je fakt, že hodnocení TB podléhalo značné interindividuální variabilitě a bylo závislé na zkušenosti odečítajícího patologa. Než bylo zavedeno toto konsenzuální doporučení, existovalo několik různých systémů sloužících k hodnocení TB, které se lišily v kvantitativních i kvalitativních parametrech klasifikace TB. Diskutovalo se o potřebě sjednotit a standardizovat tyto hodnotící systémy, aby bylo dosaženo větší konzistence a porovnatelnosti výsledků mezi různými studiemi. Právě z tohoto důvodu byl zaveden doporučený postup hodnocení TB, který je také uveden v recentní WHO klasifikaci nádorů zažívacího traktu, a podle kterého jsme postupovali i my v naší studii. Po zavedení tohoto systému by se mělo histopatologické hodnocení TB mezi patology různých koutů světa rámcově shodovat a překrývat.

Zlobec s kolegy si ve své recentní studii z roku 2021 klade otázku, zda by neměla být do systému hodnocení TB zařazena také kategorie 0, která by reflektovala absenci nádorových buds ve tkáni CRC. Tím pádem by se ze skupiny Bd1 odštěpila podskupina

Bd0. Zlobec ve své studii tuto kategorii považuje za užitečnou, a to s ohledem na biologické chování takových případů CRC.

Další diskutovanou otázkou v doporučení Lugliho a kolegů je potenciální význam TB jako prediktivního faktoru pro cílenou terapii. Zjištění, že vyšší stupeň TB je spojen s horší prognózou, naznačuje, že by TB ve tkáni CRC mohl sloužit jako indikátor agresivnějšího fenotypu a rezistence vůči léčbě.

Naše studie zjistila vysoký stupeň shody při hodnocení TB mezi preparáty barvenými hematoxylinem a eosinem a preparáty barvenými imunohistochemicky. Toto zjištění je zcela v souladu se studií Mitrovic kolegů (2012), Van Wyka a kolegů (2015) a jinými.

Celkově lze říci, že doporučení Lugliho a kolegů z roku 2017 přináší zásadní poznatky o důležitosti a prognostickém významu TB v CRC. Toto doporučení přispívá k hlubšímu porozumění a otevírá cestu pro další výzkum a využití TB jako diagnostického a prognostického nástroje ve vývoji léčebných strategií u CRC.

Podle doporučení Lugliho a kolegů TB významně koreluje s tumor grade. Toto tvrzení je zcela v souladu s výsledky naší studie.

6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo provést analýzu TB a poukázat na jeho prognostický význam na základě korelace s nádorovým grade ve tkáni CRC. Naše studie zahrnovala hodnocení TB u 50 pacientů s CRC. V našem výzkumu jsme hodnotili TB dvěma způsoby, a to na preparátech barvených hematoxylinem a eosinem a na preparátech barvených imunohistochemicky s protilátkou proti CK20 na automatizovaném barvicím automatu Ventana Benchmark Ultra.

Bakalářská práce byla rozdělena do několika částí s cílem poskytnout ucelený pohled na zkoumanou problematiku. V první části byl popsán obecný popis tlustého střeva, který zahrnoval anatomii, histologii i fyziologii tohoto orgánu. Tím bylo vytvořeno základní podvědomí o struktuře a funkcích tlustého střeva, což je důležité pro pochopení dalších témat souvisejících s CRC. Další část bakalářské práce byla věnována CRC. Tato část popisuje CRC od etiologie až po jeho různé subtypy. Byly popsány faktory, které přispívají ke vzniku CRC, jako jsou genetické a environmentální faktory. Tím bylo poskytnuto hlubší porozumění o této maligní chorobě a jejím různým aspektům. Poslední kapitola teoretické části se zaměřila na TB. Tato část zahrnovala definici, hodnotící metody a potenciální prognostický význam TB. V metodické části bakalářské práce jsme se zaměřili na rutinní postup histopatologického zpracování resekovaných vzorků CRC a následné imunohistochemické barvení s využitím protilátky proti CK20.

V našem souboru čítajícím celkem 50 pacientů byl 18 z nich (36 %) diagnostikován dobře diferencovaný karcinom (G1), 28 z nich (56 %) středně diferencovaný karcinom (G2) a 4 z nich (8 %) nízce diferencovaný karcinom (G3). Tato data naznačují větší prevalenci středně diferencovaného karcinomu (G2) v našem souboru pacientů s CRC.

Při analýze hodnocení TB z barvení hematoxylinem a eosinem jsme zjistili, že 28 pacientů (56 %) dosáhlo hodnocení Bd1, u 19 pacientů (38 %) byl TB hodnocen jako Bd2, a pouze u 1 pacienta (2 %) byl hodnocen Bd3. Vzhledem k přítomnosti abundantních extracelulárních hlenových jezírek nebylo možné spolehlivě hodnotit TB u 2 pacientů s mucinózním karcinomem (4 %). Při použití imunohistochemického barvení s protilátkou proti CK20 bylo 17 pacientů (34 %) hodnoceno jako Bd1, 28 pacientů (56 %) jako Bd2 a u 3 pacientů (6 %) dosáhlo hodnocení Bd3. Stejně jako u barvení hematoxylinem a eosinem jsme u 2 pacientů (4 %) TB nemohli validně stanovit.

Shoda v hodnocení TB mezi preparáty barvenými hematoxylinem a eosinem a preparáty barvenými imunohistochemicky s protilátkou proti CK20 dosáhla shody 87,5 %, což naznačuje, že je opravdu dostačující použít na stanovení TB barvení hematoxylinem a eosinem.

Výsledky předložené práce naznačují, že stupeň nádorové diferenciaci (grade) a TB jsou vzájemně propojeny. Dobře diferencovaný (G1) adenokarcinom většinou koreloval s Bd1 u 18 pacientů (36 %), středně diferencovaný adenokarcinom (G2) většinou koreloval s Bd2 v 23 případech (46 %) a nízké diferencovaný adenokarcinom (G3) koreloval s Bd3 u 2 pacientů (4 %). Tato souvislost mezi diferenciací nádoru a TB by mohla mít prognostický význam a mohla by pomoci při určování vhodné léčby a prognózy pacientů s CRC.

Shoda ve stanovení tumor grade a TB dosahovala v naší studii 86 %.

Jak lze vidět z výsledků naší studie, hodnocení TB z resekátů barvených hematoxylinem a eosinem je zcela dostačující a má téměř shodné výsledky s imunohistochemickým barvením proti protilátce CK20, což je zcela v souladu s celosvětově uznávaným konsenzuálním doporučením Lugliho a kolegů. V některých případech, jako je například zvýšené množství zánětlivého infiltrátu, důsledkem čehož není oblast invazivní fronty nádoru přehledně hodnotitelná, je pro lepší použít imunohistochemické barvení.

Závěrem lze říci, že TB lze považovat za silný prognostický faktor u CRC a je na místě, že byl TB zaveden ve WHO klasifikaci nádorů zaživačního traktu.

7 Seznam literatury

- Bartoňková, H. (2002) *Manuál prevence a časně detekce nádorových onemocnění: prevence nádorových onemocnění ve 21. století*. 1. vyd. Brno: Masarykův onkologický ústav.
- Bosch, S. *et al.* (2013) 'Predicting lymph node metastasis in pT1 colorectal cancer: a systematic review of risk factors providing rationale for therapy decisions', *Endoscopy*, 45(10), pp. 827–841. Available at: <https://doi.org/10.1055/s-0033-1344238>.
- Brierley, J., Gospodarowicz, M.K. and Wittekind, C. (eds) (2017) *TNM classification of malignant tumours*. Eighth edition. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.
- Chapuis, P.H., Chan, C. and Dent, O.F. (2011) 'Clinicopathological staging of colorectal cancer: Evolution and consensus-an Australian perspective: Staging of colorectal cancer', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26, pp. 58–64. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2010.06538.x>.
- Cornut, G., Fortin, C. and Soulières, D. (2008) 'Antineoplastic Properties of Bacteriocins: Revisiting Potential Active Agents', *American Journal of Clinical Oncology*, 31(4), pp. 399–404. Available at: <https://doi.org/10.1097/COC.0b013e31815e456d>.
- De Matos, L.L. *et al.* (2010) 'Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice', *Biomarker Insights*, 5, p. BMI.S2185. Available at: <https://doi.org/10.4137/BMI.S2185>.
- Ferlay, J. *et al.* (2021) 'Cancer statistics for the year 2020: An overview', *International Journal of Cancer*, 149(4), pp. 778–789. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.
- Furness, J.B. (2012) 'The enteric nervous system and neurogastroenterology', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 9(5), pp. 286–294. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>.
- Gibson, T.B. *et al.* (2008) 'The Direct and Indirect Cost Burden of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis', *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 50(11), pp. 1261–1272. Available at: <https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e318181b8ca>.
- Goldstraw, P. *et al.* (2007) 'The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumours', *Journal of Thoracic Oncology*, 2(8), pp. 706–714. Available at: <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31812f3c1a>.
- Gonzalez-Pons, M. and Cruz-Correa, M. (2015) 'Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now?', *BioMed Research International*, 2015, pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/149014>.
- Hemza, J. (2006) *Základy anatomie soustavy trávicí, žláz s vnitřní sekrecí a soustavy močopohlavní II*. 1. vyd. Edited by J. Hanzlová. Brno: Masarykova univerzita.
- Hernandez, B.Y. *et al.* (2005) 'CK20 and CK7 protein expression in colorectal cancer: demonstration of the utility of a population-based tissue microarray', *Human Pathology*, 36(3), pp. 275–281. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2005.01.013>.

Holzer, P. and Holzer-Petsche, U. (1997) 'Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation', *Pharmacology & Therapeutics*, 73(3), pp. 219–263. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(96\)00196-9](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(96)00196-9).

Hořejší, V. and Bartůňková, J. (2009) *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton.

Hrudka, J. *et al.* (2021) 'Cytokeratin 7 expression as a predictor of an unfavorable prognosis in colorectal carcinoma', *Scientific Reports*, 11(1), p. 17863. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97480-4>.

Kirchner, T. and Brabletz, T. (2000) 'Patterning and Nuclear β -Catenin Expression in the Colonic Adenoma-Carcinoma Sequence', *The American Journal of Pathology*, 157(4), pp. 1113–1121. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64626-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64626-3).

Kolodner, R.D. *et al.* (1999) 'Germ-line msh6 Mutations in Colorectal Cancer Families1', *Cancer Research*, 59(20), pp. 5068–5074.

Lugli, A. *et al.* (2017) 'Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016', *Modern Pathology*, 30(9), pp. 1299–1311. Available at: <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.46>.

Maier, F. *et al.* (2021) 'The heterogeneous morphology of networked collagen in distal colon and rectum of mice quantified via nonlinear microscopy', *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 113, p. 104116. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104116>.

Mäkinen, M.J. (2007) 'Colorectal serrated adenocarcinoma', *Histopathology*, 50(1), pp. 131–150. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02548.x>.

Nagtegaal, I.D. *et al.* (2020) 'The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system', *Histopathology*, 76(2), pp. 182–188. Available at: <https://doi.org/10.1111/his.13975>.

Qu, Q. *et al.* (2023) 'Tumor budding and the prognosis of patients with metastatic colorectal cancer: a meta-analysis', *International Journal of Colorectal Disease*, 38(1), p. 141. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00384-023-04423-8>.

Rames, J., Bencko, V. and Valenta, Z. (2007) 'Rizikové faktory prostředí a \vzivotního stylu u kolorektálního karcinomu. Dotazníkové \vsetření', in.

Rawla, P., Sunkara, T. and Barsouk, A. (2019) 'Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors', *Gastroenterology Review*, 14(2), pp. 89–103. Available at: <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>.

Shamsuddin, A.M., Phelps, P.C. and Trump, B.F. (1982) 'Human large intestinal epithelium: Light microscopy, histochemistry, and ultrastructure', *Human Pathology*, 13(9), pp. 790–803. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(82\)80075-0](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(82)80075-0).

Siegel, R.L. *et al.* (2020) 'Colorectal cancer statistics, 2020', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(3), pp. 145–164. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.21601>.

Siri, S. *et al.* (2020) 'The Macro- and Micro-Mechanics of the Colon and Rectum I: Experimental Evidence', *Bioengineering*, 7(4), p. 130. Available at: <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040130>.

Sobin, L.H. *et al.* (eds) (2010) *TNM classification of malignant tumours*. 7th ed. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.

Spencer, N.J., Kyloh, M. and Duffield, M. (2014) 'Identification of Different Types of Spinal Afferent Nerve Endings That Encode Noxious and Innocuous Stimuli in the Large Intestine Using a Novel Anterograde Tracing Technique', *PLoS ONE*. Edited by Y. Tache, 9(11), p. e112466. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112466>.

Veettil, S.K. *et al.* (2021) 'Role of Diet in Colorectal Cancer Incidence: Umbrella Review of Meta-analyses of Prospective Observational Studies', *JAMA Network Open*, 4(2), p. e2037341. Available at: <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2020.37341>.

Wang, T.C. *et al.* (2022) *Yamada's Textbook of Gastroenterology, 3 Volume Set*. Wiley. Available at: <https://books.google.cz/books?id=yWaRzgEACAAJ>.

Watters, D.A.K. and Smith, A.N. (2005) 'Strength of the colon wall in diverticular disease', *British Journal of Surgery*, 77(3), pp. 257–259. Available at: <https://doi.org/10.1002/bjs.1800770308>.

Zlobec, I. *et al.* (2020) 'Are tumour grade and tumour budding equivalent in colorectal cancer? A retrospective analysis of 771 patients', *European Journal of Cancer*, 130, pp. 139–145. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.02.007>.

8 Seznam tabulek a obrázků

Tabulka č. 1: Vyhodnocení tumor (T)	22
Tabulka č. 2: Vyhodnocení Node (N).....	22
Tabulka č. 3: Vyhodnocení Metastasis (M).....	23
Tabulka č. 4: Vyhodnocení Grade (G).....	24
Tabulka č. 5: Hodnocení TB	33
Tabulka č. 6: Vyhodnocení výsledků	35
Tabulka č. 7 Tabulka č. 7: Shoda hodnocení TB mezi imunohistochemickým barvením a barvením hematoxylinem a eosinem	39
Tabulka č. 8: Hodnocení a shoda tumor gradu a TB	40
Obrázek č. 1: Tlusté střevo – intestinum crassum (Zdroj: www.is.muni.cz)	8
Obrázek č. 2: Struktura tlustého střeva (Zdroj: www.mdpi.com)	11
Obrázek č. 3: Časový vývoj incidence a mortality (Zdroj: www.uzis.cz).....	12
Obrázek č. 4: Věková struktura populace pacientů (Zdroj: www.svod.cz).....	13
Obrázek č. 5: Incidence zhoubných nádorů kolorekta pro obě pohlaví v mezinárodním srovnání (Zdroj: kolorectum.cz)	16
Obrázek č. 6: Rozložení věkových kategorií u kolorektálního karcinomu (Zdroj: www.uzis.cz)	17
Obrázek č. 7: Popis vyhodnocení TB (Zdroj: studie Lugli et al., 2017).....	34
Graf č. 1: Porovnání věkové skupiny, (Zdroj: vlastní zpracování).....	36
Graf č. 2: Rozdělení grade podle procentuálního zastoupení, (Zdroj: vlastní zpracování)	37
Graf č. 3: TB v procentuálním zastoupení, barvení hematoxylinem a eosinem (Zdroj: vlastní zpracování)	38
Graf č. 4 Graf č. 4: TB v procentuálním zastoupení, imunohistochemické barvení (Zdroj: vlastní zpracování).....	38
Graf č. 5: Shoda hodnocení TB mezi imunohistochemickým barvením a barvením hematoxylinem a eosinem (Zdroj: vlastní zpracování).....	39
Graf č. 6: Shoda mezi TB a tumor gradem (G) (Zdroj: vlastní zpracování).....	40

9 Seznam příloh

Obr. 1: Protokol barvení hematoxylinem a eosinem

Obr. 2: Protokol imunohistochemického barvení s protilátkou proti CK20

Obr. 3: Dobře diferencovaný (G1) kolorektální adenokarcinom.

Obr. 4: Středně diferencovaný (G2) kolorektální adenokarcinom.

Obr. 5: Nízce diferencovaný (G3) kolorektální adenokarcinom.

Obr. 6: Tumor budding v dobře diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu

Obr. 7: Tumor budding ve středně diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu.

Obr. 8: Tumor budding v nízce diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu

Obr. 9: Tumor budding v dobře diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu

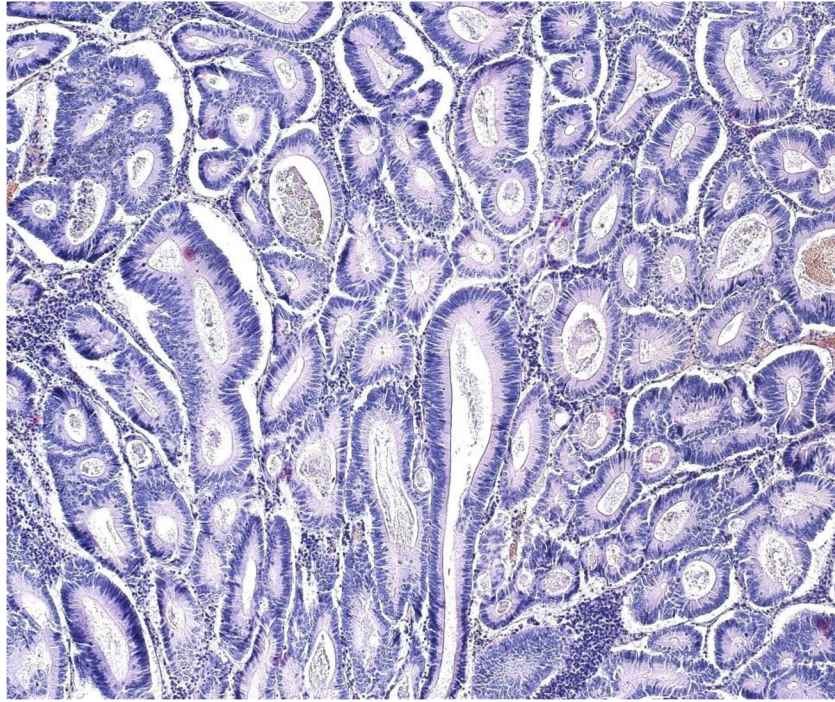
Obr. 10: Tumor budding ve středně diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu.

Obr. 11: Tumor budding v nízce diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu

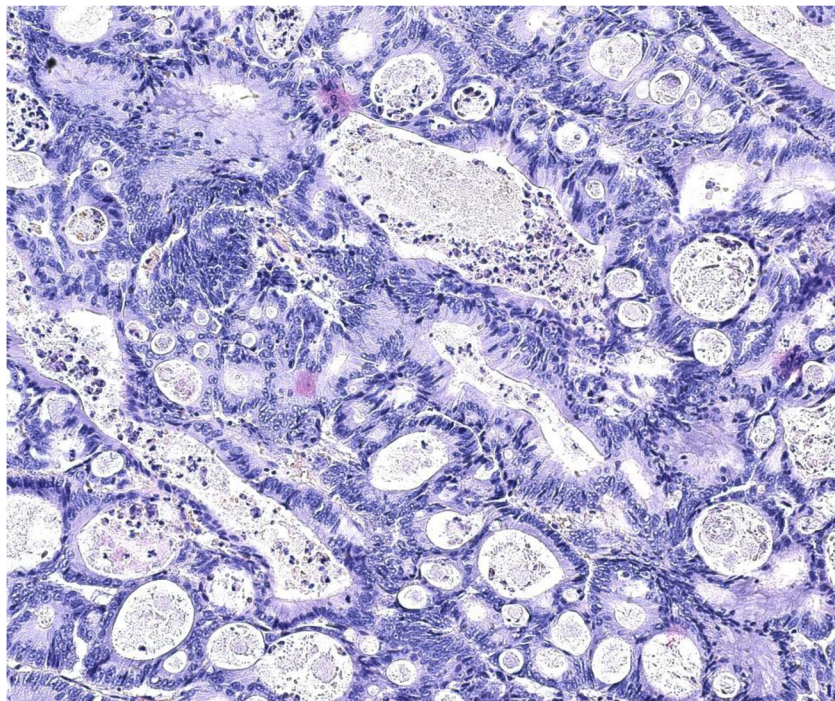
Obr. 12: Metodický list protilátky proti CK20, Ventana Benchmark Ultra

10 Seznam zkratek

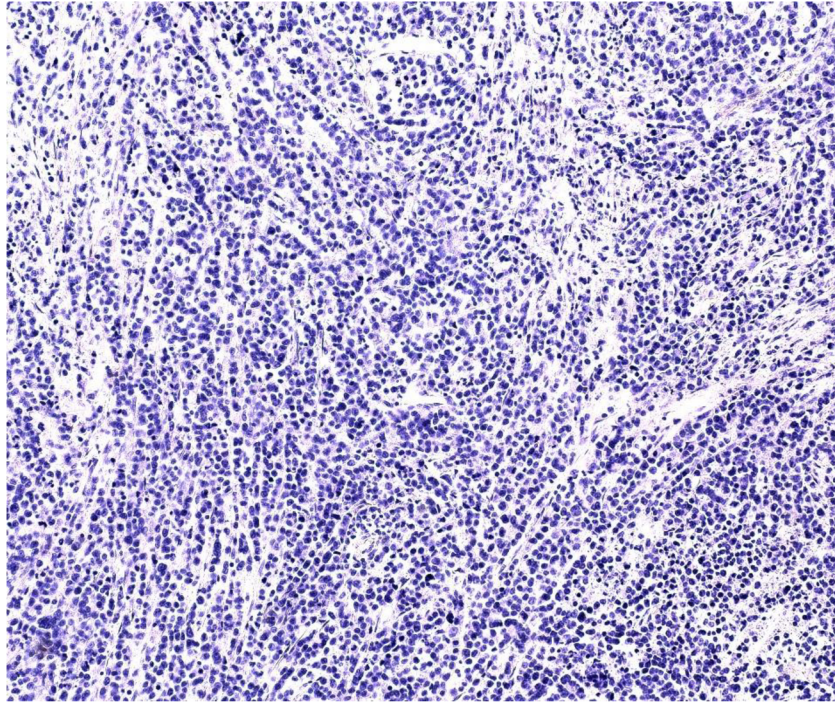
APC	Adenomatózní polypózní coli
CIN	Chromozomální nestabilita
CK	Cytokeratin
CRC	Kolorektální karcinom
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	Epiteliálně-mezenchymální přechod
FAB	Familiární adenomatózní polypóza
H&E	Hematoxylin eosin
HNPPCC	Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
IHC	Imunohistochemie
IPK	Idiopatická proktokolitida
ITBCC	Tumor Budding Consensus Conference
MSI	Mikrosatelitová nestabilita
TB	Tumor budding



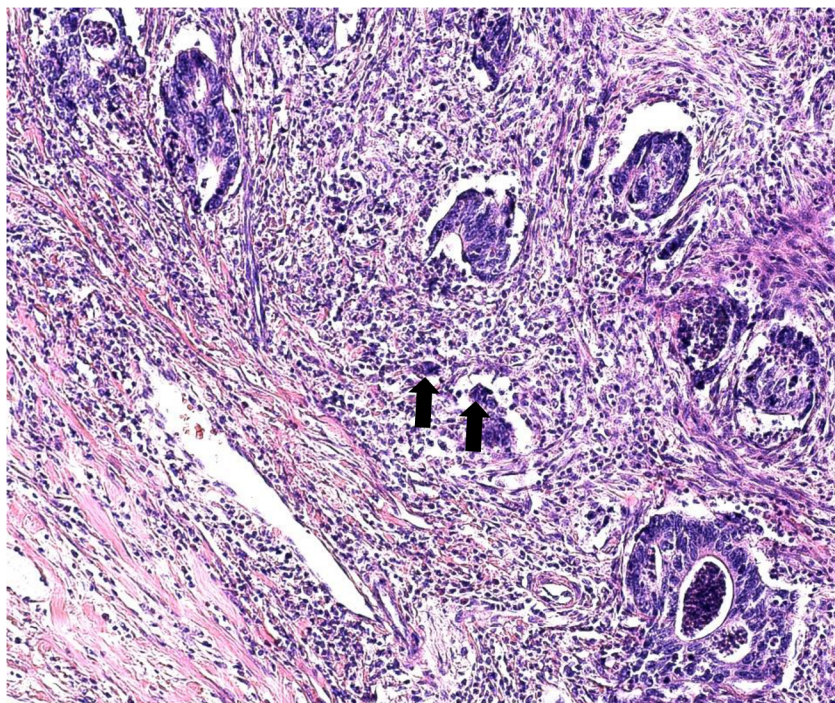
Obr. 3. Dobře diferencovaný (G1) kolorektální adenokarcinom. Patrný jsou struktury glandulárně uspořádaného adenokarcinomu intestinálního typu s low-grade nukleární polymorfií a nízkou mitotickou aktivitou neoplastických buněk (barvení hematoxylin a eosin, zvětšeno 200x).



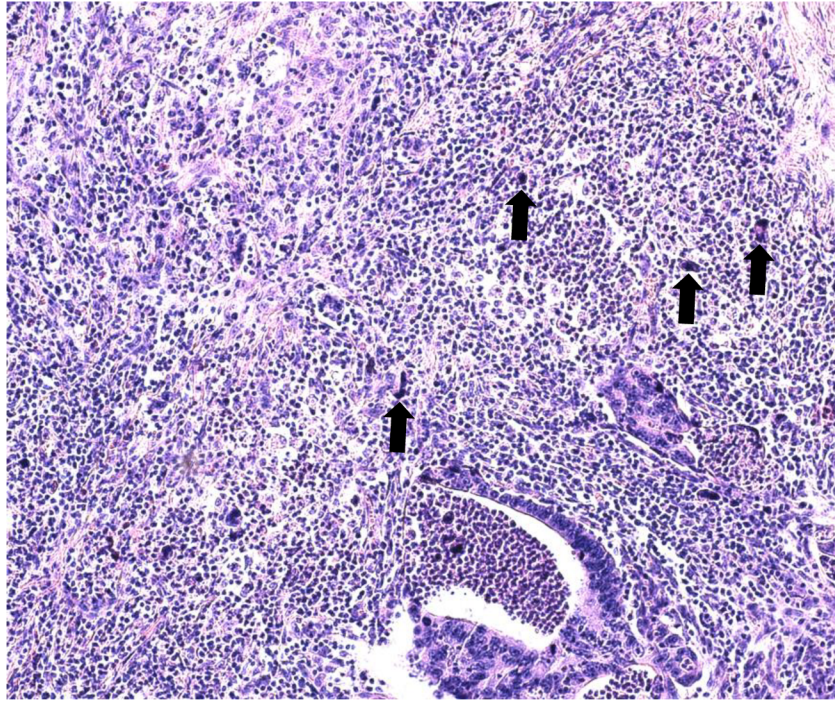
Obr. 4. Středně diferencovaný (G2) kolorektální adenokarcinom. Patrný jsou struktury kribiformně uspořádaného adenokarcinomu intestinálního typu s převažující intermediální nukleární polymorfií neoplastických buněk (barvení hematoxylin a eosin, zvětšeno 200x).



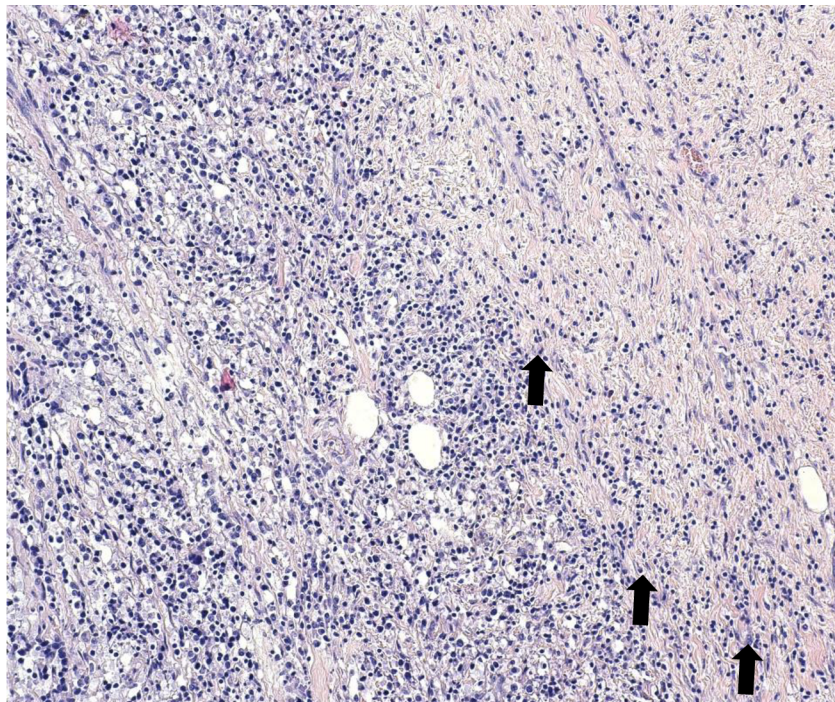
Obr. 5. Nízce diferencovaný (G3) kolorektální adenokarcinom. Patrný jsou struktury solidně a disociativně uspořádaného adenokarcinomu difuzního typu s high-grade nukleární polymorfií neoplastických buněk (barvení hematoxylin a eosin, zvětšeno 200x).



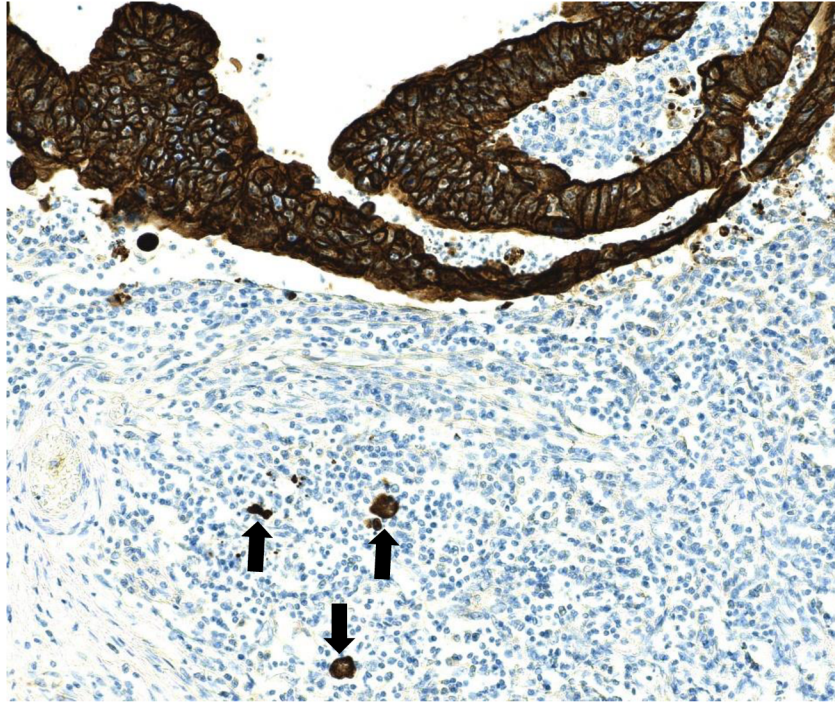
Obr. 6. Tumor budding v dobře diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu. Oblast invazivní fronty nádoru s nízkým stupněm tumor buddingu – přítomny jsou 2 tumor buds (↑) (barvení hematoxylin a eosin, zvětšeno 200x).



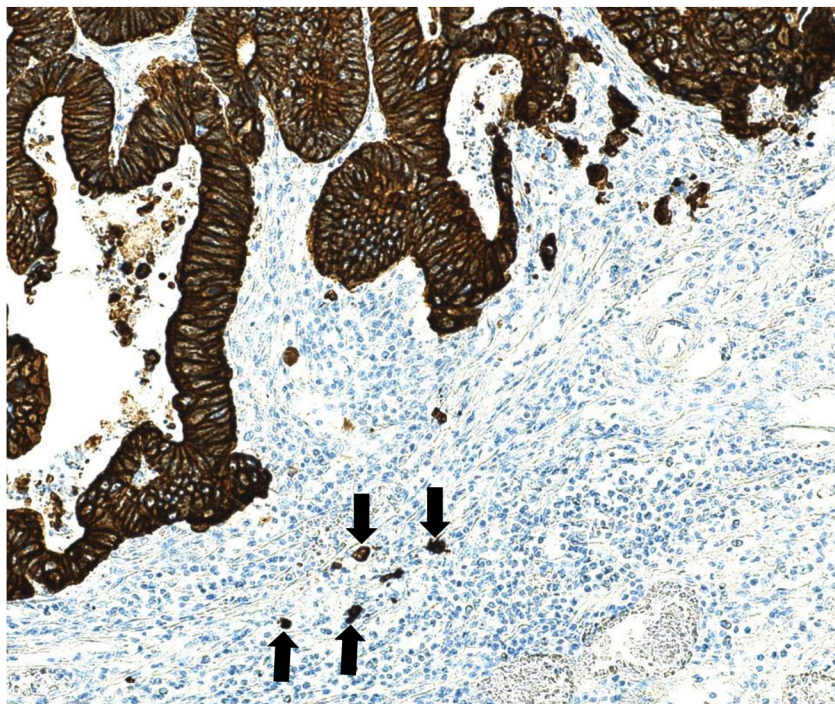
Obr. 7. Tumor budding ve středně diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu. Oblast invazivní fronty nádoru se středním stupněm tumor buddingu – přítomno je 8 tumor buds (↑) (barvení hematoxylin a eosin, zvětšeno 200x).



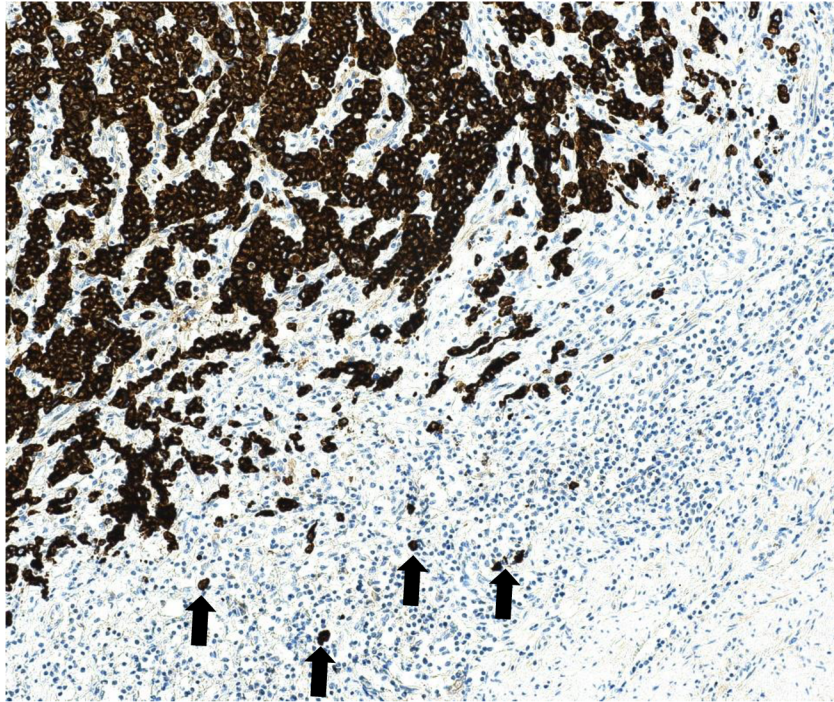
Obr. 8. Tumor budding v níže diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu. Oblast invazivní fronty nádoru s vysokým stupněm tumor buddingu – přítomno je více než 10 tumor buds (↑) (barvení hematoxylin a eosin, zvětšeno 200x).



Obr. 9. Tumor budding v dobře diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu. Oblast invazivní fronty nádoru s nízkým stupněm tumor buddingu – přítomny jsou 3 tumor buds (↑) (imunohistochemie, zvětšeno 200x).



Obr. 10. Tumor budding ve středně diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu. Oblast invazivní fronty nádoru se středním stupněm tumor buddingu – přítomno je 7 tumor buds (↑) (imunohistochemie, zvětšeno 200x).



Obr. 11. Tumor budding v nízce diferencovaném kolorektálním adenokarcinomu. Oblast invazivní fronty nádoru s vysokým stupněm tumor buddingu – přítomno je více než 10 tumor buds (↑) (imunohistochemie, zvětšeno 200x).

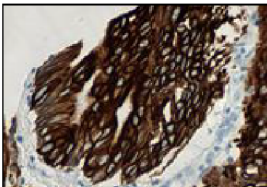
CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) Rabbit Monoclonal Primary Antibody

REF 790-4431

05587760001

IVD

50



Obr. 1. Cytoplazmatické zbarvení adenokarcinomu tlustého střeva protilátkou CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33).

URČENÉ POUŽITÍ

Protilátka CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) Rabbit Monoclonal Primary Antibody je určena pro laboratorní použití při kvalitativní imunohistochemické detekci cytokeratinu 20 (CK20) pomocí světelné mikroskopie v řezech tkáně fixované formalinem, zalité parafinem, které jsou barveny na přístroji BenchMark IHC/ISH.

Tento produkt má být interpretován kvalifikovaným patologem v kombinaci s histologickým vyšetřením,

relevantními klinickými informacemi a správnými kontrolami.

Tato protilátka je určena pro diagnostické použití in vitro (IVD).

SOUHRN A VYSVĚTLENÍ

Protilátka CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (protilátka CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33)) detekuje CK20, (kyselý) cytokeratin typu I, kódovaný genem *KRT20*.^{1,2} Detekce CK20 pomocí IHC je typicky omezena na gastrointestinální epitel, urotel a Merkelové buňky; exprese CK20 je tedy detekována v karcinomu z Merkelových buněk, ve většině případů u uroteliálních karcinomu a kolorektálních adenokarcinomu a v podskupině adenokarcinomu žlučáku.¹⁻⁵ Kromě toho je exprese CK20 pozorována u většiny mucinózních neoplasmů vaječníků a u některých adenokarcinomu slinivky a žlučodu.^{1,2,3} Je třeba poznamenat, že diagnostická využitelnost CK20 se zvyšuje při použití ve spojení s cytokeratinem 7 (CK7).^{1-4,6} Detekce CK20 pomocí imunohistochemie (IHC) s protilátkou CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) může být použita jako pomůcka při identifikaci kolorektálního adenokarcinomu. Tato protilátka může být použita jako součást panelu studií IHC. Vzor barvení je cytoplazmatický.

PRINCIP POSTUPU

Protilátka CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) je králičí monoklonální protilátka namířená proti karboxylovému konci lidského proteinu CK20. Tuto protilátku je možné zobrazit pomocí detekční soupravy *uView Universal DAB Detection Kit* (kat. č. 760-500 / 05269806001). Další informace najdete v metodickém listu k detekční soupravě *uView Universal DAB Detection Kit*.

DODÁVANÝ MATERIÁL

Protilátka CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) obsahuje dostatek reagentie pro 50 testů.

Jeden 5mL dávkovač protilátky CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) obsahuje přibližně 9,5 µg králičí monoklonální protilátky.

Protilátka je naředěna ve fyziologickém roztoku s fosforečnanovým puřhem s obsahem nosičového proteinu a 0.10 % konzervačního prostředku ProClin 300.

Konzentrace specifické protilátky je přibližně 1.9 µg/mL. Pro tento produkt není známa žádná nespecifická reaktivita protilátky.

Protilátka CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) obsahuje rekombinantní králičí monoklonální protilátku jako purifikovaný supernatant buněčné kultury.

V metodickém listu k příslušné detekční soupravě VENTANA naleznete podrobné popisy: principu postupu, materiálu a metod, odběru vzorků a přípravy pro analýzu, postupů kontroly kvality, řešení problémů, interpretace výsledků a omezení.

POTŘEBNÉ MATERIÁLY, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

Barvici reagentie, například detekční soupravy VENTANA a pomocné materiály, včetně sklíček pro negativní a pozitivní kontrolu tkáně, nejsou součástí dodávky.

Všechny produkty uvedené v metodickém listu nemusejí být dostupné ve všech zeměpisných oblastech. Obratě se na místní servisní zastoupení.

Následující reagentie a materiály mohou být při barvení potřebné, nejsou však součástí dodávky:

1. Doporučená kontrolní tkáň
2. Mikroskopická sklička, kladně nabitá
3. Rabbit Monoclonal Negative Control Ig (kat. č. 790-4795 / 06683380001)
4. *uView Universal DAB Detection Kit* (kat. č. 760-500 / 05269806001).
5. EZ Prep Concentrate (10X) (kat. č. 950-102 / 05279771001)
6. Reaction Buffer Concentrate (10X) (kat. č. 950-300 / 05353955001)
7. LCS (Prelitute) (kat. č. 650-010 / 05264839001)
8. ULTRA LCS (Prelitute) (kat. č. 650-210 / 05424534001)
9. Cell Conditioning Solution (CC1) (kat. č. 950-124 / 05279801001)
10. ULTRA Cell Conditioning Solution (ULTRA CC1) (kat. č. 950-224 / 05424569001)
11. Hematoxylin II (kat. č. 790-2208 / 05277965001)
12. Bluing Reagent (kat. č. 760-2037 / 05266769001)
13. Trvalé fixační médium
14. Krycí sklo
15. Automatizovaný podavač krycích sklíček
16. Oblečené laboratorní vylučení
17. Přístroj BenchMark IHC/ISH

SKLADOVÁNÍ A STABILITA

Po přijetí a mezi použitím uchovávejte při teplotě 2–8 °C. Nezmrazujte.

Aby byla zajištěna správná funkčnost reagentie a stabilita protilátky, musí se dávkovač po každém použití uzavřít víčkem a okamžitě umístit ve vodorovné poloze do chladničky.

Každý dávkovač protilátky má stanovenou dobu expirace. Při řádném skladování zůstane reagentie stabilní do data uvedeného na štítku. Po uplynutí data expirace reagentie nepoužívejte.

PŘÍPRAVA VZORKŮ

Pro použití této primární protilátky s detekčními soupravami VENTANA a přístroji BenchMark IHC/ISH jsou vhodné tkáně zpracované běžným způsobem, fixované formalinem, zalité parafinem (FFPE). Doporučeným vhodným fixativem na tkáň je 10% neutrální puřovaný formalin.⁷ Je třeba pořádat řezy o tloušťce přibližně 4 µm a fixovat je na kladně nabitá podložní sklička. Sklička je třeba obarvit neprodleně, neboť antigenost připravených tkáňových řezů se může postupem času snižovat. Pro více informací požádejte místního zástupce společnosti Roche o kopii dokumentu „Recommended Slide Storage and Handling“, který uvádí doporučené postupy pro skladování sklíček a manipulaci s nimi.

Vyšetření neznámých vzorků doporučujeme provádět souběžně s pozitivními a negativními kontrolními vzorky.

UPOZORNĚNÍ A BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

1. Určeno k diagnostickému použití in vitro (IVD).
2. Pouze k odbornému použití.
3. UPOZORNĚNÍ: Federální zákony USA omezuji prodej tohoto prostředku pouze lékařům nebo na jejich objednávku. (Rx Only)
4. Nepoužívejte nad rámec specifikovaného počtu testů.
5. Roztok ProClin 300 se používá v této reagentii jako konzervační prostředek. Je klasifikován jako dráždivý a při styku s kůží může způsobit senzibilizaci. Při manipulaci dodržujte příslušná bezpečnostní opatření. Zamezte kontaktu reagentii s očima, kůží a sliznicemi. Používejte ochranný oděv a rukavice.
6. Kladně nabitá sklička mohou být citlivá na zářivé prostředí, což má za následek nevhodné zbarvení. Požádejte zástupce společnosti Roche o další informace o tom, jak používat tyto typy sklíček.
7. S materiálem lidského nebo živočišného původu je třeba nakládat jako s nebezpečným biologickým materiálem a likvidovat jej v souladu s platnými bezpečnostními opatřeními. V případě expozice je potřeba se řídit zdravotnickými směrniciemi odpovědných orgánů.^{8,9}

8. Tento výrobek obsahuje 1 % nebo méně hovězího séra, které se používá při výrobě protilátky.
9. Zabráňte kontaktu reagensů s očima a sliznicemi. Jestliže se reagensie dostanou do kontaktu s citlivými oblastmi, omyjte zasažené oblasti vydatným množstvím vody.
10. Zabráňte mikrobiální kontaminaci reagensů, mohla by způsobit nepřesnost výsledků.
11. Další informace o používání tohoto prostředku obsahuje uživatelská příručka přístroje BenchMark IHC/ISH a návody k použití všech nezbytných součástí, které naleznete na internetových stránkách dialog.roche.com.
12. Doporučené metody likvidace jsou uvedeny v celostátních a/nebo místních předpisech.
13. Označení produktu bezpečnostními štítky se řídí hlavně pokyny GHS EU. Pro profesionální uživatele je na vyžádání k dispozici bezpečnostní list.
14. Pro nahlášení podezřelých závažných incidentů týkajících se tohoto prostředku se obraťte na místního zástupce společnosti Roche a kompetentní orgány členského státu nebo země, ve které uživatel provozuje činnost.

Tento produkt obsahuje součásti klasifikované následovně podle směrnice (ES) č. 1272/2008:

Tab. 1. Informace o rizicích.

Riziko	Kód	Věta
	H317	Může vyvolat alergickou kožní reakci.
	H412	Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.
	P261	Zamezte vdechování prachů/dýmu/plynů/mhl/paer/aerosolů.
	P273	Zabráňte uvolnění do životního prostředí.
	P280	Používejte ochranné rukavice.
	P333 + P313	Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetření.
	P362 + P364	Kontaminovaný oděv svléknete a před opětovným použitím vyperete.
	P501	Odstraňte obsah/bal předáním do schváleného zařízení k likvidaci odpadu.

Tento produkt obsahuje látku s č. CAS 59965-84-9, reakční hmotu: 5-chlor-2-methyl-2H-isothiazol-3-onu a 2-methyl-2H-isothiazol-3-onu (3:1).

POSTUP BARVENÍ

Primární protilátky VENTANA byly vyvinuty pro použití v přístrojích BenchMark IHC/ISH společně s detekčními soupravami a příslušenstvím VENTANA. Doporučené barvicí protokoly: viz Tab. 2.

Tato protilátka byla optimalizována pro specifické inkubační doby, uživatel však musí výsledky získané pomocí této reagensie validovat.

Parametry automatických procesů lze zobrazit, vyřísknout a upravovat podle postupů uvedených v uživatelské příručce přístroje. Další podrobné informace o postupech imunohistochemického barvení naleznete v metodickém listu k příslušné detekční soupravě VENTANA.

Další podrobnosti o správném používání tohoto prostředku najdete v metodickém listu ke vkladacímu dávkovači (P/N 790-4431).

Tab. 2. Doporučený barvicí protokol pro protilátku CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) s detekční soupravou uView Universal DAB Detection Kit na přístrojích BenchMark IHC/ISH.

Typ postupu	Metoda	
	XT	ULTRA nebo ULTRA PLUS ^a
Odparafinování	Zvoleno	Zvoleno

Typ postupu	Metoda	
	XT	ULTRA nebo ULTRA PLUS ^a
Úprava buněk (odmaskování antigenu)	CC1, standardní	ULTRA CC1, 64 minut, 95 °C
Protilátka (primární)	16 minut, 37 °C	16 minut, 36 °C
Kontrastní barvivo	Hematoxylin II, 4 minuty	
Po kontrastním barvení	Bluing, 4 minuty	

^a Shoda mezi přístroji BenchMark ULTRA a BenchMark ULTRA PLUS byla prokázána pomocí reprezentativních testů.

Vzhledem k různým způsobům fixace a zpracování tkání, jakož i obecnému stavu přístroje a podmínkám laboratorního prostředí může být potřeba prodloužit nebo zkrátit dobu inkubace s primární protilátkou, dobu úpravy buněk nebo dobu předběžného zpracování proteázou v závislosti na jednotlivých vzorcích, použité metodě detekce a preferenci hodnotitele. Další informace o různých fixacích naleznete v příručce „Immunohistochemistry Principles and Advances“ (Zásady a postupy imunohistochemie).¹⁰

NEGATIVNÍ REAGENČNÍ KONTROLA

Kromě obarvení protilátkou CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) by mělo být provedeno obarvení druhého sklíčka s odpovídající reagensii negativní kontroly.

POZITIVNÍ KONTROLA TKÁNĚ

Nejvhodnějším laboratorním postupem je uložit řez pro pozitivní kontrolu na stejné sklíčko jako testovanou tkáň. Při nanášení reagensie na sklíčko pak lze snáze zjistit případné závady. Pro kontrolu kvality je nejvhodnější tkáň se slabým pozitivním zbarvením.

Kontrolní tkáň může obsahovat pozitivně i negativně zbarvené prvky a sloužit pro pozitivní i negativní kontrolu. Kontrolní tkáň by měl být čerstvý vzorek z pily, biopsie nebo operace, připravený a fixovaný co nejdříve stejným způsobem jako testované řezy.

Známe pozitivní kontroly tkání je nutno používat pouze ke sledování správné funkce reagensů a přístrojů, nikoli jako pomůcku ke stanovení konkrétní diagnózy testovaných vzorků. Pokud pozitivní kontroly tkání pozitivní zbarvení nevykazují, je třeba považovat výsledky testovaných vzorků za neplatné.

Příklady tkáně pro pozitivní kontrolu této protilátky jsou normální epitel tlustého střeva a adenokarcinom tlustého střeva.

INTERPRETACE BARVENÍ / OČEKÁVANÉ VÝSLEDKY

Vzor barvení buněk pro protilátku CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) je cytoplazmatický.

SPECIFICKÁ OMEZENÍ

Několik tkání vykazovalo rozptýlené barvení pozadí makrofágů, avšak vzor získaný u makrofágů není podobný specifickému vzoru barvení Cytokeratinu 20 v pozitivních tkáních.

Všechny testy nemusejí být registrovány na každém přístroji. Pro více informací kontaktujte místního zástupce společnosti Roche.

FUNKČNÍ CHARAKTERISTIKY

ANALYTICKÁ VÝKONNOST

Niže jsou uvedeny výsledky provedených testů barvení týkajících se senzitivity, specifity a přesnosti.

Senzitivita a specificita

Tab. 3. Senzitivita/specifita protilátky CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) byla stanovena testováním běžných tkání FFPE.

Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů	Tkáň	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Velký mozek	0/3	Žaludek	3/3
Mozeček	0/3	Tenké střevo	3/3
Vaječník	0/3	Tlusté střevo ^a	36/36
Slinivka	0/3	Játra	0/3
Příštítné tělísko	0/3	Slinná žláza	0/3
Hypofýza	0/3	Ledvina	0/3
Vare	0/3	Prostata	0/3
Šitná žláza	0/3	Endometrium	0/3
Prs	0/3	Děložní hrdlo	0/3
Slezina	0/3	Kostelní sval	0/3
Mandle	0/3	Kůže	1/3
Brzlík	0/3	Nerv	0/3
Kostní dřev	0/3	Píle	0/3
Srdce	0/3	Mezotel	0/3
Jícen	0/3	Močový měchýř	3/3

^a Kategorie tkáně zahrnuje nenádorové zánětlivé nebo chorobné případy.

Tab. 4. Senzitivita/specifita protilátky CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (SP33) byla stanovena testováním řady neoplastických tkání FFPE.

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Glioblastom (mozek)	0/1
Meningiom (mozek)	0/1
Ependymom (mozek)	0/1
Oligodendrogliom (mozek)	0/1
Serózní karcinom (vaječník)	0/1
Mucinózní karcinom (vaječník)	0/1
Neuroendokrinní novotvar (slinivka)	0/1
Adenokarcinom (slinivka)	0/1
Seminom (vare)	0/1
Embryonální karcinom (vare)	0/1
Medulární karcinom (šitná žláza)	0/1
Papilární karcinom (šitná žláza)	0/1

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Duktální karcinom in situ (prs)	0/1
Invasivní duktální karcinom (prs)	0/1
Lobulární karcinom in situ (prs)	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (píle)	0/1
Adenokarcinom (píle)	0/1
Malobuněčný karcinom (píle) ^a	1/1
Karcinom ze skvamózních buněk (jícen)	0/1
Adenokarcinom (jícen)	0/1
Adenokarcinom (tlusté střevo)	54/65
Mucinózní adenokarcinom (tlusté střevo)	13/13
Karcinom z prstenčitých buněk (tlusté střevo)	2/2
Adenom (tlusté střevo)	8/8
Karcinom ze skvamózních buněk (tlusté střevo)	1/5
Mucinózní adenokarcinom (žaludek)	0/1
Adenokarcinom (tenké střevo)	1/1
Gastrointestinální stromální tumor (GIST)	0/3
Adenokarcinom (konečník)	0/1
Hepatocelulární karcinom (játra)	0/1
Hepatoblastom (játra)	0/1
Karcinom z jasných buněk (ledvina)	0/1
Adenokarcinom (prostata)	0/1
Uroteliální karcinom (prostatická močová trubice)	1/1
Leiomyom (děloha)	0/1
Adenokarcinom (děloha)	0/1
Karcinom z jasných buněk (děloha)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (čipek)	0/2
Embryonální rhabdomyosarkom (příčně pruhovaný sval)	0/1
Meianom (řit)	0/1
Karcinom z bazálních buněk (kůže)	0/1
Karcinom ze skvamózních buněk (kůže)	0/1
Neurofibrom (mediastinum)	0/1
Neuroblastom (retroperitoneum)	0/1
Epiteloidní mezotelom (peritoneum)	0/1
Lymfom, NOS	0/4
Uroteliální karcinom (močový měchýř)	1/1

Patologie	Počet pozitivních případů / celkový počet případů
Leiomyosarkom	0/2
Osteosarkom (kost)	0/1
Rabdomyosarkom z vřetenovitých buněk (retroperitoneum)	0/1
Adenokarcinom tlustého střeva (metastatický)	11/14
Mucinózní adenokarcinom tlustého střeva (metastatický)	9/13
Karcinomy buněk typu pečutního prstenu v tlustém střevu (metastatické)	2/2

* Některé případy malobuněčného karcinomu jsou v literatuře uváděny jako imunoreaktivní s anti-cytokeratinem 20.¹¹

Preciznost

Studie preciznosti pro protilátku CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (5P33) byly provedeny za účelem prokázání:

- Preciznosti výsledků protilátky mezi šaržemi.
- Preciznosti během jednoho cyklu a mezi dny na přístroji Benchmark XT.
- Preciznosti mezi přístroji na přístrojích Benchmark XT a Benchmark ULTRA.
- Preciznosti mezi platformami mezi přístroji Benchmark XT a Benchmark ULTRA.

Všechny studie splnily kritéria přijatelnosti.

Preciznost na přístroji Benchmark ULTRA PLUS byla prokázána pomocí reprezentativních testů. Studie zahrnovaly opakovanost v rámci cyklu, mezilaboratorní preciznost mezi dny a mezi cykly. Všechny studie splnily kritéria přijatelnosti.

KLINICKÁ VÝKONNOST

Údaje o klinické výkonnosti relevantní pro zamýšlený účel protilátky CONFIRM anti-Cytokeratin 20 (5P33) byly hodnoceny systematickou literární rešerší. Shromážděné údaje podporují použití prostředku v souladu s jeho zamýšleným účelem.

LITERATURA

1. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry: Therapeutic and Genomic Applications, 5th Edition. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2018.
2. Chu PG, Weiss LM. Keratin Expression in Human Tissues and Neoplasms. *Histopathology*. 2002;40(5):403-439.
3. Moll R, Divo M, Langbein L. The Human Keratins: Biology and Pathology. *Histochem Cell Biol*. 2006;129(6):705-733.
4. Karantza V. Keratins in Health and Cancer: More Than Mere Epithelial Cell Markers. *Oncogene*. 2011;30(2):127-138.
5. Kumar A, Jagannathan N. Cytokeratin: A Review on Current Concepts. *International Journal of Orofacial Biology*. 2018;2(1).
6. Bahrami A, Trung LD, Ro JY. Undifferentiated Tumor: True Identity by Immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(3):326-348.
7. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
8. Occupational Safety and Health Standards: Occupational exposure to hazardous chemicals in laboratories. (29 CFR Part 1910.1450). Fed. Register.
9. Directive 2000/54/EC of the European Parliament and Council of 18 September 2000 on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.
10. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, 6th edition. In: NR Rose, ed. ASM Press; 2002.
11. Chan J, Suster S, et al. Cytokeratin 20 Immunoreactivity Distinguishes Merkel Cell (Primary Cutaneous Neuroendocrine) Carcinomas and Salivary Gland Small Cell Carcinomas from Small Cell Carcinomas of Various Sites. *American Journal of Surgical Pathology*. Feb 1997;21(2): pp226-234.

POZNÁMKA: V tomto dokumentu se jako symbol pro oddělování celého čísla a desetinných míst používá vázý tečka. Oddělovače pro tisíce se nepoužívají. Souhrn bezpečnosti a funkčnosti naleznete zde:

<https://ec.europa.eu/tools/eudamed>

Symbole

Společnost Ventana používá následující symboly a znaky nad rámec uvedené v normě ISO 15223-1 (pro USA: definici použitých symbolů naleznete na internetových stránkách dialog.roche.com):



Číslo položky Global Trade



Jedinečná identifikace prostředku



Označuje subjekt dovážející zdravotnický prostředek do Evropské unie

HISTORIE REVIZÍ

Verze	Aktualizace
D	Aktualizace části Příprava vzorků, Upozornění a bezpečnostní opatření, Postup barvení, Analytická výkonnost a Symboly. Doplněn přístroj Benchmark ULTRA PLUS.

DUŠEVNÍ VLASTNICTVÍ

VENTANA, BENCHMARK, CONFIRM, *ultraView* a logo VENTANA jsou ochranné známky společnosti Roche. Všechny ostatní ochranné známky jsou majetkem příslušných vlastníků.

© 2022 Ventana Medical Systems, Inc.

KONTAKTNÍ INFORMACE



Ventana Medical Systems, Inc.
1910 E. Innovation Park Drive
Tucson, Arizona 85755
USA
+1 520 887 2155
+1 800 227 2155 (USA)

www.roche.com



Roche Diagnostics GmbH
Sandhofer Strasse 116
D-68305 Mannheim
Germany
+800 5505 6606



Obr. 12. Metodický list protilátky proti CK20, Ventana Benchmark Ultra