

Základy histopatologických vyšetřovacích metod

Karel Dvořák, Zdeňka Dvořáková, Josef
Feit, Zdeněk Lukáš, Jana Šmardová

2008

verse 0.61 (12. května 2008)

Předmluva

Tato příručka zahrnuje základní metodické disciplíny, které se používají na ústavech a odděleních patologie ve zdravotnických zařízeních, samozřejmě v různém rozsahu. Je doplněná i o stručný popis laboratoří, v nichž jsou tyto postupy prováděny. Přitom vycházíme z modelu pracoviště autorů tohoto přehledu. Vydání této je ideou a zásluhou profesora Dvořáka, kterému nebylo dopřáno dožít se realizace tohoto projektu. Práce nechce a nemůže nahradit podrobné texty s podrobným popisem barvicích metod, ani učební texty z histochemie, imunohistochemie nebo molekulární patologie.

Komu jsou tyto texty určeny? Mnohé z nich mohou čerpat zaměstnanci ústavů a oddělení patologie, a to jak laboranti, tak i začínající lékaři, kterým neuškodí si zopakovat základy barvicích metod či principy (histo)chemických reakcí. Dále také studenti medicíny a bakalářského směru, kteří ovšem mají základy biochemie v čerstvé paměti. V učebnicích a obecné i speciální patologie jsou mnohé z probíraných metod často citovány, aniž je možno je v rámci diskutované látky blíže vysvětlit. Právě o to se pokouší tato příručka

Jménem autorů *Z. L.*

Obsah

1	Histologické vyšetřovací metody v patologii, autopsie (<i>Dvořák</i>)	8
1.1	Ústav patologie, základní členění	8
1.1.1	Laboratorní komplex ústavu patologie	8
1.1.2	Druhy tkáňového bioptického materiálu zasílaného z klinických pracovišť	11
1.1.3	Odběr a úprava tkáňového materiálu na patologii	13
1.1.4	Chyby vzniklé v procesu bioptických odběrů	15
1.1.5	Bioptická průvodka, transport bioptického materiálu, časové normy na expedici nálezů	20
1.1.6	Informace, které přináší bioptické vyšetření	22
1.1.7	Informace, které přináší bioptické vyšetření nádorů.	23
1.2	Autoptický úsek ÚPA	23
1.2.1	Informace, které přináší autoptické vyšetření, druhy autopsií	24
1.2.2	Organizace autoptického komplexu.	24
1.2.3	Proces autopsie a histologické odběry	26
1.3	Výukový komplex	26
1.4	Pravidla k preparaci biopticky vyšetřovaných orgánů a odběrů.	26
1.4.1	Lymfatické uzliny	27
1.4.2	Žaludek	29
1.4.3	Tenké střevo	30
1.4.4	Tlusté střevo	31
1.4.5	Apendix	34
1.4.6	Plíce	34
1.4.7	Pankreas	35
1.4.8	Játra	37
1.4.9	Ledvina	38
1.4.10	Biopsie dělohy a adnex	40
1.4.11	Ovárium	43
1.4.12	Biopsie varlete	43
1.4.13	Prostata	44
1.4.14	Kosterní sval	45

1.4.15	Kůže	45
2	Histopatologické barvicí metody (<i>Dvořáková</i>)	47
2.1	Histologická barvení	47
2.1.1	Přehledná barvení	47
2.1.2	Elastika	47
2.1.3	Impregnační metody	48
2.1.4	Retikulární vlákna	48
2.1.5	Polysacharidy	48
2.1.6	Lipidy	49
2.1.7	Fibrin, bakterie	49
2.1.8	Amyloid	49
2.1.9	Anorganické látky	49
2.1.10	Pigmenty	50
2.1.11	Plísně	50
2.1.12	Karcinoid	50
2.1.13	MGG — krevní elementy	50
2.1.14	Myofibrily	51
2.1.15	HBs-Ag — australský antigen	51
2.1.16	HP — campylobakter	51
2.1.17	Kresylviolet	51
2.2	Základní barvení v cytologii	51
2.2.1	May Grünwald Giemsa	51
2.2.2	Papanicolaou	52
2.3	Neurohistopatologické metody	52
2.3.1	Barvení tigroidu (Nisslovy substance)	52
2.3.2	Barvení myelinu	52
2.3.3	Znázornění neuroglie	52
2.3.4	Metody na znázornění neuronů a nervových vláken	53
3	Klinická cytologie (cytodiagnostika) (<i>Dvořáková</i>)	54
3.1	Druhy cytologických vyšetření	54
3.2	Cytologická metodika	55

3.3	Cytologická diagnostika, diagnostický skrínig	56
3.4	Cytologická diagnostika děložního čípku	57
3.4.1	Hormonální cytologie	57
3.4.2	Klasifikace Bethesda	58
3.4.3	Kvalifikace skrínérky	59
4	Histochemické metody v bioptické diagnostice (Lukáš)	60
4.1	Fixace a zpracování nefixovaného materiálu	60
4.1.1	Formaldehyd	60
4.1.2	Koagulační fixativa	61
4.1.3	Zalévání a krájení fixované tkáně	62
4.1.4	Hluboké zmrazení tkáňových bloků a zpracování zmrazené tkáně .	62
4.2	Základní histochemické metody	62
4.3	Jednoduché ionální interakce	62
4.3.1	Glycidy a reakce PAS	63
4.3.2	Reakce sacharidů s bazickými barvivy	64
4.3.3	Lipidy	65
4.3.4	Enzymy	67
4.3.5	Nukleové kyseliny	70
4.3.6	Železo	71
4.3.7	Amyloid	71
4.4	Aplikace standardně používaných metod v histochemické laboratoři	71
4.4.1	Průkaz mukopolysacharidů (GAG) v buňkách gastrointestinálního traktu (GIT)	71
4.4.2	Průkaz GAG v nádorech	72
4.4.3	Histochemické vyšetření tenkého střeva při diagnostice malabsorpčního syndromu (MAS)	72
4.4.4	Histochemické vyšetření jaterních punkcí a biopsií	72
4.4.5	Průkaz cholinesteráz ke zjištění aganglionárního segmentu v GIT. .	72
4.4.6	Myozinová Ca ²⁺ ATPáza, fosforyláza, dehydrogenázy a kyselá fosfatáza v myopatologii a u glykogenózy.	73
4.5	Zařízení histochemické laboratoře	73
5	Základy imunohistochemie (Lukáš)	75

5.1	Protilátky	75
5.1.1	Polyklonální protilátky	76
5.1.2	Monoklonální protilátky	77
5.2	Fixace	77
5.2.1	Základy imunohistochemických reakcí	78
5.2.2	Průkaz antigenů in situ	78
5.2.3	Imunohistochemický průkaz sérových protilátek	83
5.3	Zařízení imunohistochemické laboratoře	84
6	Imunohistochemie v bioptické diagnostice (<i>Lukáš</i>)	85
6.1	Cytoskelet, střední filamenta a základní druhy tkání	85
6.2	Cytokeratiny, epiteliální antigeny	87
6.3	Klasifikace cytokeratinů	87
6.3.1	Přítomnost cytokeratinů podle orgánů a tkání	88
6.3.2	Význam detekce cytokeratinů pro bioptickou diagnostiku	92
6.4	Vimentin a mezenchymální deriváty	93
6.5	Antigeny krevních elementů a endotelií	93
6.6	Endoteliální markery, antigeny krevních skupin	95
6.7	Histiocytární markery, histiocytózy	96
6.8	Svalová tkáň	97
6.9	Nervová tkáň	98
6.10	Melanogenní antigeny	100
6.11	Ukazatelé rychlosti buněčné proliferace	100
6.12	Onkogeny, antionkogeny	101
6.13	Praktická aplikace imunohistochemie, příklad postupu v diagnostice nádorů	102
7	Metody molekulární patologie (<i>Šmardová</i>)	104
7.1	Místo molekulárně biologických metod v patologii	104
7.2	Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	104
7.3	PCR	106
7.3.1	Zpětná neboli reverzní PCR (RT-PCR)	107
7.3.2	Kvantitativní PCR	108
7.3.3	PCR sledovaná v reálném čase (real time PCR, online PCR)	109

7.3.4	PCR <i>in situ</i>	109
7.3.5	Nested PCR	109
7.3.6	Multiplex PCR	109
7.4	Kombinace PCR s metodami k určení bodových mutací	110
7.5	Southernův přenos	110
7.6	Northernový přenos	111
7.7	Westernový přenos	111
7.8	Izoelektrická fokusace a dvourozměrná elektroforéza	112
7.9	Průtoková cytometrie	113
7.10	Testování rezistence nádorů k cytostatikům <i>in vitro</i>	114
7.10.1	Získávání a zpracování nádorové tkáně	115
7.10.2	Separace buněk a jejich inkubace s cytostatiky	115
7.10.3	Test MTT	115
7.11	Příklady využití metod molekulární biologie v patologii	116
7.11.1	Stanovení HER2/neu	116
7.11.2	Analýza nádorového supresoru p53	116
7.11.3	Analýza některých svalových proteinů (calpain, dystrophin)	119

1 Histologické vyšetřovací metody v patologii, autopsie

1.1 Ústav patologie, základní členění

Struktura práce *ÚPA*: ÚPA je členěn na 3 základní útvary: laboratorní komplex k vyšetřování tkání, autoptický komplex, výukový komplex. Ústavy patologie jsou konstantní součástí fakultních nemocnic.

Oddělení patologie jsou zřizována v menších nemocnicích, která nemají výukovou část a zpravidla k jejich náplni nepatří výzkumná práce. Mají vždy autoptickou část a laboratoře pro histopatologii a cytodiagnostiku. Ve větších nemocnicích jsou oddělení patologie mohou provádět některé imunohistochemické a histochemické metody, výjimečně i některé metody, které již patří do kategorie molekulární patologie.

Bioptické stanice nemají výukovou a autoptickou složku. Jde menší pracoviště zřizovaná při malých nebo speciálně zaměřených nemocnicích, nebo jde o soukromá pracoviště, která slouží ambulantním zařízením praktických lékařů nebo menším soukromým nemocnicím.

Z didaktických důvodů se v textu přidržíme pracovní náplně ústavu patologie.

1.1.1 Laboratorní komplex ústavu patologie

. Laboratorní komplex patologie je tvořen souborem laboratoří vybavených na analýzu bioptických tkáňových excizí, cytologických odběrů a odběrů tkání z autopsií. Převážnou část laboratorního provozu je bioptická diagnostika, která dnes tvoří přibližně 85% ústavu.

Moderní ústav je vybaven komplexem laboratoří k nimž patří:

- Příjmová laboratoř a komplex histologických laboratoří
- Cytologická laboratoř.
- Histochemická laboratoř
- Imunohistochemická laboratoř
- Laboratoř molekulární patologie

Detašované laboratoře jsou zaměřené metodicky podle potřeb menších nemocničních celků patřících k fakultní nemocnici. Na laboratorní úsek navazuje kancelář k expedici bioptických nálezů, diagnostické pracovny lékařů, knihovna, seminární místnost a různé pracovny podle potřeb speciálního zaměření pracoviště.

Odborná kvalifikace laborantek celého ústavu je vedena tak, aby jednotlivci postupně procházeli různými laboratořemi. Výsledkem je optimální počet široce erudovaných laborantek, které se mohou v různých laboratořích plnohodnotně zastupovat a kvalifikovaně

zajišťovat komunikaci mezi jednotlivými laboratořemi celého laboratorního komplexu. Je to důležité. Vždyť na jedné závěrečné diagnóze se podílí často všechny laboratoře. Vzájemné zastupování je zajištěno také mezi laboranty základního pracoviště a bioptických stanic. Pravidlo zastupování platí pro všechny profese.

Komplex histologických laboratoří První součástí komplexu histologických laboratoří je *příjmová laboratoř*, která registruje veškerý tkáňový materiál zasílaný k vyšetření ve všech laboratořích. Z klinických pracovišť zasílané tkáňové vzorky, části orgánů i celé orgány zde tříděny. Některé vzorky jsou předávány přímo do speciálních laboratoří, většina tkáňového materiálu prochází procesem přikrajování. Přikrajování probíhá ve speciálních ventilovaných přikrajovacích boxech. Tkáně jsou makroskopicky dokumentovány popisem, případně jsou vzorky fotografovány. Následuje cílené vybírání reprezentativních tkáňových excizí a jejich úprava do blokovacích kazet. Při přikrajování tvoří lékař, laborantky a zapisovatel sehraně spolupracují tým s přesně rozdělenými funkcemi. Vše se děje v režii laborantky, která garantuje vyloučení záměny vzorků i optimální uložení tkání v kazetách. Ty jsou pak vkládány do autotechnikonů, kde v průběhu zbytku dne a v nočních hodinách je tkáň automaticky odvodňována a připravena k zalití do parafínu. Součástí histologických laboratoří, histochemické laboratoře a bioptických stanic je metoda peroperačního vyšetření.

V laboratoři pro parafinové zpracování tkání jsou excize zalévány do tvaru parafinových bločků. Laborant dbá na přesné uložení parafínem prosycených excizí do parafinového bloku, aby byla zajištěna správná orientace vzorku při krájení bločků na mikrotomech. Proces krájení a barvení probíhá v histologické laboratoři č. 1, kterou lze přirovnat k ambulantnímu provozu klinik. Laborantky pomocí mikrotomů zhotovují z excizí série několik tisíců mm tlustých tkáňových řezů. Řezy zachycené na podložní skle jsou rychle sušeny v termostatu a vloženy do barvicího automatu kde probíhá základní bavení hematoxylinem a eozinem. Barvení náročnějšími metodami se děje ručně v kyvetách. Po barvení a odvodnění jsou řezy pokryty mediem, přikryty krycím sklem. Vznikne trvalý histologický preparát. Je předán patologovi k mikroskopické diagnostice. Od přikrojení tkání po předání preparátu lékaři trvá celý proces zhotovení standardního preparátu 24 hodin. Analogicky jako bioptické preparáty jsou zhotovovány preparáty z autopsií.

V histologické laboratoři č. 2 jsou zhotovovány preparáty z endoskopických mikroexcizí, z drobných punkčních vzorků z jater, z prostaty a z jiných orgánů. Z těchto odběrů jsou standardně zhotoveny série preparátů barvených několika speciálními metodami. Laboratoř slouží také k odvápnování kostí.

Histochemická laboratoř je speciální laboratoř zaměřená převážně na průkaz enzymů v histologických řezech a na detekci jiných látek v buňce (proteinové komplexy se železem, s mědí, detekce aminokyselin atd.). Na rozdíl od histologických laboratoří pracuje histochemie převážně s nativním materiálem, tj. s tkáněmi bez výchozí formolové fixace. Histologické řezy jsou zhotoveny v kryostatu při teplotě $-20 - 30^{\circ}\text{C}$. Výsledné preparáty jsou vyšetřovány biochemickými metodami upravenými k aplikaci na tkáňový

řez. Reakcí vznikne zbarvený produkt přesně vázaný na buněčné komponenty tkání. Diagnostika je patologem odečtena mikroskopicky. Laboratoř slouží převážně k diagnostice metabolických onemocnění GIT a k diagnostice chorob kosterního svalstva.

Laboratoř pro imunohistochemii a speciální histologii V dnešní patologii je imunohistochemie nezbytnou metodikou pro přesnou onkologickou diagnostiku. Imunohistochemie umí v histologických řezech prokázat desítky antigenů vázaných na buněčné komponenty normálních tkání i nádorů. Metodika používá velký počet definovaných protilátek, které jsou aplikovány na histologický řez. Vázaná protilátka se pak prokáže histochemickou reakcí. Výsledkem je zbarvený produkt, který v mikroskopu ozřejmí přítomnost protilátky, a tedy i hledaný antigen. Imunofenotyp buňky je pro každý nádor dosti charakteristický a napomáhá k diagnóze. Metodika pracuje s parafínovými i se zmrazenými tkáňovými řezy, laboratoř je vybavena speciálním vakuovým a hyperbarickým tkáňovým procesorem a imunostainerem (přístroj automaticky aplikuje na serii řezů naprogramovanou sadu protilátek). V kombinaci se speciálními barvicími metodami je imunohistochemie dnes nezbytná pro hematologickou biopsii, pro pediatrickou onkologii, podílí se na přesné diagnostice onkologické biopsie všech orgánových systémů. Uplatňuje se také v diagnostice metabolických vad a v rozlišování buněčných typů.

Cytologická laboratoř Cytodiagnostika je zaměřena na hodnocení buněčných suspenzí získaných ze sekretů, ze stěrů sliznic, z výpotků, z moči a z nejrůznějších tělních tekutin. Základem hodnocení je cytologický preparát, tj. podložní sklíčko se zachycenými buňkami v jedné vrstvě. Preparát je zhotoven buď jako nátěr nebo jako buněčný koncentrát připravený centrifugací na speciálním přístroji „cytospinu“. Některé materiály jsou zalévány do parafínu a vyšetřeny jako histologický preparát. Metodika poskytuje cenné informace hlavně v gynekologii a v pneumologii, je často první metodou volby při podezření na nádorová onemocnění. Laborantky cytodiagnostické laboratoře zhotovují cytologické preparáty a současně jako ci skříněreky se podílejí na diagnostice. Mikroskopicky vyšetřují sestavy preparátů, formulují pro patologa předběžnou diagnózu. V gynekologické cytologii neonkologické nálezy samostatně diagnostikují, onkologické nálezy s předběžnou diagnózou předávají k hodnocení patologovi. K diagnostice je třeba mít potřebné teoretické znalosti a spoustu zkušeností. Pro funkci skříněrek je vyžadována speciálně zaměřená cytologická atestace.

Laboratoř elektronového mikroskopu Metodika polotenkových řezů a řezů pro elektronovou mikroskopii je zcela zvláštní laboratorní disciplínou. Velmi drobné tkáňové fragmenty jsou speciálně fixovány, zalévány do umělých pryskyřic, krájeny diamantovými noži na ultramikrotomu a prohlíženy v elektronovém mikroskopu. Slouží k diagnostice svalové biopsie, k biopsii periferního nervu a některých tumorů.

Laboratoř molekulární patologie V rámci oboru jde o novou disciplínu, bez níž se moderní ústav neobejde. Práce laboratoře je zaměřena na soubor definovaných diagnóz,

jejich počet však stále roste. Na rozdíl od histopatologie používá molekulární patologie metodiky molekulární biologie. Práce laborantek má však řadu styčných bodů s histologií. Standardním postupem jsou metodiky FISH (fluorescenční in situ hybridizace), metoda Western blotting, amplifikaci Her-2/neu a metoda FASAY. Diagnostická informace je odečítána na subcelulární úrovni. Metodiky molekulární patologie vstupují do přesné diagnostiky některých lymfomů, karcinomu prsu, karcinomu močového měchýře a formulují diagnózu některých svalových dystrofií. Počet diagnostických jednotek stanovených v laboratoři molekulární patologie stále roste. Metodiky garantují a provádí přírodovědci.

Detašované bioptické stanice Laboratoře disponují analogickým metodickým vybavením jak je uvedeno v komplexu histologických laboratoří základního pracoviště v Bohunicích. Mohou provádět také některé imunohistochemické metody a pro operační sály vlastní nemocnice zajišťují peroperační biopsii. K dalším metodám posílají tkáně a bloky na základní pracoviště.

1.1.2 Druhy tkáňového bioptického materiálu zasílaného z klinických pracovišť

Chce-li klinik přesné informace od patologa, musí také sám poskytnout patologovi přesné informace o pacientovi. Ve většině případů je dostačující uvést klinické údaje na žádanku, v nejasných případech je optimální osobní komunikace patologa a klinika.

Tkáňový materiál z klinických oddělení prochází nejprve příjmovou laboratoří, kde je registrován a tříděn do jednotlivých laboratoří. Do příjmové laboratoře přichází různé typy tkáňových vzorků.

Standardní diagnostické bioptické odběry Cílem chirurgického výkonu je odběr tkáně s předpokládanou patologickou změnou. K nejčastějším diagnostickým odběrům patří: excize kožních afekcí, odběr lymfatických uzlin, excize topograficky určených změn měkkých tkání, orgánové excize z ohraničených procesů, orgánové excize z difúzních procesů, kostní trepanobiopsie, nejrůznější mikroexcize odebrané endoskopicky.

Bioptické odběry provedené jako součást terapeutické operace Odběr je proveden jako součást indikované operace. S přihlédnutím k nálezům, který chirurg pozná v průběhu operace jsou odebírány cílené excize z patologicky změněných míst, jsou prováděny parciální resekce orgánů nebo odnímány celé orgány, které jsou pak biopticky vyšetřovány. Operační materiál je přenášen na patologii nativní nebo fixovaný. Zasílání materiálu vyžaduje dodržování pravidel, která mají své zvláštnosti pro jednotlivé orgány či systémy. Viz níže „pravidla pro bioptické vyšetřování orgánů“.

Peroperační biopsie (odběr pro kryostatové rychlé vyšetření). Poskytuje chirurgovi rychlou informaci nutnou pro optimální pokračování probíhající operace a v některých případech i diagnózu pro okamžitou celkovou terapii. Patomorfologické vyšetření většinou rozhoduje mezi benigním a maligním procesem, často může proces přesně pojmenovat. U jednoznačných malignit potřebuje chirurg vědět, zda byl tumor excidován celý (*in sano*). Výsledek peroperačních vyšetření usměrňuje významně další operační postup. Například při operaci plic pro ložisko v plicním parenchymu neznámé biologické povahy provede chirurg nejprve diagnostický odběr z ložiska a čeká na výsledek peroperačního vyšetření. Pokud se jedná o benigní proces, může být operace ukončena prostou excizí nebo exstirpací. V případě maligního nádoru následuje lobektomie. Analogická situace je u většiny orgánových systémů.

Po předání excidovaného materiálu patologovi následuje úprava vzorku a technické zpracování kryostatovou metodou, což trvá 10 – 15 minut. Čas nutný ke zhodnocení připraveného vzorku patologem a formulování peroperační diagnózy se pohybuje od 1 minuty po 15 minut, podle složitosti nálezu.

Je důležité zdůraznit! *Pokud by se od výsledku peroperační biopsie neodvítel další operační postup, nemá být kryostatové vyšetření požadováno* (což klinik často, z prosté profesionální zvědavosti, dělá). Zmrazením se vždy excidovaná tkáň částečně poškodí. To komplikuje následný parafinový proces. Ten je pro formulaci definitivní biopstické diagnózy nezbytný. V průběhu operace je třeba zajistit možnost komunikaci patologa s operátorem (mobilní telefon či jiný způsob).

Punkční biopsie Velmi drobné tkáňové vzorky jsou odebrané speciální punkční biopstickou jehlou. Punkční biopsie jsou dnes nedílnou součástí diagnostiky onemocnění jater, ledvin, prostaty, štítné žlázy, mléčné žlázy i jiných orgánů. Odebraná tkáň je ihned vložena do fixačního roztoku. Pokud je předpokládáno metabolické onemocnění, je nezbytné, aby klinik postup nakládání s materiálem předem s patologem dohodnul. Punkční biopsie ledvin je standardně vyšetřována elektronovým mikroskopem a imunohistochemicky, k fixaci slouží roztok glutaraldehydu. Část punkce je vyšetřována imunohistochemicky z kryostatových řezů nativní tkáně. V některých případech je nutné vyšetřit nativní tkáň s použitím histochemie. Nativní punkční válečky jsou po odběru položeny na kus suchého CO₂ v širokohrdlé termosce.

Endoskopické biopsie. Jsou dnes konstantní součástí většiny endoskopických vyšetření (bronchoskopie, gastrokopie, endoskopické vyšetření pankreatu, kolonoskopie, mediastinoskopie, cystoskopie, kolposkopie, laparoskopie). Postupy technického zpracování jednotlivých endoskopických odběrů mají své zvláštnosti pro každý orgán (velikost vzorku, počet odběrů a jiné).

Punkční cytologická biopsie Tenkou jehlou je aspirováno z několika míst patologického ložiska malé množství tkáně. Aspirát obsahuje krev a tkáňovou tekutinu se suspendovanými jednotlivými buňkami a buněčnými trsy, případně velmi drobné kousky tkáně.

Materiál je vystříknut v kapkách na podložní skla. Nátěry jsou zhotoveny analogicky jako krevní nátěry. Malé kousky tkáně jsou fixovány ve formolu a zpracovány histologicky. Punkční cytologická biopsie je nejvíce používána k vyšetření rezistencí prsu, štítné žlázy a prostaty.

Cytologické otisky Jsou doplňkem histologického vyšetření. Dnes jsou stále častěji používány v metodice molekulární patologie. Jsou také významným doplňkem vyšetření lymfatických uzlin. Metodika je jednoduchá. Řeznou plochu vyšetřované tkáně položíme (otiskneme) na odmaštěné podložní sklo. Z jedné řezné plochy lze většinou udělat 2 informativní otisky. Zaschlé otisky jsou předány patologovi souběžně s tkáňovým materiálem.

Odběry pro enzymatická vyšetření Jsou doručeny v nefixovaném stavu a dále zpracovány v histochemické laboratoři. Slouží k diagnostice enzymopatií trávicí trubice, některých vzácnějších metabolických chorob, a k diagnostice chorob kosterního svalu. Před odběrem se klinik předem domlouvá s patologem o způsobu odběru excize a způsobu doručení vzorku.

Odběry pro molekulární patologii Jde o speciální odběry i o součásti vyšetření standardních odběrů. Podrobnosti jsou uvedeny v odděleném textu.

1.1.3 Odběr a úprava tkáňového materiálu na patologii

Tkáňové materiály (bioptické odběry a orgánové resekáty) doručené do příjmové laboratoře patologie jsou v nativním (nefixovaném) stavu nebo jsou již vloženy do fixační tekutiny. Diagnostický proces začíná přikrajováním (preparací) materiálu. Patolog preparuje zaslanou tkáň, makroskopicky ji hodnotí, nalezené informace diktuje do průvodky, případně provede obrazovou dokumentaci. Hlavním smyslem preparace je cílených odběr excizí pro celý komplex histopatologických metod. Preparace tkání je vedena podle ustálených konvenčních schémat (viz níže). Její součástí je makroskopická registrace nalezených změn, registrace váhy a rozměrů, vyhledávání a odběr lymfatických uzlin i shromažďování údajů pro TNM klasifikaci. Tkáně jsou preparovány ve speciálních ventilovaných boxech. Boxy zamezují vdechování toxických par fixačních tekutin. Excize spolupracující laborant vkládá do kazet, kazety a jednotlivé excize označí čísly. Proces přikrajování musí přesně organizován, nesmí dojít z záměně excizí!

V nemocnici s patologií jsou z operačních sálů tkáňové resekáty předávány patologům zpravidla nativní (nefixované). Patolog při preparaci nativní tkáně snadno vyhledává uzliny a sám volí optimální fixační tekutinu pro standard nebo imunohistochemii, pro elektronovou mikroskopii, případně provede explantační odběr pro tkáňové kultury, vybere bloky pro vyšetření metodou zmrazených řezů, v indikovaných případech udělá otisky pro cytologické hodnocení, provede odběry pro metody molekulární patologie, případně i odběry pro mikrobiologická vyšetření.

Postupy patologa při preparaci fixovaných tkání jsou analogické jako při preparaci tkáně nativní, možnosti využití některých metodik z fixovaného vzorku jsou limitované. Některé metody z fixované tkáně nelze provést vůbec.

Základní (standardní) histologické vyšetření Úvodním a současně základním postupem je metodika zalévání tkání do parafínových bloků, krájení bloků na mikrotomu, zhotovení mikroskopických preparátů pomocí barvicích metodik. Řezy nebo nátěry jsou standardně barveny hematoxylinem-eozinem, podle potřeby pak dalšími metodami na znázornění vaziva, pigmentů, buněčné cytoplazmy, nervových buněk a vláken. Součástí standardního vyšetření jsou také některé histochemické metody a vyšetření tkání v přehledných velkoplošných histotopogramech. Nejméně v 65 % případů lze bioptickou diagnózu uzavřít ze standardního vyšetření.

Ze základního vyšetření rozliší bioptik nádorový proces od pseudotumorů a jiných nenádorových změn, odliší většinu benigních nádorů od nádorů maligních, odliší hyperplazie od dysplazií, rozliší typy prekanceróz. U maligních nádorů určí míru diferenciaci či dediferenciaci neboli gradus (grading), případně i T či N stádium tumoru. Pokud byl patologovi dodán celý preparát, lze většinou rozpoznat, zda byla excize provedena až do zdravé tkáně a zda nádorové ložisko bylo vyjmuto celé (stádium nádoru).

Vyšetření ve zmrazených řezech Metoda slouží standardně peroperační biopsii, jak bylo výše uvedeno. Vyšetření tkáně zmrazenými řezy je nezbytné pro detekci většiny enzymů, tuků a látek rozpustných v tucích a pro provedení některých imunohistochemických metod. Nefixovaná tkáň je rychle zmrazena položením na předmražený kovový stolek, proudem kyslíčnicku uhličitého, nebo ponořením do kapalného propan-butanu. Tkáňové bloky jsou krájeny v kryostatech na předchlazeném mikrotomu, řezy zachycovány na podložní skla, vkládány do fixační tekutiny a dále barveny nebo zpracovány různými metodami. Standardně jsou zmrazené řezy používány k diagnostice metabolických svalových onemocnění, malabsorpčních onemocnění tenkého střeva, k diagnostice megakolon.

Trepanobiopsie Vyšetření kostní dřevě je nedílnou součástí diagnostických postupů v onkologii a hematologii. Jde především o choroby krvetvorby a lymfatické tkáně, menší měrou i o solidní nádory, zvláště dětského věku.

Trepanbiopsie přináší následující důležité informace: Výjimečnými nálezy jsou tesaurismózy (m. Gaucher, m. Niemann-Pick), selektivní poruchy vyžívání — „pure red cell aplasia“ apod. Ke vzácným diagnózám patří i histiocytosis X, systémová mastocytóza a další. Konečně, kostní dřevě může být vyšetřována i u pacientů po transplantaci kostní dřevě (autologní i allogenní), jednak pro suspektní relaps, jednak pro posouzení příhojení transplantátu. Literatura v tomto ohledu uvádí po allogenní transplantaci poruchy v architektuře tkáně a varuje před možnou záměnou s MDS, naše omezená zkušenost zatím tyto změny nezaznamenala.

Obvykle je k histologickému hodnocení odeslán váleček houbovitě kosti obsahující dře-

ňové prostory (trepanobiopsie). Lze však s výhodou vyšetřovat i drobné částice dřeně vyplavené krví z rány po trepanobiopsii či sternální punkci. Tyto „vločky“ mohou být zaslány jako součást velkého krevního koagula, v němž jsou řídce rozptýleny, nebo raději před sražením aspirované krve koncentrovány na jedno místo Petriho misky a takto separovány od nadbytečných erytrocytů a posléze vloženy do fixativa. Tak či tak mohou být ve většině případů plnohodnotnou náhradou trepanobioptického válečku. Jsou-li zaslány spolu s ním, zvyšují diagnostickou výtěžnost vyšetření a někdy také suplují nekvalitně odebraný trepanát. Místem odběru je obvykle spina iliaca posterior superior, u obézních osob je doporučována spina iliaca anterior superior. Velikost válečku je zásadním a limitujícím faktorem ovlivňujícím kvalitu diagnostiky. Literární údaje hovoří o minimální požadované ploše tkáňových řezů 30 m^2 , což při síle 2 mm značí délku vzorku nejméně 15 mm.

Metody trepanobiopsie Tradičním a nejdostupnějším způsobem je fixace formolová (formalínová), která je i metodou volby pro vzorky kostní dřeně. Trvání 24 h je u malých objemů tkáně plně dostačující. U materiálů obsahujících kostní tkáň musí následovat dekalifikace. Trepanobioptický váleček je dále zpracováván v rámci parafinového procesu a následuje barvení řezů přehlednými barvenými — hematoxylinem a eosinem a také May-Grünwald-Giemsovým barvením. Obvykle jsou aplikovány i metody další — impregnace retikula např. Gömöryho metodou, barvení na kolagenní vlákna dle Van Giesona či Massonovým trichromem, PAS reakce, chloracetátová reakce (enzymová histochemie) prokazující buňky patřící k neutrofilní řadě a také mastocyty. V mnoha ohledech je nenahraditelná metoda imunohistochemie. Jde o určitou analogii imunofenotypizace buněčných suspenzí průtokovou cytometrií. Hledaný antigen se prokazuje monoklonální protilátkou in situ. Zásadní informací je, na jaké buňce či dokonce buněčné struktuře (jádro, plazma, membrána) se nachází. Výsledná hodnocení je tedy kombinací imunofenotypu a morfologie.

Na jednom řezu je možno v rutinním provozu detekovat jen jeden antigen, průkaz koexpresie (např. CD20+ CD5+ charakterizující B-CLL a lymfom z plášťových buněk) může tedy být u minoritně zastoupené populace problematický až nemožný. Nutno poznamenat, že po fixaci jsou mnohé antigeny zničeny a nelze je v už nijak prokazovat (například CD13, CD33). I tak je ale spektrum prokazatelných antigenů determinant dosti široké a umožňuje přesnou diagnostiku většiny patologických odchylek. Z dobře odebraného válečku lze při šetrném zacházení připravit desítky řezů a ty barvit či aplikovat libovolné protilátky.

Pro úplnost uvedme, že parafinový materiál může sloužit i pro vyšetření DNA a s omezením i RNA pomocí PCR, a to i po mnoha letech archivace — t(14,18) nebo k detekci genomových aberací pomocí FISH — t(11,14). Elektronová mikroskopie je používána při průkazu vlasatobuněčné leukemie a případně při vyšetření střádacích poruch metabolismu.

1.1.4 Chyby vzniklé v procesu bioptických odběrů

- zbytečně malý objem bioptického vzorku
- mechanické zhmoždění tkáně nešetrnou manipulací
- zpožděné dodání nativního vzorku na patologii
- použití malého množství fixačního roztoku na velký objem tkáně

- chybní prefixační úprava nebo špatná prefixační úprava odběru při posílání fixované tkáně, špatné označení vzorku stehy a jinými značkami určujícími topografii změny určené k cílenému bioptickému vyšetření
- nedostačující údaje v průvodce
- zaslání různých topografických odběrů v jedné fixační nádobce
- absence předchozí domluvy s patologem při odběru pro speciální bioptická vyšetření

Technická dokonalost postupu při odběru materiálu je předpokladem spolehlivé histopatologické diagnózy. Špatně odebraná nebo zhmožděná tkáň výrazně omezí nebo i znemožní bioptickou diagnózu, vystavuje pacienta opakovanému výkonu, komplikuje či znemožní včasnou adekvátní terapii. Chce-li klinik přesné informace od patologa, musí také sám poskytnout patologovi přesné informace o pacientovi. Je samozřejmé, že patologovi se dodaný materiál hodnotí tím lépe, čím více informací o klinickém charakteru nemoci od klinika získá. Je nezbytné, aby klinik, který chce co nejpřesnější patomorfologické hodnocení, dodal patologovi všechny důležité informace, které usměrňují použití metodického spektra a jsou pomocným vodítkem při stanovení bioptické diagnózy. V některých případech je dostačující vše podstatné uvést na žádanku, v nejasných případech je optimální osobní komunikace patologa a klinika.

Zbytečně malý objem bioptického vzorku Na objem odebraného materiálu nelze formulovat žádné univerzální pravidlo. Všeobecně platí zásada, že excize má být reprezentativní, tj. co největší při současném úsilí chirurga o co nejmenší poškození pacienta. Odběr tkáně z difúzně postiženého orgánu není problémem. Odběr ložiska je složitější, excize se musí vyhnout nekrotickým úsekům a má zasahovat hlavní část ložiska. Pokud lze odebrat ložisko celé, neměla by chybět i část přilehlé nepoškozené tkáně. Tyto požadavky nelze vždy zcela splnit. Zkušený chirurg se dovede výše uvedenému souboru postulátů potřebně přiblížit. V průvodce vždy uvede údaj o makroskopickém nálezu v místě excize.

Mechanické poškození tkáně Při nešetrné manipulaci vznikají ve tkáni tlakové artefakty. Jádra buněk jsou tmavá, zmenšená, nelze rozlišit mitotické figury od nekrotických a stlačených jader, vazivo homogenizuje, rozlišení malignity od benignity je pak zcela nejisté. Zhmoždění vzniká nejčastěji při používání kovových nástrojů (kompresí peánem, pinzetou ale také při odběru tkáně tlakem skalpelu, žiletky a pinzety při rozkrajování vzorku na menší části). Při chirurgickém zákroku je třeba brát excizi do pinzety nebo peánu za její okraj, za pouzdro, za přilehlou vazivovou tkáň a podobně, nikdy přímo za úsek, který má být vyšetřován. Zde se opět uplatňuje především zkušenost chirurga. Pokud lékař složitým postupem získá punkční váleček z hluboce uloženého ložiska v centru jater, a pak nechá vzorek málo poučenou sestrou přenést pinzetou do fixačního roztoku, je téměř jisté, že biopsie bude neinformativní. Patolog pak musí tkáň opakovaně prokrajovat, situaci složitě hodnotit v různých úhlech řezu a po speciálních metodikách, aby se

alespoň přiblížil ke správnému diagnostickému závěru. Při manipulaci s odebranou excizí již chirurgické nástroje téměř nepoužíváme.

Malé excize uchráníme před tvorbou tlakových artefaktů, když opakované použití pinzety nahradíme přímým vložením do fixačního roztoku v nádobce vhodné velikosti. Při expedici nativního materiálu lze položit materiál na čtvereček skládané gázy namočené do fyziologického roztoku. Materiál na gáze vložíme do transportní nádoby, kterou pevně uzavřeme. Vznikne tak improvizovaná vlhká komora zabráňující vysychání tkáně. Nádobku ihned zašleme na patologii.

Mikroexcize, které nevyžadují topografickou úpravu při fixaci vložíme rovněž přímo do fixačního roztoku. Endoskopické excize sliznic a válečky punkčních orgánových excizí (např. sliznice žaludku, střeva, punkční válečky jater, ledviny, prostaty) se ve fixačním roztoku nepravidelně zkroutí a zhotovení správně orientovaných a spolehlivě diagnostických histologických řezů je pak problematické. Je vhodné, když lékař provádějící slizniční endoskopickou mikroexcizi, položit tkáň spodinou na proužek filtračního papíru navlhčeného ponořením do fyziologického roztoku. Spodina mikroexcize snadno přilne k povrchu filtračního papíru (narozdíl od povrchu sliznice). K rozlišení povrchu sliznice je vhodné používat lupu. K manipulaci se vzorkem na filtračním papíře používáme zásadně injekční jehlu, nikdy pinzetu.

Punkční biopsie Váleček tkáně získaný punkční biopsií (např. játra, ledviny, prostata) je rozestřen do roviny na proužku filtračního papíru smočeného do fyziologického roztoku. Některými autory k manipulaci s válečkem tkáně doporučovaná ostrá dřevěná zubní párátko. Případné přemístění mikroexcize provedeme opatrným „nabráním“ na žiletku nebo také na hrot jehly. Mikroexcize odesílané v nefixovaném stavu (např. pro histochemické vyšetření malabsorpce) položíme na podložní sklo a předáme patologovi ve vlhké komoře (uzavřená nádoba se čtverečkem gázy smočené ve fyziologickém roztoku).

Pozdní dodání nativního odběru na patologii Předání nativního (nefixovaného) materiálu patologovi má být okamžité. Již za 15 minut vznikají ve tkáni artefakty ultrastruktury a postupně se rozvíjí autolýza. Autolýza probíhá v různých tkáních různě rychle. Platí proto zásadní pravidlo. Nativní tkáň odesíláme patologovi hned po odběru, vždy uloženou ve vlhké komoře. *Nikdy neodesíláme tkáň ponořenou ve fyziologickém roztoku!*

Nevhodný postoperační zásah klinika do excidovaných tkání před odesláním na patologii. Chirurg často vyjmuté orgány rozstříhuje a rozděluje různě orientovanými řezy, aby se informoval o makroskopických změnách. V tomto směru má dodržovat tato pravidla:

Pokud posílá chirurg patologovi nativní excize a orgány, pak do excidované tkáně instrumentálně nezasahuje. Je však vhodné a potřebné na zevním obvodu resekatu označit založením stehu lokality, které jsou komentovány v průvodce. Je povinností patologa po-

psat makroskopicky dodanou tkáň, případně provést fotodokumentaci a pokud chirurg chce být více informován, obrátí se na patologa dotazem přímo. Pokud posílá chirurg odebraný materiál ve fixačním roztoku, zasahuje instrumentálně do odebrané tkáně jen podle pravidel pro jednotlivé orgány, které předem dohodl s patologem.

Absence informačních značek na zaslaném materiálu Na resekovaných orgánech nebo na velkých resekcích chirurg má pomocí stehů označit místa, kterým přikládá nějaký zvláštní význam. Jde o místa maximální změny, resekcí linie nebo místa, která chce nějak speciálně vyšetřit. Ke značkování slouží: Založené stehy s konci dlouhými alespoň 6 cm. Stehy mohou být založeny v bezprostřední blízkosti ohraničené změny. K upřesnění většího počtu označených míst lze použít stehy různé barvy. Spínací špendlíky používáme hlavně k označování resekcí linií trávicí trubice. Přesný popis speciální lokality. Například u čípku děložního konstatování, že suspektní léze je v poloze 4 a 9, steh je založen na č. 12 (popis podle hodinových ručiček).

Poškození tkáně vysycháním nebo působením vody Vysychání tkáně je častým zdrojem znehodnocení malých vzorků. Vysychání je velmi rychlé zvláště u punkčních biopsií nebo endoskopických excizi. Vysychání se zrychluje položením excize na suchý filtrační papír nebo na suchou gázu. Prevence takového poškození je jednoduchá: Důsledný zvyk pracoviště okamžitě vkládat mikroexcizi do fixačního roztoku. Při přenášení nativního materiálu na patologii použijeme vždy vlhkou komoru. Do plastové nádoby položíme na dno složenou gázu nebo filtrační papír namočený ve fyziologickém roztoku, nádobu těsně uzavřeme víčkem.

Zásadně nepokládáme excize na suchý filtrační papír nebo na suchou gázu.

Neposíláme excizi vloženou přímo do fyziologického roztoku.

Nativní tkáň se nesmí vkládat do vody ani oplachovat vodovodní nebo destilovanou vodou, která vytváří nežádoucí osmotické artefakty.

Záměna bioptického materiálu Opatření proti záměně na každém klinickém pracovišti má zcela zásadní význam. Může se týkat 2 topografických lokalit od téhož pacienta nebo materiálu od různých pacientů. Záměně předcházíme zcela standardní organizací práce:

Všechny technické pomůcky (nádobky, štítky, formol) jsou připraveny předem.

Důsledně musí být dodržováno pořadí pracovních úkonů: ihned po vložení materiálu do nádoby je nalepen identifikační štítek se jménem pacienta, rodným číslem a pořadovým č. vzorku (případně i s krátkých údajem charakterizujícím vzorek). Nikdy není nalepován vyplněný štítek na nádobku předem. Nikdy nejsou do nádoby vkládány 2 nebo více excizi z různých topografických oblastí (např. névus paže a névus zad). Při případném nalezení malignity je pak problematické určit místo pro reexcizi.

Chyby vzniklé fixačním procesem (převážně formolovou fixací). Úkolem fixačního roz-

toku je zachovat tkáň pro histopatologické vyšetření tak, aby morfologická i biochemická stavba byla co nejvíce shodná se stavem v době odběru. Z řady používaných fixačních roztoků je v patomorfologické diagnostice nejvíce používán formol. Fixuje dobře buněčné i mimobuněčné tkáňové komponenty, je vhodný pro aplikaci imunohistologie. Formol navíc není drahý, je proto také používán ve velkých objemech k fixaci celých orgánů. Formol (formalín) je 40 % roztok plynného formaldehydu. Pro potřebu fixace tkání je ředěn v několika ustálených úpravách.

Malé množství fixačního roztoku na objem fixované tkáně Vkládání objemných excizí nebo resekovaných orgánů do malé nádoby s malým množstvím fixačního roztoku je snad nejčastější chybou. I po 24 hodinách je pak větší část tkáně nefixovaná a znehodnocená autolýzou. Za zajištění správného postupu fixace odpovídá operatér nebo pověřený lékař. Ani zkušená sestra nemůže optimální způsob fixace tkání odhadnout a zajistit. Objem fixační tekutiny má být výrazně větší než objem tkáně. Klasické histologické techniky doporučují až 100 násobné množství. Patomorfologická praxe ukázala, že objem formolu 10× převyšující objem tkáně je dostačující. Při fixaci velkých resektátů a celých orgánů má být objem alespoň čtyřnásobný. Excize k imunohistochemii pak patolog vybírá ze sousedství řezných ploch, které byly v bezprostředním kontaktu s formolem. Vždy je důležité, aby tkáň ve fixačním roztoku „vznášela“. Přístup tekutiny ke tkáni usnadníme podložením tkáně (orgánu) smotkem gázy nebo zavěšením na gázové „přepážce“.

Formol ve fosfátovém pufru (fosfátový formol). Jde o 10 % formol (4 % formaldehyd ve fosfátovém pufru). Výsledný roztok má neutrální pH. Je nejčastěji používaným fixačním roztokem. Návod na přípravu: koncentrovaný formol (tj. 37 — 40 % formaldehyd 100 ml), fosfátový pufr k neutrální reakci: 900 ml. Neutrální pH je vyžadováno k aplikaci histochemických reakcí. Lékárna by měla garantovat, že koncentrovaný formol je skutečně 40 %. Od výrobce může být dodán koncentrát s nižším obsahem formaldehydu (časté u starších roztoků) a koncentrace po zředění již je pro fixaci nedostatečná. Proto je některými pracovišti preferován „silný fosfátový formol“ o dvojnásobné koncentraci. Používání fosfátového pufru je dnes všeobecně doporučováno jako standardní fixace pro potřebu imunohistochemické metody, které se postupně stávají běžným doplňkem řady bioptických vyšetření. Roztok je většinou dodáván již připravený z nemocničních lékáren.

Formol bez pufru. Pokud není imunohistochemické vyšetření očekáváno, je fosfátový formol zbytečný. Zcela dostačující je formol ředěný vodovodní vodou 1:9 (slabý formol) nebo 1:4 (silný formol). K zajištění potřebné koncentrace formaldehydu dáváme přednost silnému formolu.

Formol ve fyziologickém roztoku. Fyziologický roztok má zabránit tvorbě osmotických artefaktů. Je třeba uvést, že osmotické jevy v přítomnosti formolu jsou značně modifikované a formol s fyziologickým roztokem nelze považovat za izotonický. Zvýšená osmotická aktivita však působí všeobecně příznivě především na morfologii malých excizí. Ředění 1:9 (slabý formol) nebo 1:4 (silný formol).

1.1.5 Bioptická průvodka, transport bioptického materiálu, časové normy na expedici nálezů

Vyplnění údajů na průvodce Průvodka je základní formou komunikace klinika s patologem. Průvodka obsahuje: Identifikační údaje pacienta (jméno, rodné číslo, adresa pacienta) a údaje pro pojišťovnu. Odesílatel (adresa, jméno, telefon, podpis klinika). Na tuto adresu je průvodka odeslána. Pokud chirurg chce, aby průvodka byla odeslána také jinému pracovišti, musí tento údaj přesně uvést. Základní údaje pro patologa: předmět vyšetření a lokalizace odběru, trvání nemoci, údaj o předchozím ozařování nebo cytostatické léčbě, údaj o fixačním roztoku, datum a hodina vložení materiálu do fixačního roztoku. Klinická diagnóza, stručný údaj o průběhu onemocnění. Požadovaný způsob vyšetření. Pokud není uveden, jde o standardní postup, vše ostatní již zvolí patolog. Pokud jde o postup speciální, je třeba vše předem dohodnout s patologem. U peroperační biopsie také číslo telefonu, kam má být výsledek sdělen.

Transport nativního materiálu V nemocnicích s vlastní patologií je tkáňový materiál předáván nativní nebo ve fixačním roztoku. Pro nativní tkáň platí, že jsou předány patologovi hned po provedení excize. V žádném případě by doba neměla přesáhnout čas 20 minut. Materiál vložený do fixačního roztoku je nejlépe posílat patologovi průběžně, analogicky jako materiál nativní nebo v konvenčně stanovených intervalech, zpravidla 2 × denně podle předcházející dohody s patologem. V pracovním programu operačního nebo endoskopického sálu musí být zakotvena pravidla transportu: tj. jméno sestry odpovídající za transport, jméno pracovníka (sestra, sanitářka), kteří patologům materiál po provedení excize okamžitě doručí. Zapojení pracovníci mají být náležitě poučeni a zaškoleni, zaškolení má být stvrzeno podpisem u vrchní sálové sestry. Malé nativní excize jsou dopravovány ve vlhkých komůrkách, větší resekáty ve velkých plastických nádobách. Klinik nativní materiál před odevzdáním patologům předem neupravuje (kromě topografických značek nebo šetrných zásahů spojených s odběrem materiálu na mikrobiologické vyšetření). Nádory s fixovaným materiálem jsou přenášeny v plastických kontejnerech (nosičkách), při transportu autem se osvědčují polystyrénové nádoby (tašky) na přenášení mrazených potravin. Při transportu autem je třeba zajistit vodotěsné uzavření nádobek s materiálem a řidič je poučen, že kontejner musí převážet ve svislé poloze.

Transport při peroperační biopsii musí být maximálně rychlý, určená osoba s materiálem vysloveně spěchá! Operatér čeká na výsledek u operačního stolu, podle výsledku bude upraven další průběh operačního výkonu. Excize je přenesena v nádobce upravené jako vlhká komora. Pracovník zajišťující přenesení musí být náležitě poučen o manipulaci s materiálem a znát místo určení. Rychlý transport na řadě pracovišť se děje potrubní poštou.

Transport tkání ke speciálním metodickým postupům Transport nativních uzlin nebo jiných tkání podle volby indikujícího lékaře zajistí nejlépe informovaný klinický lékař, který pak setrvává s patologem i u přikrajování.

Časové relace pro expedici bioptických nálezů Úvodem je třeba informovat, že bioptické vyšetření tkání se děje v soustavě následných kroků, každý krok trvá určitou dobu. Časové intervaly jsou pro standardní vyšetření závazné. Klinik má být o podrobnostech informován, což je uvedeno v bodech následujícího textu.

Peroperační biopsie Časový interval od příjmu do zhotovení preparátu je 15 – 20 minut. Odečtení může trvat 1 – 15 minut. Telefonicky je sdělen výsledek na číslo uvedené na průvodce.

Standardní histologické vyšetření. Pod termín „standardní histologické vyšetření“ jsou zahrnuta vyšetření, která je možné diagnosticky uzavřít bez speciálních histologických, imunohistologických, molekulárních metod a bez opakovaného přikrajování rezervní tkáně. Jedná se o hodnocení excizi z verukózních kožních afekcí, excizi z některých nádorů, z kyretáží, z čípku, tonzily, většina endoskopických excizi z tlustého střeva, ze žaludku, z dýchacích cest a také o histologické hodnocení apendixu, žlučníku a z jiných lokalit. Tyto vzorky jsou po 24 hodinách pobytu ve formolu již dobře zfixované a diagnózu lze uzavřít po základním barvení hematoxilin-eozinem.

Časový průběh úkonů:

Den 0 Po odběru následuje fixace formolem 24 hodin (většinou jde o čas odběru + 24 hodin (v praxi do druhého dne). Podle konvence první 24 hodin je čas patřící klinikovi, čas patřící patologovi se počítá až od manipulace s fixovanou tkání. V indikovaných případech lze dobu fixace úpravou metodiky zkrátit.

Den 1 Čas zahrnuje přikrojení tkáně, umístění excizi do autotechnikonu. Odvodnění a prosycení parafínem trvá přes noc do druhého dne, tedy asi 20 hodin.

Den 2 Druhý den je materiál zalit v parafínovém bloku, krájen, řezy jsou barveny hematoxylin-eozinem v barvicím automatu a hotové preparáty jsou v době mezi 12 – 14 odpolední hodinou předány, (takzvaně „vyneseny“) patologovi k odečtení. V době mezi 14 – 15:30 (14 – 18) je diagnóza odečtena, údaje jsou vloženy do počítače. Od chvíle, kdy je průvodka uzavřena je přístupná pomocí místní sítě klinikovi. Další den ráno (mezi 7:00 – 9:00) jsou vytištěny průvodky a odevzdány na podatelnu. To značí, že doba potřebná pro expedici průvodky klinikovi trvá patologovi 36 – 48 hodin, tedy 2 dny. Tato doba platí pro 60 % biopsií.

Objemný bioptický materiál Tímto se myslí excize větší než 1,5 cm, resekáty žaludku, tlustého střeva, blokové extirpace skupin uzlin, větší uzliny, laryngektomie, plicní lobektomie, hysterektomie a další. Tyto materiály vyžadují, aby vzorky z přikrojené tkáně patologem byly ještě dofixovány dalších 24 hodin. To značí, že k době expedice se připočítá další den. Doba potřebná pro expedici nálezu je o 24 hodin delší. Případné prokrajování a přikrajování rezervního materiálu přidává vždy dalších 24 hodin.

Materiál vyžadující imunohistochemii a další speciální metody. Z hlediska ekonomiky i z hlediska kapacity imunohistochemické laboratoře není možno aplikovat hned širokou skupinu imunohistochemických metod. Aplikace se děje v logickém sledu, pokud po první skupině metodik se nepodaří diagnózu stanovit, pak následuje další skupina pak další. Imunohistochemické metody vyžadují dokonalé vysušení parafínových řezů v termostatu, aplikace protilátek různou dobu od 4 do 16 hodin. Imunohistochemie prodlužuje uzavření diagnózy o dalších 24 – 48 hodin.

Sumace náročnějších postupů vyžaduje dobu několika dnů. Až 95 % biopsií je uzavřeno do 7 dnů. Prodloužení expedice nálezu dohodne patolog s klinikem telefonicky. U indikovaných případů je možné zpracování zkrátit. Zkrácení vyžaduje jiný postup (vakuové zalití do parafínu a jiné manipulace). To se děje u malého počtu případů, vždy po předchozí domluvě klinika s patologem.

1.1.6 Informace, které přináší bioptické vyšetření

Vyšetření odebraného tkáňového vzorku vede k bioptické diagnóze. Diagnózu formuluje kvalifikovaný patolog. Bioptická diagnóza poskytne klinikovi významné informace pro terapii. Nález patologa se vztahuje především ke změnám v místě excize, má proto své limity. Pro postup terapie koreluje klinik bioptický nález s celkovým klinickým nálezem. Při nesouhlasu klinické a bioptické diagnózy konzultuje patologa a domluví další postup. Bioptická diagnóza může přinést tyto informace:

Potvrzení klinické diagnózy Příklad: Klinická dg. je hnisavá cholecystitis, patolog nález potvrdí.

Stanovení jiné nosologické jednotky Bioptická dg. je jiná, než byla dg. předpokládána klinicky. Příklad: Klinik předpokládá např. lymfadenitidu, patolog najde v uzlině lymfom. Klinik předpokládá nádor plic, patolog najde granulom kolem cizorodého materiálu, atd. Klinik předpokládá zánětlivou infiltraci žlučníku, patolog najde infiltruující karcinom.

Biopická dg. formuluje diagnózu u nejasných klinických nálezů Příklad: Klinik zjistí nejasné jaterní změny. Biopická dg. stanoví z jaterní punkce definovanou chorobu (např. sarkoidózu, Wilsonovu nemoc, typ hepatitidy, tumor, atd.).

Pokud je nález v biopsii nevyhraněný uvádí patolog diferenciální diagnózu, uvede výčet jednotek, které jsou pravděpodobné. Další klinické vyšetření pak směřuje k upřesnění klinické dg. Příklad: Klinik předpokládá lymfadenitidu. Patolog najde granulomatózní lymfadenitidu etiologicky nejasnou s pravděpodobností v pořadí: nemoc kočičího škrábnutí, tularémie, jiné zoonózy a vyloučí nádor.

Biopická diagnóza rozpozná nádor a jeho vlastnosti Viz další text.

Bioptická diagnóza může být limitována jen na popis vyšetřovaného vzorku. Příklad: Nález může popsat normální nepoškozenou tkáň. Popsané změny ve vzorku mohou být nespecifické, například jizvení, necharakteristický zánět. Klinik pak musí uvážit, zda odebral vhodné místo a po poradě s patologem případně vyšetření opakovat hned nebo s časovým odstupem.

1.1.7 Informace, které přináší bioptické vyšetření nádorů.

Patomorfologická diagnóza je u většiny pacientů s nádorovým onemocněním základní informací. Od ní se dále odvíjí léčba. Na základě komplexního morfologického vyšetření tkáňového vzorku patolog nádor pojmenuje, určí nozologickou jednotku. Ve standardní onkologické diagnostice je definováno přes 350 diagnóz. Výsledek patomorfologického vyšetření obsahuje také následující doplňující informace o biologické povaze vyšetřeného nádoru:

Informace o růstové aktivitě nádoru (gradus) Informace o rozsahu infiltrace excidovaného orgánu nebo struktur nádorem. Kombinace makroskopického a mikroskopického vyšetření umožňuje většinou rozpoznat rozsah nádorového infiltrátu neboli pTNM stadium jednotlivých morfologicky vyšetřovaných kategorií (T, N nebo M) a zjistit, zda nádor byl vyjmut až do zdravé tkáně.

Informace o tom, zda excidované uzliny jsou infiltrované maligní chorobou nebo ne. Patolog vyšetřuje veškeré dodané uzliny, číselně vyjadřuje kolik uzlin bylo vyšetřených a kolik z nich bylo infiltrovaných.

Při *rebiopsii* provedené s časovým podstupem informuje bioptické vyšetření o změnách v růstové aktivitě nádoru.

Pokud biopsie nevede k jednoznačnému závěru, uvádí patolog *diagnostickou rozvahu* v níž sestaví diagnózy podle pořadí pravděpodobnosti.

Patomorfologické vyšetření informuje také o níže uvedených bodech, které dokreslují biologickou povahu nádoru:

- přítomnost nebo nepřítomnost hormonálních receptorů
- počet mitóz
- míra exprese proliferačních markerů
- ploedita nádorových buněk.

1.2 Autoptický úsek ÚPA

Zdrojem informací pro zhodnocení celého diagnostického a terapeutického procesu. Tvoří dnes přibližně 15 % celkové pracovní náplně patologů. Za odbornou úroveň odpovídá

přednosta (se svým zástupcem pro zdravotnický provoz), za technický provoz odpovídá vedoucí laborantka (s pověřeným sanitářem).

1.2.1 Informace, které přináší autoptické vyšetření, druhy autopsií

Makroskopické a mikroskopické autoptické vyšetření definuje:

- hlavní onemocnění, které vedlo k úmrtí pacienta
- komplikace, které přispěly k úmrtí
- bezprostřední příčinu smrti
- vedlejší méně významné nálezy

Dále podává informace o rozsahu patologických změn, informuje o adekvátnosti terapie, registruje změny, které nebyly diagnostikovány. Diagnostické výsledky jsou formulovány na základě makroskopického nálezu, na základě histologického vyšetření a dalších laboratorních vyšetření. Autopsie je také zdrojem nových poznatků pro diagnostiku, pro terapii i pro potřeby základního výzkumu.

Výsledky autopsie jsou korelovány s klinickými nálezy na klinicko-patologickém semináři. Autopsii indikuje kliník, provádí kvalifikovaný patolog. Autopsie je pravidelně prováděna v dopoledních hodinách za 6 – 24 hodin po smrti, nejdříve může být provedena za 2 hodiny od klinické diagnózy smrti. Celý proces autopsie probíhá při maximálním dodržování pravidel pietního zacházení se zemřelými.

Druhy autopsií Autopsie lze podle indikačních pravidel rozdělit na 3 druhy:

Autopsie klinická: (diagnostická patologie) je prováděna patologie na ústavech (odděleních) patologie nemocnic.

Autopsie soudní: je prováděna soudním lékařem zpravidla na ústavech soudního lékařství u případů s podezřením zavinění smrti třetí osobou nebo u náhlých úmrtí. Většina náhle zemřelých mimo nemocnici a také náhlá úmrtí v nemocnici, když ještě nemohla z časových důvodů být sestavena klinická diagnóza příčiny smrti, jsou autopticky vyšetřována také soudními lékaři.

Autopsie „na věčnou paměť“: je prováděna u významných osobností za účelem registrace údajů, které dokreslí celkový soubor informací o historii zemřelé osobnosti.

1.2.2 Organizace autoptického komplexu.

Autoptický úsek je zpravidla složen z následujících částí:

Místnost pro příjem zemřelých Je vybavena soustavou chladících boxů. Zemřelý jsou uloženi se všemi pravidly piety v samostatných boxech při teplotě 4 stupňů, jeden box má mít chlazení na -10°C pro případné uložení zemřelých při časově oddáleném pohřebním obřadu.

Autoptické sály Jsou vybaveny autoptickými stoly a dalším speciálním vybavením (k uložení nástrojů, fixačních tekutin, odběrových souprav na tkáňové vzorky, na tělní tekutiny atd.). Počet sálů (stolů) je různý podle velikosti nemocnice. V autoptických sálech pracují patologové, sanitáři, dále kliničtí lékaři, kteří přihlíží autopsii.

Speciální autoptický sál Upravený k vyšetřování plodů z předčasně ukončených gravidit (spontánních potratů nebo potratů pro klinicky zjištěnou vývojovou vadu) a ke speciální preparaci orgánů. Na ústavu mohou být další speciální sály pro odběry tkání do tkáňové banky, pro vyšetření zemřelých na prionové infekce a jiné sály se speciálním zaměřením.

Místnost pro úpravu zemřelých po autopsii Slouží k oblékání zemřelých a k dalším úpravám pro pietní obřady. Vše zajišťují autoptičtí sanitáři.

Pietní místnost Slouží pro rozloučení pozůstalých se zesnulým. V současné době stále více pozůstalých upouští od oficiálního obřadu a k rozloučení se zemřelým se děje v nemocnici. Proto se staly pietní místnosti konstantní součástí patologii.

Administrativní místnost Slouží pro zápis autoptických protokolů, pro administrativu v komunikaci s pohřební službou, s matrikou a s pozůstalými.

Základními úředními spisy jsou: list o prohlídce zemřelého (jeho součástí jsou klinické diagnózy, autoptické diagnózy a autoptické diagnózy), podrobné klinické zprávy a autoptický protokol. Protokol diktuje při autopsii patolog, dále zapisuje všechny histologické a laboratorní nálezy a protokol uzavírá souborem všech diagnostických závěrů. Autoptický nález je zasílán klinikovi, slouží ke klinicko-patologickým seminářům, dále jako doklad pro případná soudní jednání. Administrativní záznamy jsou součástí zdravotnické dokumentace. Úmrtní list pro pozůstalé zhotovuje matrika. Lékař, který autopticky zemřelého vyšetřil informuje podrobně pozůstalé.

Prostor pro předání zemřelých pohřební službě Pohřební služba přejímá zemřelého, příjem potvrzuje po přesné identifikaci.

Další součásti autoptického komplexu K autoptickému provozu patří místnosti pro denní pobyt autoptických sanitářů, filtry pro příchod patologů, kliniků a dalších pracovníků na autoptické oddělení, sklady technického materiálu a další různé prostory

k zajištění provozu a s přihlédnutím ke speciálním programům pracoviště (fotodokumentace, rtg přístroj, speciální preparace a jiné).

Stálými pracovníky autoptického úseku jsou autoptiční sanitáři a administrativní pracovník. Sanitáři zajišťují po technické stránce provoz celého úseku, asistují při autopsiích, upravují zemřelé k pietním obřadům. Pro svou práci jsou speciálně školeni. Jeden ze sanitářů je pověřen vedením ostatních a odpovídá za plynulý provoz celého úseku. Vlastní autopsie a speciální diagnostické úkony provádí kvalifikovaný patolog.

1.2.3 Proces autopsie a histologické odběry

Autopsii provádí patolog podle přesně stanovených metodických pravidel uspořádaných tak, aby vyšetření všech orgánových systémů přineslo diagnostické informace. Při autopsii jsou odebírány excize k histologickému a dalšímu laboratornímu vyšetření. Tato vyšetření jsou prováděna stejnými metodami jako bioptické excize.

Zvláštní postup je používán pro vyšetření mozku. Mozek je vyšetřován v nefixovaném stavu po zhotovení přesně orientovaných řezů o tloušťce kolem 1 cm na speciálních makrotomech a z jednotlivých anatomických formací jsou odebírány cílené excize. V některých případech může být mozek fixován celý a odběry jsou prováděny až po několika dnech stejným postupem jako u mozku nefixovaného. Při autopsii je také odebírán materiál k mikrobiologickému a biochemickému vyšetření.

1.3 Výukový komplex

Výuka je soustředěna do samostatného komplexu místností. Skládá se z demonstračního autoptického sálu, z učeben pro semináře a demonstraci histologických obrazů. Slouží k výuce mediků a k výuce studentů bakalářského směru.

1.4 Pravidla k preparaci biopticky vyšetřovaných orgánů a odběrů.

Resekované excize, orgány a orgánové systémy jsou vyšetřovány tak, aby poskytly maximum informací o stavu vyšetřované tkáně. K nim patří:

- diagnóza
- údaj o rozsahu patologických změn
- informace, zda byla patologická změna odstraněna celá, údaj o stavu uzlin regionální oblasti.

Praxe se postupně ustálila na závazných pravidlech postupu preparace odebraných orgánů a resekovaných částí orgánů a o počtu obligátně odebíraných excizí. U nádorů jsou odebírány excize tak, aby informovaly o růstové aktivitě nádoru (gradus, „grading“) a o stádiu („staging“). Popis stádia je významný ukazatel pro prognózu i pro volbu léčby. Gradus se konvenčně charakterizuje čísly 1, 2, 3; u některých orgánů je vypracován podrobnější grading. Gradus stanoví patolog z mikroskopického vyšetření. Stádium stanoví patolog pokud má k dispozici potřebný objem vyšetřovaného orgánů, v ostatních případech gradus stanoví klinik na základě bioptického nálezu a dalších klinických nálezů. Postupy preparací jsou pro pathology závazné, stejně jako pošty odebraných excizí a vyšetřených uzlin. Postupy jsou součástí

speciálních příruček, v našem textu se omezíme na demonstraci nejčastěji užívaných topografií. Text má demonstrovat význam podrobných postupů v histopatologické diagnostice, která při komplexním zpracování přináší přesné údaje. Následující text má praktický význam pro absolventy, kteří se budou věnovat bioptické diagnostice.

1.4.1 Lymfatické uzliny

Pravidla pro bioptické vyšetření uzlin jsou různá podle smyslu a indikace odběru:

Doplňkový odběr Uzlina je odebrána jako součást nebo indikovaný doplněk resekce histologicky dříve verifikovaného tumoru, pseudotumoru, definované zánětlivé afekce. V těchto případech chirurg vkládá uzliny do standardní formalínové fixace. Zpravidla je potřebné rozlišit uzliny podle topografie odběru, (přítomnosti metastáz). Pak je potřebné, aby chirurg vkládal uzliny do oddělených nádobek a na štítku nádobek i v průvodce označil topografii. K technickému zpracování stačí většinou standardní parafinový proces.

Diagnostický odběr Uzlina je odebrána pro stanovení základní diagnózy. Jde většinou o odběr zvětšené uzliny. Vyšetření má stanovit diagnózu (primární nádor uzlin, metastáza, zánětlivé onemocnění, jiný nález. Odběru a celé histologické vyšetření je dosti náročné, liší se podle předpokládané diagnózy, většinou jde o kombinaci zmrazených řezů, histologie, histochemie, elektronového mikroskopu.

Základní informace pro klinika:

- Chirurg při excizi dbá, aby tkáň tlakem nezmoždil. Pokud je to možné vyhýbá se přímé kompresi uzliny. Do nástroje uchopí především řídké vazivo v okolí, u velké uzliny její pouzdro. Tlakové artefakty mění hrubě tvar buněk a mohou znemožnit diagnózu. Při thorakoskopickém a laparoskopickém odběru se chirurg určité traumatizaci nevyhne. Ta má však být vždy minimální a údaj o případném zmoždění je třeba uvést do průvodky. Při vyjímání uzliny ze skupiny zvětšených uzlin nemusí být každá uzlina reprezentativní. V povrchové může být jen reaktivní lymfadenitida, ve hlubší nádor. Je proto potřebné vyjmout reprezentativní část skupiny nebo paketu, to jest 2 nebo 3 uzliny z různé hloubky. Topografický údaj nutno uvést v průvodce. Uzlina je vždy vyjímána celá.
- Pokud je předpokládán infekční původ zvětšené uzliny je třeba, aby chirurg odkrojil sterilně část uzliny k mikrobiologickému vyšetření.
- Pokud není uzlina po vyjmutí bezprostředně předána patologovi je excize vložena ihned do fixačního roztoku, množství tekutiny alespoň 20×převyšuje objem tkáně. Uzlinu do průměru 10 mm vkládáme do fixáže celou, nad 10 mm opatrně rozkrojíme na plátky o tloušťce 3 – 4 mm. Při krájení dbáme, aby nebyla uzlina tlakově poškozena (ostrá nová žiletka, přidržování uzliny háčkovou pinsetou za pouzdro na smotku gázy, krájení ve speciálním makrotomu. Uzlina nesmí před vložení do fixačního roztoku oschnout.
- Pokud není s patologem dohodnuta jiná speciální fixáž vloží chirurg uzlinu do neutrálního formolu (4 % formol, tj. 40 % formol (formalin) ředěný 1:9 (nebo 1,5:8,5) fosfátovým pufrům. Roztok je na požádání dodáván lékárnou. Některé patologie používají vyšší koncentraci formolu (2:4). Pokud je uzlina předána na patologii až další den je doporučováno umístit nádobku s fixující se tkání do chladničky. V některých případech je místo formolu vhodné použít jinou fixáž (viz níže). Postup se pak liší od standardního a musí být vždy předem dohodnut s patologem.
- Výsledek imunohistochemických metod zhoršuje nedofixování tkáně i její přefixování. Optimální doba formolové fixace je 24 – 36 hodin. Delší doba fixace snižuje pozitivní výsledek. Proto je vhodné indikovat odběr na první 3 dny v týdnu. Z ekonomických důvodů není možné na našich patologiích zavádět víkendové služby. Tkáň odebrané koncem týdne musí být z provozních důvodů patologií ponechány ve formolu přes víkend, což je pro imunohistochemii nevýhodné. Imunohistochemické determinanty lze sice blokovat uchováním tkáně v alkoholu, přímý postup je však spolehlivější.

- Pro speciální vyšetření mohou být použity speciální fixační směsi. K nim patří:
 - Neutrální formol: Formalín (komerčně dodávaný 40 % roztok formaldehydu) 100 ml; bezvodý dinatriumfosfát 6,5 g; natriummonofosfát, monohydrát 4 g; destilovaná voda do 1 000 g.
 - Fixační roztok B-5:
 - * Základní roztok: chlorid rtuťnatý 12 g, Na-acetát 2,5 g, destilovaná voda 200 g.
 - * Pracovní roztok: Základní roztok 20ml, formalin 40 % 2ml.
- K vyšetření uzlin jsou také používány fixační roztoky: Zenker, susa, Bouin.
- Dodání materiálu ve formolu na patologii má být nejpozději do 24 hodin po vložení do formolu.
- Průvodka má obsahovat podrobně vyplněné všechny položky, zvláště pak údaje o průběhu aktuálního stavu pacienta a o průběhu předchozí léčby. Zásadně je třeba uvést předpokládanou klinickou dg. Optimální je přímá domluva klinika s patologem. Ta je zhusta vhodná i před odběrem, optimalizuje použití metodik.
- Optimálním postupem je předání nativní (nefixované) uzliny patologovi bezprostředně po vyjmutí. Uzlina je přenášena na patologii ve vlhké komoře (uzavřená fixační nádoba, uzlina položená na kousek skládané gázy namočené ve fyziologickém roztoku). Při dobré organizaci může být uzlina do 10 minut po vyjmutí předána patologovi. Předání nefixované uzliny patologovi do 30 minut je také dostačující.
- Postup na patologii:
 - Patolog materiál makroskopicky hodnotí, diktuje makroskopický popis, provede případně fotodokumentaci. Uzlinu dělí na proužky o tloušťce kolem 3 mm, z řezných ploch zhotoví otisky na odmaštěná podložní skla (3 pro zaschnutí nátěru a 3 pro alkoholovou fixaci).
 - Při dostatečně velké uzlině lze krájet shodné tkáňové proužky k různým metodikám:
 - * Jsou odebírány vzorky pro parafínový proces, který je třeba považovat za základní zdroj informací pro diagnózu.
 - * Je odebrán reprezentativní proužek tkáně ke zhotovení polotenkových řezů a řezů pro elektronmikroskopické vyšetření.
 - * Je odebrána optimální část uzliny pro cytofotometrii z místa, které bude topograficky i skladbou shodné s diagnostickým místem v histopatologickém vyšetření.
 - * Část uzliny je zmrazena pro potřeby některých metodik imunohistochemie, případně jsou provedeny odběry pro chromozomální vyšetření, pro metodiky molekulární patologie a pro tkáňové kultury. Současně je z větších uzlin zhotoven kryostatový řez; při suspekci bakteriální infekce může být z části uzliny odebrán materiál k mikrobiologickému vyšetření.

Volba metodik je závislá na vybavenosti pracoviště a na jeho metodickém i výzkumném zaměření. Odvisí také od velikosti zaslané uzliny; při vyšetření malých uzlin preferujeme před jinými postupy parafínový proces. Pokud není předem dohodnut speciální způsob vyšetření stanoví postup patolog.
- Časový údaj uzavření patomorfoloogické diagnózy: Doba potřebná k formulaci diagnostického nálezu patologem závisí na potřebách použitých metodik a na vybavení pracoviště. Klinik nevyžaduje na patologovi předběžnou diagnózu ze zmrazených řezů pokud to není ze závažných důvodů bezprostředně nutné. Pacient (rodiče dítěte) mají být informováni, že histopatologické vyšetření je časově zhusta náročné. Tlak na patologa je neprofesionální, může vést k chybným závěrům.
 - Při konstatování reaktivních nenádorových stavů je diagnóza uzliny odečtena již ze základního barvení, diagnóza je formulována za 48 hodin po obdržení nefixovaného materiálu (24 hodin po obdržení nfixovaného materiálu).

- Při použití standardních metod (MGG, detekce plísní, BK, Warthin Starry) je třeba připočítat dalších 24 – 48 hod. Diagnóza je formulována za 2 nebo 3 dny po obdržení fixovaného materiálu (+1 den navíc při příjmu nativní tkáně).
 - Při standardní imunohistochemii (CD20, CD45RO, CD68, S100, CD15, CD30) je diagnóza formulována do jednoho týdne. Při složitější sestavě protilátek do 10 dnů.
 - Při zaslání ke druhému čtení je výsledek druhého čtení k dispozici vždy s delším časovým limitem, který neovlivní zasílající pracoviště.
 - U zvláštních a složitých případů jsou časové relace různé. Závisí na opakovaných postupech, na vyhledávání údajů v literatuře, časové relace domluví patolog s klinikem.
- Péče o materiál před předáním uzliny patologovi: Od histopatologického vyšetření uzliny se odvíjí konečná diagnóza a terapie. Praxe ukázala, že o materiál musí od doby volby uzliny přes chirurgický odběr až po dodání patologovi pečovat zainteresovaný odborník, to jest lékař. Lékař onkolog určuje uzlinu, která má být vyjmuta, sleduje odběr na chirurgii, reviduje nebo sám provede vypsání průvodky, převezme materiál a předá patologovi. Účastní se „přikrajování“ materiálu patologem, vymění si informace s patologem a případně přejímá část tkáně, kterou patolog vybere pro cytofotometrii, případně o jiné vyšetření prováděné mimo patologii.

Bioptický nálezh obsahuje:

- Makroskopický popis materiálu, počet vyšetřených uzlin.
- Seznam použitých metodik.
- Histologický popis vedoucí k diagnostickému závěru. Uvedeno je, zda změna postihuje uzlinu celou (se setřením struktury uzliny), jaký je stav pouzdra, sinusů, rozdíl mezi kůrou a dřevem, jaké je rozložení patologických změn. U metastáz je uvedena velikost metastázy.
- Imunofenotyp stanovený imunohistochemickými metodami. Pro každou diagnózu je potřebné použít soubor odpovídajících metodik.
- Diagnózu (diagnostický závěr)
- Údaje z jiných metodik (molekulární patologie a jiné).

1.4.2 Žaludek

K bioptickému vyšetření jsou zasílány resekáty a endoskopické mikroexcize. Resekáty jsou většinou parciální, méně často subtotální, výjimečně totální.

Transport fixovaného resekátu

- Krátké resekáty do 10 cm. Chirurg vsune do lumina objemný smotek gázy navlhčený vodou nebo fyziologickým roztokem. Resekát s výplní vloží do formolu a dbáme, aby byl celý. Adorální resekční linii označí spinacím špendlíkem. Také lze použít postup pro větší resekáty.
- Větší resekáty a totální gastrektomie. Chirurg oddělí omentum ve vzdálenosti 2 cm od stěny žaludku, většina uzlin zůstává při žaludeční stěně. Resekát rozstříhne podél velké křivatury, lumen rozevře vložením objemného smotku navlhčené gázy. Na rozstřiženém a nafixované žaludku při přikrajování excizi je často již nemožné rozlišit resekční linii od podélného rozstřížení. Proto již před rozstřížením stěny označí spinacími špendlíky, stehy nebo černou tuší odlišně proximální a distální okraje resekátu. Pokud je ulkus nebo tumor v oblasti velké křiviny, vede linii stříhu podél malé křivatury. Oddělené omentum vloží také do fixačního roztoku.
- Rozvinutí resekátu na korkové desce. Chirurg rozvine rozstřižený resekát serosní stranou na korkovou desku, polobu zajistí špendlíky. Desku vloží „obráceně“ do fixačního roztoku.

Transport nefixovaných resekatů Rychlé předání resekatu patologovi je nesporně optimální postup. Chirurg označí spínacím špendlíkem proximální reseční linii a stehy oblasti na které chce patologa upozornit. Vše doplní komentářem v průvodce.

Patolog po fixaci do druhého dne odebere excize (nejméně 4 z patologického útvaru, 2–4 z každé reseční linie, 2–4 ze stěny mimo patologický útvar). Excize odebírám tak, aby byla zastížena celá tloušťka stěny a také přechod do zdravé tkáně. Současně pečlivě odebere vzorky z případných rezistencí v peritoneální straně resekatu a vypreparujeme uzliny. U odebraných uzlin zapíšeme topografii odběru (např. okolí kardiie, okolí pyloru, malá kurvatura, velká kurvatura, omentum). Odběry je vhodné zaznamenat do nákresu.

Fibroskopické excize (mikroexcize) jsou drobné, průměr 2–5 mm. Správně odebrané mikroexcize zastihují celou vrstvu sliznice, muscularis mucosae, případně část submukózy. Klinik má být obeznámen s nezbytností jemné manipulace s mikroexcizí. Mechanické zhmoždění zhusta znemožní diagnostické hodnocení.

Podstatné jsou *přesné topografické údaje* klinika v průvodce. Mikroexcize z fundu může mít sliznici shodnou s pylorem nebo se střevem střevem (pylorická nebo intestinální metaplázie), kostatuje patolog nález sliznice pyloru, což je v daném případě chybná informace.

Významná je *správná orientace tkáně* při fixaci. Klinik uloží excizi řeznou plochou na proužek filtračního papíru k jehož povrchu excize přilne. Proužek pak opatrně vloží do formolu. Mikroexcize vložená do formolu volně bez proužku papíru je většinou nepravidelně prohnutá a po púrosicení parafínem je její orientace v bloku zcela nejistá. Klinik může orientaci na proužku filtračního papíru korigovat pod lupou nebo pod preparačním mikroskopem, kde snadno rozezná povrch. podle přítomnosti žaludečních jamek. Polohu mikroexcize lze zajistit metodou agarové kapky.

Histopatologické poznámky: Při krájení orientuje laborantka blok tak, aby řezná plocha probíhala kolmo na povrch sliznice. Malé mikroexcize, které se nepodaří orientovat, prokrajujeme na více skel. Každý vzorek má být prokrájen na sérii 20–30 řezů seřazených na 3–4 podložní skla, barvení HE a znázornění HP pylori jsou v rutinně dostačující. Diagnostické hodnocení je časově náročné.

Pozn.: V současné době úsporně prokrajujeme každý blok na 6–8 řezů + metoda na HP. V případě potřeby další prokrájení U mikroexcizí, kde klinik uvádí suspekci karcinomu, prokrajujeme na 3 skla, jedno sklo na metodu PAS.

Bioptická zpráva:

- makroskopický popis vyšetřované excize nebo resekatu
- bioptickou diagnózu, u nádoru také gradus u vředu a u nádoru rozsah poškození (infiltrace) žaludeční stěny
- údaj o vztahu patologického procesu k reseční linii (byl nádor vyjmut *in sano*?)
- diagnózu stavu lymfatických uzlin
- topografie a počet uzlin s metastázami, případný nález na přilehlém orgánu (byl-li zároveň k vyšetření poslán)
- stádium nádoru (pokud jsou k dispozici všechny potřebné údaje).

1.4.3 Tenké střevo

K bioptickému vyšetření jsou zasílány resekované části tenkého střeva a fibroskopické mikroexcize.

Resekované části tenkého střeva (část kličky, klička, několik kliček) jsou pravidelně zasílány i s přilehlou částí mezenteria. Tenké střevo je nejčastěji resekované pro Crohnovu nemoc, ischemii a pro nádory. Patolog volí jeden ze 3 užívaných způsobů fixace:

1. Podélné rozstřížení střeva proti úponu mezenteria s následným rozvinutím na korkové destičce.

2. Propláchnutí střeva fyziologickým roztokem — podvázání jednoho konce — naplnění fixačním roztokem, podvaz druhého konce.
3. Rozložení resekátu ve velkém množství formolu s případným vložením smotků gázy mezi jednotlivé kličky a následnou preparaci.

Fixace do dalšího dne většinou dostačuje. Výstižný popis změn a případně i nákres je nezbytnou součástí dokumentace. Počet excízi kolísá podle charakteru patologického procesu. Excize přednostně orientujeme v podélném směru, to jest kolmo na průběh slizničních řas. Součástí odběru je i excize z mezenteria a vyšetření lymfatických uzlin.

Před odběrem lymfatických uzlin je výhodné vložit resekát přes noc do methacarnu. Uzliny jsou bílé a zřetelně vystupují ve žlutavě průsvitné tukové tkáni.

Zpracování mikroexcízi sliznice tenkého střeva při podezření na malabsorpční syndrom
 Vyšetřování mikroexcízi sliznice tenkého střeva, hlavně sliznice duodenální, má velký význam k diagnostice poruch vstřebávání (malabsorpční syndrom). Základem vyšetření jsou histochemické metody.

Bioptické mikroexcize jsou odebírány z duodena gastrokopem, z tenkého střeva speciálními odběrovými sondami. Průměr excízi kolísá od 2 do 4 mm. Zasahují sliznici, případně přilehlou část podslizničního vaziva. Při jednom zavedení nástroje jsou odebírány většinou 4 vzorky.

Polovina excízi je fixována 1 – 2 hodiny vychlazeným Bakerovým formolem a šetrně zalita do parafínu (urychlený postup, případně ve vakuu). Série parafinových řezů je barvena hematoxylin-eosinem, reakcí PAS (PAS+ alciánová modř) ke znázornění hlenu, pohárkových buněk a kartáčkového lemu. Slizniční reliéf a kartáčkový lem je znázorněn reakcí na alkalickou fosfatázu, lyzomy jsou znázorněny kyselou fosfatázou, plazmatická bazofilie metylzelení s pyroninem. Barvení trichromem je doporučováno k identifikaci lamblíázy.

Druhá polovina excízi je položena na kostku suchého ledu. Kryostatové řezy jsou použity k metodám: olejová červeň (barvení neutrálních tuků), histochemické enzymatické reakce (laktáza, trehaláza, sacharáza) ke stanovení disacharidázového deficitu).

Jsou-li slizniční mikroexcize dostatečně velké, může být každá rozdělena žiletkou na dvě poloviny (jedna k zalití do parafínu, druhá ke zhotovení kryostatových řezů).

Mikroexcize sliznice tlustého střeva u Hirschsprungovy agangliózy Při vrozeném chybění gangliových buněk nervových plexů dochází k podstatnému zesílení pozitivní cholinesterázové reakce nervových slizničních vláken a k jejich zmnožení. Změna je spolehlivě zachytitelná již v mikroexcizi. Metoda stanoví přesně agangliotický úsek, který je pak chirurgicky odstraněn. Mikroexcize sliznice je zmrazena na korku zcela analogicky jako u tenkého střeva. Kryostatové řezy vyšetřujeme histochemicky reakcí na průkaz cholinesterázy.

V nekroptickém odběru tenkého střeva je sliznice většinou natrávená. Odebrané excize fixujeme položené serózou na filtrační papír (zabráníme zkroucení plošných excízi).

1.4.4 Tlusté střevo

K bioptickému vyšetření jsou zasílány parciální resekáty (u nádorů nebo u Crohnovy choroby), celé tlusté střevo (ulcerózní kolitida, střevní polypóza), jednotlivé polypózní útvary a koloskopické mikroexcize.

Vyšetření tlustého střeva u nenádorových onemocnění

Preparace Z resekovaného střeva (nefixovaného) oddělíme mezenterium a vybereme několik lymfatických uzlin. Střevo rozstříhneme podél a makroskopicky hodnotíme. V popisu má být uvedeno:

- o kterou část střeva se jedná
- délka resekátu (také délka distálního ilea a apendixu)
- popis a změny mezenteria
- popis sliznice a jednotlivých patologických změn, rozsah změn, hloubka
- ulcerací, velikost a rozložení polypů a pod.
- tloušťka stěny a popis serózy (fibrin, hnisavý povlak, nádorový povlak, fibróza a pod.)
- další nálezy (divertikly, píštěle, jiné)

Velmi často obdrží patolog střeva již naxifované (rozstřížené nebo nerozstřížené). V těchto případech postupujeme podle aktuální situace tak, abychom co nejvíce splnili výše uvedené požadavky v odstavci „preparace“. Velmi často je třeba střevo dofixovat. Pak aplikujeme také požadavky uvedené u naxifovaného střeva.

Fixace Rozstřížené střevo fixujeme rozvinuté na korkové desce (vhodné u kratších resekátů) nebo volně vložené do velké nádoby s formolem. Vzájemnou polohu jednotlivých částí střeva zajistíme smotky gázy. V potřebných případech lze střevo k fixaci na korkových deskách rozdělit na několik dobře manipulovatelných částí. Většinou dostačuje fixovat celé střevo rozstřížené podél ve velké nádobě (nebo rozdělené ve dvou nádobách) a polohu zajistit smotky papírové vaty.

Velmi dobrým způsobem fixace je *naplnění střeva formolem*. Jemnou zevní masáží vytlačíme nejprve střevní obsah a lumen propláchneme fyziologickým roztokem. Jeden konec podvážeme tlustou nití, střevo vložíme do plastické větší nádoby a zavedenou trubicí vlejeme formol. Naplněné střevo na druhém konci rovněž podvážeme a celé vložíme do nádoby s formolem. Postup vyžaduje poněkud složitější zařízení (rezervoár s formolem, přívodnou hadici, manipulaci v digestoři). Podvázané části jsou však deformovány, nelze provést fotodokumentaci naxifovaných změn. Postup je většinou používán k výzkumným účelům.

Fotodokumentace je součástí standardu vyšetření. Vhodné je rychlé zhotovení fotografií, na které pak zakreslujeme topografii excizií.

Odběr excizní Excize odebíráme kolmo na průběh slizničních řas.

Standardně odebereme:

- Po dvou excizích z distálního a proximálního konce resekátu.
- Počet excizií z patologických změn volíme podle makroskopického nálezu. Excize mají také zasahovat přechod změny v normální sliznici.
- Reprezentativní lymfatické uzliny se zaznamenáním topografie.
- Excizi z mezenteria a z mezenteriálních cév.
- Je-li součástí resekátu apendix, ileum nebo anální oblasti, standardně odebereme i vzorky z těchto orgánů.

Vyšetření tlustého střeva u nádorů Preparace a registrace údajů je prováděna analogicky jako u nenádorových změn. Linií stříhu vedeme podélně a vyhýbáme se nádorovým změnám. Při cirkulárním infiltrátu protneme nejtenší část infiltrátu.

V popisu zvláště pečlivě hodnotíme mikroskopii nádoru (velikost, nekrózy, hloubku nádorové invaze do sliznice, muskuláris, do subserózní tukové tkáně, do retroperitoneální tkáně nebo jiných přilehlých struktur), formulujeme makroskopický odhad, také zda nádor je vyjmut celý). Současně uvedeme jiné

změny mimo oblast nádoru. Vypreparujeme uzliny a topograficky rozdělíme do skupin: a) distálně od tumoru, b) v oblasti tumoru, c) proximálně od tumoru. Vyhledávání uzlin v tukové tkáni usnadňuje dofixace Methacarnem.

Fixace a fotodokumentace Postupujeme analogicky jako u nenádorových změn. Fixujeme střevo rozstřížené nebo vyplněné formolem (viz výše).

Odběr excizní Z fixovaného střeva odebíráme minimálně následující excize:

- po dvou excizích z proximálního a z distálního konce resekatu; z resekcí linie vedené v krátké vzdálenosti od tumoru většinou více excizí; volný okraj je vhodné označit tuší.
- excize podélně orientované v longitudinální ose střeva z části střeva ze stapleru.
- excize z tumoru, některá excize má zasahovat nejhlubší oblast infiltrátu.
- tkáně, tukové tkáně, případně z oblasti s většími cévami v okolí tumoru
- excize z jiných patologických změn ve střevě.
- z normální stěny nad a pod tumorem podle výše uvedené topografie
- z suspektních rezistencí v mezenteriu
- pokud excize zastihuje apendix, distální ileum a anus odebíráme vzorky i z těchto oblastí

Koloskopické mikroexcize Pro technické zpracování koloskopických mikroexcizí platí všechny údaje uvedené u mikroexcizí žaludku a tenkého střeva.

Mikroexcize rekta k diagnóze amyloidózy Fixace formolem, parafínové řezy, barvení Kongočervení a vyšetření polarizace, metoda podle Frazera, thioflavin T v UV světle. Při thesaurizmózách a neurolipidózách je vyšetřován apendix nebo mikroexcize rekta. Fixace drobných kousků Bakerovým formolem, histochemické vyšetření tuků.

Vyšetření resekatů anální oblasti Anální oblast je vyjímána jen při malignitách anorektálního spojení. Současně s resekatem bývají zaslány inguinální uzliny. Anální malignity se mohou šířit do rekta, pod rektum a do přilehlých měkkých tkání. Bioptické vyšetření má přinést informaci, zda nádor byl vyjmut celý. Před odběrem vzorků je vhodné označit zevní hranici resekatu tuší. Většinou je třeba vyšetřit řadu excizí z periferie resekatu a z anorektálního spojení.

Polypy trávicí trubice Polypózní útvary trávicí trubice jsou nejčastěji lokalizovány v tlustém střevě, méně často v žaludku a v duodenu, jen vzácně v tenkém střevě. Velikost kolísá od 2 mm do 2 i více cm. Polypy se mohou maligně zvrhnout; proto je jejich histologické vyšetření významné. Bez ohledu na topografii odběru polypů je postup histologického vyšetření shodný.

V typickém případě lze na polypu rozlišit širokou „hlavu“ a úzkou „stopku“, která může být 1 – 2 i více cm dlouhá. V popisu zaznamenáme tvar polypu (přisedlý, stopkatý, papilárně členěný a pod.).

Po fixaci změříme velikost hlavy polypu a délku stopky. U polypu s krátkou stopkou nebo bez stopky rozlišíme resekcí rovinu. Menší polypy rozkrojíme podél na dvě poloviny řezem vedeným na střední část a dbáme, aby řez pokračoval do stopky. Je-li stopka dostatečně dlouhá, zhotovíme příčný řez stopkou blízko roviny chirurgického řezu. Je-li stopka dostatečně široká, je možné vyříznout z celého průřezu polypu ploténku i s větší částí stopky. Periferní části polypu, ležící mimo stopku, nejsou již informativní pro zjištění, zda byla změna odstraněna celá. To je významné zvláště u polypů s dysplastickými změnami nebo u polypů s malignizací.

1.4.5 Apendix

V makropopisu uvádíme délku, šířku, povrch, lumen, infiltráty a další údaje. Při preparaci oddělíme 2 cm dlouhý koncový úsek a rozdělíme jej podél. Dalšími příčnými řezy hodnotíme makroskopii. K histologickému vyšetření standardně odebereme jednu podélně orientovanou polovinu z koncové části, jednu příčnou excizi ze střední části a jednu příčnou excizi z počátečního úseku. Najdeme-li nádorovou rezistenci vyšetřujeme více bloků (analogicky jako u jiných částí střeva). Přednostně odebíráme úseky s makroskopickou patologickou změnou.

1.4.6 Plíce

Metodický přístup biotického vyšetření plic volíme s přihlédnutím na klinicky předpokládanou diagnózu a s přihlédnutím na aktuální makroskopický nález. Pokud není již před operací nebo v průběhu operace základní diagnóza plicní patologie zřejmá (např. z předchozí cytologie, mikroexcize a pod.) má být z resekované tkáně za sterilních podmínek operačního sálu odebrán materiál na mikrobiologické vyšetření. Materiál k mikrobiologickému vyšetření může z nefixované tkáně odebírat i patolog. Dodržuje při tom pravidla pro sterilní odběr (kauterizace povrchu, incize s použitím sterilních nástrojů, odběr materiálu z příslušného fokusu, následná sterilizace nástrojů).

Diagnostická plicní biopsie Jde o cílenou excizi, většinou klínovitého tvaru, velikost kolem 1,5 – 2,5 cm (případně menší). Excize jsou prováděny u najasných plicních procesů, u difusních fibróz, k posouzení cévního řečiště před kardiologickými operacemi. Histologické vyšetření je informativnější je-li alveolární prostor rozepjatý. Toho lze dosáhnout:

- chirurg odebírá vzdušnou tkáň; tkáň je udržena rozepjatá peánem a po odběru hned fixovaná
- rozepjetí lze po odběru dosáhnout injekcí formolu širokou jehlou přes pleuru (případně několika vpichy)
- pod kontrolou preparačního mikroskopu injekcí formolu do některého bronchu

Preparace větších resekatů, lobektomií, pulmektomií při nádorech K vyšetření dostává patolog resekované laloky, celou plíci nebo plicní segmenty. Palpací orientačně lokalizujeme v měkké plicní tkáni nádorové rezistence, provedeme fotodokumentaci celého resekatu i nálezu během preparace.

- Vypreparujeme uzliny v hilové oblasti
- Při standardním způsobu vyšetření, který většinou zcela dostačuje pro přesnou diagnostiku, rozstříháme ostrými nůžkami bronchy podélně až k tumoru. Ostrým dlouhým nožem krájíme plicní tkáň včetně tumoru na paralelní řezy (většinou na tloušťku 1 cm). V popisu registrujeme rozměr resekatu, jeho váhu, rozsah nádorového infiltrátu a další změny. Rozkrájený resekat vložíme do nádoby s formolem, fixujeme do dalšího dne nebo i déle.

Dokonalejší způsob je fixace infuzí formolu do bronchů. Postup vyžaduje rezervoár, kontrolu infusního tlaku a práci v dobře větrané digestoři. Před postupem oddělíme krátký úsek bronchu (resekční linii) k histologickému vyšetření (prevence poškození v místě podvazu). Do počátečního úseku bronchu vsuneme kanylu přiměřené tloušťky. Tlak infundovaného formolu nemá přesáhnout 25 cm vodního sloupce. Po „naplnění“ formolem uzavřeme bronchus svorkou nebo podvazem a celou plíci vložíme do nádoby s formolem. Formolovou infuzi lze provádět také intravenózně a intraarteriálně.

Odběr excizi:

- z nádoru odebíráme tři nebo více excizi, přednostně vybíráme místa související s bronchem
- ze tkáně v okolí infiltrátu tři excize, v excizi je třeba zastihnout také pleuru
- resekční linii bronchu (která zastihuje celý průřez bronchem)

- lymfatické uzliny bronchopulmonální a mediastinální

Preparace resekátu a další zpracování při nenádorových změnách plic Postup je v zásadě shodný s preparací při nádorech. Důraz klademe na bakteriologické odběry. Při suspekci na TBC fixujeme tkáň 48 hodin. Při podezření na asbestózu seškrábneme povrch řezných ploch tkáň skalpelem a zhotovíme nátěry. Excize zhotovíme z různých částí resekátu, vybíráme místa s makroskopickými strukturálními změnami i místa makroskopicky nenápadná, bronchy, pleuru, uzliny, cévy (vše s přihlédnutím na předpokládanou diagnózu).

1.4.7 Pankreas

Na patologii jsou posílány parciální resekáty, totální resekáty s přilehlými orgány a endoskopické mikroexcize.

Pankreatikoduodenektomie, parciální resekce pankreatu Pokud klinik před odesláním na patologii vkládá resekát do formolu, musí tkáň vhodným způsobem zpracovat a označit: Před vložením do fixačního roztoku rozříznout podélně duodenum na straně proti papile. V případě současné parciální gastrektomie pokračovat nůžkami z duodena do resekované části žaludku. Identifikovat papilu a do sliznice vedle papily založit steh s dlouhými konci. Je to důležité, na fixovaném materiálu je často papila obtížně rozlišitelná. Snadný přístup fixačního roztoku k duodenu umožní vložením několika smotků gázy do lumen. Z ventrální strany rozkajují postupně hlavu a kaudu pankreatu (v případě nádoru i nádor) na příčné řezy u tloušťce kolem 1 cm, řezy nedokrajovat kompletně a dbát, aby i po rozkrájení držel celý komplex pohromadě. Pokud je součástí komplexu slezina, pak ji oddělit a vložit do fixačního roztoku samostatně podle pravidel preparace pro slezinu.

Druhou možností je poslat na patologii nefixovaný resekát.

Totální pankreatoduodenotomie (při nádorech): patolog dostává k vyšetření část pankreatu nebo orgánový různě rozsáhlý orgánový komplex zaujímající část pankreatu nebo celý pankreas, žaludeční antrum, část duodena nebo celé duodenum (případně s krátkým úsekem jejunu) a část choledochu. Součástí resekátu jsou pravidelně uzliny, může být zaujata i slezina. Většinou je současně vyjmut i žlučník. Optimální postup preparace je při vyšetření nefixovaného resekátu hned po vyjmutí. Obdržíme-li k vyšetření resekát již fixovaný postupujeme stejně jako bez fixace. Bereme v úvahu zásah chirurga, kterým zajišťuje dobrou fixaci. Postup je technicky často obtížný. Chirurg podle dohody s patologem může provést v různém rozsahu podrobnější preparaci (viz níže).

Postup patologa při *preparaci resekátu totální pankreatoduodenotomie*:

- Orientujeme resekát jako by byl uložen v dutině břišní.
- Fotodokumentaci provádíme celkovou i průběžnou během preparace
- Zjistíme, které orgány jsou v resekátu zaujaty
- Otevřeme žaludek (antrum) a duodenum. Rozstříhneme žaludek podél malé křivky a pokračujeme do duodena ve střední linii jeho přední stěny, vyhýbáme se při tom oblasti Vaterovy papily.

Při *pankreatoduodenektomii* je situace snadnější:

- při preparaci začínáme otevřením duodena
- oblast papily, u tumoru se orientujeme, zda vychází z papily, ampuly nebo z pankreatu nebo z choledochu
- Změříme pankreas a hodnotíme jeho zevní tvar
- Sondujeme a otevřeme choledochus, hodnotíme jeho vztah k tumoru

- Přes papilu sondujeme ductus pancreaticus a ve směru dlouhé osy pankreatu skalpelem protneme papilu, ampulu a přilehlou pankreatickou tkáň. V ampule i v pankreatickém duktu hledáme konkrementy, nádorový infiltrát, fibrózu a jiné afekce
- Zbývající část pankreatu rozkrojíme příčně (nebo na příčné řezy, jde-li o celý pankreas) tak, aby soubor řezů zůstal pohromadě
- Vybereme skupiny uzlin a označíme jejich topografii (peripankreatické při horním okraji a při dolním okraji pankreatu, peripylorické při horní a dolní křivatuře, pankreatoduodenální, perisplenické, případně uzliny z omenta, z okolí jejunu a z okolí choledochu
- Výše uvedenými zásahy upravený resekát topograficky zajistíme špendlíky na korkovou desku nebo proložením smotky gázy namočené ve formolu a vložíme do patřičně velké nádoby s formolem k fixaci. Fixujeme 24 hodin nebo déle.

Standardní odběr excizí:

- nejméně 3 excize z tumoru (orientace řezů by měla ukázat vztah tumoru k papile a k choledochu a k povrchu pankreatu)
- 3 excize z jiných částí pankreatu
- 2 – 3 excize
- z resekční linie pankreatu
- 2 excize z resekční linie žaludku
- excizi z resekční linie duodena (jejuna)
- orientační excizi z duodena
- uzliny jednotlivých skupin
- excizi ze sleziny
- excize ze žlučníku podle standardu; odběr excizí může být modifikován při kombinaci s histotopogramy

Prostá parciální pankreatektomie (při nenádorových onemocněních) Extirpovanou část pankreatu rozdělíme na řezy kolmé ke dlouhé ose pankreatu, makroskopicky hodnotíme a vybíráme excize z různých míst podle makroskopického hodnocení fokálních změn. K přesnému zařazení pankreatitidy se při výběru se zaměříme na dilatované vývody a na případné kalcifikáty.

Endoskopické mikroexcize vedené z pankreatického duktu, punkční mikroexcize Přímo po odběru vkládáme odběry do formolu. Při odběru souvislého válečku rozvineme punkční excizi na povrchu proužku filtračního papíru namočeného ve fyziologickém roztoku. Po přilnutí punkce k papíru opatrně vložíme proužek do formolu.

Bioptická zpráva obsahuje:

- použité metody
- makroskopický popis
- bioptickou diagnózu pankreatu (a dalších přilehlých orgánů),
- u tumoru popis, rozměr, ohraničení, vztah k okolí, invaze do cév, do nervů,
- diagnózu pankreatických změn
- u tumoru název tumoru, gradus, případně staging
- diagnózu přilehlých orgánů (žaludek, duodenum, slezina)
- nález v regionálních uzlinách

1.4.8 Játra

Nejčastějším jsou punkční biosie, méně jaterní excize a parciální resekce a lobektomie.

Jaterní punkce Váleček jaterní tkáně je podle použité odběrové jehly 1–2 mm tlustý, většinou 1–2 cm dlouhý. Jen o metabolických onemocnění jsou játra vyšetřována z nativní tkáně v kryostatových řezech nebo po fixaci alkoholem. Jinak jsou jaterní punkce standardně fixována slabým (4%) formolem nebo

slabým formolem 1% CaCl₂ (Bakerův formol), který stabilizuje lipidy. Tenký váleček rychle vysychá, proto odběr hned fixujeme. Po odběru klinik „vystříkne“ z jehly váleček přímo na proužek filtračního papíru smočený ve fyziologickém roztoku, na proužku pak pomocí jehel váleček upraví do roviny a i s proužkem opatrně vloží do formolu. Volně vložený váleček se ve fixačním roztoku často ohýbá a kroutí.

Klinik je předem dohodnut s patologem o způsobu fixace (standardní, speciální, nativní tkáň). Pro standardní odběry (to jest mimo předpokládaná metabolická onemocnění) je dostačující formolová fixace 24 hodin. U metabolických onemocnění je používána histochemie. V těchto případech po krátkodobé fixaci chlazeným Bakerovým formolem (2–3 hodiny) a urychleném šetrném zalití tkáně do parafínu lze i v parafinových řezech prokázat alkalickou fosfatázu, lyzozomální hydrolázy, nespecifickou estrázu, cholinesterázu. Jiné typy fixací jsou rovněž možné (Carnoy, Bouin, Zenker). Vyšetření nefixovaných punkcí (kryostatové řezy k histochemickému vyšetření) je používáno k hodnocení množství glykogenu a histochemickému stanovení enzymatického deficitu při glykogenózách. Metodické postupy jsou již náplní speciálním problémem histochemie. V těchto případech předem konzultuje klinik patologa.

Jeden ze standardních osvědčených způsobů:

Z parafinového bloku zhotovíme základní sérii 12 skel, na každé sklo klademe 3–5 řezů seřazených tak, aby mohly být přikryty jedním krycím sklem. Skla číslujeme a dbáme, aby série byla úplná (potřebné ke sledování jedné struktury). Řezy barvíme těmito metodami: Sklo 1 a 3 HE, sklo 2 a 4 Van Gieson, sklo 5 metodou na znázornění retikulinových vláken (např. Gömöryho metoda), sklo 6 metodou na průkaz australského antigenu (orceinová nebo jiná metoda), sklo 9 a 10 HE, sklo 11 a 12 slouží pro imunohistochemické metody. Zmrazené řezy z druhé kousku barvíme olejovou červení, případně sudanovou černí. Jiné metody (průkaz amyloidu, vyšetření v UV světle, znázornění žlučových barviv a další metody) provádíme jen v indikovaných případech. V indikovaných případech je třeba zalít tkáně pro potřeby elektronového mikroskopu. Ostrou žiletkou zhotovíme drobné bloky o hraně 1 mm. Fixace a další postup je obvyklý, neliší se od běžného zalévání elektronmikroskopických bloků.

Je-li z klinických údajů zřejmá indikace k vyšetření tuků, oddělíme malou část válečku pro zhotovení zmrazených řezů.

Zvolené metody mají znázornit základní histologickou stavbu, registrovat retenci metabolitů (tuků, glycidů, lipofuscinu, železa), znázornit inkluze, kolagenní a retikulární vazivo.

Excize u difusního poškození jater Vzorky jsou odebírány z jaterního okraje, mají tvar nepravidelného klínu, většinou zasahují do hloubka kolem 1,5 cm, část odpovídající okraji má délku kolem 1 cm. V jaterním pouzdru je často zmnožené vazivo, které vstupuje na krátkou vzdálenost do parenchymu. Takové úseky mohou být chybně v histologickém nálezu interpretovány jako fibróza nebo cirhóza. Chirurg proto zásadně vybírá úseky bez ztlustělého pouzdra. Stejná situace vzniká v lůžku žlučníku s chronickou cholecystitidou. Lůžko žlučníku je pro excizi rovněž nevhodné.

Excize z jater má být předána okamžitě patologovi ke komplexnímu vyšetření (to jest kombinace kryostatových řezů, fixace s parafinovým procesem a elektronmikroskopického vyšetření). Je-li předpoklad metabolického onemocnění je nezbytné před odběrem konzultovat patologa a dohodnout způsob fixace, použití nefixované tkáně ke kryostatovým řezům, velikost excize předem s patologem, dohodnout postup nakládání s excizi i velikost excize.

Pokud předání nativní tkáně bioptikovi není možné, rozkrojí chirurg žiletkou excizi ve směru kolmém

na kapsulu na proužky o tloušťce 3 mm. Fixace formolem nebo slabým formolem s 1 % CaCl₂ (Bakerův formol stabilizující lipidy).

Excize jater při ložiskovém poškození. Nejčastěji jde o odběr metastázy. Chirurg vybírá fokus bez nekrózy a bez prokrvácení. Vhodné je, aby excize zasahovala také do neinfiltrované jaterní tkáně.

Parciální hepatektomie Fokální a nodulární masy jsou vyjímány parciální resekci jater. V okolí ložiska je vždy vlastní jaterní tkáň. Velikost materiálu kolísá od různě velkých klínů až po celý jaterní lalok. Pokud posílá chirurg tkáň k vyšetření fixovanou nakrájí ostrým nožem resekát ze resekční plochy proti pouzdru na na plátky 4 – 5 mm tlusté. Při pouzdře zachová spojení plátek. Ve fixačním roztoku upraví resekát vějířovitě, aby formol pronikal ke všem částem. Oddělení jednotlivých plátek lze stabilizovat smotkem gázy.

Totální hepatektomie při transplantaci Celá nefixovaná játra jsou předána k vyšetření patologovi.

Bioptická zpráva obsahuje:

- makroskopický popis resekátu
- výčet použitých metod
- počet a velikost ložisek
- diagnózu ložiskové změny, u nádoru grading
- údaj o vaskulární invazi
- údaj o resekční linii (přítomnost, nepřítomnost nádoru)
- diagnostický údaj o jaterní tkáni mimo ložisko

1.4.9 Ledvina

Bioptické vyšetření ledvin má dvě základní formy: punkční vyšetření ledviny a parciální resekáty a nefrektomie.

Punkční biopsie Punkcí získaný váleček je 1 – 3 mm tlustý, 8 – 12 mm dlouhý. Technika odběru punkce je dosti náročný postup, který není pro pacienta zcela bez rizika. Je proto nutné histopatologickému vyšetření věnovat velkou péči, aby diagnostické vytížení materiálu bylo maximální. Punkční váleček předává klinik okamžitě patologovi (nebo informovanému histopatologickému laborantovi).

Metodické zpracování punkce je komplexní, používá metodiku elektronové mikroskopie, parafínovou histologii, imunofluorescence. Tyto 3 rozdílné postupy se musí „podělit“ o jeden punkční váleček. Někdy bývají standardně odebírány 2 válečky. Volbu metodik upravíme podle objemu získaného válečku. Při malém množství tkáně upřednostňujeme metodiky v pořadí: elektronová mikroskopie, imunofluorescence, parafínová histologie. V protokolu uvádíme počet válečků, makroskopii, možnost rozlišení kůry a dřene.

Postup zpracování punkcí užívaný v různých laboratořích se v podrobnostech liší. Obecné zásady jsou však shodné a je třeba je respektovat. Punkce ledvin by neměla být hodnocena pracovištěm, které nedisponuje elektronovým mikroskopem a imunofluorescenční metodikou. Odběr a úpravu punkčního válečku může provést informovaný klinik nebo patolog.

Váleček tkáně položíme na parafínovou desku nebo Petriho misku z umělé hmoty. Většinou lze makroskopicky (případně pomocí lupy) rozlišit kůru podle přítomnosti glomerulů, které mají živě červenou barvu. Z korového konce válečku oddělíme dva kousky (1 mm dlouhé) a fixujeme chlazeným glutaraldehydem pro zalití do některého z elektronmikroskopických medií. Pokud nelze spolehlivě rozlišit kůru a dřev, odebereme pro elektronový mikroskop kousky z obou konců válečku.

Kovový stolek rotačního mikrotomu s plochou kapkou vody na horní ploše vychladíme vložením na dobu 15 minut do pevného kyslíčnicku uhlíčitého (nebo podobným způsobem). Jemnou pinzetou položíme

zbytek válečku na vychlazený blok. Tkáň je velmi rychle zmrazena. V tomto stavu lze tkáň přechovávat v suchém ledu i po dobu několika dní.

Zmrazenou tkáň krájíme v kryostatu na řezy 5–7 μm pro potřeby imunofluorescenčních metod. Zmrazení lze provádět také ponořením stolku s tkání do kapalného propan-butanu.

Praxe ukázala, že standardní výsledky dává také následující postup: váleček nativní tkáně položíme na tenkou korkovou ploténku, kterou vkládáme do malé krabičky z umělé hmoty (od krycích skel). Krabička je předmrazená vložením do suchého ledu na dobu 30 minut. Uzavřenou krabičku opět vložíme do suchého ledu. Odběr k elektronovému vyšetření je pak prováděn až po nakrájení řezů pro imunohistologické metody.

Zbytek válečku rozmrazíme vložením do chlazeného formolu. Fixujeme 2–3 hodiny, následuje zalití do parafínu urychleným postupem. Krájíme sériové řezy na 10 za sebou jdoucích skel, na každé sklo klademe 3–5 řezů tak, abychom všechny řezy pokryli jedním krycím sklem. Skla číslováme 1–10, řezy klademe v sérii za sebou, aby bylo možno jednotlivé struktury prostorově sledovat.

Užívány jsou následující metodiky: sklo 1: HE, sklo 2: Van Gieson, sklo 3: PAS, sklo 4: Van Gieson, sklo 5: trichrom (modrý nebo zelený), sklo 6: Johnsova metoda ke znázornění bazálních membrán, sklo 7: kongo-červeň, sklo 8: fibrin (Weigertova metoda na fibrin), sklo 9: HE, sklo 10: Van Gieson.

Metody jsou vybrány tak, aby znázornily základní mikroskopickou skladbu, kolagen, retikulární vlákna, bazální membrány, fibrin (hyalinní kapénky) a amyloid.

Vyšetření parciálních resektátů a nefrektomií

Příprava resektátu před fixací tkáně Je-li u totální nefrektomie makroskopický nález v obou polovinách ledviny analogický (svráštělá ledvina arteriosklerotická, glomerulonefritis, pyelonefritis, cystická degenerace, pokročilá hydronefróza) je optimální následující postup: chirurg ledvinu rozkrojí lehce asymetricky podélně až do pánevičky. Řez vede z konvexity do hilu těsně před komplexem pánevička, arterie, vena. U nádoru vede řez podél přes střední oblast nádoru směrem do hilu. Další preparaci provede patolog.

Ventrální segment pak rozkrájí přibližně radiálně na řezy o tloušťce 4 mm. Řezy vede přes komplex kůra pyramida a papila. Druhou polovinu ponechá vcelku, vše vloží do fixačního roztoku. Obě poloviny ledviny vložíme na objemný smotek gázy do nádoby s dostatečným množstvím formolu (objem 5 a vícekrát větší než objem ledviny).

Uvedený postup zajistí dosti dobře fixaci tkáně a zachovává zbytek ledviny k fotodokumentaci a k další preparaci bioptikem.

Zpracování nefixovaného resektátu Na patologii předáváme nefixovanou ledvinu. Další preparaci provede patolog podle standardních pravidel.

Bioptická zpráva

- použité metody
- makroskopický popis ledviny
- popis nádoru (vztah k renálnímu sinu, k cévám, ohraničení, velikost)
- diagnóza
- u nádoru diagnóza, gradus, stádium (je-li možné definovat)
- nález na uzlinách (jsou-li přítomny)

Vyšetření nefrektomií u nenádorových difusních změn, které vyžadují komplexní patomorfologické vyšetření jako u punkcí, rozkrojíme nefixovanou ledvinu přes konvexitu podélným řezem až do

pánvičky a z jedné poloviny v příčném směru vykrojíme 1 mm tenký plátek (plátky) tkáně, který zpracováváme analogicky jako punkční biopsii. Další postup je standardní (viz sub "b").

Vyšetření nefrektomií u nenádorových změn — standardní postup

Preparace: Ledvinu rozkrojíme podél přes konvexitu až do páničky, nůžkami otevřeme kalichy, prohlédneme papily a odstup ureteru. Vyjmeme kameny (případné biochemické vyšetření). Sondujeme a preparujeme odstup ureteru. V popisu registrujeme rozměr ledviny, váhu, změny tvaru, tloušťku kůry, kresbu pyramid, cysty, hranici mezi kůrou a dřemí, objem kalichů a páničky, spojení páničky a ureteru, ureter.

Odběr excizi: Po fotodokumentaci odbíráme excize v poněkud radiálním směru tak, aby zasahovaly kůru, dřemí a papilu. Při difusních procesech: tři excize zaujímající kůru a dřemí, papilu; dvě excize zasahující páničku a přilehlou tkáň ledviny; jednu příčnou excizi z ureteru a příčnou excizi z arterie. Při nestejnoměrných změnách, cystách, abscesech a dalších změnách odebíráme vedle odběrů makroskopicky nepoškozené tkáň ještě excize z patologických změn.

Vyšetření nefrektomií u nádorů Postup je obdobný jako u u změn nenádorových. Popisu tumoru je třeba věnovat velkou pozornost, makroskopie často rozhoduje v diagnóze benignity-malignity. Registrujeme polohu tumoru, tvar, u tumorů ovoidního tvaru také délku krátké a dlouhé osy, pouzdro (zda nádor je celý obklopen pouzdrém nebo jen částečně), prorůstání nádoru do cév, do páničky, rozrušení ledvinné kapsuly, šíření do okolí, nekrózy. Fotodokumentace. Při preparaci hledáme uzliny a otvíráme podél renální věny.

Odběr excizi: Z nádoru odebíráme minimálně 3 excize zasahující nádor a přilehlou ledvinu, dále dvě excize z ledviny mimo tumor, excizi z páničky, excizi z horní části ureteru, lymfatické uzliny, příčný řez ureterem. U nádorů ledvin dětí vyšetřujeme soubor excizi celé plochy průřezu nádorem.

Poznámka k fixaci: Pokud obdržíme ledvinu již fixovanou postupujeme analogicky jako uvedeno výše, informativní hodnota vzorků je však snížena a imunofluorescenční metody již nelze provést. Po odběru excizi z nefixované ledviny vložíme zbytek ledviny jako rezervu do formolu. Ledvinu lze také fixovat infuzí formolu renální arterií nebo ureterem před preparací. Takové postupy volíme při v jednotlivých indikovaných případech a při řešení výzkumných úkolů.

1.4.10 Biopsie dělohy a adnex

Endometriální biopsie přichází k bioptickému vyšetření: jako mikroabraze určená většinou k vyšetření funkčního stavu endometria, dále jako kyretáž, nejčastěji při nepravidelném krvácení, vyšetřované také k vyloučení nádoru endometria, dále jako objemný materiál z terapeutických kyretáží nebo jako objemný materiál při abortech.

Mikroabraze jsou úzké proužky endometria (3–4 mm široké, kolem 10 mm dlouhé. Po fixaci zaléváme do parafínu kompletně. Dbáme, aby proužek sliznice byl zbaven krevního koagula a aby v parafinovém bloku byl orientován podélně. Většinou stačí krátká serie řezů na 2 podložní skla, barvení HE a PAS.

Endometriální kyretáže jsou předávány do bioptické laboratoře většinou již fixované, kde tkáňové součásti jsou promíchány s krevními koaguly. Nejsnadněji vybereme kousky tkáně po promytí materiálu na sítku (cedníku) z umělé hmoty. Vhodná je prohlídka materiálu preparačním mikroskopem k identifikaci

a výběru případných součástí abortu (klky, embryo nebo jeho části. Makroskopii registrujeme stručným popisem. U abortů uvedeme výčet nalezených struktur (části placenty, viditelné klky, části embrya), zaznamenáme i chybění embrya.

U kyretáží vybíráme reprezentativní části materiálu, zpravidla 5 bloků. Vybíráme tkáň, které se pokusíme makroskopicky identifikovat (části placenty, klky, obaly, části plodu, cystické útvary, makroskopické ekrózy) Do kazety skládáme proužky tkáně pokud možno dlouhou osou rovnoběžně.

U abortu s proužky endometria vybíráme části placenty a fétu.

Bioptické vyšetření při hysterektomii

Některé kvantitativní údaje Normální děloha váží 60 – 120 g, délka je 7 – 9 cm, šířka 4,5 – 6 cm, předozadní tloušťka je 2,5 – 3 cm; čípek je 2,5 – 3 cm dlouhý, průměr endocervikálního kanálu je v nejširším místě kolem 8 mm, délka endometriální dutiny je 5 cm, tloušťka endometria kolísá podle menstruačního cyklu 1 – 8 mm; tloušťka myometria kolísá kolem 1,5 cm.

Preparace nefixovaného uteru Tuby a ovária oddělíme a vyšetřujeme samostatně (viz vyšetření adnex). Dělohu otevřeme ostrými nůžkami uterus přes cervikální kanál podél děložních hran až po děložní rohy a řezem přes fundus rozdělíme na přední a zadní polovinu. Je-li přítomna objená rezistence, rozřízneme ji řezem vedeném kolmo na dlouhou osu uteru. Po uvedené preparaci fixujeme celý uterus do druhého dne.

Hodnocení fixovaný fundus krájíme na řezy o tloušťce 1 cm, řezy jsou vedené kolmo na dlouhou osu uteru. Z kompletní serie řezů vybíráme cílené excize s přihlédnutím k makroskopickému nálezu. Čípek krájíme příčně na průběh cervikálního kanálu, exocervix naopak podélnými řezy. Jsou-li přítomny myomy, pak vedeme řez přes každý myom.

Popis zaznamenáme velikost uteru, jeho tvar, tloušťku myometria, endometria a případných polypů nebo jiných anomálií, počet a velikost myomů, morfologii cervixu.

Odběr excizi ke standardnímu vyšetření *Cervix:* po jedné excizi z přední a zadní části. *Fundus:* po jedné excizi z každé poloviny fundu. Excize má zaujímat pokud možno současně endometrium, myometrium i serózu. Další excize volíme s ohledem na makroskopické změny (endometriální polyp, prominence sliznice a pod.). Z každého myomu vyšetříme alespoň jednu excizi, z velkých myomů odpovídající větší počet excizi s přihlédnutím na makroskopii (prosáknutí, nekrózy, cystická přeměna a pod.).

Endometriální polyp rozkrojíme podél a vyšetříme celý, z větších myomů zhotovíme reprezentativní bloky.

Bioptické vyšetření hysterektomie s karcinomem čípku

Preparace nefixovaného uteru

1. Oddělíme čípek od uteru ve vzdálenosti asi 2,5 cm od orificium externum. Ostrými nůžkami zasunutým do endocervikálního kanálu nebo ostrým skalpelem otevřeme čípek podélně v rovině odpovídající poloze „12“. Čípek pak rozvineme do roviny na korkové desce a polohu zajistíme čtyřmi špendlíky. Fixujeme do druhého dne. Zbytek uteru připravujeme analogicky jako při preparaci standardní hysterektomie.

2. Po nafixování a po označení vaginální resekcční plochy tuší krájíme čípek na kompletní serii plátek (zpravidla 12), které číslováme v pořadí za sebou. Při větším objemu plátek (při rozsáhlejší infiltraci) rozdělíme každý příslušný plátek na epiteliální a vaginální polovinu. Polohu plátek zakreslíme do schématu a očíslováme. Vaginální polovinu je třeba vyšetřit, abychom rozlišili přesnou hloubku infiltrátu.
3. Fundus vyšetříme podle popisu standardní hysterktomie.
4. Součástí hysterektomie je vyšetření jednotlivých skupin lymfatických uzlin.
5. Adnexa vyšetříme podle příslušného návodu.

Bioptické vyšetření čípku Biopticky jsou vyšetřovány přímé excize z podezřelých míst, Schillerovy seškraby, prstencovité biopsie, kónizace, amputace čípku.

Přímá excize změněné tkáně Excidovaná část má většinou tvar plátku pomeranče, v optimálním provedení zasahuje vedle změněné tkáně také sousední tkáň nepoškozenou. Rovinu řezů orientujeme kolmo na epitel a podélně s osou excize. Zásadně je třeba excizi prokrájet.

Schillerovy seškraby jsou prováděny ostrou lžičkou z několika míst čípku. Zasahují epitel a přilehlou část vaziva. Při zalévání je třeba důsledně dbát na orientaci drobných částek tkáně, aby byly krájeny kolmo na povrch epitelu.

Prstencovitá excize je již podobná konizaci Excize zaujímá pás tkáně v okolí zevního orificia. Prstenec je třeba rozdělit na větší počet bloků buď klínového tvaru nebo na příčně orientované excize, analogicky jako u kónizace (viz níže).

Konizace je terapeutický úkon, kdy z čípku je vyjmuta konická excize zaujímající okolí zevního orificia a část tkáně v okolí cervikálního kanálu. Kónizovaný kužel lze rozříznout na jedné straně již v nefixovaném stavu, rozvinout a rozdělit na větší počet klínovitých excizi. Tuto manipulaci provede většinou gynekolog, který také označí (zpravidla stehem) excizi s nejzávažnějším nálezem. Většina autorů však dává přednost fixaci celé excize. K orientaci je nezbytné, aby kliník označil stehem hranici mezi pravým a levým horním kvadrantem (č. 12) a případně také místo, které považuje za nejdůležitější k podrobnému vyšetření.

Vlastní dělení kónizovaného úseku na jednotlivé excize se děje podle schématu A nebo B. Při klínovitých (dortových) excizích není na značném počtu histologických řezů zastížena souvislost s epitelem; proto je všeobecně dávana přednost excizním podle schématu B. Každou excizi je třeba označit příslušným číslem. Kónickou část, zaujímající cervikální kanál, oddělíme a rozdělíme na 2 či více bloků orientovaných kolmo na dlouhou osu cervikálního kanálu. Amputovaný čípek je vyšetřován zcela analogicky jako tkáň získaná konizací. Z cervikálního kanálu zhotovíme řezy o tloušťce 0,5 cm, zaléváme je celé nebo rozdělené ve střední rovině na polovinu.

Děloha Při histologickém vyšetřování celé dělohy nelze většinou zhotovovat histotopogramy. Dělohu rozkrájíme na řezy o tloušťce asi 0,5 cm a k histologickému vyšetření jsou vybrány cíleně některé excize. Vždy je třeba dbát, aby řez byl veden kolmo na povrch endometria a zastihoval pokud možno celou stěnu dělohy.

Bioptické vyšetření čípku fixovaného v celku Z čípku vyšetřujeme nejčastěji konusy, méně často celý čípek po supravaginální nebo prosté vaginální amputaci. Kliník většinou standardně označuje okraj předního pysku na č. 12. V diagnostice je třeba vedle rozpoznání typu dysplastické změny také určit rozsah změny, především, zda byla excize provedena do zdravé tkáně („in sano“). Na fixované tkáni nelze uplatnit postup s rozvinutím do plochy.

Pokud je konus vysoký, je vhodný následující postup: Z konusu odkrojíme apex, která rozřízneme na 2 poloviny a parafínový blok prokrájíme. Zbytek čípku krájíme na plátky. Před krájením je vhodné obarvit zevní řeznou plochu konusu tuší. Pokud chceme přesně rozsah dysplastických změn lokalizovat, označíme jednotlivé bloky pořadovým číslem v soulase se souběžně pořízeným nákresem. Analogicky postupujeme také při vyšetření amputovaného čípku.

U nízkého konusu apex neoddělujeme.

Některými autory je také uváděn postup s radiální orientací řezů (dortové řezy). Při zalévání konických řezů a při krájení parafínových bloků se velmi často nepodaří orientovat řez na hrot klínovitých excizí, sliznice se také často oddrolí. Metoda s dortovými řezy není proto příliš vhodná.

1.4.11 Ovárium

Ovarium před obdobím fertility má pravidelný ovoidní tvar, na řezu je hnědošedé, homogenní. V období fertility váží 40 – 80 g, velikost je 2,5 – 5 cm × 1,5 – 3 cm. (Ovárium v menopauze se zmenšuje, povrch je hrubě zprohýbaný, váha kolísá od 10 do 20 gramu). Kůra obsahuje folikuly, žlutá a bílá tělíska. Folikuly s dutinou lehce prominují nad úroveň okolí, žluté tělíska má průměr kolem 1 cm, na řezu má okrově jasné zbarvení, po menstruaci je prokrváčené. Tělíska se výrazně zvětšuje v počínající graviditě (až na 1/3 objemu celého ovária). Hilus ovaria je místo vstupu a výstupu cév.

- Registrujeme velikost a váhu. V popisu zaznamenáme zevní tvar, rozlišitelnost hilu, nepravidelnosti povrchu, srůsty, krvácení, cystická vyklenutí.
- Strukturu hodnotíme na příčných řezech o tloušťce 4 mm. Zaznamenáme tloušťku kůry, cystické útvary, žluté tělísko, tumoriformní změny. Podle makroskopie volíme počet excizí.
- Při nenádorové morfologii odebíráme 2 standardní excize, pokud je zastiženo corpus luteum vedeme jednu excizi tímto útvarem. Excize volíme tak, aby zasahovaly hilus, dřev a kůru.
- Při nádorech postupujeme podle morfologie.

1.4.12 Biopsie varlete

Druhy bioptického vyšetření varlete: klínovité excize, prostá orchiektomie, radikální orchiektomie

Klínovité excize Je prováděna k diagnostice mužské neplodnosti, k hledání leukemických infiltrátů. K fixaci je používána zpravidla Bouinova tekutina, která lépe zachovává cytologické podrobnosti než standardní formol. Excize zaléváme tak, aby histologické řezy byly vedeny kolmo na tunica albuginea.

Prostá orchiektomie Je prováděna u zánětů, jako paliativní výkon u karcinomu prostaty, k odstranění kryptorchického varlete.

Varle měříme a vážíme, v popisu uvedeme stav obalů, případnou přítomnost tekutiny v obalech, stav nadvarlete. Varle rozkrojíme podélně od pólu k pólu řezem vedeným přes střední linii nadvarlete a přilehlou oblast rete testis. Histologické excize odebíráme kolmo na dlouhou osu, excize vedeme tak, aby zaujaly tunica albuginea a přilehlé nadvarle. Počet excizí volíme s přihlédnutím na pestrost makroskopických změn. Při orchiektomii pro karcinom prostaty prokrájící varle po 4 mm k registraci případných metastáz.

Radikální orchiektomie Je prováděna u maligních nádorů varlete. Preparát obsahuje varle s nadvarletem, obaly varlete a funiculus spermaticus.

Preparace: otevřením obalů odkryjeme povrch varlete, hodnotíme případný nádorový růst v obalech a mezi obaly, tekutiny, krev, nekrózy. Rozkrojíme varle podélně, hodnotíme morfologii řezných ploch, nalezené změny fotografujeme. Každou polovinu varlete krájíme na plátky o tloušťce 3–4 mm ve směru kolmém na předchozí řeznou plochu a na dlouhou osu varlete a hodnotíme morfologii tumoru. Do řezů pokud možno zaujímáme i nadvarle. Funiculus spermaticus vyšetříme v řezech vedených v několika úrovních, vždy kolmo na jeho dlouhou osu.

Popis: Registrujeme váhu varlete, velikost, délku funiculus spermaticus, morfologii obalů, rozsah nádorového infiltrátu, jeho barvu, vztah k tunica albuginea, případné postižení nadvarlete a funikulu.

Odběr excizií: Z tumoru odebíráme větší počet excizií (alespoň 2 excize z každé poloviny rozkrojeného tumoru, při větších nádorech alespoň jedna excize z roviny každého cm). Odběr má zaujímat všechny makroskopicky různé oblasti (tuhé, prokrvácené, měkké, nekrotické). Celkový počet excizií nelze proto definovat, vždy se řídíme aktiální morfologií.

Z neinfiltrované tkáně jednu excizi z každé poloviny varlete, z nadvarlete 1–2 excize, z funiculus spermaticus příčný řez vedený celou tloušťkou provazce včetně obalů (1 cm nad varletem, jeden příčný řez z centrální oblasti a jeden z koncové oblasti resekatu).

1.4.13 Prostata

Druhy bioptického vyšetření prostaty: punkční jehlová biopsie, transuretrální reseke, intrakapsulární prostatektomie (enukleace), radikální prostatektomie.

Punkční biopsie Punkční bioptické válezky jsou 1–2 mm tlusté, 1–2 cm dlouhé. Jsou odebírány přes stěnu rekta, většinou klinikem položeny na proužek filtračního papíru. Punkční válezky jsou zalévány do parafínu kompletně a hodnoceny po seriovém prokrájení. Před zalitím uvedeme do popisu velikost, tvar a celkovou morfologii punkce (souvislý váleček, rozdrobená tkáň atd).

Transuretrální reseke K vyšetření je zasílán ve formolu velký počet protáhlých tkáňových proužků (většinou 10×5×3 mm). Soubor všech kousků zvažíme. Makroskopicky je vhodné vybírat přednostně žlutavé tuhé kousky, které jsou suspektní z malignity. Exaktní přístup je histologické vyšetření všech kousků, což je často technicky i ekonomicky náročné. Za dostatečné lze považovat vyšetření 1 kazety na každých 5 g tkáně nebo náhodný výběr vzorků nejvýše do 6-ti kazet. Excize skládáme do každé kazety vedle sebe do jedné vrstvy a obsah každé kazety zaléváme seskupený do jednoho parafínového bloku. Je-li nález z prvního výběru vzorků nejasný, zaléváme další výběr excizií.

Intrakapsulární prostatektomie Resekovaná část prostaty je většinou dosti objemná, často rozdělená na 2 i více kousků. Nativní nebo fixovanou tkáň vážíme a krájíme na plátky o tloušťce 3–4 mm. Orientace řezů má být kolmá na průběh prostatické části uretry. Po 24 hodinové fixaci hodnotíme makroskopii.

V popisu uvedeme celkový tvar resekovaných částí a jejich makroskopii (uzly, zbarvení, nekrózy, prokrvácení). Při výběru upřednostňujeme žlutavé a nápadně tuhé oblasti, které jsou suspektní z malignity a také excize z dorzální části prostaty, která je nejčastějším místem výskytu karcinomu.

Odběr excizií: K vyšetření vybíráme 3–5 excizií z pravého a z levého laloku, 1–2 excize ze středního laloku. Jestliže je materiál zaslán ve více částech, pak je třeba odebrat excize z každé zasláné části.

Radikální prostatektomie Preparát zaujímá celou prostatu, obě glandula vesiculosa a část přilehlých měkkých tkání případně s uzlinami. Ve vyšetření je třeba vedle základní diagnózy malignity ještě rozhodnout, zda nádorová změna byla odstraněna celá („in sano“). K označení periferie obarvíme celý povrch resekatu tuší.

Prostatu krájíme příčně na průběh uretry na plátky kolem 5 mm, seřadíme podle pořadí odběru, hodnotíme makroskopicky rozsah infiltrátu, pořídíme fotografii. Nejlepší a nejpřehlednější vyšetření je metoda histotopogramů, kdy vyšetříme histologicky průřez celou prostatou. Přesnou informaci o rozsahu nádoru lze získat také odběrem většího počtu standardních bloků.

Odběr excizi: Nádor: počet potřebných bloků z nádoru je různý podle makroskopie. V některých případech stačí vyšetření 3 bloků, jindy je třeba vyšetřit z infiltrované oblasti 10 i více excizi. Excize mají zasahovat kapsulu i uretru. Prostata mimo nádor: z každého laloku 2 – 3 bloky. Excize z každé glandula vesiculosa. Příčné excize z obou konců uretry. Excize z každé nalezené uzliny. Další excize podle makroskopického nálezu.

1.4.14 Kosterní sval

Metodika komplexního vyšetření kosterního svalstva se skládá z histochemického vyšetření, z kvantitativního vyšetření, z histologického konvenčního vyšetření a ze zalití tkáně pro elektronový mikroskop.

- Histochemické vyšetření. Přehled metodik je uveden u charakteristiky svalových vláken.
- Vyšetření kvantitativní informuje o procentuálním zastoupení vláken typu I. a II. a o změnách příčných průměrů vláken (atrofie, hypertrofie). Kvantitativní hodnocení vyjadřuje histogram. V preparátech s reakcí na průkaz myosinové ATPázy měříme příčné průměry vláken typu I. a II. (celkem 100 vláken každého typu) a hodnoty vynásíme do grafu. Na osu x vyneseme hodnoty v nm nebo v pracovních jednotkách daných způsobem měření (např. počet dílků okulárového mikroskopu), na osu y počet naměřených vláken. Výsledná křivka ukáže velmi instruktivně, jde-li o atrofii, hypertrofii nebo kombinaci obou procesů. Procentuální zastoupení typu I. a II. stanovíme prostým spočítáním vláken v zorném poli nebo na mikrofotografii. Na mikrofotografii lze měřit i příčné průměry. Protože řezná plocha není vždy přesně kolmá na průběh vláken a vznikají často elipsovité průřezy, měříme vždy kratší průměr.
- Konvenční histologické vyšetření: část preparátů vyšetřujeme v přehledném histologickém barvení (hematoxylinem eosinem, Van Gieson, retikulární vlákna). K tomuto účelu je vhodné zbytek excize po nakrájení kryostatových řez zalít do parafínu a v případě potřeby bloček prokrájet. Prokrájení se osvědčuje hlavně při hledání zánětlivých změn, ložiskové infiltrace endomyxia, při kolagenózách, při poškození cév atd.
- Zalití pro elektronový mikroskop. Drobná částička svalu bezprostředně po vyjmutí excize je zalita konvenčním způsobem pro případné ultrastrukturální vyšetření. K histochemickému vyšetření jsou používány kryostatové řezy z nativní tkáně. Zmrazování je třeba věnovat velkou pozornost. Po vyjmutí excize (optimální velikost 1,5 – 2 cm, průměr 6 – 8 mm) ostrou žiletkou upravíme tloušťku bloku (jeden v kolmém řezu, jeden v podélném směru s průběhem svalových vláken). Správně orientovaný blok na stolku nebo na korkové ploténce zmrazíme vložením do kapalného propan-butanu, vychlazeného kapalným dusíkem na olejovitou konzistenci. Uvedeným způsobem zamezíme vzniku mrazových artefaktů, které znehodnocují blok při prostém zmrazení pevným CO₂ nebo proudem CO₂. Zpracování v kryostatu se děje konvenčním postupem. S nativní tkání manipulujeme velmi opatrně. Mechanický tlak, např. peánem, vyvolává nežádoucí tlakové artefakty.

1.4.15 Kůže

Kožní excize jsou prováděny z důvodů diagnostických při nenádorových lézích, dále při benigních a maligních lézích jako léčebný nebo léčebně-kosmetický výkon. Je nutná spolupráce s klinikem, aby přikrajující

rámcově věděl, o kterou indikaci se jedná.

U menších excisí je vždy vhodné, pokud klinik před vložením do fixačního roztoku položí excisi na fyziologickým roztokem zvlhčený proužek filtračního papíru.

Při zpracování kožních excisí má zásadní význam orientace tkáně. Pokud se nepodaří pořídit histologické řezy kolmo na povrch, jsou možnosti patologa omezeny a diagnóza je problematická.

Diagnostická excise při nenádorovém onemocnění Snažíme se, aby řez zachytil co největší část tkáně. Často řežeme excise podélně. U puchýřů se snažíme zachytit přechod nepostižené tkáně do vesikuly.

Velmi důležitá je i přiměřená velikost excise. U excisí nepatrných rozměrů, které nejdou spolehlivě orientovat, často nelze dospět k diagnóze.

Při kožních excisích z důvodů diagnostiky *alopecie* se doporučuje rozdělit tkáň podélně, jednu polovinu orientovat klasicky a tu druhou rozdělit dále tak, aby řezy vedené rovnoběžně s povrchem zachytily hlubokou oblast (cibulky) a povrchovou oblast (v místech vývodů mazových žlázek). To ovšem předpokládá odběr tkáně adekvátní velikosti: průměr cca 10 mm, hloubka do tukové tkáně včetně. Vzhledem k tomu, že tímto způsobem se u nás biopsie při alopecii neodebírání a zpravidla přijde drobná, jen 1 – 2 mm velká excise, je vhodnější takovou tkáň zalít vcelku. Zpracováním podle doporučeného schématu by se tkáň zmařila.

Při *barvení* používáme rutinně HE, PAS a barvení na elastická vlákna, dále dle situace.

Diagnostická excise u kožních tumorů *Označíme (nejlépe stříbřením) okraje excise.* U předpokládaných benigních lézí vedeme řezy napříč tumorem v místech největšího přiblížení tumoru k okrajům excise.

U kožních bazaliomů (kde často není tumor patrný a vzdálenost od okrajů excise nelze odhadnout) zpracováváme tkáň celou. Buď (podlouhlou) excisi nařežeme na několik plátků a označíme zvlášť oba cípy nebo volíme přikrajování do kříže (zde je nutné zvlášť pečlivě orientovat tkáň v bločku).

U velkých resekátů odebíráme reprezentativní vzorky z tumoru a dále řadu menších odběrů z okrajů.

Pokud klinické (například při plastických výkonech) označují orientaci tkáně (stehy), je nutné nejen obarvit okraje řezu, ale také zajistit, aby bylo možné bloky a jejich hrany orientovat: je nutné číslovat bloky a použít na značení barevné tuše.

Při popisu uvedeme velikost vzorku, zda je patrný tumor, jeho velikost a vztah k okrajům excise, jakým způsobem byla tkáň přikrojena a označena.

Tumory barvíme rutinně HE, dále dle případných dalších požadavků pro identifikaci tumoru.

2 Histopatologické barvicí metody

2.1 Histologická barvení

2.1.1 Přehledná barvení

Hematoxylin-eozin Základní barvicí metodou v patologii je barvení Hematoxylinem-Eozinem (HE). Hematoxylin je bazické barvivo, kterým se barví jádra buněk modře, eozinem (kyselé barvivo) se barví cytoplazma červeně. Nejčastěji používaným hematoxylinem pro rutinní barvení je Mayerův hematoxylin. Roztok hematoxylinu sám o sobě bazofilní substance neobarví, nejdříve je třeba jej oxidací (jodičnanem sodným) přeměnit v hematein a z něj připravit barevný lak přidáním mořidla (kamence draselného). Acidofilní substance se barví vodním roztokem žlutého eozinu.

Weigert van Gieson Nejužívanější metodikou na barvení kolagenu je podle Weigert van Giesona. Jádra se barví železitým hematoxylinem modročerně a roztok pikrofuchsinu obarví kolagenní vazivo červeně a svalstvo žlutě.

Trichomy K barvení vaziva tzv. trichromem se používá anilinová modř (modrý trichrom), světlá zeleň žlutavá (zelený trichrom) nebo dnes již nepoužívaný šafrán (žlutý trichrom). U všech trichromů slouží k barvení jader Weigertův hematoxylin, k dobarvení kolagenu a dalších struktur ponceau kyselý fuchsin, oranž G a světlá zeleň žlutavá, případně anilinová modř. Oranž G se může použít jako samostatný barvicí roztok nebo ve směsi se světlou zelení případně anilinovou modří. Tato směs je použita v barvicí modifikaci Goldner G 5.

Trichromy se barví jádra modročerně, sval a erytrocyty červeně a kolagen zeleně nebo modře (podle použitého barviva).

Obdobná metoda na barvení kolagenu je *Malloryho metoda*. K barvení se používá anilinová modř ve směsi s oranží G a kyselinou šfavelovou. Kolagen se barví modře, erytrocyty a sval červeně, jádra oranžově a fibrin růžově.

2.1.2 Elastika

Elastická vlákna se barví nečastěji resorcin-fuchsinem nebo orceinem a k dobarvení dalších tkáňových struktur se používá Weigertův železitý hematoxylin, pikrofuchsin, indigokarmín a jádrová červeň.

V metodice s resorcin fuchsinem se vybarví elastika tmavě fialově, k dobarvení je použit buď pikrofuchsin (kolagen obarví červeně, sval a erytrocyty žlutě), nebo indigokarmín (kolagen obarví zeleně, svalovinu a erytrocyty žlutě). Jádra jsou v obou případech obarvena Weigertovým hematoxylinem modročerně.

V barvicí metodě s orceinem jsou elastická vlákna zbarvena hnědočerveně a po dobarvení jádrovou červení a indigokarmínem jsou jádra červená, kolagen je zbarven zeleně, sval a erytrocyty žlutě.

2.1.3 Impregnační metody

Principem všech impregnačních metod je v první fázi impregnace tkání různě upravenými roztoky stříbra. Ve druhé fázi je kovové stříbro redukováno na jednotlivých strukturách přímo nebo pomocí redukčních činidel. Dále je možno získaný obraz ustálit (podobně jako ve fotografii), nejčastěji sirnatanem sodným a někdy je možno v další fázi tónovat např. roztokem chloridu zlatitého. Takto se stříbro může vyredukovat na celé řadě buněčných typů a struktur (neurony, neuroglie, retikulární vlákna, ...). K tomu jsou jednotlivé metody empiricky adaptovány tak, aby došlo ke znázornění žádoucího typu buněčné struktury. Jednotlivé metody se tak liší v podrobnostech zahrnujících různé koncentrace použitých solí, různé pH, přítomnost dalších látek v inkubačním prostředí, předchozí oxidací řezů, atd. Není tedy jasně definovaná molekula nebo skupina, na kterou se vyredukováný kov naváže. Nicméně řada z těchto metod se dosud úspěšně používá ke znázornění retikulárních vláken, vápenatých solí, melaninu, plísni, k průkazu karcinoidu a *Helicobacter pylori*.

Obecně platí o všech impregnačních metodách nutnost dbát maximálně na čistotu laboratorního skla (chromsírová kyselina, destilovaná voda), precizní zpracování a je nutná jistá zkušenost, aby bylo dosaženo optimálního výsledku.

2.1.4 Retikulární vlákna

Retikulární vlákna zviditelníme impregnační metodou dle Gomoriho. Tkáňové řezy oxidujeme manganistanem draselným, následuje impregnace amoniakálním roztokem stříbra, které se vyredukuje na retikulárních vláknkách, a potom tónuje a ustálí. Retikulární vlákna jsou zbarvena černě, jádra buněk jsou dobarvena jádrovou červení červeně.

2.1.5 Polysacharidy

Ke znázornění *polysacharidů* jsou užívány metody PAS, PAS s digescí (polysacharidy jsou červenofialově a jádra modře Mayerovým hematoxylinem), alcianová modř (kyselé mukopolysacharidy barví modrozeleně), Haleho metoda k průkazu kyselých mukopolysacharidů koloidním železem (jsou vybarveny rovněž modrozeleně).

Hlen barvíme mucikarmínem, po předbarvení jader Mayerovým hematoxylinem a obarvení v roztoku metanilové žluti. Výsledek barvení: jádra jsou znázorněna modře, vazivo žlutě, hlen intenzivně červeně, erytrocyty a svalovina žlutě.

Podrobněji jsou metodiky rozvedeny v kapitole histochemické metody.

2.1.6 Lipidy

Průkaz tuků provádíme na *řezech na zmrzlo*, případně na kryostatových řezech. Lipidy prokazujeme barvením olejovou červení s následným dobarvením jader Mayerovým hematoxylinem (tukové kapénky jsou obarveny pomerančově červeně, jádra modře) nebo černým sudanem, který lipidy znázorní modročerně.

Cholesterol se prokazuje v řezech na zmrzlo metodou podle Schultzeho. Řezy se moří 7 dnů v roztoku síranu železitoamonném při 37°C. Po vyprání v kyselém octanovém pufru a přenesení do roztoku formolu se barví cholesterol a jeho estery v několika prvních vteřinách červenofialově a mění se v tmavě zelenou. Barvení není stále, do hodiny vybledne, proto je třeba odečítat okamžitě.

Podrobněji jsou metodiky rozvedeny v kapitole histochemické metody.

2.1.7 Fibrin, bakterie

Weigertovo barvení je vhodné ke znázornění fibrinu i bakterií. Používá se při ní gencianovioleť (Gram I.), Lugol a k dobarvení jader jádrová červeně. K diferencování se používá směs anilin-xylool. Fibrin se barví modře, Gram pozitivní bakterie modře, Gram negativní bakterie růžově a jádra červeně.

Gram na bakterie se liší od předchozího barvení pouze diferenciací po Lugolu. Používá se směs aceton-alkohol a znázorněna jsou pouze jádra a bakterie, fibrin se nebarví.

Barvení mykobakterií podle Ziehl-Neelsena umožňuje v termostatu přehřátý roztok karbolfuchsinu. Zbarví Kochovy bacily fialově červeně, ostatní tkáň je dobarvena methylenovou modř světle modře.

2.1.8 Amyloid

Amyloid prokazujeme barvením v roztoku kongo červení s následným dobarvením jader Mayerovým hematoxylinem. Barví se červeně. Amyloid je možno znázornit řadou dalších metod (thioflavin, imunohistochemické metody). Podrobněji jsou metodiky uvedeny v kapitole histochemické metody.

2.1.9 Anorganické látky

Železo Trojmocné železo se prokazuje Perlsovou metodou založenou na reakci trojmocného železa s feroxyanidem draselným v kyselém prostředí za vzniku berlínské modři. Po dobarvení jader jádrovou červení jsou jádra zbarvena červeně a železo modře až modrozeleně. Podrobnosti jsou uvedeny v kapitole histochemické metody.

Vápník Vápenaté soli se prokazují impregnační metodou podle Kossy, založenou na redukcí dusičnanu stříbrného na stříbro. Po dobarvení jader jádrovou červení jsou jádra vybarvena červeně a vápenaté soli černě.

Měď Měď se znázorní pomocí kyseliny rubeanovodíkové hnědočerně. Po obarvení se musí rychle odečíst, protože barva se rychle ztrácí.

2.1.10 Pigmenty

Bilirubin Tento pigment prokazujeme metodou dle Foucheta. Řezy jsou vystaveny působení Fouchetovy směsi (roztok chloridu železitého a kyseliny trichloroctové v destil. vodě). Bilirubin je zbarven zeleně a po dobarvení pikrofuchsinem se vybarví vazivo červeně a erytrocyty žlutě.

Melanin Průkaz melaninu provádíme impregnační metodou dle Massona. Z amoniakálního roztoku stříbra při pokojové teplotě za 24 hod. redukuje melanin kovové stříbro a zbarvuje jej černě, jádra jsou dobarvena jádrovou červení.

Další metodika na znázornění promelaninu a melaninu je modifikace Bodianovy protargolové metody dle Dublina. Impregnace v protargolu probíhá ve tmě 24 hod., pak následuje vyvolání hydrochinonem, tónování chloridem zlatitým a ustálení v sirnatanu sodném. Promelanin a melanin je znázorněn černě, ostatní tkáňové složky odstíny růžové a šedomodré.

2.1.11 Plísň

K průkazu plísni slouží impregnační metoda dle Grocotta, v níž se po předchozím moření v kyselině chromové impregnuje roztokem urotropinu s dusičnanem stříbrným. Po tónování a ustálení jsou plísň zbarveny černě, jádra červeně po dobarvení jádrovou červení.

2.1.12 Karcinoid

Karcinoid prokážeme impregnací v roztoku dusičnanu stříbrného a následnou redukcí v roztoku hydrochinonu a siřičitanu sodného. Následuje dobarvení jádrovou červení. Výsledek: karcinoid — černá granula, jádra červená. Při diagnostice karcinoidů se uplatňují také metody imunohistologické.

2.1.13 MGG — krevní elementy

U trepanobiopsií, krevních koagul, případně v uzlinách potřebujeme znázornit krevní elementy. K tomu slouží metoda *May Grünwalda Giemsy*. Pokud je tkáň fixována formolem, naloží se před barvením nejméně na 24 hod. do metylalkoholu. Po obarvení roztokem

May Grünwald a ředěným Giemsou jsou eozinofilní složky v různých odstínech růžové a červené a bazofilní složky v různých odstínech světlomodré a tmavomodré.

Jaderný chromatin znázorní metoda dle Unna Pappenheima. V roztoku metylenové zeleně a pyroninu se zbarví chromatin zeleně, ostatní složky v různých odstínech červené a plazmocytů intenzivně červeně.

2.1.14 Myofibrily

K znázornění příčně pruhovaného svalu a jaderného chromatinu se používá barvení dle Heidenheina. Po moření v roztoku síranu železitoamonného barvíme alkoholickým hematoxylinem. Myofibrily a chromatin jsou znázorněny modročerně, ostatní tkáň má šedé a hnědavé odstíny.

2.1.15 HBs-Ag — australský antigen

Je-li třeba v játrech prokázat australský antigen, moří se řezy tkáně v roztoku manganistanu draselného a kyseliny sírové, následuje vodný roztok kyseliny šťavelové a barvení orceinem při pokojové teplotě 24 hod. Po diferenciaci v kyselém alkoholu se jeví australský antigen jako tmavě hnědá granula, ostatní tkáň je světle hnědá.

2.1.16 HP — campylobakter

K průkazu *helicobacteria pylori* se užívá impregnační metoda Warthin-Starry. Řezy se inkubují 1 hodinu v roztoku dusičnanu stříbrného v termostatu při 56°C. Použitím vývojký (roztok želatiny, hydrochinonu a dusičnanu stříbrného) se zbarví HP tmavě hnědě až černě.

2.1.17 Kresylvioleť

Jde o základní přehlednou neurohistologickou metodiku, která slouží také k ozřejmění žírných buněk v kůži. K barvení se používá roztok kresylvioleti v acetátovém pufru pH 4, octanu sodném a kyselině octové ledové. K barvení se používá vždy čerstvý roztok. Nukleoly jsou zbarveny sytě modrofialově, jádra jsou ostře konturovaná a světlá.

2.2 Základní barvení v cytologii

2.2.1 May Grünwald Giemsa

Je základní jednoduchá monochromatická metoda používaná v cytodiagnostice. K barvení se používá roztok May Grünwalda a následně ředěný roztok Giemsy. Buněčné struktury jsou vybarveny v různých odstínech modré až modrofialové barvy. Dobře znázorňuje i nebuněčné struktury, jako bakterie, plísňe.

2.2.2 Papanicolaou

Je druhým základním barvením v cytologii, nezbytné pro barvení gynekologických nátěrů, ale používané i na všechny ostatní systémy. Jde o barvení polychromní, je to metoda složitá a vyžaduje fixáž cytologických nátěrů až do doby barvení. K barvení se používá na barvení jader Harrisův hematoxylin, následuje barvení roztokem oranže G a polychromem EA 50.

Buňky jsou transparentní, jsou dobře vidět i když jsou přeložené nebo ve dvou vrstvách. Polychromatické barvení umožňuje sledovat vyzrávání dlaždicového epitelu, což je důležité pro sledování ve funkční cytologii.

2.3 Neurohistopatologické metody

Ke znázornění struktur CNS jsou používány barvicí a impregnační metody. Podle typu znázornění jednotlivých složek nervové tkáně je dělíme na čtyři základní skupiny:

2.3.1 Barvení tigroidu (Nisslovy substance)

K barvení tigroidu (granulární retikulum + ribozomy) slouží přehledné barvicí metody podle Nissla, které znázorní základní kontury buněk, jádra a Nisslovu substanci v různých odstínech jednoho barevného tónu (fialové nebo modré). Nejpoužívanější je barvení kresylvioletí (roztok kresylvioleti v acetátovém pufru v kyselém pH), při kterém se barví nukleoly a Nisslova substance modrofialově, jádra jsou světlá, ostře konturovaná. K barvení používáme vždy čerstvý roztok barviva.

Dále je možno použít prakticky se stejným výsledkem roztok toluidinové modři nebo thioninu.

2.3.2 Barvení myelinu

Myelinové pochvy barvíme metodou podle Spielmeyera, Loyeze nebo Weila. Barvíme hematoxylinem po předchozím moření tkáně kamencem (nejčastěji železitoamonným). Působením kamence se stane myelin nerozpustným a ve spojení s hematoxylinem vznikne barevný lak, kterým se myelin obarví.

Při barvení luxolovou modří se používá alkoholický roztok luxolové modři. Ten obarví fosfolipidy, které jsou důležitou součástí myelinu, modrozeleně.

2.3.3 Znázornění neuroglie

Neuroglii je možno znázornit barvicími metodami, nebo impregnací (viz oddíl impregnace).

Z barvicích metod je nejužívanější Malloryho fosfowolframový hematoxylin (modifikace dle Andersona). Při barvení používáme roztok sublimátu, Andersenovo neurogliové mořidlo (složení: roztok siřičitanu sodného, kyseliny šťavelové, jodidu draselného a krystalického jódu) a Malloryho fosfowolframový hematoxylin. Neuroglie a fibrin se znázorní modře, pozadí růžově.

Impregnační metody na glii byly používány na nervovou tkáň fixovanou bromformolem. Metoda Cajalova na zmrazené řezy, ve které se glie impregnuje v zlatosublimátovém roztoku (sublimát a chlorid zlatitý) v temnu. Astrocyty jsou znázorněny modročerně, gangliové buňky jsou načervenalé.

V současné době se ke znázornění neuroglie používá téměř výhradně imunohistochemických metod k detekci GFAP (gliální fibrilární acidický protein) a dalších.

2.3.4 Metody na znázornění neuronů a nervových vláken

Impregnační metody ke znázornění neuronů byly používány před nástupem imunohistochemie do neuropatologické diagnostiky. Znázorňují dobře senilní drůzy a patologické změny neurofibril.

Spolehlivé výsledky dávala metoda podle Bielschowského či metoda podle Gross-Schulze ve zmrazených řezech.

V parafinových řezech to byla metoda podle Palmgrena.

Bodianova protargolová metoda bývala používána na parafinových řezech pro její jednodušost a časovou nenáročnost.

3 Klinická cytologie (cytodiagnostika)

Cytodiagnostika je morfologická diagnostická metoda, která hodnotí jednotlivé buňky oddělené z tkání. Materiály dodávané do cytologické laboratoře jsou různorodé, podle místa odběru lze didakticky dělit cytologii na několik skupin (druhů). Výhodou metodiky je její rychlost, nízká cena a netraumatizující přístup k pacientovi.

3.1 Druhy cytologických vyšetření

Exfoliativní cytologie hodnotí buňky oddělené z epiteliálních povrchů. Do této skupiny patří standardní gynekologická cytologie (stěry z děložního čípku, z cervikálního kanálu dělohy a z endometria), pneumologická exfoliativní cytologie (stěry a laváže bronchů a z plic, sputum), urologická cytologie (buňky získané z moče a z výplachů močového měchýře), dále stěry z ostatních epiteliálních povrchů.

Cytologie z výpotků tělních dutin jako je fluidothorax, ascites, hydroperikard, kloubní výpotek, mozkomíšní (spinocerebrální) likvor.

Obsah cyst a pseudocyst získaný punkcí.

Otisky z řezných ploch orgánů, nádorů a pseudotumorů, odebíraných k histologickému vyšetření.

Punkční cytologie tkání tenkou jehlou je metoda mírně invazivní, prováděná běžně ambulantně. Používá se nejčastěji v dg. změn štítné žlázy, prostaty, prsu, pankreatu, z plicní tkáně a z jiných orgánů. Klinik vpichuje do suspektního ložiska tenkou injekční jehlou a speciální pumpou (pistolí) aspiruje. Z okolí hrotu jehly jsou strhávány buňky a drobné tkáňové útržky společně s tkáňovým mokem a krevními elementy. Obsah jehly je vystříkván na podložní sklo a rozetřen do plochy. Drobné útržky tkáně jsou fixovány a vyšetřeny histologicky.

Cytologii jako obor založil americký gynekolog Papanicolaou. Popsal změny buněk na nátěrech z děložního čípku v průběhu menstruačního cyklu. Zjistil, že početní zastoupení buněk a jejich morfologie se charakteristicky v průběhu cyklu mění. Z odchylek od normy lze odhadnout některé patologické procesy. Také v průběhu postupné malignizace (metaplázie a dysplázie) vznikají dosti charakteristické změny, které jsou diagnosticky hodnotitelné. Papanicolaou navrhl speciální barvení nátěrů na podložních sklech zhotovených z buněčných stěrů čípku. Tato metoda nese jeho jméno a používá se dodnes. Postupně byla vypracována řada dalších modifikací.

Cytodiagnostika je metoda jednoduchá, levná a rychlá, poskytuje diagnostické informace blízké nálezům z tkáňových excizí. Proto se postupně rozšířila na ostatní orgánové systémy. Byly srovnávány přesné histologické nálezy s cytologickými odběry a byla stanovena kritéria pro různé tkáně, která, analogicky jako na děložním čípku, definující znaky postupné transformace od normy až k maligními zvratu. V nátěrech lze rozpoznat také zánětlivé změny, rozlišit bakterie, prvky a plísňe.

Cytologické vyšetření hraje dnes významnou roli v onkologii, především v preventivní onkologii. Cytodiagnostika v širším slova smyslu má 3 složky: vlastní metodiku, skríníng a formulaci závěrečné diagnózy. Metodiku a skríníng provádí histologičtí laboranti s nadstavbovou atestací (skrínérky). Skrínérka prohlíží preparáty, vyhledává diagnostická místa, provádí jejich popis. Preparáty s předběžnou dg. pak předkládá kvalifikovanému patologovi k formulaci závěrečné diagnózy.

3.2 Cytologická metodika

Při vyšetřování různých cytologických materiálů je metodika v zásadě stejná. Pro informační přehled jsme vybrali jednu diagnostickou disciplínu, tj. pneumologickou cytologii. Cytologické preparáty jsou zhotovovány z patologických výpotků, sekretů, stěrů, z tekutiny získané z laváží a z fluidothoraxu. Z odebraného materiálu zhotoví nátěry na podložní sklo buď přímo klinik, nebo materiál posílá do laboratoře k dalším úpravám. K úpravám tekutin patří nejčastěji centrifugace. V nátěru centrifugátu jsou buňky mnohem početnější než v přímém nátěru odebraných tekutin. Velká koncentrace buněk je v preparátech z tekutin zpracovaných pomocí speciální centrifugy, cytopsinu. Exfoliativní materiál, sputum nebo jiné viskózní tekutiny, které nejde spolehlivě rozetřít (např. zahoustlé obsahy cyst) mohou být po fixaci zalévány do parafínu (cytoblok) a cytologický obraz je hodnocen v histologických řezech. Nález je odečítán na podložním skle po vizualizaci buněk různým barvením nebo histochemickými, případně imunohistochemickými metodami.

Do laboratoře posílá klinik několik druhů materiálu z respiračního systému, každý z nich vyžaduje jiný postup. Bronchiální výplachy, pleurální výpotky, tekutina z bronchoalveolární laváže, pukce z cyst jsou většinou dodávány ve zkumavkách, případně také ve sputovkách bez příměsí fixačních roztoků. Sputum je dodáváno ve fixačním roztoku v širokých nádobkách — sputovkách. Ve formě nátěrů jsou dodávány kartáčkové stěry odebrané při bronchoskopii, nátěry aspirátů, nátěry punkcí z tkání získaných tenkou jehlou, také nátěry jiných, většinou viskózních tekutin, případně také sputum a pleurální výpotky. Zde je třeba zmínit výrazný podíl klinika na výsledku. Jen dobře provedený nátěr umožní správnou diagnózu.

Sputum: Vyšetření sputa je starší, ale stále vysoce informativní součástí cytodiagnostiky. Sputum lze vyšetřovat v nátěrech. Nátěr však reprezentuje jen malou část celého objemu sputa. Proto je dnes přednostně používaná metoda cytobloku. Sražené-fixované sputum vkládáme do histologických kazet a dále zpracováváme v parafínových řezech jako tkáňovou excizi. Výhodou cytobloku je možnost aplikace dalších metod. Pokud jsou v řezech zachyceny útržky nádoru, mohou být další řezy vyšetřeny imunohistochemicky a upřesněn typ nádoru.

Nátěry: Metodika barvení nátěrů je jednoduchá. Lze použít HE, PAP (Papanicolaou), MGG (May Grünwald Giemsa) a jiné. Optimální je standardně používat na každý ma-

teriál MGG a PAP. Má to své výhody. Každá metodika znázorňuje selektivně jednotlivé typy buněk a jiné složky nátěru, např. bakterie, plísně. Řezy lze barvit jednotlivě nebo v sériích ve speciálních držácích, případně v barvicím automatu.

Cytospin: Významný pokrok v cytodiagnostice znamená zavedení cytospinu. Cytospin je speciální centrifuga. Vyšetřovaná tekutina je nakapána do konické kyvety, která je připojena na držák s podložním sklem. Při centrifugaci je tekutina odsáta do vložky z filtračního papíru, buňky zůstávají stejnoměrně rozložené na podložním skle v malém kruhovitém poli.

Pomocí cytospinu lze zhotovit informativní preparát i z málo buněčných tekutin, případně z malého množství materiálu. Buňky jsou v porovnání s prostým nátěrem nepoškozené. Dalším použitím cytospinu je zhotovení cytospinových cytobloků. Metodika je náročná časově i finančně, používána jen v indikovaných případech. Při cytospinové centrifugaci jsou buňky zachycovány v gelovém prostředí. Gel se suspenzí buněk je dále zpracován parafínovým postupem a buňky jsou hodnoceny v histologických řezech. Metodika dovoluje širší aplikaci imunohistochemie v cytologii. Vysvětlení: V prostých cytospinových preparátech se v mikroskopu díváme na celou buňku. Celý povrch kryje cytoplazmatická membrána. Nelze rozlišit, zda rozložení imunohistochemické reakce je pozitivní na buněčné membráně, v cytoplazmě nebo v jádře. Řada protilátek s vazbou na cytoplazmatické antigeny přes buněčnou blánu neproniká nebo proniká špatně. V řezu jsou však buňky rozkrojeny. Rozlišení membránových, cytoplazmatických a jaderných antigenů je pak velmi přesné.

3.3 Cytologická diagnostika, diagnostický skríníng

Cytologické metodiky jsou tou snadnější částí práce. Náročnou částí je interpretace nálezu, tj. formulace předběžné diagnózy a konečné cytologické diagnózy. V prvním kroku formulují dg. skríněři. Umějí rozlišit variace normy, zánětlivé změny, prekancerózy, hlavní typy nádorů. K tomu je vypracován systém soustavného vzdělávání, který skríněři průběžně absolvují. Práce skríněřů šetří práci patologům a speciálním cytodiagnostikům. Cytodiagnostika je hojně používanou metodikou. Bez skríněřů by práce kvalifikovaných patologů nebyla ekonomická. Skríněř odpovíděně vyloučí nátěry, které nejsou suspektní (až 80%). Závěrečnou dg. (ze zbývajících 20%) garantuje kvalifikovaný patolog. Patolog provádí také namátkovou kontrolu skríněřských diagnóz.

Skríněřská cytodiagnostika chorob respiračního traktu a plic umí z dobře odebraného materiálu rozlišit normální nález a řadu patologických obrazů.

Normální nález: jeho součástí je přítomnost řasinkových buněk, pohárkových buněk, rezervních buněk, normálních buněk patřících k imunitnímu systému (neutrofilů, lymfocytů, plasmatické buňky, makrofágy).

Při zánětech mohou být epitele regresivně poškozené a buňky imunitního systému jsou různě zmnožené podle typu zánětu. Při granulomatózních zánětech mohou být přítomny buňky epiteloidní, případně metaplastické epitelie.

Při prekancerózách a karcinomech se objevují buňky metaplastické a atypické se zvětšenými hyperchromními jádry a zmenšeným objemem cytoplazmy. U *dlaždicobuněčného karcinomu* dominuje polymorfie jader s výraznými nukleoly, tendence k rohovění nebo výrazné rohovění. Změny jsou rozdílné u karcinomu z buněk bazocelulárního typu, intermediálního typu a superficiálního typu. *Malobuněčný karcinom* (ovískový) je charakterizován drobnými buňkami s tmavými jádry a s malým množstvím cytoplazmy nebo jádry bez cytoplazmy a bez zřetelných jadérek. Buňky se často sekupují v trsy. *Adenokarcinomy* vykazují většinou buněčnou polymorfii, přítomnost hľenu v cytoplazmě, případně řazení buněk do adenoidních formací. Polymorfní *velkobuněčný karcinom* je charakterizován velkými polymorfními buňkami, některé buňky mají mitotické figury, nebývají přítomny známky rohovění a produkce hľenu. Podrobný popis těchto nálezů a nálezů u dalších diagnostických jednotek je uveden v příslušných diagnostických monografiích.

3.4 Cytologická diagnostika děložního čípku

Cytologická diagnostika čípku je dnes podrobně vypracovaná. V průběhu vývoje metodiky bylo zavedeno několik diagnostických systémů. V současné době je pro všechny cytology celosvětově závazná klasifikace „Bethesda“. Byla vypracována skupinou expertů v r. 1988 v americkém městě Bethesda, odtud dnešní název.

Předpokladem správné diagnózy je správný odběrový postup: tj. tenký nátěr provedený gynekologem, okamžitá fixace a následné barvení nátěru. K odběrům se používá kartáček, dřevěná špátle, méně vhodná je vatová štětka. Pro hormonální cytodiagnostiku jsou odebírány stěry z horní třetiny pochvy. Pro onkologickou cytodiagnostiku jsou odebírány nátěry z podezřelých lézí na vulvě, pochvě, ektocervixu, endocervixu, případně z děložní dutiny. Za fixační tekutinu slouží nejčastěji směs alkoholu a éteru nebo izopropylalkohol, případně se nátěry postříkají fixačním sprejem. Nátěry jsou barveny polychromatickou metodou podle Papanicolaoua. Při hodnocení skrínér rozeznává všechny druhy buněk, posuzuje změny jádra, jadérka a jaderné membrány i změny cytoplazmy. Také popisuje jiné komponenty nátěru jako jsou bakterie, mykózy a trichomonas. Vyjadřuje se také ke kvalitě provedeného nátěru.

3.4.1 Hormonální cytologie

Cytologické vyšetření informuje klinika o hormonální aktivitě ve vztahu k menstruačnímu cyklu. K tomu slouží řada indexů, které informují o aktuální zralosti vrstevnatého dlaždicového epitelu vagíny.

Index karyopyknotický vyjadřuje poměr povrchových buněk s pyknotickým jádrem

k buňkám intermediálním bez ohledu na barvu cytoplazmy.

Index eozinofilní vyjadřuje poměr počtu eozinofilních superficiálních buněk k superficiálním buňkám cyanofilním.

Index maturační vyjadřuje poměr mezi počtem parabazálních, intermediálních a superficiálních buněk.

Index svinování ukazuje poměr počtu zralých buněk s hladkými okraji k počtu buněk se svinutými okraji.

Index shlukování vyjadřuje poměr počtu odloučených epitelíí ve shlucích k počtu zralých buněk uložených v nátěru jednotlivě nebo ve shlucích do 3 buněk.

3.4.2 Klasifikace Bethesda

Klasifikační schéma Bethesda poskytuje klinikovi standardní informace (viz výše). Skrínerka odečítá z nátěru řadu údajů. Problematika je obsáhlá, je náplní speciálních monografií. Nález klinika úvodem informuje o tom, zda správně nátěr odebral (adekvátnost vzorku), sdělí, zda vzorek dostačuje pro diagnostické vyšetření, zda je nebo není zachycena transformační zóna. Dále informuje, zda není kvalita znehodnocena překrytím krví, nadměrnou hustotou nátěru, zaschnutím před fixací aj. V případě, je-li nátěr nehodnotitelný, je třeba uvést důvod. Může být uveden popis nálezu s poznámkou, že nátěr nedostačuje k vyšetření abnormit. V praxi není vždy jednoduché odlišit reaktivní změny od dysplastických. Hlavním nálezem v klasifikaci Bethesda (analogicky jako u jiných klasifikací) je přítomnost atypií epitelových buněk a přítomnost nádorových buněk. Atypie jsou charakterizovány přesně definovanými mezinárodně užívanými zkratkami a názvy. Stručný přehled uvádíme.

Zkratky pro atypie dlaždicových epitelíí:

ASC-US (atypical squamous cell of undetermined significance) atypické dlaždicové buňky nejasného významu

ASC-H (atypical squamous cells) atypické dlaždicové buňky — nelze vyloučit HSIL.

LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion) lehká dlaždicobuněčná intraepiteliální léze

HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion) střední a těžká dlaždicobuněčná intraepiteliální léze

Dlaždicový karcinom

Zkratky pro atypie cylindrických epitelů:

AGC-NOS (atypical glandular cells not otherwise specified): atypické glandulární buňky
blíže nespecifikované

AGC-FN (atypical glandular cells favor neoplastic) atypické glandulární buňky spíše
maligní

adenokarcinom

- endocervikální
- endometriální
- původem mimo dělohu
- blíže neurčený

jiné zhoubné nádory

3.4.3 Kvalifikace skríněrky

Skríněrka získává kvalifikační oprávnění po speciální dvou-tříleté přípravě zakončené cyto-diagnostickou atestací. Kvalifikace skríněrky je průběžně kontrolována na pracovišti kvalifikovanými patology/cytology a celostátně (i mezinárodně) příslušnými testy.

4 Histochemické metody v biotické diagnostice

Histochemické metody slouží k identifikaci chemických individuí, tedy prvků, funkčních skupin či molekul *in situ*, tzn. k průkazu jejich přítomnosti ale i lokalizaci v rámci textury či struktury vyšetřovaných buněk a tkání. Tím se liší od metod prokazujících kvantitativně nebo kvalitativně jen přítomnost těchto skupin, např. v homogenátech, v roztocích či tělesných tekutinách, tedy *extra situm*.

Během zpracování tkáňových bloků, náterů a otisků však musí být prvky, molekuly, enzymy a funkční skupiny, které chceme ve tkáních prokazovat, nepoškozeny nebo nezměněny a navíc nesmějí difundovat z míst, kde jsou v živé tkáni přítomny, do jiných částí buňky či tkáně, nebo dokonce z řezu uniknout do inkubačního prostředí. Enzymy, které máme prokazovat, nesmějí být při zpracování inaktivovány. Tyto požadavky je nutno respektovat během všech fází zpracování tkání počínaje fixací. Některé tkáně z těchto důvodů nelze fixovat vůbec a místo toho je lze hluboce zmrazit. V tomto stavu je lze uschovat po dobu potřebnou k dalšímu zpracování, např. ke nakrájení v kryostatů a provedení reakcí na kryostatových řezech.

Histochemické metody jsou dobře definované chemické reakce probíhající ve tkáňových řezech, tím se liší od histologických barvicích metod, které jsou většinou empirické, reakce probíhající při vazbě barviva na tkáňové složky nejsou známé

4.1 Fixace a zpracování nefixovaného materiálu

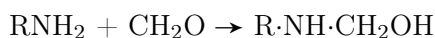
Fixací se rozumí konzervace buněk a tkání aby se zabránilo jejímu rozkladu — autolýze — (zejména působením buněčných enzymů) i heterolýze (poškození tkání mikroorganismy) zkoumaného materiálu a zamezil se růst bakterií a plísní. Při fixaci dochází k denaturaci proteinů, takže fixovaný materiál již není totožný s nativní tkání. K fixaci lze použít celou řadou fixačních prostředků a tekutin, avšak nejrozšířenější jsou dva způsoby: fixace aldehydy, které příčně svazují polypeptidové řetězce proteinů, a tak tkáň zpevňují, a koagulační fixativa, nejčastěji alkoholy nebo aceton.

4.1.1 Formaldehyd

Je vůbec nejužívanějším fixativem a histochemické i imunohistochemické metody, které chceme aplikovat na archivní materiál, tedy na formolem fixované tkáňové bloky zalité do parafinu, jsou limitovány tím, že proteiny jsou formolem příčným svázáním polypeptidových řetězců zesíťované.

Ve zředěných vodních roztocích je formaldehydu ve volném stavu méně než 4 procenta, většina je ve formě metylenglykolu $\text{CH}_2(\text{OH})_2$. Ve vyšších koncentracích tvoří polyoxymetyleny $\text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$ a v alkoholických roztocích hemiacetaly $\text{R}\cdot\text{OCH}_2\text{OH}$. Podobně reagují s formaldehydem i glycidy, škrob a celulóza. Pro reaktivitu s proteiny je důležitá reakce s aminy, amidy a guanidylovými skupinami: formaldehyd reaguje s nenabitými,

nikoli s protonovanými ($-\text{NH}_3^+$) skupinami. V první reakci jsou tvořeny vysoce reaktivní metylolové sloučeniny.



Při příznivých sterických podmínkách metylolové skupiny kondenzují s amidy nebo jinými skupinami přičemž se tvoří metylenové můstky které příčně svazují polypeptidové řetězce.



Schematicky lze znázornit i takto:

[???? obrázek je rozpadlý]

Formolová fixace tak maskuje některé funkční skupiny, které mohou být součástí antigenní determinanty či epitopu hledaného antigenu. To je nutno respektovat zejména v imunohistochemii.

Přes všechny uvedené výhrady lze doporučit standardní fixaci neutrálním formalinem, která je ve světě nejrozšířenější, běžně používaná ve většině laboratoří:

Formalin (komerčně dodávaný 40 % roztok formaldehydu)	100 ml
Dinatriumfosfát (bezvodý)	6,5 g
Na monofosfát, monohydrát	4,0 g
Destilovaná voda	do 1000,0 ml

Formaldehyd dobře fixuje lipidy, zejména v přítomnosti Ca^{2+} iontů. Nukleové kyseliny (DNA a RNA) formol nefixuje, avšak jsou zachyceny a znehybněny („zabedněny“) v příčně svázaných polypeptidových jaderných i cytoplasmatických strukturách. Formolová fixace velmi dobře zachová mikroskopickou strukturu tkání, a proto je v histologické i histopatologické praxi nejužívanější metodou. Také většina imunohistochemických metod je prováděna na formolovém materiálu.

4.1.2 Koagulační fixativa

Druhým typem fixativ jsou koagulační fixativa, nejčastěji alkoholy. Fixace etanolem, metanolem, nebo jejich roztoky (Carnoyova tekutina, Methacarn, chloroform-metanol) sbalí bílkovinné řetězce do klubek, v nichž jsou však některé skupiny více a jiné méně přístupné činidlům, kterými se přítomnost hledané molekuly či skupiny prokazuje.

Pro imunohistochemické účely je z této skupiny fixativ oblíbený methacarn, uchovávající reaktivitu mnohých antigenních determinant lépe než formol. Glykogen je aldehydy špatně fixovaný: alkoholová fixativa zadrží ve tkáni (resp v řezu) 70 % glykogenu, zatímco formaldehyd pouze 12 %. Enzymy jsou na fixaci citlivé, fixační činidlo musí zachovat strukturu tkáně i aktivitu enzymu. Citlivost k fixaci je pro jednotlivé enzymy velmi rozdílná: pro detekci některých enzymů nutno pořídit nefixované řezy z hluboce zmrazených tkáňových bloků.

4.1.3 Zalévání a krájení fixované tkáně

Pro histochemická vyšetření je někdy možno zalévat fixované bloky do parafinu zcela obdobně, jako se zalévá pro přehledná i speciální barvení. Pokud je cílem histochemického vyšetření detekce enzymu, je někdy třeba použít parafin o nižších teplotách tuhnutí (pokud možno do 52–54°C) aby nedošlo k inhibici enzymatické aktivity. Během zalévání tkání do parafinu a odparafinování řezů působí směs alkoholu či xylolu extrakci některých lipidů z vyšetřovaných tkání. Proto je nutno se v některých případech zalévání do parafinu vyhnout a fixovanou či nefixovanou (nativní) tkáň přímo zmrazit a krájet v kryostatu.

4.1.4 Hluboké zmrazení tkáňových bloků a zpracování zmrazené tkáně

Hluboké zmrazení tkání musí proběhnout co nejrychleji, aby byla zamezena tvorba ledových krystalů, které by mohly porušit buněčné membrány a další struktury. Proto je výhodné použít prostředí, které by zaručovalo velký teplotní spád. Hluboké zmrazení se nejčastěji provádí ve směsi propan-butan (zkapalněný plyn běžně distribuovaný v bombách do vařičů) nebo izopentanu vychlazeném kapalným dusíkem. Ten má teplotu asi -160°C . Pokud není kapalný dusík k dispozici, je možno bločky vychladit ve směsi aceton – suchý led CO_2 .

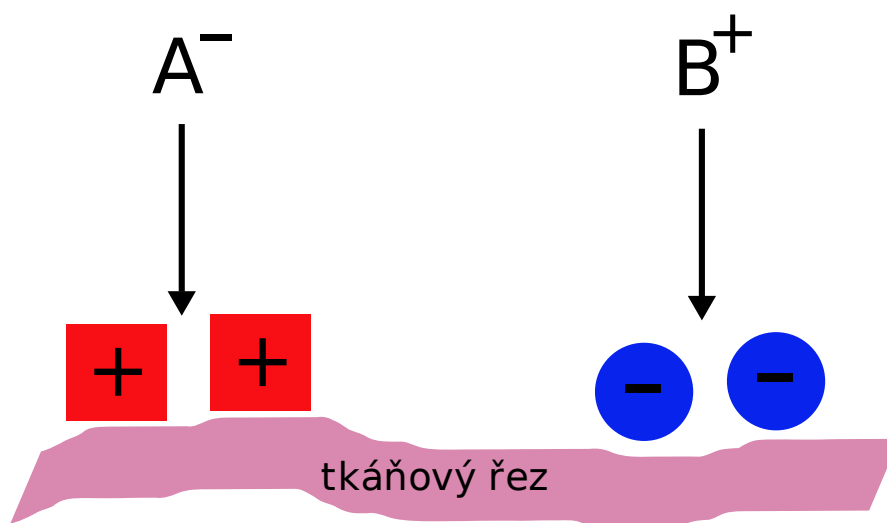
Zmrazené tkáňové bločky se krájí na zmrazovacím mikrotomu, kde je nůž chlazený na -70°C , např. suchým ledem CO_2 nebo daleko snadněji v kryostatu, kde je zmrazovací mikrotom vložený do chladicí skříně s nastavenou teplotou atmosféry kolem -20°C a nůž bývá chlazený zvláště na ještě nižší, rovněž nastavitelnou teplotu.

4.2 Základní histochemické metody

Parafinové nebo kryostatové řezy se zpracují podle účelu histochemického vyšetření patřičnými metodami (barvením). Pokud by výsledek reakce samotné nepřinesl jasnou informaci o lokalizaci reakčního produktu či detegované struktury, bývá vhodné sousední řez přehledně obarvit například hematoxylinem-eozinem.

4.3 Jednoduché ionální interakce

Jsou základem řady přehledných barvení. Pozitivně nabitá bazická barviva (B^+) nebo negativně nabitá kyselá barviva (A^-) reagují se skupinami opačného náboje ve tkáňových makromolekulách. Samozřejmě jsou tyto reakce málo specifické a příkladem může být barvení bazickým hematoxylinem (B^+), k němuž se váží negativně nabitě fosfátové skupiny (P^-) (tedy bazofilní struktury) jaderné DNA, a kyselým eozinem (A^-), kterým se obarví acidofilní (eozinofilní) struktury buněčné cytoplasmy (viz obrázek 1. K tomuto typu reakcí patří též histochemická detekce glykosaminoglykanů bazickými barvivy jako alcianová modř a další (viz níže).



Obrázek 1: Reakce kyselých (A^-) a bazických (B^+) barviv s kationickými a anionickými substancemi ve tkáni.

4.3.1 Glycidy a reakce PAS

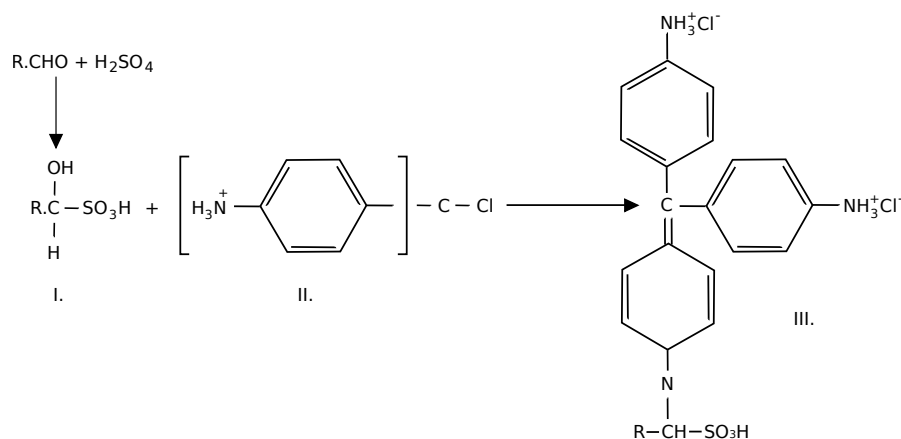
Fyziologicky významné sacharidy (glycidy) zahrnují několik skupin: *monosacharidy*, které nemohou být hydrolyzovány na jednodušší sacharidy, z nich nejvýznamější je glukóza (tzv. krevní cukr). Pro histochemický průkaz glycidů je důležitá přítomnost vicinálních glykolových skupin na monosacharidových jednotkách.

Disacharidy poskytují hydrolyzou dvě molekuly téhož nebo různých monosacharidů. Příklady jsou sacharóza, laktóza, trehalóza a maltóza. Oligo- a polysacharidy (glykany) poskytují hydrolyzou několik molekul sacharidů. K polysacharidům patří glykogen, celulóza, glykosaminoglykany (mukopolysacharidy) a glykoproteiny (mukoproteiny). Aminocukry (hexosaminy) jsou součástí glykoproteinů (GP), glykosaminoglykanů (GAG), gangliosidů a některých antibiotik. Ve tkáních lze prokázat glykogen, glykosaminoglykany, glykoproteiny, a ovšem i některé enzymy, které se účastní jejich metabolismu (viz další kapitola).

Základní reakcí pro průkaz polysacharidů je reakce PAS (Periodic Acid Schiff), Dialdehydy polysacharidů vzniklé oxidací vicinálních (sousedících) glykolů kyselinou jodistou jsou Schiffovým reagens konvertovány v intenzivně zbarvené sloučeniny.

Reakce aldehydů se Schiffovým reagens probíhá takto: Tkáňové aldehydy reagují s kyselinou siřičitou za vzniku kyseliny sulfonové, která se pak naváže na pararosanilin HCl (základní složka Schiffova reagens) za vzniku barevné (magenta, červené) sloučeniny (viz obrázek 2).

Polysacharidy nelze takto znázornit přímo, protože jejich vicinální hydroxylové skupiny nenesou elektrický náboj ani nereagují se Schiffovým reagens nebo s diazoniovými solemi. Tyto vicinální hydroxylové skupiny (1,2-glykoly) je však možno oxidovat kyselinou



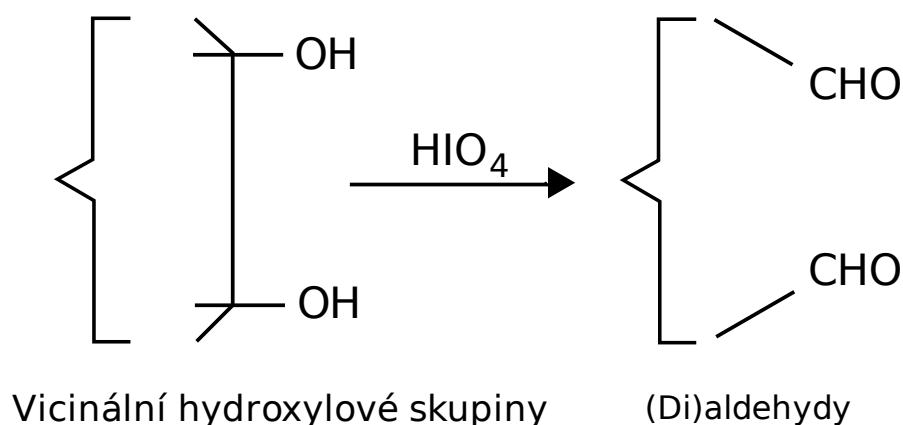
Obrázek 2: Průběh reakce tkáňových aldehydů (R.CHO) se Schiffovým reagens. Aldehydy reagují napřed s kyselinou siřičitou za vytvoření meziprojektu (I.), který se poté kombinuje s pararosanilin hydrochloridem (II.), základní barvicí složkou Schiffova reagens za vzniku barevného reakčního produktu (III.).

jodistou (periodic acid) na aldehydy, které pak reagují se Schiffovým reagens. Glykogen je však ve vodních mediích, tedy i v roztoku aldehydů, silně rozpustný. Doporučuje se proto řezy z hluboce zmrazených bloků pokrýt celoidinem zamezujícím do značné míry jeho difuzi. Silně rozpustné ve vodních mediích jsou i mukopolysacharidy, z aldehydových roztoků jich uniká přes 70 %. Digescce diastázou (slinná amyláza) před vlastní reakcí odstraní z řezů glykogen, zatím co glykosaminoglykany a glykoproteiny zůstávají in situ, a jsou tedy prokazatelné. Jadernou DNA je též možno vizualizovat Feulgen-Schiffovou metodou. Při ní jsou řezy fixované tkáně hydrolyzovány 5M HCl (Feulgenova hydrolyza) a desoxyribózová složka DNA tak poskytne aldehydickou skupinu, která se barevně prokáže výše uvedeným způsobem Schiffovým reagens.

4.3.2 Reakce sacharidů s bazickými barvivými

Mukosubstance (GAG) lze znázornit díky jejich afinitě k bazickým barvivům (Azur A, toluidinová modř, alciánová modř, „high iron diamine“, koloidní železo) při kyselém pH. GAG se skládají z disacharidových jednotek obsahujících (1) kyselinu uronovou vázanou na (2) acetylovaný/sulfonovaný aminosacharid-aminoglycid. Kyselina sírová může být vázána jako ester. Disacharidové jednotky jsou spojeny vazbou 1-4.

Alciánová modř je užitečná k selektivnímu znázornění jednotlivých GAG podle jejich acidity. To lze provést nastavením pH nebo rozdílnou koncentrací kationtů v inkubačním roztoku: v obou případech molekuly bazického barviva kompetují (soupeří) s protony H^+ nebo s kationty Mg^{++} přítomnými v inkubačním mediu o acidické skupiny GAG prokázovaných ve tkáňových řezech. Čím více anionických skupin uhlohýdrátového komplexu,



Obrázek 3: Selektivní štěpení *vicinálních* hydroxylových skupin kyselinou jodistou (HIO_4) za vzniku dialdehydů.

tím snáze vyváže protony H^+ nebo ionty Mg^{++} a může se navíc navázat na bazické barvivo (alciánovou modř), viz obrázek 4.

Azur A (pH 3.5 – 4) se váže k nejkyselějším GAG a k GP obsahujícím kyselinu sialovou prostřednictvím jejich záporně nabitých skupin. Navázané barvivo má červenou barvu (vykazuje metachromazii) na rozdíl od ortochromaticky (tedy modře) zbarvených dalších bazofilních složek v buňkách (nukleové kyseliny)

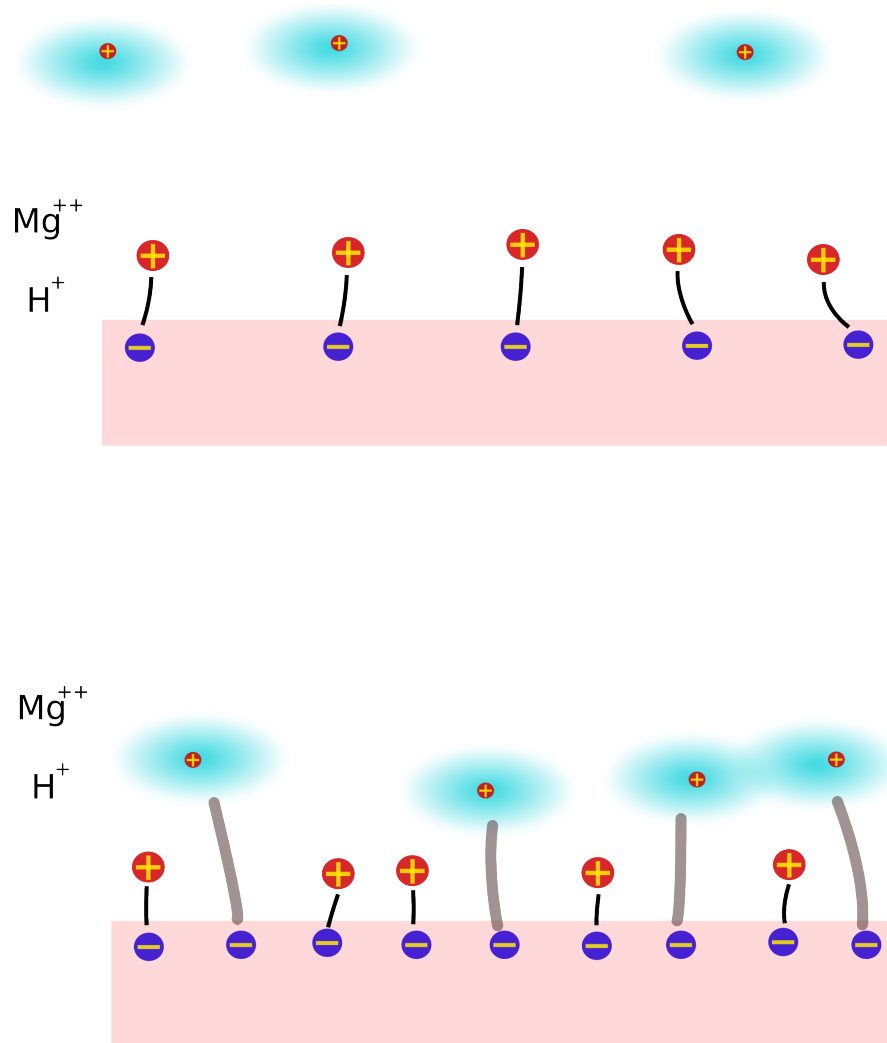
Identitu některých GAG lze potvrdit inkubací řezů před barvením v roztocích obsahujících glykosidázy (hyaluronidázu nebo chondroitinázu), které daný glykosid hydrolyzují.

4.3.3 Lipidy

Biochemicky významné lipidy dělíme na jednoduché a složené. K jednoduchým lipidům patří estery mastných kyselin s alkoholy a glycerolem, složené lipidy jsou estery obsahující mimo mastné kyseliny a alkohol ještě další skupiny. Patří sem fosfolipidy (glycerofosfolipidy a sfingofosfolipidy), glykolipidy, sulfolipidy, aminolipidy a lipoproteiny. K lipidům dále patří jejich prekurzory a odvozené lipidy: alkoholy včetně glycerolu a sterolů, mastné kyseliny, uhlovodíky, v tucích rozpustné vitaminy a hormony.

Acylglyceroly, cholesterol a jeho estery nenesou žádný náboj a nazývají se neutrální nebo nepolární tuky. Extrakčními postupy lze tyto dvě skupiny lipidů rozlišit: nepolární lipidy jsou selektivně a úplně extrahovány z řezů acetonem (touto metodou jsou extrahována jen 2% polárních lipidů). Extrakce chloroform-metanolem naproti tomu odstraní z řezu všechny lipidy kromě lipofuscinu a lipoproteinů.

Základní metody znázornění lipidů: *Olejová červeň* (Oil red O) barví nepolární lipidy, triglyceridy a mastné kyseliny.



Obrázek 4: Alcianová modř se váže pokud je ve tkáni dostatek acidických GAG skupin, nenavázaných na protony inkubačního média.

Sudanová čern (Sudan black) rovněž barví nepolární lipidy, avšak nikoli volné mastné kyseliny (free fatty acids, FFA), z polárních lipidů se váže na fosfolipidy.

Železitý hematoxylin je metodou volby ke znázornění fosfolipidů, nejlépe v kombinaci s extrakčními metodami a alkalickou hydrolýzou esterických vazeb, která odstraní fosfolipidy kromě sfingomyelinu.

Reakcí *OTAN* (osmiumtetroxid– α –naftylamin) možno znázornit nenasycené lipidy (obsahující dvojné vazby): nenasycené hydrofobní lipidy jsou zbarveny černě jako výsledek redukce OsO_4 na OsO_2 . Nenasycené hydrofilní lipidy se barví oranžově červeně (glykolipidy, sfingomyeliny, lecitiny, kefaliny). Protože mohou reagovat i nelipidové složky, je nutno je odlišit extrakčními metodami.

PAS reakce odhalí glykolipidy.

Autofluorescence je citlivá metoda ke znázornění lipopigmentu, ve všech vývojových stupních (interceroid, ceroid, lipofuscin). V průběhu peroxidace nenasycených mastných kyselin vzniká malonylaldehyd, který kondenzuje s aminoskupinami proteinů a uhlohydráty za vzniku amino-iminoskupin.

Digitoninem prokazujeme volný cholesterol ve zmrazených řezech (krystalické jehličky, které jsou patrné v UV světle) nebo Schultzeho metodou (oxidace železitým kamencem a barvení směsí kyseliny sírové a octové), výsledkem je zelenomodrý produkt.

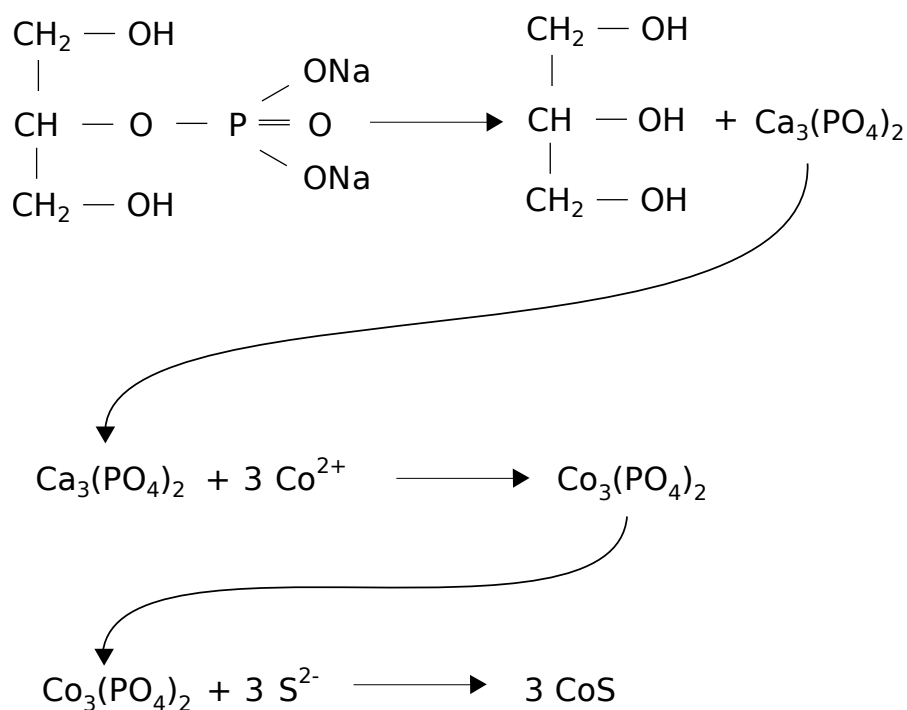
Průkaz mědi: rubeanová metoda znázorní volné mastné kyseliny. Měď s rubeanovou kyselinou tvoří s volnými kyselinami mýdla, kalcium je odstraněno kyselinou etylen-diamin-tetraoctovou (EDTA). K odlišení nespecifické reaktivity (oxaláty, lipofuscin, kalcifikace, proteiny) je nutná extrakce sousedního řezu acetonem.

4.3.4 Enzymy

Histochemie enzymů je rozsáhlá součást teoretické i praktické histochemie. V dalším budou uvedeny a vysvětleny jen enzymy a histochemické reakce používané v našich laboratořích. V dalším textu budou uvedeny ty enzymy, které jsou běžně používané v našich laboratořích k diagnostickým účelům.

Alkalická fosfatáza (AF), kyselá fosfatáza (KF), nespecifická esteráza (NE): AF prokazujeme např. v kartáčovém lemu diferencovaných enterocytů: ten vykazuje deficity při některých onemocněních spojených s malabsorpčním syndromem (MAS). V imunohistochemii bývá exogenní AF navázaná na protilátku jako součást detekčního systému. Kyselá fosfatáza je markerem lyzosomů, a prozrazuje jejich přítomnost a aktivitu. Nespecifická esteráza je též přítomna v lyzosomech ale i v motorických ploténkách.

Azokopulační reakcí lze prokázat aromatické sloučeniny s centry bohatými na elektrony, např tyrozin. Podobně prokazujeme i některé hydrolázy (esterázy nebo fosfatázy), které enzymaticky odštěpí z α –naftylacetátu či α –naftylfosfátu acetát či fosfát a uvolněný alfa-naftol se kopuluje s diazoniovými solemi (např Fast Blue B) za vzniku azobarviva, barevného produktu, který se deponuje v místě enzymatické aktivity.



Obrázek 5: Odštěpení fosfátu a převedení na barevný CoS.

Vzorec Lojda 8

Variantou této metody je kopulace diazoniových solí s indoxylem. Indoxyl je uvolněný enzymaticky z některého chlor-indoxyl-esteru příslušnou esterázou (karboxyl-esterázy, glukozidázy, galaktozidázy, glukuronidázy, glukosaminidázy, fosfatázy) a kopulací s diazoniovou solí vznikne azoindoxylové nerozpustné barvivo.

Ca^{2+} -ATPáza: slouží v myopatologii jako metoda k typové klasifikaci svalových vláken. Prokazuje se: kalcium-kobaltovou metodou se substrátem ATP. Touto metodou lze prokázat i nahoře jmenované fosfatázy a esterázy.

Katalytickou aktivitou enzymů (hydroláz), které ve tkáních detegujeme, se ze substrátu alfa-glycerofosfátu odštěpí fosfát a ten se (v zásaditém mediu) srazí kalciovými ionty, přítomnými v inkubačním prostředí, v bezbarvou sraženinu Ca-fosfát. Ten se pak převede kobaltnatými ionty v Co-fosfát a ten se ve třetí fázi této metody konvertuje na barevný CoS. Druhá možnost je (v kyselém mediu) precipitace fosfátu olovnatými ionty přítomnými v inkubačním roztoku v Pb-fosfát a ten je pak siříkem amonným převeden v černou sraženinu PbS (viz reakci na obrázku 5).

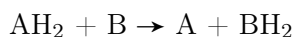
Acetylcholinesteráza: reakce s acetylthiocholinem slouží ke zjišťování přítomnosti aganglionárního segmentu při podezření na m. Hirschsprung i k detekci motorických plotének v myopatologii.

Při histochemické detekci acetylcholinesterázy se rovněž uplatní metody se solemi těžkých kovů. Metodou volby je Karnovského reakce s acetylthiocholinem. Ferikyanid draselný je redukován na ferokyanid thiocholinjodidem uvolněným ze substrátu (acetylthiocholin) enzymatickou (tedy acetylcholinesterázovou) aktivitou, kterou v řezu prokazujeme. Ferokyanid je pak precipitován měďnatými ionty přítomnými v inkubačním mediu v hnědou sraženinu $\text{Cu}_2\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ zvanou Hatchettova hněď.

Vzorci Lojda, schema 10

Mitochondriální dehydrogenázy jsou běžně prokazovány tetrazoliovými metodami. Rutinně prokazujeme NADH-tetrazolium reduktázu či sukcindehydrogenázu (SDH) v myopatologii. Touto metodikou je možno stopovat reaktivitu a distribuci mitochondrií a některé mitochondriální myo-cytopatie.

Tetrazoliová sůl je redukována vodíkem uvolněným oxidací či dehydrogenací substrátu (laktát, sukcinát) flavinovými enzymy či fenazinmetosulfátem (PMS), převedena v nerozpustný, barevný formazan (dehydrogenázy, disacharidázy, monoamino-oxidáza (MAO) podle schématu:



Příklad: laktát dehydrogenáza (LDH):



Tetrazoliové metody lze použít i k detekci fosfatáz a esteráz: v první fázi reakce se z indoxylfosfátu enzymatickou aktivitou (fosfatáz) uvolní indoxyl. Jeho reakce s tetrazoliovou solí vede ke vzniku indigové běloby a barevného formazanu.

Alfa-glukan fosforyláza: reakce se používá k detekci endogenní fosforylázy v biopsiích, kde pátráme po deficitu tohoto enzymu (deficit jaterní či svalové fosforylázy při glykogenózách).

Peroxidáza: Metoda s diaminobenzidinem deteguje endogenní peroxidázovou ale i pseudoperoxidázovou (hemoglobin!) aktivitu ve tkáni. V současné době je detekce peroxidázy metodou volby při provádění imunohistochemických reakcí, kde ovšem nejde o průkaz endogenního enzymu, ale exogenní peroxidázy navázané na protilátku nanesenou na řez jako součást inkubačního roztoku (podobně jako alkalická fosfatáza). Detekcí této exogenní peroxidázy pak prokazujeme přítomnost antigenu, po kterém pátráme. Exogenní peroxidáza bývá i součástí inkubačních roztoků při detekci disacharidáz.

Průkaz peroxidáz: peroxidáza katalyzuje reakci:



Ve známé metodě Grahama a Karnovského jsou používanými donory elektronů 3,3-diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB) nebo 3-amino-9-etylkarbazol (AEC). Hnědá sraženina je výsledkem reakce. Je třeba upozornit, že DAB má kancerogenní a mutagenní účinky. V imunohistochemických metodách bývá peroxidáza navázána na protilátku v inkubačním mediu a je to tedy exogenní enzym do tkáně dopravený. Metoda průkazu exogenního enzymu se neliší od detekce endogenních peroxidáz.

Disacharidázy: přítomnost endogenních disacharidáz prokazujeme při podezření z jejich deficitu u malabsorpčního syndromu. Exogenní peroxidáza bývá přítom součástí inkubačního media.

Průkaz disacharidáz s exogenní peroxidázou a glukózooxidázou: K průkazu jsou vhodné metody s použitím přirozených substrátů — laktózy, sacharózy a trehalózy. Disacharidáza odštěpí z disacharidu glukózu, ta se oxiduje glukózooxidázou na glukonát za vzniku peroxidu vodíku. Peroxidázou uvolněný kyslík (viz předchozí reakci) oxiduje diaminobenzidin (DAB) na hnědou sraženinu.

Schéma reakce:

1. Disacharid + H₂O $\xrightarrow{\text{disacharidáza}}$ Glukóza + Hexóza
2. Glukóza + O₂ $\xrightarrow{\text{glukózooxidáza}}$ glukonolakton + H₂O₂
3. DAB + H₂O₂ $\xrightarrow{\text{peroxidáza}}$ DAB-Ox + H₂O

Místo třetího kroku je možno redukovanou glukózooxidázou redukovat fenazinmetosulfát (PMS) a dále redukovaným PMS redukovat tetrazoliovou sůl, např. NitroBT na barevný formazan.

Fosforyláza katalyzuje syntézu a hydrolýzu molekul amylózového typu podle této reakce: (1, 4- α -D-glukozyl)_n + ortofosfát \leftrightarrow (1, 4- α -D-glukosyl)_{n-1} + D glukozo-1-fosfát

Rovnováha této reakce je závislá na pH: při nízkém pH je posunuta doleva, tedy glukosylové zbytky jsou přenášeny na glukosylový řetěz, tzv. primer. Délka nevětveného řetězce je úměrná přítomné fosforylázové aktivitě a při znázornění jodem se barva řídí délkou řetězce. Negativní reakce je tedy nažloutlá a se zvětšující se délkou řetězce se mění na hnědou, purpurovou až černou.

4.3.5 Nukleové kyseliny

DNA i RNA mohou být intracelulárně lokalizovány afinitou jejich negativně nabitého esteru fosfátu (P-) jakýmkoli bazickým barvivem, zejména hematoxylinem (viz výše) nebo i metyl-zelení s pyroninem.

Hematoxylinem se jádra obsahující DNA barví tmavě modře, avšak cytoplasmatická RNA se výrazněji barví jen tam, kde je plasma bohatá na RNA, např. v nádorových buňkách a v regenerujících tkáních.

Fluorescenční bazická barviva jako akridinová oranž jsou též velmi vhodná ke znázornění buněčné DNA a RNA. Při vazbě na nedenaturovanou jadernou DNA (bylo již uvedeno, že DNA není formolem fixována) emitují zelenou fluorescenci a červenou fluorescenci při vazbě na RNA, zejména v regenerujících tkáních a buňkách. Specifičtější fluorochromy pro DNA jsou etidium bromid, propidium jodid, DAPI a Hoechst 33342.

Feulgen-Schiffova reakce ke znázornění jadené DNA již byla zmíněna výše.

V současné době se nukleotidové sekvence v DNA a RNA vizualizují na úrovni optické i elektronové mikroskopie hybridizací in situ (viz příslušný oddíl)

4.3.6 Železo

V hemosiderinu je přítomno trojmocné železo Fe^{3+} a reakce s ferokyanidem draselným (Fe^{2+}) skýtá berlínskou modř (vysoká citlivost reakce, $0.1 - 0.003\gamma$). Odparafinované řezy mohou být redukovány sirníkem amonným a trojmocné železo přejde ve dvojmocné ($\text{Fe}^{\text{III}} \rightarrow \text{Fe}^{\text{II}}$). To lze prokázat reakcí s ferikyanidem za vzniku Turnbullovy modři.

Ferrokyanid K + Fe^{III} → Berlínská modř (Prussian blue)

Ferrikyanid K + Fe^{II} → Turnbullova modř.

Aplikace: přítomnost železa v hemosiderinu (ve fibrózních histiocytomech, v jaterních excizích a punkcích).

4.3.7 Amyloid

Amyloid lze znázornit několika způsoby, nejspecifičtější je konžská červeň. Vlákniť složka amyloidu váže molekuly barviva tak, že jim mezi amyloidovými fibrilami uděluje určitou orientaci, uděluje určitou orientaci, takže že v polarizovaném světle vykazují dichroismus. Vazba kongo červeně na kolagen tuto změnu neindukuje.

Citlivá, ale poněkud méně specifická, je vazba Thioflavinu T na amyloid. Projeví se žlutozelenou fluorescencí v UV světle.

Selektivní rozlišení základních druhů amyloidu (AA amyloid a AL amyloid) umožňuje oxidace tkáňového řezu okyseleným manganistanem draselným. Primární AL amyloid neztrácí svoji reaktivitu, je tedy vůči oxidaci resistantní, ale sekundární AA amyloid ztrácí afinitu ke Kongo červeně. Imunohistochemická detekce s aplikací protilátek proti epitopům jednotlivých druhů amyloidu nejlépe umožní jejich rozlišení, je-li to nutné.

4.4 Aplikace standardně používaných metod v histochemické laboratoři

4.4.1 Průkaz mukopolysacharidů (GAG) v buňkách gastrointestinálního traktu (GIT)

Kolumnární foveolární žláznové buňky v žaludku secernují neutrální GAG, které se barví PAS reakcí (bez i po digesci amylázou), tedy červeně, ale nikoliv alciánovou modří. Naproti tomu pohárkové buňky ve střevě obsahují kyselé GAG, které se barví alciánovou modří při pH 2,5. V reakci PAS se samozřejmě barví též, protože obsahují vicinální glykolové skupiny. Nehledě k morfologickým parametrům, lze takto snadno rozeznat kompletní (úplnou) intestinální metaplasii foveolárních epitelů v pyloru při gastritidách nebo intestinální metaplasii ve sliznici kardie, která je definujícím znakem Barrettova jícnu. Samozřejmě mohou odhalit v duodenu vzácnější gastrickou metaplasii sliznice.

4.4.2 Průkaz GAG v nádorech

Myxoidní nádory — myxoidní lipom, lipoblastom, myxoidní liposarkom, myxoidní maligní fibrosní histiocytom, myxoidní fibrom — jsou pozitivní při barvení alcianovou modří pH 2,5. Digesce hyaluridázou reakci negativizuje, což prokazuje přítomnost kyseliny glukuronové odpovědné za afinitu k barvivu.

4.4.3 Histochemické vyšetření tenkého střeva při diagnostice malabsorpčního syndromu (MAS)

Reakce na alkalickou fosfatázu lumenální membrány enterocytů dobře znázorňuje výšku a šířku klků, nebo úsekovité defekty mikrovilózní zóny při dediferenciaci enterocytů při některých chorobách, např. celiakální sprue. Též při fatálním střevním onemocnění zvaném „mikrovilózní inkluzní choroba“ jsou na lumenální membráně enterocytů (může být postiženo i tlusté střevo!) různě rozsáhlé deficity této reakce. Pozitivně reagující vakuoly jsou však přítomny uvnitř enterocytu ve formě mikrovilózních inkluzí, které z místa translace (endoplasmatické retikulum) a distribuce (Golgiho zóna) stavebních proteinů nedoputovaly až k lumenální membráně enterocytů. Alkalická fosfatáza v brush-borderu enterocytů je ovšem též jedním z parametrů při hodnocení intestinální metaplázie v žaludeční sliznici.

Disacharidázy tenkého střeva štěpí disacharidy přicházející z naštěpených polysacharidů z potravy. V mikrovilózní zóně enterocytů vykazují za normálních okolností pozitivní reaktivitu, avšak selektivní deficity disacharidáz, nejčastěji laktázy, se projeví ve snížení až v negativizaci této reaktivity. U chorob s dediferenciací enterocytů jako je celiakální sprue, dochází k nestejněmurné redukci všech složek mikrovilózní zóny, tedy i disacharidáz, takže zde často nacházíme poly-disacharidázový deficit.

Neutrální lipidy se hromadí v plasmě enterocytů při tzv. α -beta-lipoproteinémii, kdy není syntetizován apolipoprotein B. Volné mastné kyseliny a monoglyceridy, jako výsledek hydrolýzy dietního tuku, vstoupí do cytoplasmy enterocytů a jsou re-esterifikovány, avšak nemohou být seskupeny do chylomikronů. Jsou tedy uloženy do vakuol v plasmě enterocytů, kde se dobře znázorní reakcí na neutrální lipidy. Steatóza enterocytů však může mít i jiné příčiny.

4.4.4 Histochemické vyšetření jaterních punkcí a biopsií

Zahrnuje celou paletu barvicích metod a reakcí: PAS, barvení na železo (Perls), měď (kyselina rubeanovodíková), α -1-antitrypsin CD antigeny.

4.4.5 Průkaz cholinesteráz ke zjištění aganglionárního segmentu v GIT.

M. Hirschsprung je charakterizovaný tím, že ve stěně tlustého střeva a rekta chybějí v submukózním a myenterickém plexu gangliové buňky. Pravděpodobně jako kompen-

zace pronikají do střevní stěny vlákna ze sakrálního parasymptiku, která se vyznačují silnou pozitivní reaktivitu na acetylcholinesterázu. Tato pozitivita signalizuje přítomnost a rozsah aganglionárního segmentu a tak může detekce AChE agangliózu vyloučit, nebo v pozitivním případě určit její rozsah a určit hranice případné resekcce postiženého segmentu střeva.

4.4.6 Myozinová Ca^{2+} ATPáza, fosforyláza, dehydrogenázy a kyselá fosfatáza v myopatologii a u glykogenózy.

Myozinová Ca^{2+} ATPáza slouží k typové klasifikaci svalových vláken, porovnání velikosti a distribuce základních typů, tedy rychlých a pomalých svalových vláken, případně ke zjišťování deficitu myosinových filament.

Mitochondriální dehydrogenázy mohou též sloužit k typizaci svalových vláken (NADH-tetrazolium reduktáza) avšak slouží i ke stopování oxidativně aktivních mitochondrií a zjišťování mitochondriálních cytopatií, např. „ragged red fibres“ (SDH). Také histochemická detekce neutrálních lipidů odhalí další z nich (deficit karnitinu).

Deficit *myofosforylázy* je podkladem glykogenózy typu V. Histochemický průkaz s pozitivní kontrolou (normální sval) je diagnosticky cenný. K detekci glykogenózy jako celé skupiny metabolických poruch charakterizovaných akumulací glykogenu v buňkách (játra, sval, myokard, ledvina atd) je samozřejmě na místě PAS reakce, digescí lze glykogen odstranit a tím odlišit případnou interferenci mucinů.

Detekce *kyselé fosfatázy* je určena k posouzení lyzozomální aktivity u myopatií a svalových dystrofií, avšak i u glykogenózy II., kde její vysoká reaktivita kompenzuje deficit kyselé maltázy.

4.5 Zařízení histochemické laboratoře

Základní výbava histochemické laboratoře vychází z popsané metodiky k dosažení základního cíle, totiž identifikace tkáňových skupin, molekul a atomů přímo na celulární nebo tkáňové úrovni.

Především jsou to chladicí a mrazicí zařízení. Bylo uvedeno, že alternativou fixace tkání je hluboké zmrazení. K tomu je zapotřebí kapalný dusík, nádoby k hlubokému zmrazení a uchovávání zmrazených bloků a nádoby k jeho doplňování. Kapalný dusík má -160°C , a proto je použití kapalného dusíku k hlubokému zmrazení metodou volby, avšak k uchovávání zmrazeného materiálu mohou sloužit mrazicí boxy s teplotou pod -80°C . K tomuto účelu lze použít i suchý led CO_2 , jehož zásoby však musí být pravidelně doplňovány. K samotnému zmrazení nepoužíváme přímo kapalný dusík, protože na povrchu zmrazované tkáně by se tvořil izolační plášť bublinek plynného N_2 : tím by se doba zmrazení prodloužila. a ve tkáni by se začaly vytvářet krystalky ledu, které by rozrušily buněčné struktury a membrány. Proto vložíme tkáňový blok do nádoby obsahující směs propanbutan (na trhu k dodání v bombách do plynových vaříčků) a tuto nádobku ponoříme do

termosky s kapalným dusíkem. Ke zmrazení větších bloků nestačí mrazení suchým ledem CO₂ (ten má teplotu asi -70°C , a i ve směsi s acetonem může být dosaženo jenom asi -90°C). K uchování materiálu jsou však teploty suchého ledu CO₂ nebo mrazícího boxu, tedy -70°C resp. -80°C , dostačující.

Další chladicí nebo mrazicí zařízení slouží k pořízení zmrazených řezů. Bylo již uvedeno, že k tomuto účelu slouží kryostat, je to box se zvlášť chlazenou atmosférou a zvlášť mrazeným nožem.

K natažení a přichycení řezů na skla používáme polylysinu, silanu nebo skla s elektrostaticky nabitým povrchem. Tím zajistíme pro náročné procedury (např pro enzymatickou digesci řezů nebo pro pobyt či inkubaci ve vysokých teplotách) dostatečnou adhezi.

Protože pro inkubaci řezů s patřičnými substráty je zapotřebí určité teploty a vlhkosti prostředí, používají se k tomu inkubační boxy nebo inkubační lázně, ve kterých je možno patřičné parametry nastavit.

Histochemická detekce celé řady molekul i některé enzymy snesou opatrné zalití do parafinu (např. alkalická fosfatáza) a je možno šetrně fixované tkáně odvodnit a zalít do parafinu s nízkým bodem tání. To však je možné i v běžné histologické laboratoři.

5 Základy imunohistochemie

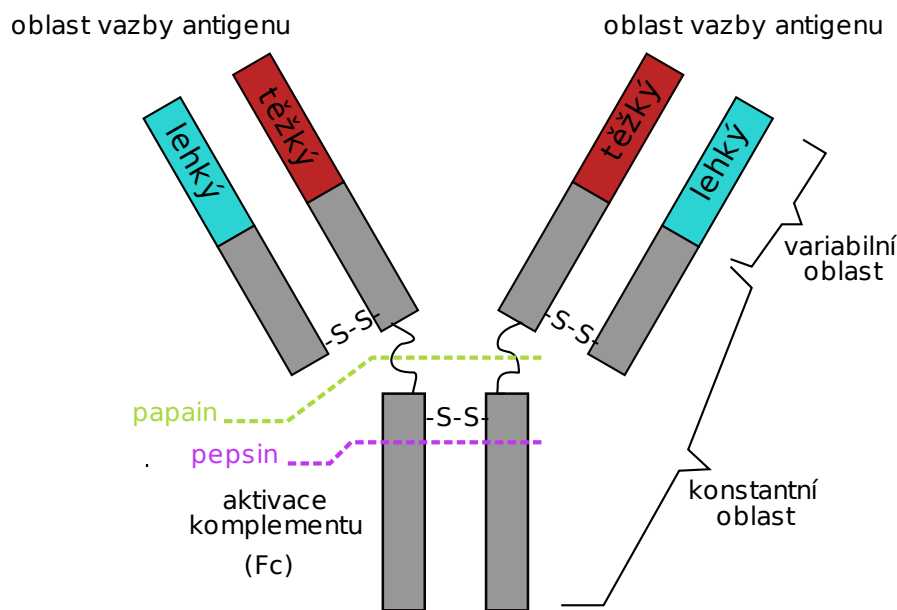
Imunohistochemii (imunocytochemii) můžeme chápat jako aplikaci imunologických principů a metod na studium tkání a buněk. Jestliže definujeme histochemii jako detekci chemicky definovaných individuí *in situ*, tedy v buňkách, tkáňových kulturách a řezech z tkáňových bloků, pak imunohistochemie, která je její součástí, používá k této detekci afinitu antigenu a specifické protilátky a jejich vzájemnou vazbu. Antigen, resp. jeho antigenní determinanty, hledáme či prokazujeme v buňkách a ve tkáních protilátkami, které se na buňky, tkáňové řezy nebo kultury nanášejí. Endogenní antigeny jsou součástí tkání a buněk (cytoskeletální, membránové či jaderné antigeny, produkty onkogenů apod.), exogenní jsou do buněk dopraveny infekcí, fagocytózou apod, nejčastěji jsou to antigeny bakteriální a virové). Pokud je antigenní determinanta, proti níž je specifická protilátka namířená, ve tkáni přítomna, protilátka se na ni svým Fab fragmentem naváže. Tuto vazbu s navázanou protilátkou je možno znázornit řadou způsobů, jak bude uvedeno dále.

Jindy pátráme po přítomnosti serových protilátek proti antigenům, jejichž přítomnost v tkáních je dobře známa (v jádrech, endomysiu, mitochondriích apod.). Někdy bývá k imunohistochemickým reakcím přiřazovaná i hybridizace „*in situ*“. Tato však není založená na vazbě antigenu a protilátky, ale na vazbě komplementárních sekvencí nukleotidů DNA a RNA a bude předmětem diskutovaným v další kapitole.

Imunohistochemie zaujímá v současné době významné místo ve výzkumu i histopatologické diagnostice v návaznosti na metody histologické a elektronmikroskopické na jedné straně a metody biochemické a molekulárně genetické na straně druhé. Imunohistochemii lze provádět na úrovni světelné i elektronové mikroskopie, avšak vzhledem k zaměření tohoto textu se omezíme na její aplikaci na světelné úrovni.

5.1 Protilátky

Jednou ze základních složek imunitního systému vyšších obratlovců jsou protilátky (angl. antibody). Jsou to bílkoviny nazývané též imunoglobuliny (zkráceně Ig) a slouží organismu především k rozpoznání cizích molekul. Každá substance schopná vyvolat tvorbu protilátek se označuje jako antigen (z anglického antibody generator). Ig jsou glykoproteiny produkované B lymfocyty (plasmatickými buňkami), jejichž celková koncentrace v krevním séru se pohybuje v rozmezí 15 – 20 mg/ml a tvoří tak asi 20 % všech proteinů krevního séra. V séru vyšších obratlovců nalézáme pět různých tříd imunoglobulinů — IgA, IgD, IgE, IgG a IgM, přičemž třídy IgA a IgG mají ještě několik podtříd. V největším množství jsou v séru zastoupeny protilátky třídy IgG (přibližně 75 % všech Ig), které jsou produkovány zejména během sekundární imunitní odpovědi a jejichž molekulová hmotnost je kolem 160 kDa. Protilátky IgG mají tvar písmene Y. Molekula IgG je tvořena dvěma těžkými a dvěma lehkými řetězci (Obr 1), které jsou spojeny jak kovalentními (disulfidickými) můstky, tak nekovalentními vazbami. Tato čtyřřetězcová struktura je společná všem Ig. Druhou nejvíce zastoupenou třídou imunoglobulinů v séru je IgM (při-



Obrázek 6: Schema protilátky

bližně 10 % všech Ig séra). IgM se objevuje v krvi v časném stádiu odpovědi na antigen. V séru se vyskytuje ve formě pentameru, tvořeného pěti jednotkami, které mají stejnou strukturu jako IgG. Každý pentamer navíc obsahuje jednu kopii tzv. J řetězce, který je kovalentně vázán mezi dvěma sousedními Fc řetězci. Molekula IgM má 10 vazebných míst pro antigen, její molekulová hmotnost je kolem 900 kDa.

Proteolytické enzymy papain a pepsin štěpí molekuly Ig na charakteristické fragmenty. Po štěpení papainem získáme tzv. Fab fragmenty (z angl. fragment antigen binding), každý s jedním vazebným místem pro antigen a Fc fragment (z angl. fragment crystallized). Pepsin štěpí Ig na F(ab)₂ fragment, který je na rozdíl od Fab fragmentu bivalentní. Viz schema protilátky na obrázku 6.

5.1.1 Polyklonální protilátky

Antigeny mívají řadu antigenních determinant. Ta část antigenu, kterou protilátka pozná, a na kterou se váže svým vazebným místem pro antigen, se nazývá antigenní determinanta nebo epitop. Specifita protilátky je dána především prostorovou komplementaritou vazebného místa protilátky a epitopu, též se uplatňuje komplementarita elektricky nabitých skupin a hydrofobní vazby.

Příprava polyklonálních protilátek je zásadně jednoduchá. Zvíře, nejčastěji myš, je imunizovaná vybraným antigenem a buňky imunitního systému začnou produkovat patřičné protilátky. Každý klon lymfocytů produkuje protilátku s jednou specifitou, protilátku ro-

zeznávající jednu antigenní determinantu, která vyvolala jeho množení. Protože takových klonů je mnoho, odpověď se nazývá polyklonální. Polyklonální serum získané odběry krve po opakované imunizaci představuje velmi heterogenní směs protilátek, s různou specifitou, s různou afinitou k antigenu, různých tříd (IgG, IgE. . .) a podtříd a různých biologických a fyzikálně-chemických vlastností.

U většiny antiser je často pozorována nežádoucí reaktivita, způsobená přítomností protilátek proti jiným proteinům, než proti kterým byla provedena imunizace. Tuto reaktivitu lze většinou odstranit afinitním čištěním. Především afinitně čištěné polyklonální protilátky izolované vazbou na antigen a jejich následným uvolněním z této vazby jsou úspěšně používány v imunohistochemických metodách. avšak jsou případy, kdy afinitně čištěné nebo i monoklonální protilátky vykazují tzv. zkříženou reaktivitu. To znamená, že vedle vazby na protein, který vyvolal jejich tvorbu, se mohou vázat i na protein nepříbuzný.

5.1.2 Monoklonální protilátky

Kohler a Milstein vyvinuli techniku, která umožňuje *in vitro* růst buněčné populace jednoho klonu produkujícího protilátky žádané specifity. První fáze přípravy probíhá stejně jako příprava polyklonálních protilátek. Zvíře, nejčastěji myš, je imunizované vybraným antigenem. Ze sleziny imunizovaného zvířete je připravena buněčná suspenze, která je fuzována s relativně nesmrtelnými myelomovými buňkami. (Myelomové buňky jsou odvozeny od linie, která ztratila schopnost syntetizovat molekuly Ig). Fuze slezinových a myelomových buněk se provádí v prostředí, které stimuluje fuzi membrán, po níž následuje fuze jaderná. Hybridní buňky jsou pak testovány na produkci protilátek žádané specifity. Monoklonální protilátky produkované jednou hybridomovou linií jsou identické, tedy jedné třídy, se mohou navázat na jednu jedinou antigenní determinantu a mají shodné fyzikálně-chemické i vazební vlastnosti.

(Obr 2).

5.2 Fixace

Materiál určený k imunohistochemickému vyšetření představují zejména parafinové a kryo-ostatové řezy, tkáňové, krevní a cytologické nátěry. Imunohistochemické reakce je možno provádět i na nefixovaném materiálu s vědomím, že před reakcí i během reakce probíhá autolytický rozklad vyšetřované tkáně. Většinou se však tkáň fixují, aby autolytickým i heterolytickým pochodům bylo zabráněno. Fixační prostředky svým působením či vazbou na antigenní determinanty ovšem ovlivňují výsledky imunohistochemických reakcí. V současné době jsou především vyvíjeny protilátky odolné vůči formolové fixaci, která nejlépe zachovává histologickou strukturu tkání.

Některé epitopy mohou být fixací natolik zablokovány nebo pozměněny, že nejsou schopny vázat protilátku. Jinde může být jejich poškození jen částečné, a jejich imunoreaktivita může být postižitelná jen s použitím vysoce sensitivních amplifikačních postupů. To pak dělá problémy při interpretaci nálezů: buňky s vysokou hustotou antigenu mohou být

po použití určitého fixačního prostředku pozitivní, zatím co ostatní buňky exprimující daný antigen v menších množstvích či koncentracích se mohou dostat pod práh citlivosti. Např. některé lymfomy po formolové fixaci nevykazují zřetelnou pozitivitu na CD45 (= LCA, leukocytární společný antigen), zatím co nenádorové lymfocyty reagují zcela jasně pozitivně. Tentýž lymfom vykáže po alkoholové fixaci nebo po použití fixativa B5 jednoznačnou pozitivitu. Uvedená skutečnost vedla opakovaně k diagnostickým omylům a může vést i nadále, pokud se patolog spolehne na pozitivní reaktivitu normálních lymfocytů jako na vnitřní kontrolu reakce (Battifora 1996). Falešně negativní výsledky mohou být eliminovány použitím více než jednoho druhu fixativa. Ještě větším zdrojem omylů může být blokáda silného epitopu fixací, zatím co zkříženě reagující epitop, resistantní vůči fixačnímu činidlu, je fixací nepostižen. Výsledkem je falešně pozitivní reaktivita. Je tedy vhodné nespoléhat na jednu jedinou protilátku.

5.2.1 Základy imunohistochemických reakcí

Bylo již uvedeno, že antigeny, resp. jejich antigenní determinanty, hledáme či prokázáme v buňkách a ve tkáních protilátkami, které se na buňky, tkáňové řezy nebo kultury nanášejí. Jindy však je zapotřebí prokázat v seru přítomnost protilátek proti určitým tkáňovým nebo buněčným složkám. Nejprve se v tomto textu zmíníme o průkazu antigenních složek in situ, tedy v buňkách a ve tkáních. — ve tkáňových kulturách a v řezech.

5.2.2 Průkaz antigenů in situ

Průkaz antigenů in situ se zakládá na průkazu specifické protilátky, která se v průběhu reakce naváže, na antigen (antigenní determinantu) přítomnou ve studované tkáni. Tuto vazbu lze prokázat tím, že na specifickou protilátku navážeme detekční systém, kterým se její přítomnost vizualizuje. Je-li součástí tohoto systému fluorochrom, jedná se o systémy imunofluorescenční, pokud je to enzym, jsou to metody imunohistochemické. V imunofluorescenčních metodách prozradí přítomnost a lokalizaci hledaného antigenu fluorescence v místě vazby protilátky. Ve fluorescenčním mikroskopu se užije filtru propustného pro vlnovou délku emitovanou použitým fluorochromem. V imunohistochemických metodách je enzymem, který je součástí detekčního systému, nejčastěji peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. Enzym, který je navázaný na protilátku, se deteguje stejnými metodami, jako se prokazují enzymy endogenní. Imunohistochemické metody mají proti imunofluorescenčním metodám mají tu výhodu, že skýtají trvalé preparáty, které možno vyhodnocovat ve viditelném světle.

Přímé a nepřímé imunohistochemické a imunofluorescenční metody Imunohistochemické i imunofluorescenční metody jsou přímé nebo nepřímé. Při přímé metodě je protilátka žádané specifity konjugována s fluoroforem nebo enzymem. Při tom se však enzym (fluorofor) konjugovaný se specifickou protilátkou může navázat na její doménu, kterou se váže na antigenní determinantu, a tak stericky zabránit této specifické vazbě



Obrázek 7: Schema přímé metody



Obrázek 8: Schema nepřímé metody

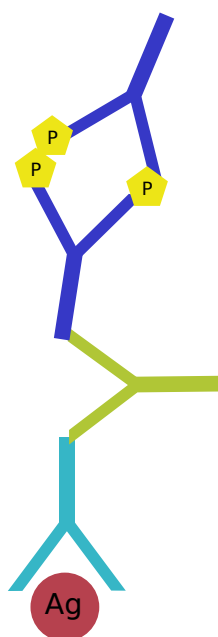
(viz obrázek 7).

Přímých metod s označenou specifickou protilátkou se nyní používá zřídka, většinou jsou to metody imunofluorescenční.

Nepřímých metod je celá řada: u dvoustupňových metod je enzym nebo fluorofor navázaný na sekundární protilátku, která se naváže na specifickou protilátku primární. Předností nepřímých metod je i jejich větší citlivost, což je způsobeno tím, že na každou primární protilátku může být navázáno několik molekul značené sekundární protilátky (viz obrázek 8).

U metody PAP (peroxidáza-antiperoxidáza) se využívá rozpustný komplex skládající se z tří molekul peroxidázy a dvou králičích protilátek proti peroxidáze (Kpap). Tento komplex je vázán na primární protilátku přemosťující protilátkou. Primární protilátka je králičí, proti lidským antigenům (K anti-hum), sekundární protilátka je zpravidla prasečí, zaměřená proti králičí, tedy primární protilátce (anti-K). Viz schema 9).

Vicestupňové metody tak dovolí značně zesílit signál, tedy epitop s navázanou specifickou protilátkou, a tím zvyšují citlivost reakce. Určitou obdobou dvoustupňových imunohisto-



Obrázek 9: Schema metody metody PAP (alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza)

chemických metod je systém DAKO Envision, kde na polymerový nosič jsou navázány molekuly enzymu (HRP, peroxidáza) a sekundární protilátky. Přes sekundární protilátku se polymer spojí s primární protilátkou, navázanou na tkáňový antigen (viz obrázek 10).

V současné době se nejčastěji používají nepřímé metody ABC (avidin-biotin komplex).

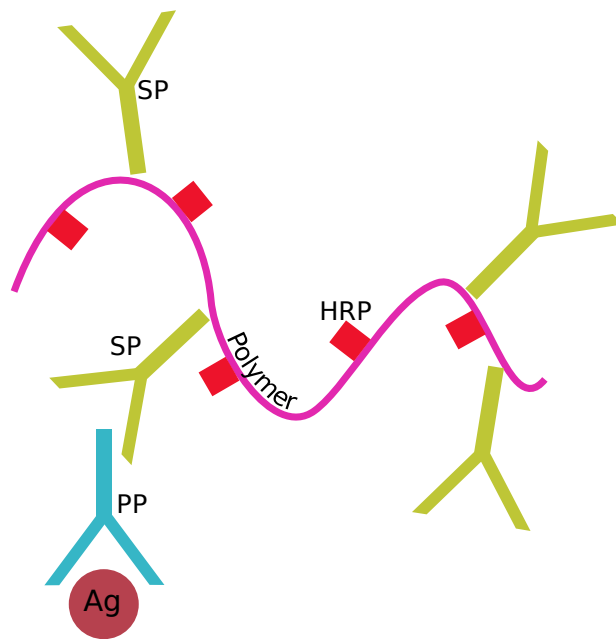
ABC metody využívají k detekci protilátek vysoké vazební afinity mezi avidinem a biotinem. Na primární specifickou protilátku naváže sekundární protilátka konjugovaná s biotinem. Třetím stupněm je komplex avidin — biotin — peroxidáza (nebo jiný enzym), který se na sekundární biotinylovanou protilátku pevně naváže a propůjčí sestavě výrazné zesílení signálu. V dalším se pak vizualizuje vhodným systémem (viz obrázek 11).

Výraznému zesílení — amplifikaci reakce lze dosáhnout použitím metod s tyraminem. Těmi se však zvýší i možnost nespecifické, neimunitní vazby protilátky a tím i vzniku artefaktů.

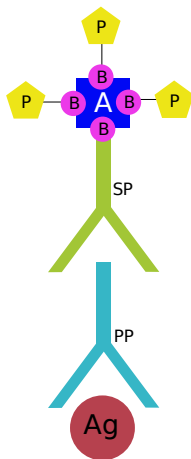
Vizualizace konjugovaného enzymu je posledním krokem v imunohistochemickém průkazu hledaného antigenu. Enzym, který je součástí detekčního systému, je ve tkáni odhalen a lokalizován zcela stejnými enzymově-histochemickými metodami, jako jsou prokazovány tytéž enzymy endogenní (viz kapitola histochemie). Bylo již uvedeno, že to jsou zejména peroxidáza a někdy i alkalická fosfatáza.

Schema tyramin

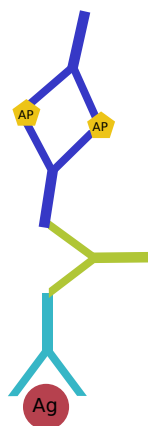
Peroxidáza může oxidovat různé substráty — donory elektronů. Přítomnost donoru, který



Obrázek 10: Schema Envision DAKO



Obrázek 11: Schema ABC



Obrázek 12: Schema metody metody APAAP (alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza)

se v důsledku oxidace změni ve zbarvený produkt (proto též označení chromogen), je motorem katalytické reakce. Používanými donory elektronů jsou 3,3-diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB) nebo 3-amino-9-etylkarbazol (AEC). Je třeba upozornit, že DAB má kancerogenní a mutagenní účinky. Dalším problémem bývá často vysoká endogenní peroxidázová nebo pseudoperoxidázová (hemoglobin!) aktivita ve studované tkáni, která je zdrojem falešné reaktivity pozadí, a kterou je nutno v předem potlačit. Alkalická fosfatáza odštěpuje a transferuje fosfátové skupiny z organických esterů, např. z alfa-naftylfosfátu. Aktivátory enzymu jsou Mg^{2+} , Mn^{2+} a Ca^{2+} .

Užití alkalické fosfatázy v imunohistochemii umožnilo zavedení metody APAAP (alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza) (viz obrázek 12), jejíž největší předností je nezávislost na peroxidázové endogenní aktivitě a kromě toho ji lze použít při metodách s dvojitým značením, tedy při detekci dvou různých antigenů v jednom řezu. Alkalickou fosfatázu v imunohistochemii je možno prokazovat celou řadou metod (viz oddíl histochemie), nejčastěji to bývá metoda tetrazoliová nebo azokopulační.

Znázornění dvou antigenů v jednom řezu Ke znázornění dvou antigenů v jednom řezu je nejvýhodnější, je-li každá z obou specifických protilátek připravena z jiného druhu, např. monoklonální myší protilátka proti jednému antigenu a polyklonální králičí protilátka proti antigenu druhému. Pak je možno přidat primární i sekundární protilátky do jednoho inkubačního media a detekce se může provést též současně, třeba peroxidázou (výsledkem je hnědá sraženina) a alkalickou fosfatázou (červená či modrá barva podle zvoleného

systému). Obdobně lze provést imunofluorescenční detekci obou antigenů, z nichž je protilátka proti jednomu označena fluoresceinem (zelená fluorescence) a druhou texaskou červení, rodaminem či Cy3 (červená fluorescence)

Demaskování epitopů Bylo uvedeno, že nehledě k možné autolýze, které kupodivu celá řada epitopů po určitou dobu odolá, dochází v průběhu fixace k vyvázání, maskování, někdy i k zablokování antigenních determinant přítomných v nativní tkáni, a tím ke zkreslení výsledků imunohistochemického vyšetření. K demaskování či revitalizaci zablokovaných epitopů v současné době slouží zejména digesce proteolytickými enzymy nebo zahřátí tkáňových řezů v autoklávu, tlakové nádobě, nejčastěji však v mikrovlnné troubě.

Nejčastěji používanými proteázami jsou trypsin a pepsin.

Je známo, že trypsin štěpí v nativních tkáních vazby mezi lysinem a jakoukoli jinou aminokyselinou, a mezi argininem a jinou aminokyselinou. Po rozštěpení je na konci vzniklého fragmentu arginin nebo lysin s volnou COOH skupinou. Pepsin štěpí ty peptidické vazby, jejichž dusík pochází z tyrozinu nebo fenylalaninu, a vazbu mezi leucinem a glutamátem. Není však prokázáno, že na fixovaném materiálu mají tyto enzymy identický účinek. Aplikace proteázy na řez však může způsobit jeho poškození, protože příslušný enzym může svojí aktivitou natrávit i ty vazby, které jsou přítomny v nativních proteinech.

Inkubace řezů v mikrovlnné troubě (MWT), tzv. mikrovlnná stimulace, představuje metodu volby revitalizace antigenu ve formolem fixované tkáni. Mikrovlny jsou elektromagnetické vlny o frekvenci 300 MHz – 300 GHz, což odpovídá vlnové délce 1 m až 1 mm. Mikrovlny pronikají do roztoků a tkání různou rychlostí a tkáně dobře absorbují MW energii s kumulací tepla. Mikrovlnné záření je neionizující

MW ozářením ovšem stoupá teplota homogenních medií v závislosti na radiační síle, dielektrických vlastnostech materiálu, tepelné vodivosti, orientaci objektu a na dalších vlastnostech. Také tvar a optické vlastnosti media mohou ovlivnit účinek MWT. Proto řezy musí dobře adherovat k podložním sklům. Revitalizace antigenu ve formolem fixovaném materiálu spočívá nejen v částečném rozvolnění příčných vazeb polypeptidů (viz oddíl fixace) účinkem tepla, avšak záření porušuje i některé peptidické vazby (např. asparátu s další aminokyselinou). Tento účinek MWT je pravděpodobně nespecifický.

5.2.3 Imunohistochemický průkaz sérových protilátek

Průkaz se uplatňuje zejména při diagnostice kolagenóz (difusní onemocnění pojiva, „connective tissue diseases“), kdy pátráme po přítomnosti sérových auto-protilátek proti antigenům buněčných struktur (antimitochondriální antigeny, antinukleární antigeny apod). Testování sera probíhá tak, že na skla nakrájíme řezy z lidské buněčné tkáně (ledvina, játra), kde jsou přítomny příslušné antigeny, a ty překryjeme vrstvou zkoumaného sera. Jsou-li v seru přítomny protilátky proti jmenovaným antigenům, navážou se na příslušné struktury ve tkáni, tedy antimitochondriální protilátky na mitochondrie, antinukleární protilátky na jaderné složky atd, a přítomnost protilátky se pak vizualizuje některou

z výše uvedených metod.

Tento postup se uplatní m. j. v diagnostice malabsorpčního syndromu, konkrétně celiakální sprue, kdy pátráme po přítomnosti protilátek proti endomysiu. Epitopy endomysia se nacházejí v orgánech obsahujících svalovinu, např. v opičím jícnu nebo v pupečním provazci (obsahujícím vasa umbilicalia). Řezy z těchto tkání převrstvíme zkoumaným serem a protilátku navázanou na endomysium prokážeme některou z výše uvedených metod.

5.3 Zařízení imunohistochemické laboratoře

Základní výbava v podstatě odpovídá zařízení běžné bioptické laboratoře, protože se zpracovává převážně formol-parafinový materiál. Pokud se reakce provádějí na kryostatových řezech z hluboce zmrazeného materiálu, je třeba použít zařízení používaných v laboratoři pro histochemii (viz tato). Jinak jsou pro imunohistochemickou laboratoř typické a charakteristické dva přístroje: mikrovlnná trouba (MWT) nebo podobné zařízení k dosažení vysokých teplot, a přístroj určený k hromadné inkubaci a dalšímu zpracování řezů k imunohistochemickému vyšetření, imunostainer.

Mikrovlnná trouba K revitalizaci antigenů lze použít autokláv, tlakovou nádobu, nejčastěji však mikrovlnnou troubu. Může to být běžná MWT určená pro domácnost pracující sa frekvencí 2,45 GHz, lepší jsou však profesionální, přímo k tomuto účelu zkonstruované MWT, například MVT Bio-Red H2500 Microwave processor.

Imunostainery jsou zařízení k hromadnému zpracování řezů určených k imunohistochemickému vyšetření. Uplatní se zejména na pracovištích, kde se imunohistochemické metody používají k rutinní diagnostice, například v laboratořích ústavů patologie, nebo v ústavech zaměřených na imunologickou či molekulárně genetickou problematiku. Na trhu je celá řada typů.

System	Vnější průměr	Funkce
Mikrotubuly	25 nm	orientace, polarizace, uspořádání organel, vnitrobuněčný pohyb
Mikrofilamenta	7 nm	pohyb buňky, změny tvaru buňky, přenos signálu
Střední filamenta	10 nm	pružnost struktur

Tabulka 1: Složky cytoskeletu a jejich funkce

6 Imunohistochemie v bioptické diagnostice

Imunohistochemické metody se staly nedílnou součástí bioptické diagnostiky. Následující text se bude týkat detekce těch antigenů, která pomůže identifikovat a rozlišit základní typy tkání a buněk a aplikace imunohistochemie v onkologické histopatologické diagnostice. Patolog má dnes k dispozici velké množství protilátek. Jejich aplikací lze odhalit typ tkáně, ze které nádor vychází, tedy jeho histogenezu, pojmenovat přesně většinu nádorů a odhadnout proliferaci aktivitu nádorových buněk.

V následujícím textu je petitem popsána řada podrobností, které se uplatňují v praktické diagnostice, které však přesahují rámec požadovaných znalostí zdravotnického laboranta, bakaláře nebo studujícího medicíny. Doporučujeme však i odstavce psané petitem pročíst z těchto důvodů:

- student získá představu o možnostech i náročnosti imunohistochemie jako disciplíny v diagnostické patologii
- v praxi pak uvedené údaje poskytnou reálné informace laborantům a absolventům, kteří se budou imunohistochemii a molekulární patologii speciálně věnovat.

6.1 Cytoskelet, střední filamenta a základní druhy tkání

Cytoskelet (cytoskeleton) je trojrozměrná síťovitá plazmatická struktura, která na jedné straně navazuje na buněčné jádro, na druhé straně na plazmatickou membránu (ty však mají své vlastní cytoskeletální složky). Na tuto síť jsou vázány buněčné organely a další struktury. K cytoskeletálním proteinům a polypeptidům je asociovaná řada dalších proteinů, takže vzniká velmi komplexní systém. V současné době je rozeznáváno několik kategorií cytoskeletálních proteinů, které jsou podle velikosti klasifikovány do tří skupin: mikrofilamenta (aktinová filamenta), střední filamenta a mikrotubuly (viz tabulku 1).

Aktin je významným proteinem všech živých buněk a uplatňuje se v řadě funkcí jako jsou změny buněčného tvaru, pohyb buňky ve tkáních i nitrobuněčný pohyb, včetně mitózy.

Třída	Název	Počet isoform	Proteiny
Typ I.	Keratiny (kyselé)	16	K9 – K20; trichocytární keratiny Ha1 – Ha4, Hax
Typ II.	Keratiny (neutrální a bazické)	13	K1 – K8; Hb1 – Hb4, Hbx
Typ III.	skupina vimentinu	4	vimentin, desmin, peripherin, GFAP
Typ IV.	Neurofilamenta	5	NF-L, NF-M, NF-H, nestin, α -internexin
Typ V.	Laminy	4	laminy typu A (laminy A, C); laminy typu B (laminy B1, B2)

Tabulka 2: Střední filamenta

Mikrotubuly jsou duté, nekontraktilní struktury kolísavé délky, přítomné ve všech eukaryotických buněčných typech. Jsou stavebními složkami stabilních struktur jako cilie a bičíky, i labilních jako dělicí vřeténko. Hojně jsou v nervovém systému, kde hrají klíčovou roli při formování a zrání axonů a dendritů.

Význam určení typu středních (intermediárních) filament v buňkách a ve tkáních vyplývá zejména ze skutečnosti, že exprese známých skupin těchto filament (cytokeratiny epitelí, vimentin mesenchymálních buněk, desmin svalové tkáně, neurofilamenta neuronů, gliální filamenta astrocytů) zpravidla odpovídá histogeneze příslušných buněk, tkání a z nich odvozených či vycházejících nádorů. Přehled typů středních filament je v tabulce 2.

Ukázalo se však, že v expresi typu středních filament dochází již v průběhu ontogeneze k řadě přesunů a reorganizací: v některých orgánech dochází v časných stádiích embryonálního vývoje určitých buněčných populací k epiteliálně-mezenchymálním přechodům doprovázeným i několikanásobnými oscilacemi mezi expresí vimentinu a cytokeratinu. Je rovněž známo, že i některé vyzrálé buňky a tkáně koexprimují spolu s filamenty charakteristickými pro daný typ tkáně i filamenta další. To se pak promítá i do exprese středních filament u patologicky změněných tkání, zejména nádorů. Zkřížená reaktivita mezi strukturálně blízkými antigeny i zkřížená mezidruhová reaktivita některých protilátek může být dalším zdrojem komplikací. Všechny tyto skutečnosti je třeba respektovat při interpretaci imunohistochemických nálezů.

6.2 Cytokeratiny, epiteliální antigeny

6.3 Klasifikace cytokeratinů

Cytokeratiny a epiteliální antigeny zaujímají mezi středními filamenti zvláštní postavení pro svoji komplexnost. U člověka je přítomno několik desítek různých keratinových bílkovin rozlišitelných podle molekulární hmotnosti a izoelektrického bodu.

Klasifikace keratinů byla provedena na základě dvoudimenzionální gelové elektroforézy, v jednom směru používající pH gradientu (s bazickými polypeptidy putujícími vlevo, kyselými vpravo) a v kolmém směru podle molekulární hmotnosti. Tak byly vytvořeny dvě základní podskupiny cytokeratinů, kyselé (I) a bazické (II). Expresce cytokeratinů je spojená s diferenciacním programem příslušného epitelu, takže určité kombinace cytokeratinů jsou charakteristické pro různé typy epitelů.

Jednoduché (simple) epiteliální buňky jsou přítomny v jednovrstevném epitelu. Na jedné straně jsou v kontaktu s bazální membránou a povrch tvoří lumenální hranici. Tyto epitelie exprimují cytokeratiny 8 a 18, někdy též 7 a 19, případně 20.

Vrstevnaté epitelie se skládají ze stratum basale, které je v kontaktu s bazální membránou, ale nikoli s povrchem, a z několika řad suprabazálních vrstev bez kontaktu s bazální membránou. Všechny bazální buňky exprimují cytokeratiny 5 a 14, avšak suprabazální buňky exprimují přinejmenším jeden další pár cytokeratinů sekundárních, charakteristických pro lokální specializaci epitelů.

Jak buňky vyžívají a migrují směrem od bazální vrstvy, tak relativní podíl těchto sekundárních keratinů specifických pro diferenciaci vzrůstá na účet keratinů primárních. Nerohovějící slizniční (vlhké) vrstevnaté dlaždicovité epitelie (bukální, esophageální, vaginální, exocervikální) exprimují sekundární cytokeratiny 4 a 13. Rohovějící (suché) epitelie epidermálního typu, ve kterých suprabazální vrstvy se nakonec diferencují v protektivní stratum corneum, exprimují sekundárně keratiny 1 až 10 (to je největší pár z celé cytokeratinové rodiny), a to spolu s dalšími proteiny: matrix, proteiny obalovými (involukrin) a s filamenti asociovanými proteiny (filagrin, histidinem bohatý bazický protein). Tyto proteiny přispívají k tvorbě denzního nerozpustného komplexu materiálů, které se souborně nazývají keratin. Cytokeratiny 2 a 11 tvoří nutně pár. Jsou typické pro regiony epidermis, které jsou obzvláště namáhané, keratin 2 je hlavní komponentou gingiválního epitelu. Keratin 9 je charakteristický pro oblasti s tlustou vrstvou stratum corneum proprium, jako je chodidlo nebo dlaň. Tam, kde se keratinocyty obměňují rychle a diferenciacce je v důsledku toho neúplná, jsou exprimovány keratiny 6 a 16, což jsou tak zvané hyperproliferativní keratiny. Tyto se objevují v průběhu regenerace při hojení ran, zejména ve tkáních, které mají přirozeně vysokou obměnu, jako např. orální epitelie. Vysoce specializovaný transparentní epitel rohovky je jediná lidská tkáň, kde byly zjištěny keratiny 3 a 12. Smíšené epitelie žláz se skládají ze dvou distinktních buněčných typů s charakteristikami jednoduchých epitelů a keratinocytů.

6.3.1 Přítomnost cytokeratinů podle orgánů a tkání

U karcinomů z jednoduchého epitelu, zejména adenokarcinomů, odpovídá cytokeratinové spektrum cytokeratinům výchozích epiteliálních buněk, zatímco u spinocelulárních karcinomů bývají exprimovány kromě cytokeratinů vrstevnatého epitelu i „simple“ cytokeratiny. Na rozdíl od výchozích epitelů však keratiny 2, 3, 9 a 12 nebyly dosud u nádorů nalezeny.

Adenokarcinomy zažívacího traktu i jejich metastázy exprimují podobně jako výchozí epitely „simple“ cytokeratiny. To svědčí o vysokém stupni konzervativnosti v expresi těchto cytokeratinů. Zajímavé je chybění cytokeratinu 7 v intestinálním epitelu stejně jako ve všech případech karcinomů tlustého střeva, takže pro intestinální diferenciaci jsou typické cytokeratiny 8, 18 a 19.

Cytokeratinové spektrum jednoduchého epitelu není omezeno na karcinomy vycházející z gastrointestinálního traktu, ale týká se i adenokarcinomů ovariálních a endometriálních. Avšak zde, kromě cytokeratinů výchozího epitelu, bývá koexprimováno i menší množství cytokeratinu 5, charakteristického pro stratifikovaný epitel. Kolorektální karcinomy exprimují keratin 20 prakticky vždy, karcinomy žaludku asi v 50 % případů.

Pro diferenciální diagnostiku metastazujících adenokarcinomů je vhodné kombinovat CK7 a CK20:

CK7+ ; *CK20+*: uroteliální karcinom, karcinom pankreatu, mucinózní karcinom ovaria

CK7+ ; *CK20-*: adenokarcinomy a malobuněčný karcinom plic, mammy (duktální i lobulární), nemucinózní ovariální karcinomy, endocervikální a endometroidní karcinom, mesotheliom

CK7- ; *CK20+*: kolorektální karcinom, karcinom z Merkelových buněk

CK7- ; *CK20-*: spinocelulární karcinom plic, adenokarcinom prostaty, karcinom z renálních buněk, thymus

Hepatocyty exprimují cytokeratiny 8 a 18, zatímco epitel žlučových cest navíc typ 7 a 19 a tato exprese platí též pro korespondující karcinomy. Přítomnost cytokeratinu 7 nebo 19 tedy svědčí pro cholangiocelulární původ studovaného tumoru (AE1/3 reaguje také s CK19):

CK7-, *AE1/3-*, *CK20-*: hepatocelulární karcinom (fibrolamelární varianta je CK7+)

CK7+, *AE1/3+*, *CK20+*: cholangiocelulární karcinom

Protilátka HepPar-1 (proti jednomu z proteinů hepatocytů) se váže na hepatocyty i v cirhoticky a nádorově transformovaných hepatocytech.

Karcinomy žlučových cest a žlučníku exprimují ve 3/4 případů i cytokeratin 20. Imunohistochemická analýza však potvrdila přítomnost přechodných forem mezi hepatocelulárním a cholangiocelulárním karcinomem- hepatocholangiokarcinomy.

Embryonální a fetální typy hepatoblastomů exprimují hepatocelulární cytokeratiny 8 a 18, ale překvapivě též typ 19, ve dvou případech dokonce byl nalezen též cytokeratin 7. V menším procentu publikovaných případů byla zjištěna pozitivní reaktivita na cytokeratin i vimentin, ale ve vyšším procentu z nich byla nalezena imunoreaktivita na α -fetoprotein, karcinoembryonální antigen (CEA), v některých hepatoblastomech i na α -1-antitrypsin, feritin a vimentin.

Normální epitel dýchacích cest je též heterogenní. Cylindrické řasinkové i pohárkové buňky obsahují cytokeratiny jednoduchých epitelů, zatím co bazální buňky exprimují cytokeratiny vrstevnatého epitelu.

Adenokarcinomy plicní exprimují zcela pravidelně cytokeratiny 7, 8, 18 a 19. Velkobuněčné plicní karcinomy mohou být subklasifikovány do dvou skupin: první exprimuje pouze cytokeratiny jednoduchých epitelů, takže může být považována za níže diferencovaný adenokarcinom, druhá se vyznačuje přítomností keratinů vrstevnatého epitelu a může se tedy jednat o níže diferencovaný spinaliom.

Neuroendokrinní plicní karcinomy, tedy malobuněčný karcinom a karcinoid, exprimují kromě „jednoduchých“ cytokeratinů též vimentin a polypeptidy neurofilament.

U plicních spinaliomů je východiskem pro neoplastickou transformaci dlaždicovitá metaplasie. Převažují zde cytokeratiny vrstevnatého epitelu, zejména cytokeratin 13 a 17, navíc jsou exprimovány keratiny 8, 18 a zejména 19.

Maligní pleurální mesotheliomy exprimují keratiny jednoduchých epitelů, podobně jako adenokarcinomy. Kromě toho epiteliální a bifázické mesotheliomy exprimují též keratiny 5, 14 a 17. Od karcinomů se však mesotheliomy liší též vydatnou koexpresí vimentinu, která u plicních karcinomů bývá nevýrazná. Nejlepším způsobem k odlišení karcinomů od mesotheliomů je však aplikace protilátek proti antigenům mikrokřů, které intenzivně reagují s mesotheliemi a jejich neoplastickými deriváty:

h-Caldesmon: reaguje s mesotheliemi (pro odlišení od metastázujících ovariálních karcinomů) a s bb. hladkého svalu

Calretinin: mesotheliomy (a také schwannomy)

Urotel vykazuje unikátní cytokeratinové spektrum se všemi keratiny jednoduchých epitelů, i s cytokeratiny vrstevnatého epitelu, zejména cytokeratin 13, a dále cytokeratin 20. V normálním urotelu byly zjištěny ve všech buněčných vrstvách cytokeratiny jednoduchého epitelu, tedy polypeptidy 7, 8, 18 a 19, zatím co protilátky proti cytokeratinům typickým pro stratifikované epitelie reagují pouze s bazálními bunkami, případně (cytokeratin 13) s buňkami bazálních a středních vrstev. Tento způsob exprese byl zachován rovněž v neoplaziích nízkého stupně malignity (G1), ale je výrazně modifikován už ve druhém stupni těchto tranzitocelulárních karcinomů. U třetího stupně keratiny jednoduchého epitelu zcela převažují, zatím co množství cytokeratinu 13 je výrazně redukováno. Toto spektrum bývá zachováno i v metastázách. Pozitivita keratinu 20 u urotheliálních karcinomů byla nalezená v 80 % případů, většinou je heterogenní, zpravidla soustředěná na povrchovou vrstvu buněk.

U spinaliomů sliznic, např. jícnu jsou exprimovány kromě cytokeratinů charakteristických pro stratifikované epitelie i jednoduché cytokeratiny zejména cytokeratin 19. Není zcela zřejmé, zda tyto změny cytokeratinové exprese oproti výchozím tkáním jsou podmíněny neoplastickou transformací buněk nebo výsledkem selekce minoritního buněčného typu v heterogenním normálním epitelu během kancerogeneze.

Spinocelulární karcinomy děložního čípku vycházející z metaplastického skvamózního epitelu jsou charakterizovány velmi širokým spektrem cytokeratinové exprese. Převažují zde cytokeratiny vrstevnatého epitelu, zejména cytokeratin 13 a 17, navíc je zde vydatná exprese cytokeratinů charakteristických pro jednoduché epitelie, tedy cytokeratin 8, 18 a hlavně 19. Tato koexprese jednoduchých cytokeratinů je výraznější u níže diferencovaných spinaliomů. Jak bylo uvedeno dříve, podobná je situace u spinaliomů plicních.

Prostatické žlázy exprimují cytokeratiny jednoduchých epitelů 8, 18 a 19, slabě reagují protilátky namířené proti cytokeratinu 5. Adenomatózní hyperplázie a neoplázie jsou rovněž doprovázeny expresí keratinů tohoto typu, avšak zvláštní pozornosti se těší protilátky proti cytokeratinům o vyšší molekulové váze, tzv. HMW keratinům, na př. 34 – β – E12 (Enzo Biochemicals). Tyto keratiny se vyskytují typicky v bazálních buňkách prostatických žlázek, a jejich průkaz snadno odhalí hyperplázii bazálních buněk, zatímco v prekancerózách bazálních buněk ubývá a v adenokarcinomu zcela chybí. U některých benigních a semimaligních — dysplastických lézí (PIN) jsou HMW-pozitivní buňky přítomny, ale netvoří kontinuální vrstvu. Za normálních okolností bazální buňky nemají povahu myoepiteliálních buněk, postrádají imunoreaktivitu na S100 protein a na aktin hladkého svalu, mohou ovšem vykazat myoepiteliální metaplazii s pozitivní imunoreaktivitou na oba tyto antigeny, např. při sklerózující adenóze. Na rozdíl od sekrečních buněk neexprimují prostatický antigen ani prostatickou kyselou fosfatázu (protilátky proti těmto dvěma antigenům jsou metodou volby při pátrání po metastázách karcinomu prostaty), avšak aspoň heterogenní obsahují receptory na androgeny. Představují asi multipotentní populaci pro vznik normálního, hyperplastického i neoplastického epitelu. Nověji se pro detekci těchto buněk používá také p63 (podobně jako u karcinomu mammy).

CD10 se ztrácí časně v průběhu kancerogeneze a zpravidla chybí u karcinomů o nízkém score dle Gleasona (3+3). Naopak high grade karcinomy jsou CD10 pozitivní (včetně metastáz v lymfatických uzlinách).

Ovariální karcinomy z povrchového (celomového) epitelu exprimují jednoduché cytokeratiny 8, 9, 18 a 19. Avšak cytokeratin 20 činí dělítko mezi mucinózním karcinomem na jedné straně a ostatními typy na straně druhé: zatímco mucinózní karcinom jej exprimuje ve 100 % případů, ostatní vůbec. Tím se také jednoduše odlišují primární nemucinózní karcinomy ovaria od metastáz karcinomů z GIT, zejména žaludečního (Krukenbergův nádor). Mucinózní nádory secernují kromě cytokeratinů i EMA, CEA, a 75 % maligních nádorů i amylázu.

Serózní ovariální nádory obsahují kromě cytokeratinů i EMA a S100 protein, maligní někdy i vimentin a GFAP. Dále exprimují glykoproteiny, na které se vážou lektiny. Mesonefroidní adenokarcinom kromě keratinů exprimuje často i Leu-M1.

Endometriální adenokarcinomy exprimují jednoduché cytokeratiny 7, 8, 18, 19, v 65 % případů vimentin a v případech dlaždicové metaplázie i CEA. Většinou lze prokázat i přítomnost receptorů na estrogeny a progesteron. Existuje však nepřímá úměrnost mezi expresí p53 a přítomností receptorů na steroidní hormony. Častý je nález mutací c-Ki-ras genu.

Epidermis bylo již uvedeno, že z cytokeratinů charakteristických pro vrstevnaté epitely je cytokeratin 1 přítomný v rohovějící epidermis. Též spinocelulární karcinomy kožní často exprimují tento polypeptid, svědčící pro omezenou terminální epidermoidní diferenciaci. Konstantně se u nich vyskytují keratiny 5 a 14. Na rozdíl od bazaliomů jsou u diferencovaných spinaliomů přítomny i keratiny 6 a 16. Kožní veruky a prekancerózy nelze od karcinomů odlišit expresí cytokeratinů: epidermální hyperkeratózy s akantózou i prekancerózy exprimují CK 1, 5, 6, 14, 16 a 17, tedy v podstatě stejné jako diferencované spinaliomy. U nízkce diferencovaných spinaliomů však přistupuje (u části buněčné populace) exprese cytokeratinů charakteristických pro jednoduché epitely, což bylo nalezeno i u m. Bowen. U nízkce diferencovaných karcinomů může být prokázán i vimentin. Na rozdíl od bazaliomů exprimují spinaliomy i vazebné antigeny pro *Ulex europaeus*. Bazaliomy silně exprimují cytokeratiny bazálních keratinocytů 5 a 14 a s nimi keratin 17, charakteristický pro zevní epiteliální vlasovou pochvu. Nikdy však cytokeratiny 1, 10 a 11 a velmi zřídka EMA, CEA a involucrin. Většina bazaliomů se pozitivně znázorní reakcí na BerEP4.

Cytokeratin 5 je vhodný pro průkaz spinocelulárních karcinomů (je pozitivní i u málo diferencovaných forem), dále pro průkaz mesoteliomů, myoepiteliálních buněk prsu, bazálních buněk prostaty, thymomů, tumorů slinných žláz. Negativní bývá u adenokarcinomů plic, jater, tlustého střeva, žaludku, prostaty, karcinomů ze zárodečných buněk a štítné žlázy.

Extrammární Pagetův karcinom vykazuje v celém rozsahu pozitivní reaktivitu se širokospektrými protilátkami proti keratinům, avšak Pagetovy buňky lze selektivně znázornit protilátkami proti keratinu 18 (a obsahují i keratiny 7, 8 a 19); pozitivní je i CEA a GCDFP-15. U podobné pagetoidní Bowenovy choroby jsou dysplastické keratinocyty CK7- a pozitivní na p16.

U karcinomu z Merkelových buněk jsou s cytokeratiny jednoduchých epitelů, avšak zejména s cytokeratinem 20, který je přítomen vždy, koexprimovány i antigeny neurofilament.

Adnexální žlázy exprimují jednoduché cytokeratiny 7, 8, 18 a 19, a navíc 5, 14 a 15. Ekrinní porom kromě cytokeratinů pravidelně exprimuje též EMA, čímž se snadno odliší od basaliomu a seboroické keratózy. Ekrinní akrospirom (spiradenom) reaguje pozitivně na keratin, EMA, CEA, S-100 protein a vimentin. Smíšený nádor má v buňkách uvnitř nebo kolem luminu cytokeratiny, EMA a CEA, vnější buněčné vrstvy reagují na vimentin, S-100 protein, NSE a někdy i GFAP. Ekrinní cylindrom vychází z intradermálních úseků vývodů potních žlázek, a také exprimuje odpovídající keratiny.

Epiteliální složka mléčné žlázy, duktální i lobulární, je tvořena dvěma typy buněk: vnitřním epitelem sekrečním a zevními myoepiteliálními buňkami. Spolehlivými markery sekrečních buněk jsou cytokeratiny 18 a 19, EMA, HMFG antigen a laktalbumin. Myoepiteliální buňky obsahují keratin 14, avšak lepším markerem je aktin, případně S100 protein a HMW cytokeratin. Nověji však jsou tyto markery nahrazovány specifitějšími markery, jako SMMHC (smooth muscle myosin heavy chain, cytoplasma), calponin (cytoplasma) a p63 (jádra).

Rozpoznání *sklerozující adenózy* velmi usnadní průkaz aktinu v myoepiteliálních buňkách a přítomnost bazální membrány (laminin, kolagen IV) kolem tubulů. Podobně poznání adenomyoepiteliální adenózy usnadní znázornění S100 proteinu v myoepiteliálních buňkách. *Duktální hyperplazie při fibrocystické nemoci* je charakterizovaná silnou imunoreaktivitou na HMW cytokeratin spojenou se slabší reakcí na S100 protein. In situ *duktální karcinomy* komedonového typu většinou postrádají v postižených úsecích myoepiteliální buňky a také v papilárních in situ karcinomech zpravidla myoepiteliální buňky chybějí. *Lobulární karcinomy* in situ stejně jako invazivní karcinomy exprimují cytokeratiny jednoduchých epitelů (7, 8, 18, 19,), dále EMA a HMFG, a v 60 % i S100 protein. Reakce na aktin hladkého svalu ukáže reziduální myoepiteliální buňky při bazální membráně. V neporušené bazální membráně lze kontinuálně prokázat laminin a kolagen IV.

Problematické bývá odlišení tubulárního karcinomu a různých forem adenózy (zejména mikroglandulární). Mikroglandulární adenóza postrádá myoepiteliální buňky, je však pozitivní na S100 protein a kolagen IV. U tubulární a sklerozující adenózy jsou myoepiteliální buňky přítomny a reakce na S100 protein a kolagen IV. je negativní. Tubulární karcinom je negativní na všechny tyto tři markery.

Antigeny proti myoepiteliálním buňkám se uplatňují i při diagnóze vzácných myoepiteliálních karcinomů.

Při *rozlišení duktálních a lobulárních karcinomů* se uplatňuje e-cadherin (pozitivní v duktálních buňkách). V duktálních karcinomech je pozitivní také CEA.

V *metastázách mamárního karcinomu* je pozitivní GCDFP-15 (gross cystic disease fluid protein), který není příliš specifický. Většina tumorů mammy je pozitivní na CK7, pozitivita na CK20 je variabilní, zpravidla slabá. Diagnostický význam průkazu estrogenních a progesteronových receptorů je nízký, průkaz se dělá spíše v rámci plánování terapie.

Invazivní duktální karcinomy exprimují — stejně jako karcinomy lobulární — keratiny jednoduchých epitelů, EMA, HMFG, dvě třetiny též CEA a laktalbumin. Malé procento těchto karcinomů reaguje na vimentin, GFAP, avšak 10 až 45 % je pozitivních na S100 protein. Tato imunoreaktivita metastáz v axilárních uzlinách stejně jako pozitivní reaktivita s protilátkou HMB45 může být zdrojem mylné diagnózy maligního melanomu. Ten však nereaguje s protilátkami proti cytokeratinům. Od intraduktálních karcinomů in situ lze infiltrativní karcinomy odlišit i nepřítomností či diskontinuitou bazální membrány.

Význam průkazu *overexprese HER-2/neu* (produkt c-erb-B2 genu) je dvojí: předpokládaná odpověď

na chemoterapii je u pozitivních pacientek lepší a dále tyto pacientky budou lépe reagovat na terapii protilátkou, blokující tyto receptory.

Nediferencovaný karcinom nazofaryngu představuje někdy diagnostický problém, imunohistochemie pomůže pozitivní reaktivitou na keratiny 7, 8 a 19, případně přítomností EMA. (Lymfoidní populace má prokazatelné znaky B anebo T buněk.)

6.3.2 Význam detekce cytokeratinů pro bioptickou diagnostiku

Význam detekce cytokeratinů pro bioptickou diagnostiku je tedy dvojitý: znalost exprese určitého typu cytokeratinů příslušným epitelem či odvozeným nádorem usnadní volbu protilátky nebo směsi protilátek, které s těmito keratiny reagují. Avšak patolog si ještě častěji klade otázku, *zda studovaná tkáň nebo nádor vůbec exprimuje keratin či nikoli*, tedy zda se jedná o epitel či epiteliální nádor. V podobných případech lze doporučit použití směsí monoklonálních protilátek namířených proti co nejširšímu spektru cytokeratinů, nebo i protilátek polyklonálních.

Bylo již uvedeno, že cytokeratiny však nejsou stoprocentně tkáňově specifické, tedy nejsou omezeny na epitel. Většinou se v těchto případech jedná o koexpresi s jinými středními filamenti, zejména s vimentinem a exprese keratinů v těchto nádorech nikdy nebývá homogenní a velmi intenzivní. Uvedené skutečnosti by se neměly státí zdrojem skepse vůči diagnostice. Kromě exprese daného antigenu (cytokeratinu) histogeneticky odlišnými buňkami může být pramenem nesprávné interpretace i sdílení určitého epitopu různými antigeny v odlišných tkáních (zkřížená reaktivita), ale i difuze a fagocytóza molekul nebo jejich degradačních produktů nesoucích epitop. Ta nastává zejména v některých nádorech a zdaleka se netýká jenom cytokeratinů nebo středních filament. Původní simplifikující představy o absolutní tkáňové specifitě středních filament dále mění skutečnost, že celá řada epiteliálních tkání a jejich derivátů exprimuje kromě cytokeratinů i další střední filamenta, jak již bylo uvedeno výše (malobuněčný karcinom, karcinoid a další). Protilátek proti jednotlivým cytokeratinům i proti různě širokým jejich spektrům je k dispozici celá řada. Proti jednoduchým keratinům jsou zaměřeny oblíbené protilátky CAM 5.2 proti cytokeratinům 7 a 8, (nikoliv 8, 18 a 19, jak je v literatuře opakovaně mylně opisováno), C04 a DC10 (cytokeratin 18), Ba17 a A53-B/A2 (CK19). Protilátka 34- β -E12 reaguje s cytokeratiny vyšší molekulové váhy, tzv. HMW cytokeratiny (1, 5, 10, 14) — viz výše. Ze směsí protilátek proti širokému spektru keratinů jsou známé AE1/AE3 (AE1 reaguje s cytokeratiny 10, 14–16, 19, zatím co AE3 s cytokeratiny 1–8), nebo směs monoklonálních protilátek zvaná Anti-pancytokeratin (C11, PCK-26, CY-90, KS-1A3, M20 a A53-B/A2).

Epiteliální membránový antigen (EMA) se nachází na luminálním povrchu epitelů a dobře/středně diferencovaných karcinomů. Kromě toho však reaguje i s mesoteliomy, meningeomy, některými maligními lymfomy a mesenchymálními nádory, např. epiteloidním sarkomem měkkých tkání (viz i cytokeratiny). Tyto a jiné zkřížené reakce je nutné brát jako fakta, často vysvětlitelná komplikovaným diferenciačním procesem.

Onkofetální antigeny, karcinoembryonální antigen (CEA) a α -fetoprotein (AFP), mají tu společnou vlastnost, že jsou exprimovány fetálními tkáněmi, zatímco v diferencovaných tkáních se nacházejí v daleko nižším množství. V průběhu neoplázie pak dochází k derepresi genu a obnovené silnější imunoreaktivitě. Epitely jsou od přiléhajícího vazivového stromatu odděleny bazální membránou, jejíž komponentami jsou kolagen 4 a laminin. Protože jejich imunohistochemická detekce může odhalit nepravidelnosti či diskontinuitu bazálních membrán, bylo zcela logicky pátráno po užitečnosti jejich zná-

zornění při podezření na počínající mikroinvazi karcinomu. Avšak v metastázách některých maligních nádorů v lymfatických uzlinách se kolem nádorových buněk nebo buněčných skupin vytvářejí složky vlastní bazální membrány — kolagen IV a laminin, což může být prospěšné při pátrání a průkazu metastáz. Detekce těchto antigenů se uplatní i při diferenciální diagnostice germinálních nádorů ovaria a varlete.

6.4 Vimentin a mezenchymální deriváty

Vimentin je ve vyztáhlých a diferencovaných tkáních středním filamentem pojiva, derivátů mezenchymu a mezoblastu, tedy vaziva, chrupavky a kosti, elementů krevních řad a endotelu. I když je vimentin středním filamentem pojiva, je v průběhu ontogeneze exprimován i v dalších typech tkání a tento diferenciační program se pak obrátí i u patologických derivátů těchto tkání, včetně nádorů.

V neuroektodermu je vimentin prekurzorem GFAP u gliových elementů i předchůdcem neurofilament u neuroblastů. Ve zralých astrocytech je pak s GFAP koexprimován, zatím co v neuronech nikoliv. Jeho exprese předchází v průběhu ontogeneze svalové tkáni expresi desminu. Zvláště častá je koexprese vimentinu s cytokeratiny během histogeneze, v diferencovaných epitelích a jejich nádorových derivátech u celé řady orgánů. Např. v některých entodermálních epitelích bronchiálního stromu se u 10-ti týdenních embryí koexprimuje vimentin s cytokeratiny a tuto koexpresi lze prokázat i ve skupinách epiteliálních buněk novorozenecké i postnatální plíce. Koexprese vimentinu v karcinomech ledviny (nejenom u jeho sarkomatoidní formy) byla popsána opakovaně. V neonatálním endometriu exprimuje vimentin část žlázových buněk, v korporálním endometriu dospělé ženy je to již 80 %. Také endometriální adenokarcinomy vykazují přítomnost vimentinu v padesáti až šedesáti procentech případů. Naproti tomu endocervikální žlázy ani z nich odvozené karcinomy neobsahují vimentin.

Je tedy zřejmé, že deriváty jednoho embryonálního orgánu (Müllerova vývodu) v určitém úseku vimentin koexprimují, v jiném zase nikoliv, i když si všude podržují epiteliální strukturu. Štítná žláza vzniká invaginací spodiny primitivního faryngu jako trámčina, která se pak za interakce s okolním mesenchymem přestavuje ve folikly. Vimentin je ve folikulárních buňkách koexprimován s cytokeratiny ve fetální, neonatální i dospělé štítné žláze, stejně jako v některých v karcinomech (zejména papilárních), které z ní vycházejí. Exprese vimentinu byla též zaznamenána v karcinomech mammy, hepatocelulárních karcinomech, cholangiocelulárních karcinomech, spinaliomech děložního čípku, karcinoidu a paragangliomech, ovariálních karcinomech a pleiomorfních adenomech slinných žláz. Koexprese vimentinu nebyla zjištěna ve většině adenokarcinomů tlustého i tenkého střeva, žlučníku a prostaty, v nádorech ze zárodečných buněk (seminomy a dysgerminomy), avšak vimentin byl nalezen v mesenchymálních složkách teratomů, ložiskovitě i v embryonálních karcinomech. O vysokém procentu koexprese cytokeratinů s vimentinem u epiteloidních sarkomů již byla zmínka stejně jako u mesoteliomů, kde imunoreaktivita na vimentin má intenzitu srovnatelnou s reaktivitou na cytokeratiny. Koexprese vimentinu s cytokeratiny značně snižuje význam detekce vimentinu k odlišení epiteliálních tkání a jejich derivátů od mezenchymálních.

Detekce vimentinu však je, jak již bylo uvedeno, významná ve tkáních, kde je jediným středním filamentem. Na trhu je k dispozici řada protilátek, které se vážou na epitop odolný vůči formolové fixaci a zalití do parafinu.

6.5 Antigeny krevních elementů a endotelií

K pojivovým tkáním náleží i krevní elementy a endothelie: analýza membránových molekul vyztárajících buněk imunitního systému s pomocí monoklonálních protilátek vedla

k podrobnému sestavení jejich exprese v jednotlivých vývojových stádiích. Povrchové antigenní molekuly lymfocytů, leukocytů a endotelií jsou zařazeny do skupin-shluků nazývaných CD (cluster of differentiation) a označeny pořadovým číslem. Toto označení se však vztahuje i na protilátky rozeznávající tyto antigeny.

CD34 antigen (human progenitor cell antigen) je protein o MW. 115 kD, kódovaný genem na chromosomu 1q a exprimovaný na povrchu hemopoetických kmenových buněk lymfoidní a myeloidní řady v kostní dřeni a u některých akutních leukemií. Byl však identifikován i ve vaskulárních endotheliích, dendritických buňkách dermis a v endoneuriu.

Z pluripotentní kmenové buňky CD34+ se vyvíjí kmenová buňka zadaná k vývoji v lymfoidní větev, která nese terminální deoxinukleotidyl transferázu (TdT). Ještě v kostní dřeni je možno na buňkách, které migrují do thymu, nalézt vedle TdT též molekulu CD7, kterou si T lymfocyt podrží po celou dobu vývoje. První povrchovou molekulou, kterou T buňky získávají v mikroprostředí thymu je CD2. To je adhezivní molekula, jejíž ligandou je LFA-3 (CD58). Spolu s molekulou CD3 patří mezi tzv. pan-T lymfocytární povrchové molekuly, které se nacházejí na všech T lymfocytech periferní krve. Povrchový komplex CD3 je asociovaný s receptorem pro antigen na T lymfocytech a přenáší z něho aktivační signály do nitra buňky. Dalšími významnými povrchovými molekulami T lymfocytů jsou CD4 a CD8. V průběhu vývoje v thymu prochází část vyvíjejících thymocytů stadiem, kdy jsou exprimovány současně obě molekuly, a potom se však tyto buňky diferencují buď v CD4 anebo v CD8. Tyto dva typy představují převážnou většinu lymfocytů kolujících v periferní krvi. Molekula CD4 je funkčně induktorová, pomocná (charakterizuje „helpery“), molekula CD8 je funkčně tlumivá, cytotoxická (charakterizuje „supresory“).

Pro imunohistochemickou diagnostiku má velký význam tzv. *společný leukocytární antigen* (leucocyte common antigen, LCA). Představuje rodinu pěti či více glykoproteinů o vyšší molekulové váze (MW 180, 190, 205 a 220 kDa), přítomných na povrchu většiny lidských leukocytů. Proti jejich epitopům byla připravena řada protilátek, většinou použitelných ve formol-parafinovém materiálu. Diferenciace kmenových buněk B řady začíná v průběhu osmého týdne gestace, kdy kmenové buňky putují ze žloutkového váčku do fetálních jater, později se B lymfocyty diferencují v kostní dřeni. Vývoj B buněk se děje přes řadu stádií, které se dají postihnout zčásti morfologicky, nejlépe však na základě exprese membránových molekul.

Pro-B lymfocyty exprimují (kromě HLA-DR) antigeny CD10 a CD34, dále CD19 a CD22, pre-B buňky CD9, 10, 19, 20, 22, 24 a 37. Nezralým B lymfocytům chybějí na rozdíl od předchozích CD9 a CD37, avšak již exprimují povrchové imunoglobuliny stejně jako zralé B lymfocyty.

Zralé B buňky jsou charakterizovány přítomností CD19, 20, 21, 22, 24, 37, aktivované B lymfocyty kromě toho exprimují též CD 23 a CD 25. Zastoupení populace B lymfocytů v periferní krvi se určuje podle přítomnosti pan-lymfocytárních znaků, nejčastěji CD19 a CD20 s omezením, že nejsou exprimovány na plasmatických buňkách (ty nesou znak CD38 a CD138). Normální zastoupení B lymfocytů v periferní krvi činí asi 10%. CD znaky charakterizující B lymfocyty jsou zpravidla přítomny i na B non-Hodgkinských maligních lymfomech a leukemiích (např. B-CLL). CD znaky plasmocytů jsou přítomny i na jejich neoplasiích (plasmocytom).

Schopnost fagocytózy mají dvě buněčné populace: granulocyty a buňky monocytomakrofágové linie.

Nejmladší buňky zadané ve vývoj v myeloidní větev nesou povrchové molekuly CD33 a CD13. Zralé elementy nesou i CD15.

K identifikaci T lymfocytů a T lymfomů je oblíbená monoklonální protilátka UCHL-1 (CD 45RO) použitelná v nativním i formolparafinovém materiálu. Reaguje s CD4 i CD8 pozitivními lymfocyty, ale i s granulocyty a monocyty. Normální B lymfocyty jsou negativní, avšak 10 % B lymfomů reaguje pozitivně. Negativně reagují všechny nelymfoidní tkáně a jejich nádorové deriváty.

Z populace T lymfocytů zasluhují zmínku především skupiny CD4 a CD8. CD4 antigen slouží ve své membránové komponentě jako receptor pro molekuly MHC druhé třídy, ale i pro HIV. Tím se dá vysvětlit selektivní tropismus viru pro CD4 T lymfocyty. Cytoplasmatická část molekuly je asociována k p56 tyrozin-kináze. Glykoprotein o MW 59 kDa je přítomen na membráně T buněk subpopulace „helperů“ či induktorů a ve většině kožních T lymfomů včetně mycosis fungoides. CD4 antigen lze nalézt i v některých případech akutní lymfoblastické T leukemie a T lymfomu (v posledním případě spolu s CD8 antigenem). CD4 T lymfocyty jsou přítomny i ve sliznici střeva.

CD8 antigen o MW 32 kDa je přítomen na supresorových či cytotoxických lymfocytech. CD8 slouží jako receptor pro molekuly MHC první třídy. Její cytoplasmatická část je též asociována k p56 tyrozin-kináze. Supresorové-cytotoxické T lymfocyty zaujímají v periferní lymfatické tkáni jenom 15 až 20 % buněk v T zoně (interfolikulární oblasti), avšak až 80 % T buněk v kostní dřeni a střevním epitelu. V thymu nese CD8 naprostá většina kortikálních thymocytů a 30 % dřevných ve slezině kromě supresorových lymfocytů reagují pozitivně i T buňky lemující siny.

Hodgkinův ML je charakterizován klonální proliferací B lymfocytů, méně často T buněk obklopených kolísavým počtem zánětlivých elementů a fibrosou. Pro diagnózu klasického Hodgkinova ML je charakteristická exprese antigenu CD30, patřícího ke skupině tumor nekrotizujícího faktoru (TNF). RS buňky též exprimují CD40 antigen charakteristický pro zárodečná centra B buněk. Jehož aktivace inhibuje apoptózu. Dalším znakem RS buněk v klasickém Hodgkinově ML je exprese CD15, který lze odhalit ve většině případů protilátkou Leu M1.

6.6 Endoteliální markery, antigeny krevních skupin

Již zmíněný Faktor VIII related antigen (F VIII, von Willebrand factor) je produkován endoteliálními buňkami a megakaryocyty. Je-li endothel aktivován (např. cytokiny), začne během krátké doby produkovat prostaglandiny, adhezní molekuly a další proteiny. Jeho funkce je dvojitá: za prvé, vytváří komplexy s antihemofilickým faktorem známým jako koagulační protein faktor VIII. Za druhé, jeho adhezní molekuly se uplatňují při agregaci krevních destiček. Pacienti, kterým tento faktor chybí, jeví hemoragickou diatézu známou jako von Willebrandův syndrom. Antigen je vázán na Bierbeckova granula a byl nalezen v endotelu lymfatik, lymfangiomech a ložiskovitě i u Kaposiho sarkomu. Vyskytuje se v benigních i maligních cévních lézích a nádorech. Je konstantním markerem benigních a semimaligních cévních nádorů, avšak jen v nízkém procentu přítomen u nízcce diferencovaných angiosarkomů.

Dalším již jmenovaným antigenem je CD34, přítomný v naprosté většině cévních nádorů, často ve vyšší frekvenci než Faktor VIII. O jeho výskytu mimo krevní elementy a endotelie již byla zmínka.

Konečně asi nejvýhodnějším antigenem endotelu je CD31, jehož exprese zůstává zachována i u většiny angiosarkomů.

Antigeny krevních skupin též náleží mezi endoteliální markery. Je to skupina větvených uhlohydrátových řetězců přítomných na povrchu všech buněk, ale tradičně jsou spojovány s erythrocyty, kde určují

skupinovou kompatibilitu. Tyto antigeny jsou odvozeny od společného prekursoru, který je modifikován přítomností určitých alelických genů. V přítomnosti H genu je prekursor konvertován v H antigen, charakterizující osoby se skupinou 0. V přítomnosti genu A nebo B se H substance dále mění a dává vznik A nebo B antigenu. Imunocytochemický význam těchto izoantigenů spočívá v tom, že imunologické nebo neimunologické vazby na tyto glykoproteiny mohou přispět k identifikaci endotelu. Expres ABH izoantigenů byla u zjištěna adenokarcinomů a epiteloidních mesotheliomů.

6.7 Histiocytární markery, histiocytózy

Monocyty periferní krve dají vzniknout řadě tkáňových makrofágů (histiocytů) a dendritickým buňkám. V uzlinách se nacházejí v sinech a v parenchymu.

Byly popsány aspoň čtyři druhy mononukleárních dendritických buněk a makrofágů: folikulární dendritické buňky v centrech folikulů, interdigitující buňky v parakortexu uzlin, Langerhansovy buňky v kůži a řada typů makrofágů v mnoha lokalizacích. Uvedené elementy náležely do kontextu retikulárně endotheliálního (Aschoff) resp. retikulárně histiocytárního či monocytárně fagocytárního systému. Jejich úkolem je fagocytóza, úklidové reakce, bariérové funkce a tvorba kolagenu, u některých jsou tyto funkce potlačeny a do popředí vystupuje navození imunitních reakcí, schopnost přenášet antigen a předkládat jej lymfatickým tkáním.

Původně byly za markery histiocytů pokládány $\alpha - 1$ -antitrypsin (A1AT), $\alpha - 1$ -anti chymotrypsin (A1ACT) a lysozym (muramidáza), které lze skutečně prokázat ve většině histiocytárních elementů, avšak celá řada zkřížených reaktivit s jinými tkáněmi, např. s epitely, snížila význam jejich detekce.

Antigen CD68, charakteristický pro histiocyty a makrofágy, je glykoprotein o MW 110 000 lokalizovaný intracytoplasmaticky. Protilátky proti tomuto antigenu označují makrofágy v řadě orgánů, jako Kupferovy buňky v játrech a makrofágy ve slezině, střevě, plicích a kostní dřeni. Protilátky proti CD68 reagují i s buňkami monocytární a myelomonocytární leukemie avšak jen s některými proliferujícími elementy akutní myeloidní leukemie.

Naproti tomu antigen prezentující buňky — Langerhansovy, interdigitující a folikulární dendritické buňky s protilátkami proti CD68 nereagují. Dendritické buňky jsou stálou součástí nejrůznějších tkání (dendritické rezidentní buňky), ale nemají konstantní sadu markerů: S100 protein pozitivní jsou prakticky jenom Langerhansovy X-buňky.

CD34 pozitivní jsou dendritické buňky v řadě tkání. Přitom CD34 pozitivita vylučuje S100 pozitivitu a naopak. V epidermis se vyskytují i non-X buňky, které jsou CD34 pozitivní. Endoteliální elementy se vyznačují zejména pozitivní reakcí na faktor XIIIa a faktor VIII.

Histiocytóza X (nyní označovaná jako Langerhans cell histiocytosis) je charakterizovaná heterogenní lymforetikulární proliferací (také eosinofily, neutrofilie, lymfocyty, plazmatické a žírné buňky) a přítomností Langerhansových buněk, které reagují silně s protilátkami proti CD1, CD4, HLA-DR a S100 proteinu, avšak nereagují s protilátkami proti CD68.

Histiocytární medulární retikulóza asi není klinicko-patologickou jednotkou, spíše syndromem. Ukazuje se, že některé takto popsané případy patří ke Ki-1 malignímu lymfomu, jiné k perifernímu T lymfomu (s erythrocytofágií nebo bez ní).

6.8 Svalová tkáň

Cytoskeletální desmin je středním filamentem svaloviny. Některé isoformy aktinu a k nim asociované nebo vazebné proteiny (myosin) jsou charakteristické pro jednotlivé svalové tkáně. Dystrofin (s asociovanými proteiny) je součástí membránového cytoskeletu svalového vlákna. Myoglobin je hemový protein, který váže kyslík přítomný v kosterním a srdečním svalu.

Desmin je polypeptid, který má nehelikální aminoterminální hlavovou část a karboxyterminální koncový úsek, které spojuje střední, alfa helikální doména s asi třemi sty aminokyselin. Desmin je středním filamentem hladkého, kosterního a srdečního svalstva i neoplastických derivátů svalové tkáně. Avšak incidence a intenzita imunoreaktivity u těchto nádorů je značně variabilní.

Zejména u leiomyosarkomů je udáváno 0 až 85 % pozitivních nálezů, avšak tyto údaje zahrnují i stromální nádory GIT. U ostatních je tato pozitivita mnohem vyšší, nejvyšší u leiomyosarkomů děložních a následujících LMS měkkých tkání. U rhabdomyosarkomů se udává rozpětí 35 – 100 % s průměrem 78 %. Imunoreaktivita na desmin je takřka absolutní pro alveolární a embryonální podtypy a může být diagnosticky rozhodující pro níže diferencované rhabdomyosarkomy. Naproti tomu imunoreaktivita u pleiomorfí formy není dostatečně zhodnocena, zřejmě pro její raritní výskyt. U leiomyomů mimo GIT a u všech rhabdomyomů je imunoreaktivita na desmin prakticky stoprocentní.

Desmin se nevyskytuje v myoepiteliálních buňkách, ale zkřížená reaktivita na desmin (viz začátek této kapitoly) byla popsána v retikulárních buňkách lymforetikulárních tkání, v endometriálních stromálních buňkách, podocytech, fetálních mesotheliích, ve stromálních buňkách fetálních ledvin, v choriových klících a v pupečním provazci. Expresí desminu v nádorech nesvalového původu je rovněž známa, i když v nevysokém procentu. Myofibroblast, který se rychle dokáže přeměnit v myoidní (kontraktilní) nebo fibroblastickou (syntetizující) formu exprimuje desmin jen v některých fázích těchto buněčně-typových přechodů. Tyto přechody jsou též spojeny s expresí jiného typu aktinu.

Aktin je významným proteinem všech živých buněk a je potřebný pro řadu funkcí jako změny buněčného tvaru, pohyb buňky a účast při buněčném dělení. Spojení mezi aktinem a membránovou složkou cytoskeletu posilují a tvarují plazmatickou membránu. Aktin patří k nejkonzervativnějším proteinům eukaryont a je u savců a ptáků exprimován v šesti izoformách.

Existují tyto specifické izoformy aktinu:

- α -aktiny jsou přítomny ve svalových buňkách
- α - a γ - aktin jsou v hladkém svalu
- α - kardiální a α -skeletální aktin v srdečním a kosterním svalu
- β - a γ - aktiny převažují v nesvalových buňkách

Aktin v cytoplazmě existuje ve dvou polymerizačních stavech: nepolymerizovaný G-aktin a polymerizovaný F-aktin.

Proteiny, které se váží na aktin nebo asociované proteiny s aktinem, jsou na rozdíl od vysoce konzervativních aktinů variabilní a často tkáňově specifické. Existuje jich několik skupin: některé zasahují do

polymerizace aktinu, jiné připojují aktin k dalším filamentům a strukturám. Myozin je hlavním kontraktilním proteinem kosterního svalu asociovaným s aktinem a patří mezi molekulární buněčné motory.

Myoglobin je hemový protein, který váže kyslík přítomný v kosterním a srdečním svalu. Není přítomen ve hladkém svalu, a tedy je v tomto směru užitečný k imunodiagnostice lézí kosterního svalu, nejčastěji rhabdomyosarkomu, i když k jeho detekci můžeme použít i jiných antigenů (desmin, myosin, aktin).

Dystrofin a asociované proteiny (dystrofin glykoproteinový komplex, DGC) jsou proteiny zpevňující sarkolemmu při pohybu svalových vláken. Dystrofin je longitudinální molekula, která se váže k aktinu svou aminoterminální doménou a ke glykoproteinu tvořícímu součást plasmatické membrány (β -dystroglykan) se váže svojí karboxyterminální a cysteinem bohatou doménou. Dystrofin tedy vytváří spojnicí mezi kontraktilním cytoskeletem a povrchovou membránou, která je na druhé straně ukotvená v extracelulární matrix (laminin). Jeho průkaz je cenný v diagnostice tzv dystrofiopatií — Duchennovy a Beckerovy svalové dystrofie. Také identifikace asociovaných proteinů (merosin, sarkoglykany a další) i některých jaderných membránových proteinů (emerin, lamin A/C) se uplatňuje v diferenciální diagnostice svalových dystrofií.

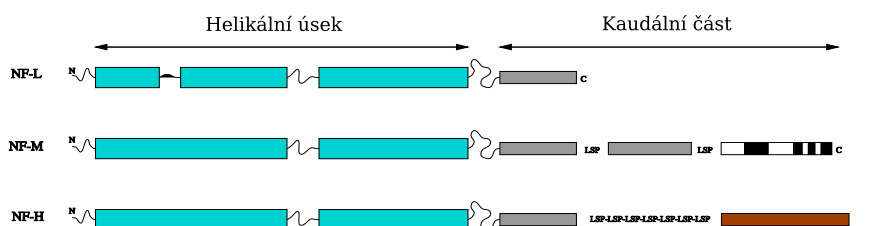
6.9 Nervová tkáň

Neurofilamenta nejsou přítomna v prvotních základech neuroektodermálních struktur. Středním filamentem elementů medulární (neurální) trubice před a v počátcích jejich diferenciace na neuronální a gliovou řadu je však vimentin, který je později u zrajících a zralých elementů neuronální řady vystřídán neurofilamenty, u glie gliálním fibrilárním acidickým proteinem, GFAP.

Mezi neuroendokrinní antigeny patří synaptofyzin. Je to membránový protein presynaptických měchýřků neuronů. Nachází se v nervových buňkách centrálního i periferního nervového systému. Dalším neurálním markerem je chromogranin/sekretogranin, je to skupina kyselých proteinů přítomných v matrix sekrečních granulí neuroendokrinních buněk.

Neurofilamenta se obvykle dělí na tři skupiny, těžká (H — heavy), střední (M — middle) a lehká (L — light, viz obrázek 13). Tyto podjednotky jsou v průběhu vývoje nervového systému exprimovány v pořadí L-M-H a uvnitř neuronů jsou různě distribuovány. Polypeptidy neurofilament jsou syntetisovány v perikaryích a potom procházejí pomalým axonálním transportem na periferii. Nádory vycházející z gangliových buněk — neuroblastomy (sympatoblastomy, meduloblastomy), ganglioneuroblastomy a ganglioneuromy — obvykle exprimují neurofilamenta všech tří skupin, výjimečně mohou chybět v neuroblastomech filamenta H.

Synaptofyzin patří mezi neuroendokrinní antigeny. Je to membránový protein presynaptických měchýřků neuronů. Nachází se v nervových buňkách centrálního i periferního nervového systému, i v buňkách neuroendokrinních. Také se ukázal jako velmi citlivý



Obrázek 13: Schematická reprezentace tří podjednotek neurofilamentového tripletu — amino (N) terminální oblast, oblast s α -helikálními doménami a karboxyterminální část. (LSP: aminokyseliny Lysin, Serin, Prolin) reprezentující kaudální oblast. Seriny v těchto oblastech jsou substráty pro fosforylaci v axonálních, ale ne dendritických neurofilamentech.

prostředek k rozpoznání neuroendokrinních nádorů nejrůznějších lokalizací. Neuroblastické nádory — neuroblastom, ganglioneuroblastom a ganglioneurom — i paragangliomy obsahují tento membránový protein. Ovšem jen alkoholová fixace optimálně zachová jeho antigen.

Chromogranin/sekretogranin představují skupinu kyselých proteinů přítomných v matrix sekrečních granulí neuroendokrinních buněk. Tři hlavní skupiny těchto proteinů zahrnují chromogranin A, chromogranin B a sekretogranin II. Chromogranin A je přítomen ve většině neuro-endokrinních buněk i nádorů. Hladina chromograninu A v seru je vysoce citlivý a specifický marker neuroblastomů.

Gliální fibrilární kyselý protein, GFAP je hlavním středním filamentem neuroglie. Avšak v nezralých gliových elementech je — podobně jako u neurofilament — jeho předchůdcem vimentin, který je však i ve vyzrálých astrocytech i jejich nádorových derivátech s GFAP rozsáhle koexprimován. Mono- a polyklonální protilátky proti GFAP reagují v centrálním nervovém systému s astrocyty a některými skupinami ependymálních buněk. V periferním nervstvu reagují pozitivně Schwannovy buňky, satelitní buňky a enterické gliální elementy. Koexprese GFAP, vimentinu a cytokeratinů byla popsána u papilárního meningeomu, v metastázách Grawitzova karcinomu a v pleiomorfním adenomu slinné žlázy. Koexprese s vimentinem byla zjištěna v chondrocytech epiglottis, ale i ve všech fetálních a neonatálních chrupavkách a v plicích chondrohamartomech.

S100 protein je kyselý protein velmi rozšířený v centrálním i periferním nervovém systému. Není specifický pro nervový systém: jak již bylo uvedeno, vyskytuje se v řadě nenervových tkání (tuková tkáň). Nejužitečnější je při diagnostice nádorů nervových pochev a melanogenního systému. Je přítomen ve schwannomech a neurofibromech. Přítomnost S100 proteinu je neocenitelná v rozpoznání celulárního schwannomu, benigního nádoru, který může být zaměněn za fibrosarkom nebo za maligní tumor nervových pochev.

Ve fibrosarkomu chybí S100 protein zcela, v maligním schwannomu je imunoreaktivita slabá a jen ložiskovitá, zatímco v benigním schwannomu je intenzivní a homogenní. S100 protein se nachází i v tzv. myoblastickém myomu (Abrikosovův nádor, granular cell tumor) což může být chápáno jako jeden z dokladů jeho neurogenního původu. Přítomnost S100 v melanomech může být užitečná při identifikaci jejich metastáz.

6.10 Melanogenní antigeny

Melanocytární antigeny jsou charakteristické pro tu část neuroektodermální populace, která se diferencuje směrem k melanocytárnímu či melanogennímu systému. K první orientaci postačí pozitivní reakce na vimentin a S100 protein spolu s negativní reakcí na cytokeratiny.

Nejčastěji používanou protilátkou proti melanomovému antigenu je HMB45. Je to monoklonální protilátka proti cytoplasmatickému premelanosomálnímu glykoproteinu melanocytů spjatého s tyrozinázovým systémem, odolávajícím formol-parafinovému zpracování. Není vhodný k rozlišování benigních a maligních melanocytárních lézí

Pro průkaz melanocytů se dále používá protilátka Melan A.

6.11 Ukazatelé rychlosti buněčné proliferace

Většina buněk diferencovaných tkání u dospělých jedinců se nedělí. Tato „mlčící“ populace je organizovaná a regulovaná. Například v tenkém střevu proliferují buňky na bazi krypt, což je spojeno s buněčným pohybem v kryptách směrem nahoru a dále na klky. Migrující buňky nad touto proliferační zónou se však již nacházejí ve stavu růstové zástavy a při hrotu klku u nich dochází ke kontrolované apoptóze. V játrech je za normálních okolností mitoticky aktivních asi 1% hepatocytů, avšak po parciální hepatektomii tento počet vzroste na 10%.

Některé diferencované tkáně procházejí buněčným cyklem i za normálních okolností, např. při menstruačním cyklu. Buněčná proliferace může být reakcí na řadu patologických podnětů, např. u proliferativních zánětů, avšak jednou z nejaktuálnějších kapitol současné patologie je proliferace nádorová.

Předmětem sledování rychlosti buněčné proliferace je již po desetiletí mitotická aktivita. Ta se týká krátké části buněčného cyklu (M fáze), nevyžaduje však žádnou speciální metodiku zpracování preparátu, naopak k jejímu vyhodnocení zcela postačí tenké parafinové řezy přehledně barvené hematoxylinem. Obecná patologie učí, že při nádorové proliferaci je mitotická aktivita (mimo jiné) přímo úměrná maligní biologické dignitě procesu. Samotná úroveň mitotické aktivity však nemá v různých tkáních a nádorech stejnou předpovědnou hodnotu: jiná je u urotheliálního papilomu a jiná u děložního leiomyomu nebo fibrózního histiocytomu.

Proto se do popředí zájmu (zejména histopatologů) dostalo stanovení úrovně buněčné proliferace sledováním exprese proteinů vázané na určitou část buněčného cyklu. Mezi

tyto kontrolní uzly buněčného cyklu rozhodující o velikosti buněčných populací patří jaderný antigen (a stejně nazvaná monoklonální protilátka) *Ki67*. Ta reaguje s lidským jaderným antigenem exprimovaným v proliferujících buňkách prakticky ve všech fázích buněčného cyklu s výjimkou G_0 a je dobrým nástrojem k identifikaci proliferující subpopulace buněk ve tkáních. Její exprese však není omezená na nádory (karcinom mammy), například u ulcerosní kolitidy je možno s její pomocí demonstrovat rozšíření proliferační zony střevních krypt.

Jaderný antigen proliferujících buněk (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), je 36 kDa jaderný fosfoprotein, který jako kofaktor DNA delta polymerázy je nezbytný pro semikonzervativní syntézu DNA. Hladina PCNA je prakticky zanedbatelná v klidových buňkách, ale dramaticky narůstá v průběhu buněčného cyklu. Jeho zvýšená produkce v jádře začíná ke konci G_1 fáze buněčného cyklu před začátkem syntézy DNA, během S fáze dosahuje maxima a klesá během G_2 a M fáze. Aplikace protilátek proti PCNA se osvědčila při sledování proliferační aktivity řady nádorů.

6.12 Onkogeny, antionkogeny

Ke kontrolním uzlům buněčného cyklu patří i skupina onkogenů a antionkogenů. V sedmdesátých letech minulého století byly středem pozornosti nádorové biologie onkogenní viry. Z DNA virů jsou tři předmětem zvláštního zájmu: Epstein Barr virus (EBV), Human papilloma virus (HPV) a virus B hepatitidy (HBV). Většina lidských nádorů však není způsobena virovou infekcí. Důležitou roli v regulaci buněčné proliferace a diferenciaci normálních buněk hrají protoonkogeny a onkogeny. Existují tři třídy normálních regulačních genů: růst podporující protoonkogeny, růst inhibující antionkogeny a geny regulující apoptózu — programovanou buněčnou smrt. Transformace protoonkogenů v onkogeny vzniká zásahy do genomu, často mutacemi.

Tyto zásahy a tedy i vznik nádorového bujení se mohou realizovat na několika úrovních. Za prvé při interakci růstového faktoru a membránového receptoru. Tato interakce nebo vazba zevního — růstového faktoru na membránu vede k přestupu signálu přes membránu, následuje přenos tohoto signálu k jádru dráhou druhého messengeru, a konečně iniciací transkripce a replikace DNA vedoucí k buněčnému dělení. Onkogenů, které se uplatňují v jednotlivých fázích tohoto procesu, je celá řada. Jimi kódované proteiny se nazývají onkoproteiny a tyto se dají většinou imunohistochemicky prokázat. Mezi růstové faktory patří například *sis*, receptory růstových faktorů jsou *erbB1*, *erbB2* a *erbB3*, přenosu signálů se účastní *ras* a *abl*, jaderné regulační proteiny jsou *myc* (*N-myc* a *L-myc*) a vlastní regulátory buněčného cyklu jsou cykliny a cyklin-dependentní kinázy (CDK). O těch byla zmínka v kapitole o buněčné proliferaci.

K dispozici jsou protilátky proti většině ze jmenovaných onkogenních proteinů, což se uplatňuje zejména v onkologické diagnostice. Antionkogeny byly objeveny v souvislosti se studiem retinoblastomu, nádoru postihujícího jedno ze 20 tisíc dětí. Asi v 60 % případů se vyskytuje sporadicky, ve 40 % případů má výskyt familiární. Gen retinoblastomu (*Rb*) se nachází na chromosomu 13q14. K rozvoji retinoblastomu musí být inaktivovány obě normální alely.

Nejnámějším antionkogenem je *gen p53*. Jeho mutované formy však patří mezi onkogeny.

Abnormity p53 v důsledku mutací jsou nacházeny stále častěji v širokém okruhu nádorů a zdá se, že patří k nejčastějším onkogenům při neoplaziích. Protein kódovaný tímto genem i proteinové produkty na p53 vázané (p21, mdm2) se dají snadno imunohisto-chemicky prokázat.

6.13 Praktická aplikace imunohistochemie, příklad postupu v diagnostice nádorů

Cílem této části není nastavit zrcadlo opravdovému metodickému postupu patologa, ale pouze nastínit postupy, kterými se práce patologa ubírá. Práci patologa přináší zásadní informaci pro rozhodování o tom, zda léčit či neléčit a pokud léčit, tak jakým způsobem. Je to práce zajímavá a lze ji přirovnat k práci detektiva nebo k práci kriminalistické laboratoře. Z dalšího popisu vyplývá, že patolog musí mít jednak velké teoretické znalosti a dále, že mu je současně s makroskopickou a mikroskopickou diagnostikou také odborníkem znalým řady laboratorních metod.

Prvním krokem patologa je analýza histologické stavby tkáně. Již hodnocením standardně barvených preparátů lze většinou usoudit a rámcově zařadit, ve velkém počtu případů jde o přímé pojmenování nalezeného nádoru nebo jiné změny. Pokud je zařazení podle prostých morfologických znaků nejisté, pomůže ke skupinovému zařazení imunohistochemie. Detekcí tkáňového původu nádoru lze rozpoznat, zda se jedná o lymfatickou, epiteliální nebo mezenchymální neoplazii, tzn. pomůže rozlišit, zda se jedná o lymfom, karcinom nebo sarkom.

Dalším krokem je hledání bližších znaků jednotlivých tkání, z nichž by nádor mohl vycházet. Těmito znaky jsou orgánově či tkáňově specifické diferenciační antigeny, nebo speciální sekretorické produkty.

Snadné je pojmenování nádoru i z metastázy při nálezů specifického markeru, což je možné jen u některých tumorů. Velmi dobře lze například potvrdit, že uvedená metastáza vychází z prostaty, neboť lze použít průkazu prostatické specifické kyselé fosfatázy a prostatického specifického antigenu. Cesta k diagnóze se děje postupným potvrzením a vylučováním znaků.

Z uvedeného textu by mělo vyplynout, že současná patomorfologie již obsahuje tolik nozologických jednotek a teoretických informací, že jeden člověk nemůže být dobrým odborníkem na vše. Podobně jako v klinické medicíně, kde se lékaři i v rámci definovaných oborů jako je onkologie, interna (kardiologie, respirační choroby, gastrointestinálních onemocnění, hematologie), endokrinologie nebo chirurgie specializují na užší oblasti než je definice jejich oboru, například chirurg se specializuje na plicní operace, nebo na břišní chirurgii či onkochirurgii, je nutné, aby se i patologové uvnitř jejich oboru specializovali na užší spektrum problému a potom v něm mohou dosáhnout dokonalosti. To ovšem znamená, že kvalitní služby může podávat jedině oddělení patologie s dostatečně velkým

týmem pracovníků, který jim umožní specializovat se na určitou oblast patomorfologie, což je směr, který sledují velká pracoviště, především ústavy univerzitního typu. Ty pak slouží i k superkonziliální pomoci menším oddělením patologie.

7 Metody molekulární patologie

7.1 Místo molekulárně biologických metod v patologii

Molekulárně cytogenetické a molekulárně biologické metody mají široké uplatnění v nej-různějších oborech medicíny. Svě trvalé místo získávají také v patologii. Zde se uplatňují především v onkologické diagnostice, ale také v oblastech neonkologických. Klasická patologie bohatě využívá imunohistochemickou analýzu, tedy analýzu na úrovni proteinů. Můžeme říci, že cytogenetické a molekulárně biologické přístupy doplňují současnou moderní patologii především o analýzy prováděné na úrovni DNA, případně RNA. Ale i metodické přístupy pro analýzu proteinů se v moderní molekulární patologii rozšiřují.

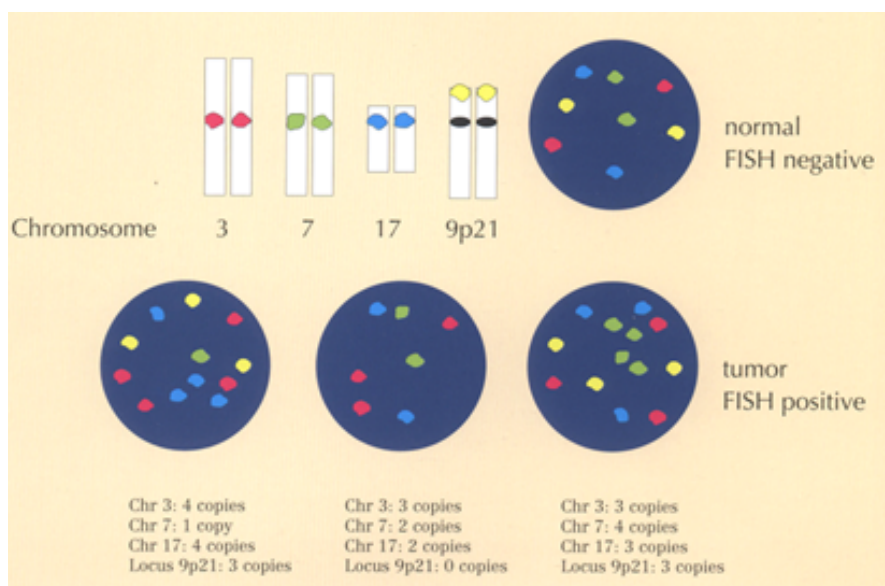
V procesu stanovení diagnózy stojí metody molekulární patologie až na samotném jeho konci. Jsou to metody, které mohou poskytnout velmi přesné, až detailní odpovědi, ale také předpokládají položení již velmi přesných, konkrétních otázek.

Výběr správné metody pro analýzu konkrétního problému záleží především na tom, jaký typ aberace stanovujeme. Dále jsme ve výběru metody omezeni možnostmi materiálu, z něhož vycházíme. Nejběžnějším výchozím zdrojem je formol-parafinový archivní materiál. Stále častěji ale analyzujeme také nefixovanou čerstvou nebo hluboce zmraženou tkáň, vzorky krve nebo moči. Účelem této kapitoly je poskytnout přehled molekulárně cytogenetických a molekulárně biologických metod využívaných v současné patologii a na několika konkrétních příkladech naznačit možnosti jejich využití.

7.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Cytogenetické metody jsou zaměřeny na detekci velkých strukturních změn v genomu jako jsou změny v počtu celých chromozomů nebo rozsáhlé změny ve struktuře chromozomů (translokace, delece, inverze). Nevýhodou klasických cytogenetických přístupů je, že vyžadují vyšetření dělicích se buněk. Příprava kvalitních kondenzovaných metafázových chromozomů z nádorových buněk může být často obtížná. Tento striktní požadavek neplatí pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH). Metoda FISH je založena na schopnosti jakýchkoliv dvou jednořetězcových DNA nebo RNA spolu navzájem hybridizovat za předpokladu, že se jejich sekvence vyznačují úplnou nebo alespoň částečnou komplementaritou bází. Tak se pomocí značené sondy DNA vyhledává v analyzovaném materiálu cílová sekvence komplementární se sondou. V případě fluorescenční hybridizace je sonda označena fluorescenční barvou a její přítomnost ve zkoumaném materiálu lze snadno sledovat fluorescenční mikroskopií. Velkou předností metody FISH je to, že výchozím materiálem pro toto stanovení jsou tkáňové řezy připravené z formol-parafinových bloků, případně fixované buňky izolované z krve nebo moči. Fluorescenční *in situ* hybridizaci můžeme v patologii využít k několika různým účelům:

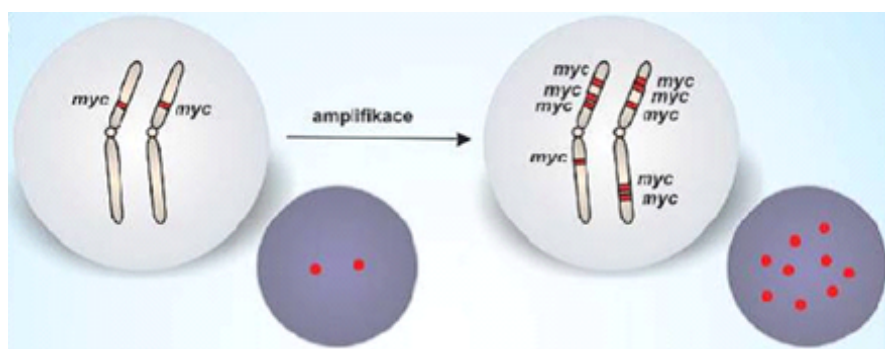
- pro detekci *přítomnosti cizorodé DNA* v lidských buňkách. Například s využitím sondy specifické pro příslušnou virovou DNA můžeme detekovat přítomnost sek-



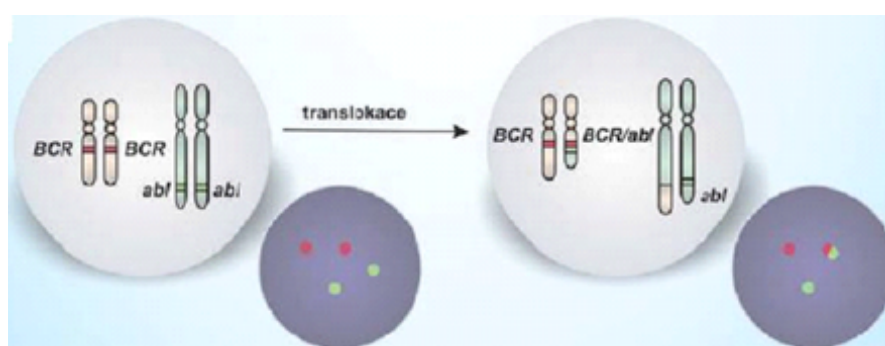
Obrázek 14: Fluorescenční in situ hybridizace — detekce aneuploidie CH 3, 7, 9, 17 v nádorových uroteliích

vencí DNA lidského papilomaviru v buňkách děložního čípku.

- pro analýzu *změn v počtu celých chromozomů*. K tomuto účelu se mohou jako sondy použít směsi krátkých fragmentů pokrývajících celé chromozomy nebo fragmenty specifické pro dané chromozomy, například centromerické sondy. Podle počtu signálů stanovených mikroskopii lze určit, zda se v buňkách nacházejí dvě kopie daného chromozomu nebo zda je jejich počet změněn. Příkladem může být detekce aneuploidie chromozomů 3, 7, 9 a 17 v nádorových uroteliích pomocí vyšetřovacího setu UroVysion (viz obr. 14).
- pro analýzu *amplifikace genů*. Použijeme sondu specifickou pro sledovaný gen a určíme počet signálů v jedné buňce. Příkladem může být sledování amplifikace genu N-myc u neuroblastomů nebo amplifikace genu *c-erbB2* (HER2/neu) u karcinomů prsu, pankreatu a dalších typů nádorů (obr. 15).
- pro detekci *translokace chromozomů*. Pro potvrzení přítomnosti fúzního genu se používají dvě sondy značené odlišnými fluorescenčními barvami. Každá sonda se váže k sekvenci jednoho z genů, který se účastní dané translokace. Pokud je v karyotypu přítomna hledaná translokace, způsobí vznik smíšeného signálu v důsledku fluorescence sond navázaných na cílové sekvence v těsném sousedství. Ve většině případů je translokována pouze jedna alela, proto ve shodném materiálu jsou zachyceny i samostatné signály obou sond. Příkladem takto sledovaných translokací jsou t(14;18) u folikulárního lymfomu, t(8;14) u Burkittova lymfomu nebo t(9;22)



Obrázek 15: Fluorescenční in situ hybridizace — detekce amplifikace genu *myc*



Obrázek 16: Fluorescenční in situ hybridizace — detekce translokace *BCR/abl*

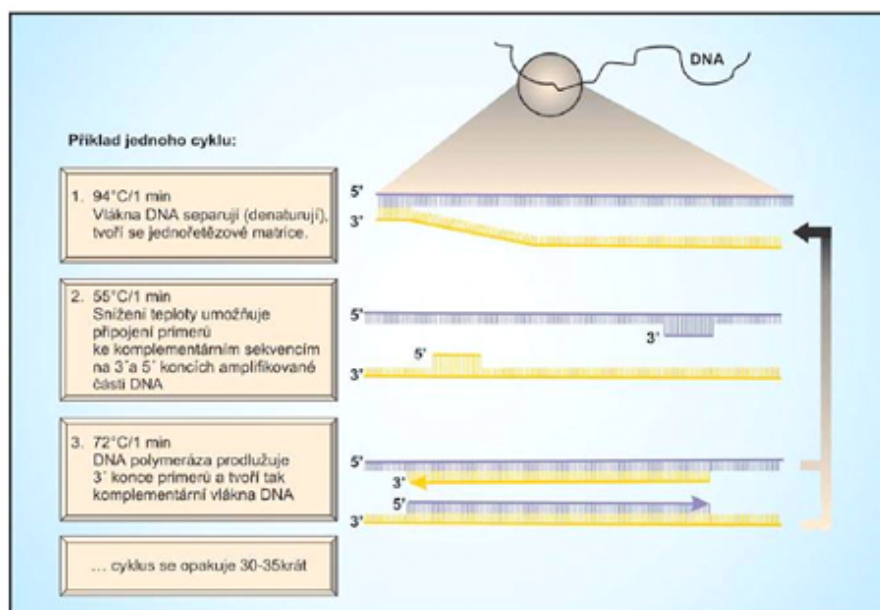
u chronické myeloidní leukémie (obr. 16).

7.3 PCR

Polymerázová řetězová reakce („polymerase chain reaction“ — PCR) patří dnes ke klíčovým metodám užívaným v molekulární diagnostice. Její podstatou je enzymatická amplifikace krátkého úseku DNA (řádově stovky až tisíce bází) ohraničeného syntetickými oligonukleotidy (tzv. primery) specifickými pouze pro analyzovaný úsek genu. Při syntéze DNA se používají termostabilní DNA polymerázy, které odolávají teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů, při nichž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky (obr. 17):

1. denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 — 98°C)
2. připojení primerů k odděleným — denaturovaným DNA řetězcům (30 – 65°C)
3. polymerační reakce (65 – 75°C).

Reakce se provádějí v termocyklerech, ve kterých se teplota automaticky mění podle předem zvoleného programu. Výsledným produktem reakce jsou fragmenty DNA defino-



Obrázek 17: Polymerázová řetězová reakce — během PCR se opakuje cyklus tří kroků: denaturace DNA, připojení primerů, syntéza nového řetězce

vané délky (obr. 18). PCR tak umožňuje získat z několika vláken DNA řádově milióny přesných kopií konkrétního úseku genu. Takto připravená DNA může být vizualizována po elektroforéze a obarvení (např. ethidium bromidem, stříbrem) nebo použita k dalším analýzám.

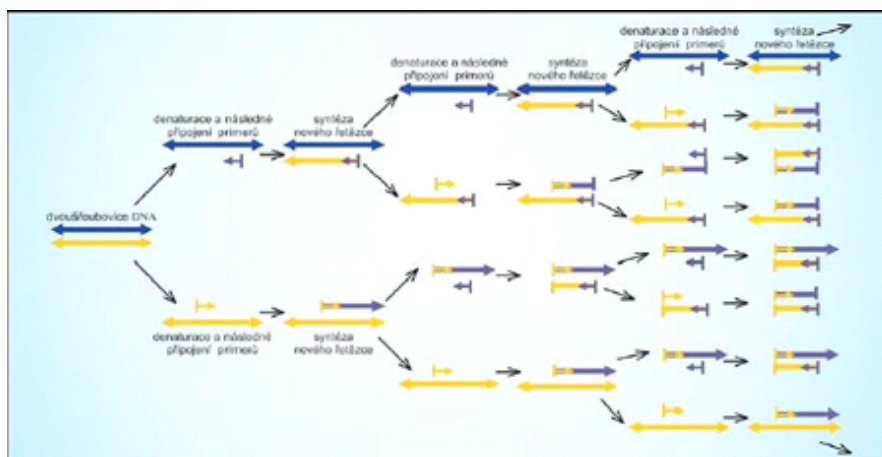
Vedle standardního provedení metody PCR existuje celá řada jejích variant.

7.3.1 Zpětná neboli reverzní PCR (RT-PCR)

RT-PCR je určena k amplifikaci molekul RNA. RNA je nejdříve přepsána zpětnou (reverzní) transkriptázou do komplementární DNA — cDNA, která se pak amplifikuje standardním postupem. V této souvislosti můžeme poznamenat, že obecně je pro metody analyzující DNA výchozím materiálem buď genomová DNA nebo mRNA. Každá z těchto dvou možností má své výhody i nevýhody.

Výhodou práce s genomovou DNA je její snadná dostupnost, poměrně velká stabilita, rovnoměrné zastoupení obou alel v izolovaném vzorku a možnost detekce mutací v nekódujících oblastech genu (promotorové oblasti genu a introny). Navíc dnes již existují komerčně dostupné sety na přípravu DNA z formol-parafinových archivních bloků v dostatečné kvalitě pro následné použití pro PCR.

Výhodou práce s mRNA je možnost analyzovat dlouhé úseky kódující sekvence nepřerušované introny.



Obrázek 18: Polymerázová řetězová reakce — amplifikace cílového fragmentu DNA při zvyšujícím se počtu cyklů

Nevýhodou práce s mRNA je často její slabá exprese v dostupných vzorcích, nízká stabilita a rychlá degradace. Dnes se již začínají využívat i komerčně dostupné postupy na izolaci mRNA z formol-parafinových bloků, ale jejich použití je velmi omezené jen na poměrně krátké úseky RNA (do 250 – 300 nukleotidů).

Další podstatnou nevýhodou analýzy mRNA je možnost nerovnoměrného zastoupení obou alel v izolovaném vzorku RNA.

7.3.2 Kvantitativní PCR

K některým účelům (např. při detekci minimální zbytkové nemoci, MRD) se používají varianty PCR, které umožňují přímou nebo nepřímou kvantifikaci produktu reakce PCR. Nejvyužívanějším kvantitativním zhodnocením PCR je metoda *kompetitivní PCR*, při které je ve stejné reakční směsi s jedním párem primerů současně amplifikována cílová sekvence a sekvence vloženého exogenního standardu (kompetitoru) o známé koncentraci. Kompetitor je nejčastěji připravován modifikací sledované cílové sekvence DNA (např. inzercí nebo delecí malého restrikčního fragmentu), což umožňuje odlišení obou PCR produktů po elektroforéze na základě jejich různé délky. Po titračním ředění kompetitoru v konstantním množství sledovaného vzorku produkuje PCR dva produkty s rozdílnou intenzitou. S klesající koncentrací kompetitoru klesá i intenzita jeho PCR produktu a narůstá intenzita signálu produktu testovaného vzorku a naopak. Je-li koncentrace kompetitoru příliš nízká proti testovanému vzorku, amplifikuje se pouze sekvence specifická pro testovaný vzorek. Při vyhodnocování hledáme bod ekvivalence obou produktů, tedy koncentraci, při které je v amplifikovaném vzorku stejné množství kompetitoru i analyzovaného materiálu.

7.3.3 PCR sledovaná v reálném čase (real time PCR, online PCR)

Tato varianta PCR umožňuje přímou kvantifikaci amplifikačního produktu v reálném čase, to znamená, během reakce. Jednou z možností jak toho lze dosáhnout je například použití barviva, které fluoreskuje po vazbě na dvouřetězcovou DNA, kterou tvoří produkt PCR. Fluorescenční signál se zvětšuje se vzrůstajícím množstvím produktu PCR.

Nejpřesnější a nejužívanější metodou kinetického sledování amplifikace je tzv. systém TaqMan, kdy se využívá 5' nukleázové aktivity Taq polymerázy a specifické fluorescenčně značené jednořetězcové sondy, která se váže podle principu komplementarity na jeden řetězec cílové DNA. Fluorochromy pro značení sondy jsou voleny tak, aby v intaktním stavu sondy jeden fluorochrom pohlcoval energii emitovanou druhým fluorochromem po excitaci laserovým paprskem. Tento efekt, tzv. zhášení, je zrušen po exonukleázovém rozštěpení sondy, navázané na cílové místo, DNA polymerázou postupující v průběhu elongace po amplifikovaném templátu. Rozdíl v intenzitě fluorescence obou fluorochromů je detekován optickým systémem, který přenáší emitované záření z jednotlivých reakčních zkumavek a je počítačově zpracováván.

7.3.4 PCR *in situ*

Klasické uspořádání PCR *in vitro*, kdy do reakce vstupuje jako templát izolovaná nukleová kyselina, neumožňuje vizualizovat a lokalizovat amplifikovaný produkt v konkrétní buňce na tkáňovém řezu. Toto omezení řeší kombinace metod PCR a *in situ* hybridizace. Principem je dosažení amplifikace specifické sekvence nukleových kyselin v buňkách do takové úrovně, která je následně detekovatelná hybridizací *in situ*. PCR *in situ* může být využita pro detekci cizorodých, například virových DNA sekvencí (např. viru CMV, HIV, HPV, HBV a dalších) v lidských tkáních.

7.3.5 Nested PCR

Při tomto uspořádání se provádějí postupně dvě kola PCR s dvěma sadami primerů. V prvním PCR slouží jako matrice výchozí zdroj DNA, například genomová DNA, a používají se tzv. vnější primery. Následuje další PCR, tzv. „nested“ PCR, ve kterém je matricí alikvot produktu reakce předcházející a použijí se vnitřní primery, specifické pro produkt první reakce. Druhá reakce vlastně ověřuje „správnost“ produktu první reakce a celkově tak zvyšuje specifitu celé PCR.

7.3.6 Multiplex PCR

Tato varianta PCR používá v jediném kroku několik sad primerů najednou. To umožňuje paralelní amplifikaci a následnou analýzu (například na základě velikosti syntetizovaných úseků DNA nebo využitím další analýzy) několika různých sekvencí DNA. Tak je možné analyzovat najednou například několik exonů téhož genu. Tohoto uspořádání PCR se

využívá například při analýze delecí v genu pro dystrofin (Xp21) při diagnostice Duchennovy svalové dystrofie či její mírnější alelické varianty Beckerovy svalové dystrofie. Současná amplifikace několika exonů různé velikosti dovoluje po následném elektroforetickém rozdělení produktů PCR určit v jediném kroku chybějící signály svědčící pro deleční mutace v oblasti daného exonu. Podmínkou tohoto uspořádání PCR je podobná teplota připojení všech použitých primerů k jejich specifickým sekvencím.

7.4 Kombinace PCR s metodami k určení bodových mutací

Jednou z významných aplikací metody PCR je příprava a izolace definovaných úseků DNA jako výchozího materiálu k přesnější analýze menších a bodových mutací. K detekci neznámých mutací v DNA se často užívají testovací metody založené na principu odlišné konformace a tím i elektroforetické mobility mutovaného a nemutovaného řetězce, a to jak jednořetězců DNA (například SSCP — „single strand conformational polymorphism“), tak i dvouřetězců (heteroduplexní analýza nebo její dokonalejší varianty jako například denaturační gradientová gelová elektroforéza DGGE). Citlivost klasické elektroforetické metody lze zdokonalit využitím kapilární elektroforézy nebo separací PCR produktů na chromatografických kolonách při teplotě způsobující částečnou denaturaci (denaturační vysokovýkonná kapalinová chromatografie DHPLC). Jiným způsobem zvýšení citlivosti metod detekujících heteroduplexní stav PCR produktu, je štěpení jakékoli nekomplementarity vzniklé v místě mutace, a to buď chemicky (CCA — „chemical cleavage of mismatch“) nebo enzymaticky (RCA — „RNase cleavage assay“).

Každá z dříve zmíněných metod má své optimální využití v konkrétním případě, výhody, nevýhody a zároveň má své hranice citlivosti. Jedinou metodou, která dokáže určit přesné pořadí jednotlivých bází v řetězci DNA je sekvenování.

7.5 Southernův přenos

Southernův přenos je dnes již klasickou metodou používanou k detekci intragenových přeskupení, delecí nebo inzercí větších úseků genomové DNA. Intragenová přeskupení postihují řádově stovky až tisíce bází a zahrnují často celé exony zkoumaného genu. Principem Southernova přenosu je štěpení DNA restričními endonukleázami, tj. enzymy které mají schopnost štěpit dvouřetězcovou DNA v přesně definovaných místech. Vzniklé fragmenty DNA jsou rozděleny gelovou elektroforézou, přeneseny na membránu, denaturovány a hybridizovány se značenou sondou. Sonda je většinou jednořetězcová cDNA nebo oligonukleotid představující krátký úsek zkoumané DNA. Spektrum fragmentů na membráně, které jsou viditelné pouze po hybridizaci se specifickou značenou sondou, odpovídá jednotlivým úsekům zkoumaného genu. Změny v pozici nebo intenzitě fragmentů pak představují oblasti genu s intragenovým přeskupením.

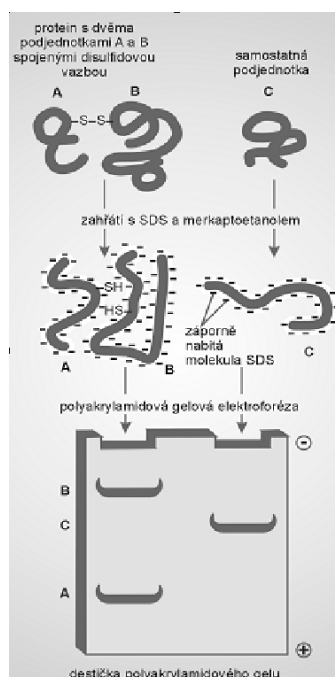
7.6 Northernový přenos

Northernový přenos je metodou určenou k detekci specifické mRNA. Je založen na hybridizaci RNA se specifickými značenými sondami. Zahrnuje elektroforetickou separaci molekul RNA purifikovaných z buněk, jejich imobilizaci na membráně a hybridizaci se specifickou sondou. Umožňuje detekovat přítomnost specifické mRNA a odhadnout její velikost. Při provedení pečlivé kalibrace, např. na základě srovnání se silou hybridizačního signálu pomocného genu o známé úrovni exprese, nebo při porovnání s fyziologickou kontrolou můžeme northernovým přenosem detekovat aberantní úroveň exprese sledovaného genu ve vyšetřovaném materiálu. Hlavní slabinou techniky northernového přenosu, která omezuje jeho použití, je poměrně nízká citlivost metody a tedy nutnost použití relativně vysokých množství RNA, a především již výše zmíněná nestabilita molekul RNA a tedy nutnost používat čerstvý nebo hluboko zmražený nefixovaný materiál.

7.7 Westernový přenos

Tradiční metodou užívanou v patologii k analýze proteinů je imunohistochemická analýza. Tato metoda má mnoho předností. Na histologickém řezu nejenom určí přítomnost hledaného proteinu, ale zároveň protein lokalizuje do specifické oblasti v buňce. Například určí, zda se protein nachází v jádře, v cytoplazmě nebo zda je třeba vázán na membránu a podobně. Dále tato metoda dokáže rozlišit, zda jsou z hlediska přítomnosti analyzovaného proteinu pozitivní všechny buňky daného typu nebo pouze jejich frakce. Proto mají další přístupy k analýze proteinů v patologii jen doplňkový charakter a používají se spíše výjimečně.

Jednou z těchto metod je rozdělení proteinů v polyakrylamidovém gelu elektrickým polem a westernový přenos. Při nejobvyklejším uspořádání elektroforézy se proteiny nanesou do jamek gelu v alkalickém pufru, který jim udělí negativní náboj. Po aplikaci elektrického pole se proteiny pohybují od anody ke katodě. Pohyblivost proteinů gelem při elektroforéze závisí na tvaru (globulární proteiny putují rychleji než vláknité), na „hustotě náboje“ (tj. poměru velikosti náboje k jednotce hmoty), na velikosti (větší molekuly se pohybují pomaleji než menší) a na koncentraci akrylamidu (se vzrůstající koncentrací akrylamidu pohyblivost molekul klesá). Interpretaci výsledků polyakrylamidové gelové elektroforézy proteinů významně usnadňuje její denaturační varianta zvaná SDS-PAGE. Při této variantě se proteiny před nanesením na polyakrylamidový gel denaturují detergentem dodecylsulfátem sodným (SDS), případné disulfidové vazby se eliminují redukčním činidlem (β -merkaptoetanolem) a denaturace se dokončí krátkým varem. Malé a negativně nabitě molekuly SDS obklopí makromolekulu proteinu a v důsledku jejich elektrostatického odpuzování dojde k jeho natažení (denuraci). Proto za přítomnosti SDS proteiny zaujímají obdobný tyčinkovitý tvar. Navíc, vzhledem k tomu, že počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti, získává každý protein za přítomnosti SDS, bez ohledu na svou velikost, ekvivalentní hustotu náboje. Proto jediným faktorem, který bude rozhodovat o pohyblivosti proteinů při SDS-PAGE, bude jejich molekulová hmotnost (obr. 19).



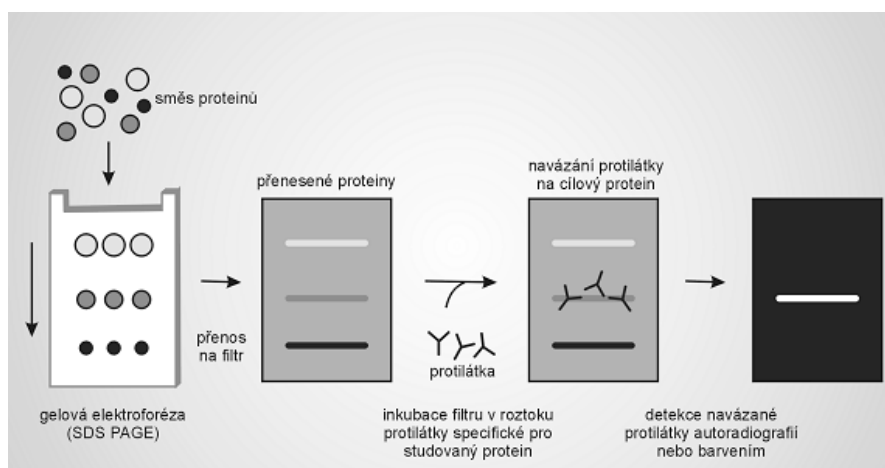
Obrázek 19: Westernový přenos — princip SDS-PAGE

Po dokončení elektroforézy lze proteiny zviditelnit nespecifickými barvivy (stříbro, coomassie brilantová modř), které obarví všechny proteiny daného vzorku, nebo specificky protilátkami. V takovém případě je nejprve třeba rozdělené proteiny přenést působením elektrického pole na nitrocelulóзовou membránu (tzv. westernový přenos). Membránu s imobilizovanými proteiny lze potom podrobit reakci s protilátkou specifickou pro studovaný protein. Protilátka asociovaná s antigenem se obvykle zviditelňuje prostřednictvím sekundární protilátky konjugované s určitým enzymem (například alkalickou fosfatázou, peroxidázou), která rozeznává a váže imunoglobulin protilátky primární. Celý komplex pak lze zviditelnit barevnou reakcí nebo emisí světla katalyzovanou enzymem sekundární protilátky (obr. 20).

Příkladem, kdy může být metoda westernového přenosu pro analýzu proteinů v patologii nezastupitelná, je diagnostika dystrofinopatií při Beckerově svalové dystrofii. V případě tohoto onemocnění se v dystrofinovém gelu nachází deleční mutace, která vede k expresi zkráceného proteinu.

7.8 Izoelektrická fokusace a dvourozměrná elektroforéza

Vedle SDS-PAGE a westernového přenosu se stále častěji používá také dvourozměrná gelová elektroforéza, která zahrnuje v jednom směru izoelektrickou fokusaci a ve druhém směru SDS-PAGE. Principem izoelektrické fokusace je aplikace elektrického pole napříč



Obrázek 20: Westernový přenos — detekce specifického proteinu

stabilním gradientem pH. Všechny proteiny jsou typické svým izoelektrickým bodem (pI), který představuje takové pH, při kterém nemají ani pozitivní ani negativní náboj. Při vyšších hodnotách pH než je pI, ponese protein negativní náboj, naopak při nižším pH než pI ponese protein pozitivní náboj. Negativně nabité proteiny se v gradientu pH budou pohybovat směrem ke kladně nabitě elektrodě (anodě) a to tak dlouho, dokud nedosáhnou takového pH, které odpovídá pI. V tomto bodě všechny náboje ztratí a jejich pohyb se zastaví. Naopak kladně nabité proteiny dokud nedosáhnou pI se budou pohybovat ke katodě. Výsledkem těchto procesů je „zaostření“ každého proteinu do specifického bodu gradientu pH. Ve druhém rozměru se proteiny rozdělují podle velikosti. Dvourozměrnou elektroforézou s vysokým rozlišením může být rozděleno až 10000 proteinových skvrn.

7.9 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která v sobě kombinuje princip fluorescenčního mikroskopu a hematologického analyzátoru, a která umožňuje komplexní studium buněčných populací. Jedinečnost této metody spočívá v tom, že poskytuje informace o jednotlivých buňkách a nikoliv o celé buněčné populaci, jak tomu je u většiny jiných metod. Princip metody spočívá ve sledování míry fluorescence jednotlivých buněk v buněčné populaci, ve které míra fluorescence odpovídá sledovanému parametru. Suspenze analyzovaných buněk se opatří fluorescenční značkou, která se specificky váže na cílovou molekulu. Touto cílovou molekulou může být některý povrchový nebo cytoplazmatický protein nebo nukleové kyseliny. K označení DNA se obvykle používá fluorescenční barvivo propidium jodid (v permeabilizovaných buňkách) nebo Hoechst 33342 (v nepermeabilizovaných, tj. živých buňkách) a pro rozmanité proteinové antigeny protilátka konjugovaná s fluorescenční značkou. Často používanými fluorochromy jsou fluorescein isothiocyanát (FITC), R-phycoerythrin (PE) a další. Označené buňky potom jednotlivě procházejí

vlastním měřicím zařízením, ve kterém se ozáří laserovým paprskem. Excitovaná fluorescenční značka emituje záření, které se pro každou buňku zvlášť zachycuje detekčním zařízením a ukládá v paměti počítače. Průtokovou cytometrií může být vyhodnocen například stupeň ploidity buněk a určena jejich proliferující frakce (je-li cílovou označenou molekulou DNA). Nebo může být tato metoda použita k určení buněčných typů a míry jejich diferenciaci, jsou-li označeny příslušnými markery. Praktické uplatnění průtoková cytometrie nachází hlavně v diagnostice maligních lymfomů a leukemií.

Kromě těchto základních funkcí může průtoková cytometrie sloužit také k frakcionaci buněk podle určitých vlastností (např. podle stupně exprese sledovaného markeru) za předpokladu, že je cytometr opatřen frakcionačním zařízením (FACS — fluorescence-activated cell sorter). U cytometrů s frakcionačním zařízením je každé buňce udělen elektrický náboj, jehož velikost odpovídá míře emitované fluorescence. Při průchodu elektrickým polem mezi dvěma deskovými elektrodami se modifikuje dráha procházejících buněk podle velikosti náboje tak, že je možné jejich zachycení do oddělených zkumavek. V této souvislosti je třeba poznamenat, že jednou z výhod průtokové cytometrie je fakt, že buňky nejsou vlastním měřením nijak poškozeny ani kontaminovány a lze je použít pro další kultivaci.

7.10 Testování rezistence nádorů k cytostatikům in vitro

Základem současné diagnostiky nádorů je TNM klasifikace, která odráží rozsah a stupeň diferenciaci nádorového onemocnění, napomáhá stratifikaci pacientů a stanovuje léčebný postup. Avšak pozitivní odpověď i na statisticky nejefektivnější léčbu vykazuje pouze část nemocných. Důvodem je fakt, že v rámci určitého histologického typu nádoru se vyskytuje mnoho biologicky odlišných podtypů, které se liší spektrem somatických genetických změn, tedy genotypem, a také svým fenotypem, tedy mimo jiné i svou citlivostí na terapii. Pro zvýšení účinnosti chemoterapie zhoubných nádorů a snížení jejich nežádoucích účinků je třeba léčbu individualizovat. Jedním z možných přístupů, jak vybrat co nejúčinnější léčbu pro individuálního nemocného, je testovat podrobněji genotyp jeho nádorových buněk. Některé postupy detekce somatických mutací vyskytujících se v nádorech jsou uvedeny výše.

Odlišnou cestou k individualizaci léčby — jakoby z opačného konce, je testování citlivosti/rezistence nádorových explantátů k cytostatikům v podmínkách in vitro. Smyslem testování rezistence nádorů k cytostatikům in vitro je eliminace takových preparátů, které jsou pro daného pacienta neúčinné. Při tomto postupu je z čerstvě odebrané nádorové tkáně připravena suspenze buněk a rozdělena na malé alikvoty. Ty jsou následně inkubovány s testovanými cytostatiky. Po inkubaci je v jednotlivých alikvotách vyhodnocena míra proliferace a viability buněk. K tomuto účelu lze využít tzv. MTT test. Jeho podstatou je měření celkové aktivity mitochondriálních dehydrogenáz, která koreluje s počtem metabolicky aktivních buněk v kultuře. Ke kultuře se přidá některý typ tetrazoliových solí (např. MTT, WST-1), které jsou dehydrogenázami štěpeny na barevný formazan, jehož množství lze vyhodnotit spektrofotometricky. Koncentrace formazanu bude nepřímo

úměrná účinnosti cytostatika.

7.10.1 Získávání a zpracování nádorové tkáně

Tkáň určená k testování musí splňovat některé požadavky:

- Musí se skutečně jednat o tkáň nádorovou, s minimální „kontaminací“ nenádorovými a stromálními buňkami.
- Musí se jednat o tkáň viabilní. Zachování co nejvyšší viability buněk musí mít na paměti každý pracovník, který se na přípravě tkáně podílí, a tento zájem musí být zohledněn v každém kroku zpracování. Počínaje chirurgem a tedy vyjmutím a prvním ošetřením tkáně (a jejím uložením v bezsérovém kultivačním médiu s antibiotiky), přes rychlou a šetrnou přepravu tkáně na oddělení patologie pro její okamžité vyšetření a rozdělení až po její rychlé zpracování v laboratoři.
- Po celou dobu zpracování musí být zohledněn další požadavek na kvalitu tkáně, a to její sterilita. V případě kontaminace tkáně by totiž mohlo dojít k tomu, že v závěrečné fázi testu by se měřila aktivita dehydrogenáz jiného původu než odvozených z buněk studovaného vzorku.

7.10.2 Separace buněk a jejich inkubace s cytostatiky

Vlastní provedení testu začíná homogenizací tkáně. Tkáň je rozdrčena na sterilním kovovém sítku, nanесena na Lymphoprep a centrifugací jsou separovány homogenizované buňky od erytrocytů, nebuněčného materiálu a nezhomogenizovaných částí tkáně. Buňky jsou odebrány, opakovaně promyty a přeneseny do média.

Připravené homogenizované buňky v kultivačním médiu jsou naředěny na koncentraci 106 buněk na 1ml a alikvotovány do jamek 96-jamkové ELISA-destičky. Ve dvou řadách je na destičce ponecháno médium bez buněk. Toto médium slouží jednak jako kontrola sterility, ale hlavně při závěrečném měření absorbance poskytuje referenční hodnotu (blank). V dalších dvou řadách je médium s buňkami, ke kterým se nepřidává žádné cytostatikum. Toto slouží jako kontrola viability buněk a je takto získána referenční hodnota, ke které se potom vztahují hodnoty rezistence. A konečně dále následují řady, do kterých se k buňkám přidávají cytostatika. Spektrum cytostatik a jejich přesné koncentrace jsou voleny v panelech podle typu nádoru, případně individuálně podle historie léčby nebo podle konkrétního požadavku klinika. Takto připravené buňky jsou kultivovány 72 hodin v inkubátoru ve 37°C v 5% CO₂.

7.10.3 Test MTT

Pro měření buněčné proliferace a viability bylo vyvinuto několik typů tetrazoliových solí, např. MTT, XTT, MTS a WST-1. Všechny tyto soli jsou buněčnými dehydrogenázami

štěpeny na formazany, a proto jsou pro stanovení stejně využitelné. Nicméně se liší některými svými vlastnostmi jako např. stabilitou a dále rozpustností svých produktů. Vlastní test se provádí tak, že se substrát (WST-1) přidává k inkubovaným buňkám a ty jsou inkubovány dalších 5 hodin. Následuje měření absorbance na přístroji ELISA reader při vlnové délce 420 až 480 nm (s maximem kolem 440 nm), kdy jako referenční je použita hodnota absorbance naměřená v kultivačním médiu bez buněk. Výsledky měření absorbance jsou potom statisticky zpracovány, a to pomocí softwaru „Chemorezist“.

7.11 Příklady využití metod molekulární biologie v patologii

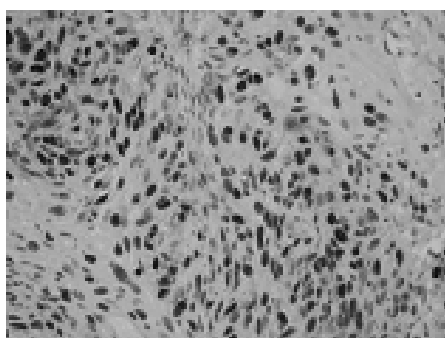
I ze stručného výčtu molekulárně biologických a cytogenetických metod, který jsme uvedli, je zřejmé, že možnosti dnešní molekulární patologie jsou široké a dále se rozšiřují. Na dvou příkladech nyní ukážeme, jak lze různé metody při studiu aberací jediného genu a/nebo jeho produktu vybírat nebo kombinovat tak, abychom získali co nejúplnější informaci o povaze aberace. Ukážeme, jak typ aberace, který stanovujeme, ovlivňuje výběr vhodné metody. Dále ukážeme, jak je pro správnou interpretaci získaných výsledků analýzy konkrétního genu či proteinu nezbytné znát jeho fyziologickou míru exprese, jeho funkci a jejich způsob regulace.

7.11.1 Stanovení HER2/neu

HER-2/neu (označovaný také jako *erbB2*) je protoonkogen, který se nachází na chromozomu 17q a kóduje transmembránový protein p18^{5HER-2}. Tento protein funguje jako protein kinázový receptor, který je součástí mitogenní signální dráhy stimulující buněčné dělení. Nefyziologicky vysokou expresi tohoto proteinu je možné detekovat na povrchu mnoha nádorových buněk, mezi nimi také asi u 10 až 30 % karcinomů prsu. Častou příčinou vysoké exprese proteinu p18^{5HER-2} je amplifikace genu HER-2/neu. Proti proteinu p18^{5HER-2} byla zkonstruována humanizovaná monoklonální protilátka (Herceptin), která může být použita jako vysoce účinné terapeutikum. Při rozvaze, které pacientky by mohly být léčeny touto strategií, je vyšetření stavu proteinu a genu HER2 nezbytným krokem.

7.11.2 Analýza nádorového supresoru p53

Aberace nádorového supresoru p53 patří k nejčastějším změnám, které lze detegovat v nádorových buňkách. Funkční protein p53 hraje významnou roli při udržování stability genomu. Jako odpověď na některé buněčné stresy (včetně poškozené DNA) může vyvolat blok buněčného cyklu ve fázi G1 a indukovat expresi opravných mechanismů. Při rozsáhlejších poškozeních indukuje p53 apoptózu. Všechny tyto funkce vykonává společným mechanismem, a to aktivací exprese svých cílových genů. Funguje tedy jako klasický transkripční faktor, který má specifickou DNA vazebnou doménu a transaktivační doménu. Mezi cílové geny p53 patří například genu *bax*, p21^{WAF1/cip1} a mnoho dalších a také gen *mdm2*. Produkt tohoto genu, protein MDM2, funguje jako negativní regulátor funkce p53



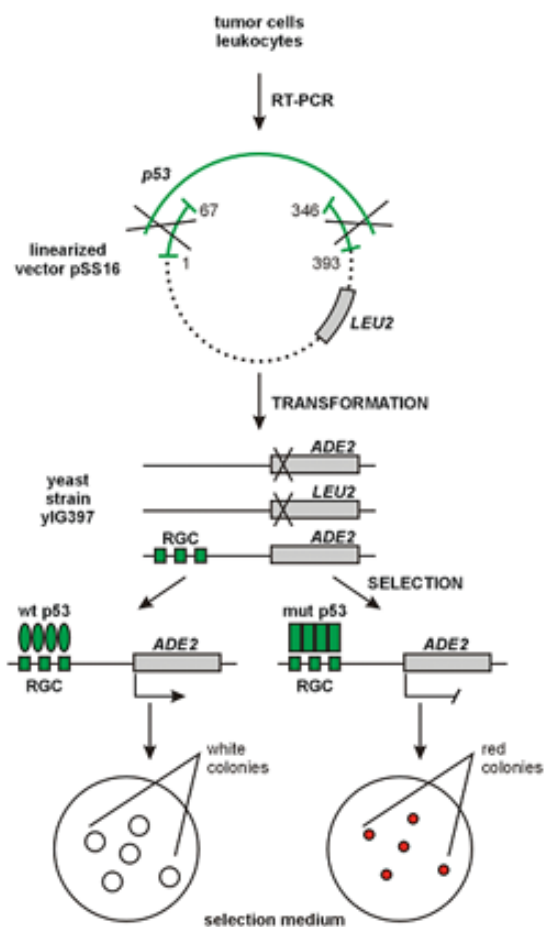
Obrázek 21: Analýza nádorového supresoru p53 — imunohistochemická detekce akumulace proteinu p53 v buňkách.

a významně se podílí na degradaci proteinu p53. Bylo vyvinuto několik metod, které lze využít pro analýzu aberací p53. Každá z těchto metod má své výhody i své nevýhody.

Technicky je nejdostupnější *imunohistochemická analýza proteinu p53* (obr. 21). Ta je založena na pozorování, že mutace genu p53 často vedou k akumulaci proteinu p53 v buňkách. Nefunkční protein p53 nemůže totiž aktivovat transkripci genu *mdm2*. Proto se netvoří protein MDM2, který by zahájil degradaci proteinu p53 a protein p53 se hromadí v buněčných jádrech. U mnoha typů nádorů existuje velice dobrá korelace mezi mutací p53 a akumulací proteinu p53 a tedy možností jeho imunohistochemické detekce. Ne u všech nádorů je tato korelace ale dostatečná a proto je třeba zvolit jiný způsob analýza p53.

Z analýzy DNA je zvláště významné *přímé sekvenování DNA*, které umožní přesně určit mutaci. Tento postup zahrnuje izolaci genomové DNA, amplifikaci jednotlivých exonů genu p53 a jejich následné sekvenování. Metoda je to pracná a poměrně nákladná. Proto je někdy vlastnímu sekvenování DNA předřazena skrínovací metoda jako například SSCP nebo CFLP. Touto metodou je určen exon, v němž je mutace a teprve tento exon je sekvenován. Použití skrínovacích metod zrychlí a zlevní postup analýzy, ale zase se snižuje její spolehlivost.

Další skupinu metod tvoří *funkční testy*. Ty mohou přímo měřit některé biologické vlastnosti proteinu p53, jako například schopnost blokovat růst transformovaných buněk či schopnost vyvolat apoptózu po příslušném podnětu. Většina funkčních testů ale měří přímo transaktivační schopnost proteinu p53. K těmto metodám patří také poměrně náročný, ale mezinárodní komunitou vysoce hodnocený test nazývaný funkční analýza separovaných alel v kvasinkách — FASAY („*functional analysis of separated alleles in yeast*“) (obr. 22). Prvním krokem metody je RT-PCR. Z analyzovaného materiálu se připraví RNA a pomocí RT-PCR se amplifikuje centrální část genu p53. V dalším kroku je produkt PCR transformován, spolu s další DNA, do kvasinkových buněk. Ty jsou upraveny tak, že v nich po úspěšné transformaci dochází jednak k expresi testované p53 a dále k analýze její funkce. V případě funkčního proteinu p53 mají kvasinkové kolonie kul-



Obrázek 22: Analýza nádorového supresoru p53 — funkční analýza separovaných alel v kvasinkách

tivované na selekčním médiu bílou barvu, zatímco buňky exprimující nefunkční p53 mají bílou barvu. Status p53 se potom vyvozuje s poměru červených a bílých kvasinkových kolonií.

Aby výčet metodických přístupů k analýze nádorového supresoru p53 a jeho signální dráhy byl úplný, musíme zmínit ještě skutečnost, že mutace nádorového supresoru p53 jsou recesivní a proto je mutace p53 v jedné alele genu často doprovázena některou z forem ztráty heterozygotnosti. Nejběžnější formou je ztráta celého chromozomu 17 nebo lokusu 17p13, ve kterém se gen p53 nachází. Při detekci těchto aberací má nezastupitelnou úlohu *fluorescenční in situ hybridizace*.

7.11.3 Analýza některých svalových proteinů (calpain, dystrophin)

Bude dodáno.