

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2016

Michal Szöke

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Michal Szöke

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**ZPRACOVÁNÍ BIOPTICKÉHO VZORKU
ZMRAZOVACÍ TECHNIKOU**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Robert Slunečko

PLZEŇ 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 30. března 2016

.....
vlastnoruční podpis

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat MUDr. Robertu Slunečkovi za odborné vedení práce, poskytování rad a potřebných podkladů. Dále děkuji všem laborantům a lékařům ze Šiklova ústavu patologie za vstřícnost a ochotu při odborné praxi a praktických cvičeních z histologické techniky, především paní Gabriele Suché za vysvětlení problematiky histopatologické laboratoře.

ANOTACE

Příjmení a jméno: Szöke Michal

Katedra: teoretických oborů

Název práce: Zpracování bioptického vzorku zmrazovací technikou

Vedoucí práce: MUDr. Robert Slunečko

Počet stran (číslované): 51

Počet stran (nečíslované): 8

Počet příloh: 1

Počet titulů použité literatury: 35

Klíčová slova: histologie, histologická technika, biopsie, zmrazovací technika, kryostat, tkáň, histologické barvení, mikrotom, peroperační vyšetření

Souhrn:

Tato bakalářská práce posuzuje limity peroperačního vyšetření a porovnává jejich výhody a nevýhody oproti zpracování tkáně z parafínového bločku v souvislosti s vyšetřovanou tkání a diagnózou. V rámci šetření se objevila 4% neshoda výsledků z biopsie zpracované zmrazovací technikou, která byla následně podrobně rozebrána. Práce popisuje základní histologickou problematiku, fyziologickou a následně patologickou stránku věci. Důraz je kladen také na laboratorní postupy zpracování tkání v histopatologické laboratoři.

ANNOTATION

Surname and name: Szöke Michal

Department: Department of theoretical fields

Title of thesis: Frozen section biopsy – material, methods and interpretation

Consultant: MUDr. Robert Slunečko

Number of pages (numbered): 51

Number of pages (unnumbered): 8

Number of appendices: 1

Number of literature items used: 35

Key words: histology, histological technics, biopsy, frozen section, cryostat, tissues, histology staining, microtome, intra-operative frozen section

Summary:

This Bachelor thesis reviews the limits of intra-operative examination and compares their advantages and disadvantages with processing of paraffin embedded tissue with regard to examined tissue and diagnosis. During the examination, a discrepancy of 4% of frozen section biopsy results was revealed and consequently thoroughly analyzed. The thesis describes the fundamental questions of histology, followed by physiological and subsequently pathological point of view. Laboratory procedures of tissue processing in histopathological laboratories are also emphasized.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. HISTOLOGIE	10
2.1 Buňka	10
2.2 Odběr vzorků.....	11
2.3 Optický mikroskop	11
3. TKÁNĚ	13
3.1 Tkáň epitelová.....	13
3.2 Tkáň pojivová.....	14
3.3 Tkáň nervová.....	15
3.4 Tkáň svalová	16
3.5 Krev.....	17
4. PATOLOGICKÉ NÁLEZY	18
4.1 Mikroskopické změny.....	18
4.2 Pseudotumory.....	18
4.3 Nádory.....	18
4.3.1 Rozdělení nádorů.....	19
4.3.2 Metastáza.....	20
4.4 Genetické vlivy, porucha buněčného cyklu	20
4.5 Protoonkogeny, onkogeny, tumor supresorové geny	21
4.6 Mutagenní vlivy	22
4.6.1 Chemické vlivy	22
4.6.2 Fyzikální vlivy.....	22
4.6.3 Viry	22
4.6.4 Hormony	23
4.6.5 Dědičnost, životní styl.....	23
5. HISTORIE ZPRACOVÁNÍ ZMRAZOVACÍ TECHNIKOU	24
6. CÍL PRÁCE, HYPOTÉZY	27
7. ZPRACOVÁNÍ HISTOLOGICKÉHO VZORKU - ZALITÍ DO PARAFÍNU.....	28
7.1 Odběr, fixace.....	28
7.2 Zpracování tkání.....	28
7.3 Mikrotom, krájení parafínových řezů.....	29
7.4 Barvení parafínových řezů	29
7.5 Hematoxylin-eosin	30
8. ZPRACOVÁNÍ HISTOLOGICKÉHO VZORKU PRO PEROPERAČNÍ VYŠETŘENÍ	32
8.1 Transport a příprava vzorku	32
8.2 Kryostat	32

8.3 Krájení.....	33
8.4 Barvení preparátů z peroperační biopsie.....	34
8.5 Komplikace při krájení na kryostatu.....	34
8.6 Zmrazovací technika - výhody.....	35
8.7 Zmrazovací technika - nevýhody, omezení.....	35
8.8 Další využití zmrazovací techniky.....	36
9. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ DAT.....	37
9.1 Souhrn peroperačních biopsií (ŠÚP Lochotín, 2013 - 2015).....	37
9.2 Vybrané biopsie (ŠÚP Lochotín, 2013 - 2015).....	41
10. DISKUZE.....	46
ZÁVĚR.....	48
POUŽITÁ LITERATURA.....	49
SEZNAM ZKRATEK.....	51
SEZNAM TABULEK.....	52
SEZNAM GRAFŮ.....	53
SEZNAM OBRÁZKŮ.....	54
SEZNAM PŘÍLOH.....	55
PŘÍLOHY.....	56

1. ÚVOD

Tato bakalářská práce nese název „Zpracování bioptického vzorku zmrazovací technikou“. Tím se rozumí všechny histologické techniky, kdy se ke krájení vzorků používá kryostatů. K samotnému zmrazení se používá dusík, suchý led, stlačený plyn ve spreji nebo chlazená plocha přímo v kryostatu. Tyto techniky umožňují výrazné zrychlení celého procesu, díky čemuž je možné je využít především jako peroperační vyšetření, kdy hraje čas významnou roli. Pacient může být ušetřen jedné operace (standardně má první operace diagnostický význam, druhá význam kurativní), což s sebou přináší hned několik výhod. Zákrok na operačním stole s sebou nese rizika vniknutí infekce do organismu, vzniku trombu, vykrvácení a v neposlední řadě nutnost použití narkotik k navození umělého spánku. Zmrazovací technika je tudíž velmi výhodná, jelikož tato rizika minimalizuje z důvodu ušetření jedné operace. Je potřeba pouze operační zákrok pozdržet na 15 - 30 minut, než dojde k transportu, zmrazení, nakrájení, zfixování, obarvení, montování preparátu a odečtení biopsie. Výsledek je konzultován telefonicky mezi odečítajícím lékařem a operujícím chirurgem.

Samozřejmě s sebou tato technika přináší i jisté nevýhody. Mezi nejvýznamnější z nich patří riziko nedokonalé fixace nebo obarvení, díky čemuž může dojít ke zhoršení podmínek pro odečítajícího lékaře. V krajním případě až možnost zkreslení výsledku a nutnosti nakrájet a obarvit biologický materiál znovu. S něčím takovým se ale v dnešní praxi setkáváme již opravdu zřídka, protože barvicí protokoly jsou již velmi dobře odzkoušené a laboranti provádějící tuto práci jsou dobře zaškoleni a poučení. Chybou personálu však není myšleno mírné poškození a znehodnocení tkáně samotným zmrazením a nutností krájet řezy širší, než je tomu u vzorků získaných z parafinových bloků, avšak je nutno na to brát zřetel při samotném odečítání lékařem. Tato „deformace“ je u jednotlivých materiálů a patologií různě závažná. I při správném dodržení všech postupů nelze zabránit tomu, že preparát vyrobený zmrazovací technikou se výrazně liší od toho, který vznikl nakrájením parafinového bločku. Hodnotící lékař musí mít zkušenosti s odečítáním takto zpracovaných biopsií.

2. HISTOLOGIE

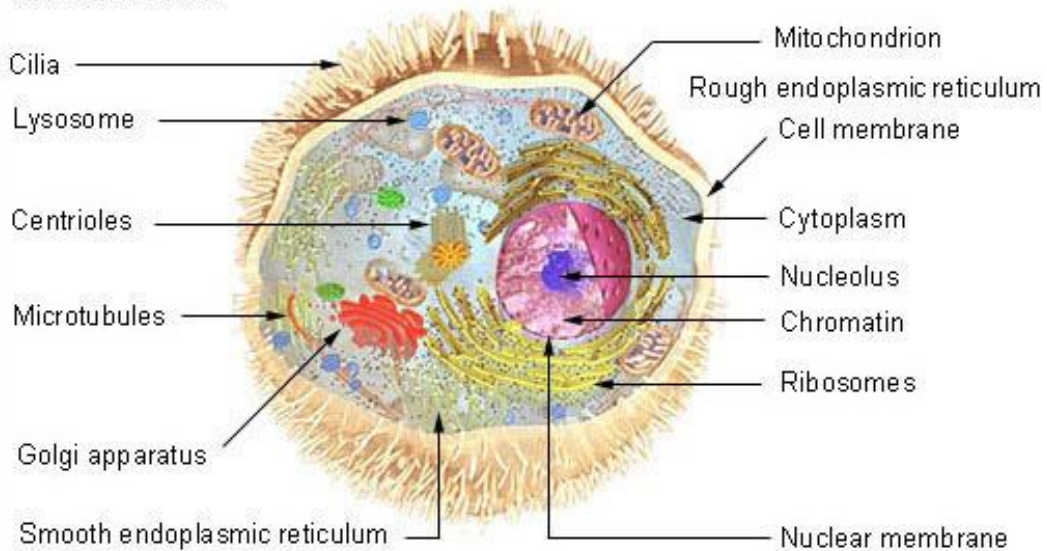
Výraz histologie pochází z řečtiny a skládá se ze 2 slov: histos (tkáň) a logos (nauka), což značí, že se jedná o nauku o tkáních. Zabývá se mikroskopickou stavbou buněk, tkání a orgánů, případně její funkcí. Studium a popis všech živých organismů je většinou prováděn mikroskopicky na tenkých řezech. Pracuje se zde v jednotkách od milimetru, přes mikrometry až po nanometry. Mezi cíle histologie patří porozumění vztahu mezi strukturou tkáně a její funkcí. (Lüllmann-Rauch, 2012)

Alfou a omegou v dnešní medicíně je odhalení a určení jednotlivých patologických jevů. Je však nutné brát v potaz fakt, že histologické metody mají jistá omezení, například nutnost pozastavení biologického děje za účelem zpracování a pozorování. Následující stránky se věnují pouze histologii člověka. Proto je zde důležitá znalost eukaryotní buňky, jednotlivých tkání a orgánových soustav homo sapiens sapiens. (Vacek, 1995)

2.1 Buňka

Základním stavebním kamenem živé hmoty je buňka. Slovo cellula poprvé použil Robert Hooke (1635-1703) ve své knize Micrographia. Navázal na něj německý zoolog Theodor Schwann (1810-1882), ten zformuloval buněčnou teorii, která obsahuje základní dogma říkající již výše zmíněné, že všechny organismy mají buněčný základ. Dalším významným vědcem zabývajícím se touto problematikou byl Rudolf Virchow (1821-1902), který řekl: „Každá buňka pochází z buňky“ (lat. „Omnis cellula e cellula“). A právě o tyto znalosti se opírá dnešní histologie. Studium buněk, rozlišení fyziologického od patologického. Dále také rozeznání různých artefaktů a nečistot od zkoumané struktury. V neposlední řadě schopnost správně určit diagnózu a tudíž správný klinický postup při léčbě pacienta. Při studiu buňky se na ni přihlíží jako celek (velikost, tvar), ale i neméně důležité je hodnocení cytoplazmy a jednotlivých organel, které se v ní nachází. Předmětem zkoumání je zde také vztah mezi buňkami a tkáněmi, mezi buňkami a tkáněmi. Samostatná věda zabývající se studiem buněk se nazývá cytologie. (Kočárek, 2006; Lüllmann-Rauch, 2012)

Cell Structure



Obrázek 1 Buňka

Zdroj: training.seer.cancer.gov/images/anatomy/cells_tissues_membranes/cell_structure.jpg

2.2 Odběr vzorků

Tkáně lze rozdělit na biopsie a nekropsie. První jmenovaná je odebrána z těla živého člověka, nekropsie pochází z pitevny (z mrtvého organismu). Laboratoř tuto skutečnost nerozlišuje a oba tyto typy zpracovává podle stejných postupů. V případě velkého množství vzorků má přednost lidský život, biopsie je tedy vyšetřována primárně. (Lüllman-Rauch, 2012)

Technika odběru vzorků se dělí na resekci, excizi, punkci, kyretáž, exfoliativní cytologii, aspiraci a excizi pomocí endoskopu. Nejběžnější je excize, což je odebrání části tkáně pomocí skalpelu - velmi ostrým nožem. Skalpel je jednobřítý nůž s čepelí, která je krátká a ostrá. Vyráběn je z nerezové, tzv. chirurgické oceli. Resekcí se míní odnětí celého orgánu. Získání materiálu pomocí punkce se používá při odebírání materiálu kostní dřeně, ledvin, jater. Nabodnutím se získá váleček dané tkáně. Pacient není v tomto případě uveden do umělého spánku. Ta není nutná ani při kyretáži, kdy se pomocí drátěné kličky (kyrety) seškrábne vzorek. (Vacek, 1995; Jirkovská, 2006)

2.3 Optický mikroskop

Histologické preparáty nelze sledovat pouhým okem, tím lze pouze někdy podle specifických znaků rozlišit, o jakou tkáň se s největší pravděpodobností jedná. Pro studium buněk a tkání je potřeba využít optický mikroskop. Za jeho vynálezce je považován Zacharias Janssen, který jej sestrojil v roce 1590 v Nizozemsku. Mikroskop se skládá z

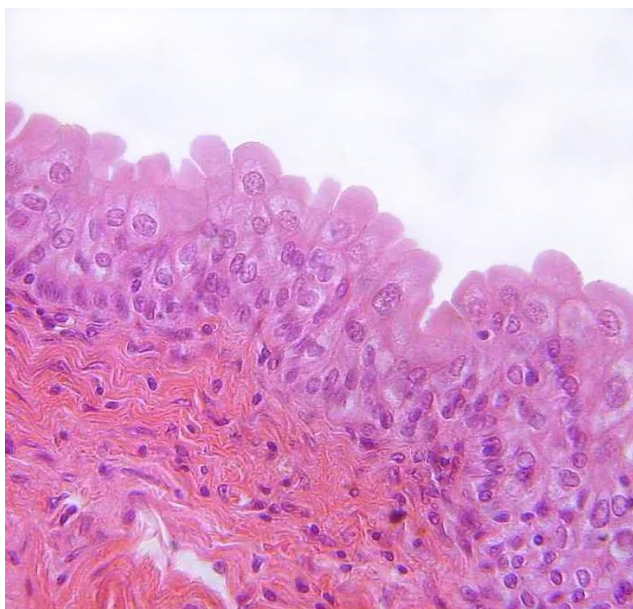
optické soustavy, osvětlovací soustavy a mechanického zařízení. První jmenovanou lze dále rozdělit na objektiv a okulár. Objektiv lze popsat jako soustavu čoček, která je umístěna těsně nad pozorovaným předmětem. Díky němu lze dosáhnout zvětšení až 100x. Obraz je nejen zvětšený, ale u starších mikroskopů i převrácený. Okulár je soustava čoček fungující jako lupa, nejčastěji poskytující desetinásobné zvětšení (na dnešním trhu jsou k dispozici i okuláry se zvětšením 20x). Celkové zvětšení mikroskopu se počítá jako součin zvětšení objektivu a okuláru. Při jeho hodnotě 1000x a více je z důvodu lomu světla nutná aplikace imerzního oleje na sklíčko. (Vacek, 1995; Beneš a kol., 2015)

3. TKÁNĚ

Tkáně se skládají z buněk a z mimobuněčné hmoty (tzv. extracelulární matrix). Buňky jednotlivých typů tkání se při svém vývoji specializují. Díky tomu mohou vykonávat různé funkce. Vzhled a funkce zde spolu vždy velmi úzce souvisí. Z tkání se vytvářejí orgány a celé orgánové soustavy, které se skládají v jeden celek - organismus. Lidské tělo se skládá ze 4 základních typů tkání. Jsou jimi tkáň epitelová, pojivová, nervová a svalová. Samostatnou (pátou) kapitolou je krev, která má svá zvláštní specifika a někteří autoři ji ani nezařazují mezi tkáně. (Konrádová, 2005; Vacek, 1995)

3.1 Tkáň epitelová

Buňky jsou uspořádány těsně vedle sebe, vyskytuje se zde pouze minimální množství extracelulární matrix. Na povrchu buněk jsou vyvinuty specializované struktury (např. mikroklyky, stereocilie, řasinky a bičíky). Je zde vysoká mezibuněčná soudržnost díky mezibuněčným spojům. Tkáň se vyznačuje bohatou inervací a bezcévnatostí. Bazální membrána ji odděluje od pojivové tkáně. Epitel je neustále obměňován, je zde vysoký podíl regenerace. Všechny epitelové buňky mají polarizovanou strukturu, avšak funkčně i tvarově se od sebe povrchy jednotlivých buněk liší. Tato tkáň se dále rozlišuje na epitel krycí, žlázo- vý, resorpční, respirační, svalový a smyslový. Krycí epitel se rozděluje podle tvaru buněk (dlaždicový, krychlový, válcový) a počtu vrstev (jednovrstevný, víceřadý). Žlázo- vý epitel má dělení na žlázy se zevní sekrecí (serózní, mucinózní, seromucinózní) a vnitřní sekrecí (jednobuněčné, mnohobuněčné). Epitel resorpční má funkci, která již vychází ze samotného názvu - resorpce (vstřebávání). Respirační epitel je výstelkou alveolů (plicních sklípků) a skládá se z jedné vrstvy plochých buněk, které lze rozlišit jen v elektronovém mikroskopu. Funkcí je výměna O₂ a CO₂. Svalový epitel se skládá z buněk, které obsahují aktinová a myozinová mikrofilamenta - ta způsobují smršťování (kontrakci). Vyskytuje se například v duhovce člověka, kde při jeho smrštění rozšiřuje zornice. Pro smyslový epitel je typická dráždivost a vzrušivost, díky nimž dochází k zachycování vnějších podnětů. (Konrádová, 2005; Vacek, 1995; Junqueira, 1997)



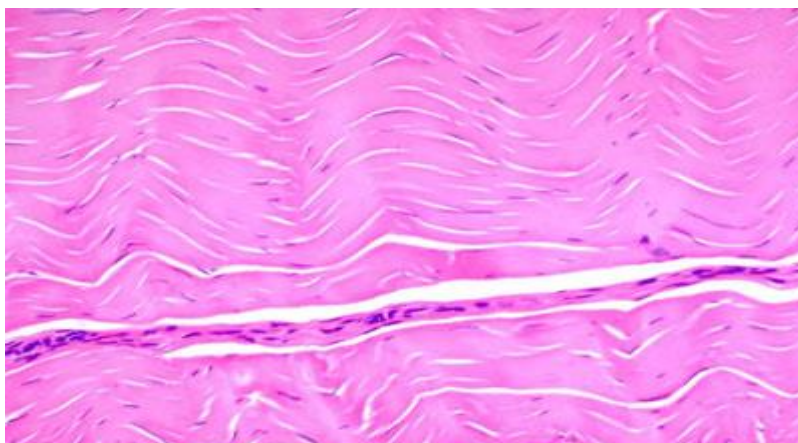
Obrázek 2 Tkáň epitelová

Zdroj:

upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Harnblase_Urothel.png

3.2 Tkáň pojivová

V pojivové tkáni převažuje extracelulární matrix, ve které jsou uloženy buňky. Mezibuněčná hmota se skládá ze 2 složek - amorfní a vláknité. Základní rozdělení tkáně pojivové je na vazivo, chrupavku a kost. Největší rozdíl mezi nimi se nachází v mezibuněčné hmotě. Význam této tkáně tkví v podpůrné funkci. Rozdělujeme zde 2 typy buněk - fixní a volné (popisovány také jako bloudivé). Fixní buňky produkují extracelulární matrix a vyskytují se v ní neustále, po celou dobu svého života. Jako příklady fixních buněk lze uvést histiocyty, chondrocyty, chondroblasty, fibrocyty a fibroblasty. Bloudivé buňky se vyskytují pouze po určitou část jejich života. Patří mezi ně žírné buňky, makrofágy, plasmatické buňky a krevní elementy. Extracelulární matrix se také dělí - amorfní složka obsahuje H_2O , kationty,



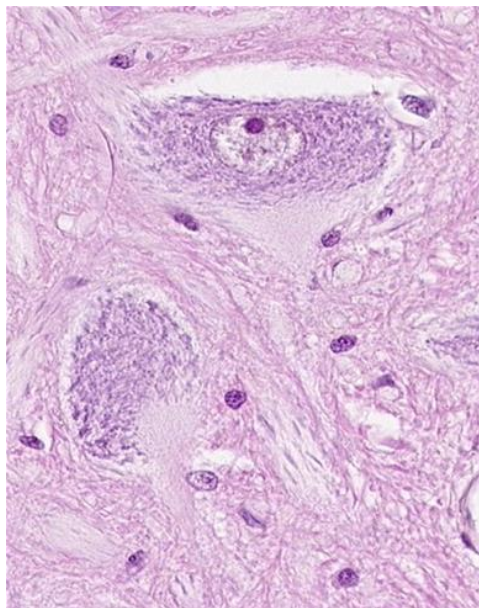
Obrázek 3 Tkáň pojivá

Zdroj: medcell.med.yale.edu/histology/connective_tissue_lab/images/quiz2.jpg

anionty, proteoglykany, glykoproteiny a glykosaminoglykany. Vlákenná složka je složena z kolagenu a elastanu. Hlavním rozdělení pojivové tkáně je následující - vazivo, chrupavka, kostní tkáň a zubovina. Dále lze vazivo rozlišit na kolagenní, elastické, tukové a retikulární. Chrupavka má 3 podtypy - hyalinní, elastická a vazivová. Kost se dělí na houbovitou (spongiózní) a kompaktní část. Velmi podobná kostní tkáni je zubovina (dentin), která tvoří hlavní součást zubu. (Mačák, 2005; Vacek, 1995)

3.3 Tkáň nervová

V nervové tkáni se nachází 2 typy buněk - neurony (buňky nervové) a gliové buňky. Funkce je zřejmá - příjem, tvorba a vedení nervových signálů. Neuron je složen z těla a výběžků. Výběžky se rozdělují na axon (neurit, dlouhý výběžek) a dendrity (krátké výběžky). Neurony se rozdělují podle počtu výběžků na multipolární (více než 2 výběžky, nejčastěji se vyskytující v lidském těle), bipolární (2 výběžky - dendrit a neurit) a pseudounipolární (1 větvičí se výběžek). Mezi jednotlivými neurony vznikají synapse, díky kterým dochází k přenosu nervového impulsu. Buňky nervové tkáně, které se nezabývají dráždivostí, ale výživou a podporou neuronů se nazývají neuroglie. Ty se dále dělí na astrocyty, oligodendrocyty, mikroglie, ependymové, schwannovy a satelitové buňky, přičemž každá z nich má svoji specializaci. (Konrádová, 2005)



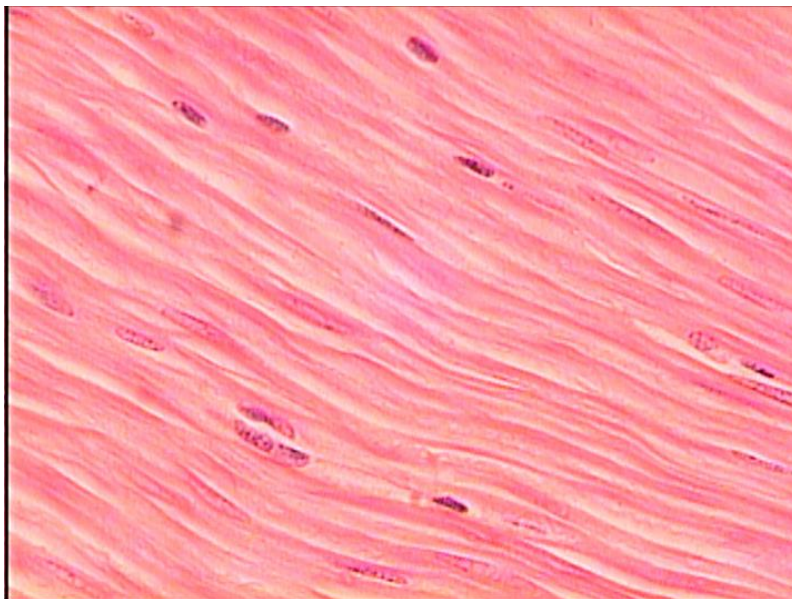
Obrázek 4 Tkáň nervová

Zdroj:

http://undergraduate.vetmed.wsu.edu/images/libraries/provider8/VPh308/wsu_1_055_6.jpg?sfvrsn=2

3.4 Tkáň svalová

Funkcí svalové tkáně je kontrakce, která zodpovídá za většinu typů pohybu lidského těla. Tkáň se dělí na 3 typy - příčně pruhovanou (kosterní), srdeční a hladkou. Každá z nich má za úkol plnit specifický úkol. Kosterní tkáň se skládá z dlouhých svalových vláken, které jsou cylindrické a zároveň mnohjaderné. Dochází zde k rychlé, řízené kontrakci. Příčně pruhovaná tkáň je podřízena volní kontrole. Srdeční svalovina se skládá z kardiomyocytů, které jsou charakterizovány jako protáhlé, rozvětvené buňky. Hladká svalová tkáň se skládá z vřetenovitých buněk, kontrakce je pomalá a nelze ji ovlivnit vůlí. Nachází se ve velké řadě vnitřních orgánů, kde tvoří stavbu jejich stěny. (Konrádová, 2005)



Obrázek 5 Tkáň svalová

Zdroj:

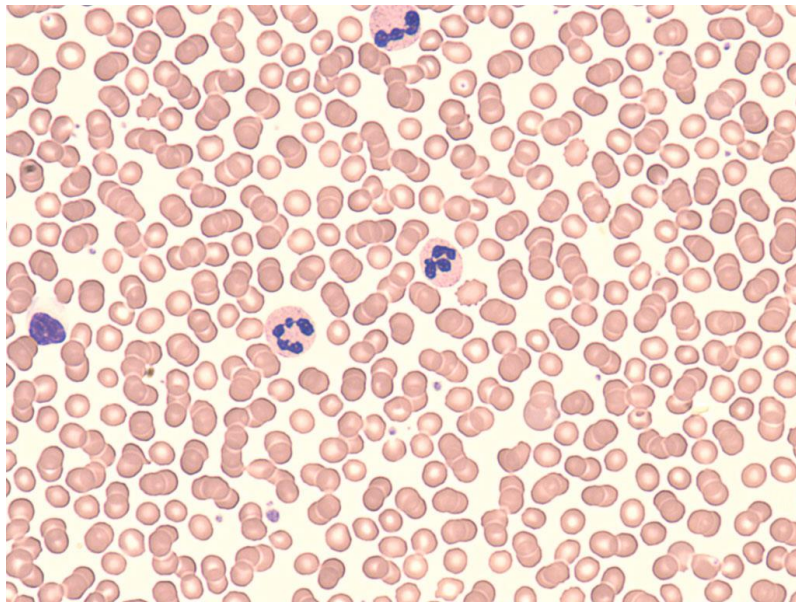
www.gwc.maricopa.edu/class/bio201/Histology/31SmoothMusc3_400X_rev.jpg

3.5 Krev

Krev je složena z tekutiny - plazmy, v níž se nacházejí erytrocyty, leukocyty a trombocyty. V dospělém lidském těle se nachází 5-6 litrů krve. Nejpočetnějšími krevními elementy jsou červené krvinky vyznačující se velikostí o průměru 7 μm a absencí jádra. Jejich funkcí je transport dýchacích plynů - O_2 a CO_2 . Jejich životnost je přibližně 120 dní. (Kittnar, 2011)

Leukocyty jsou na rozdíl od erytrocytů buňkami jadernými. Rozdělují se podle tvaru jádra a typu granul v cytoplasmě na granulocyty a agranulocyty. Granulocyty se dále dělí podle barvitelnosti granul na neutrofil, eosinofil a bazofil. U agranulocytů se rozlišují lymfocyty a monocyty. Funkcí leukocytů je imunitní odpověď. (Mourek, 2012)

V krvi se nachází také krevní destičky, neboli trombocyty, které vznikají jako úlomky megakaryocytů. Jsou bezjaderné a jejich funkce se týká krevního srážení. V místě porušeného endotelu se dokáží shlukovat a spolu s dalšími faktory tak zastavit krvácení. (Penka, 2011)



Obrázek 6 Krev

Zdroj: www.medcell.med.yale.edu/image_gallery/home_images/blood.jpg

4. PATOLOGICKÉ NÁLEZY

Per-operační vyšetření zmrazovací technikou se využívá především k potvrzení nebo vyvrácení diagnózy, ve které se uvažuje o novotvaru. Pomocí zobrazovacích metod a klinického stavu pacienta lze mít nějaké předběžné stanovisko, jehož hodnota ještě nemusí být vypovídající. Tu lze získat až z mikroskopického preparátu, pomocí něhož se ve většině případů určí konkrétní typ patologie. (Mačák, 2012)

4.1 Mikroskopické změny

Mikroskopicky dochází k architektonickým atypiím, což je důsledek zvýšené proliferační aktivity. Velmi často je pozorován atypický obraz buněčného dělení. Buňky ztrácí normální uspořádání i svou polaritu. Mezi cytologické změny patří buněčná a jaderná pleomorfie (změna velikosti a tvaru jader i celých bb.). Objevuje se jaderná hyperchromasie, distribuce chromatinu je nepravidelná a dochází ke ztlustění jaderné membrány. Dochází ke zvýšené frekvenci výskytu mitóz a k jejich atypiím (kvadripolární “kříž”, tripolární “mercedes”). Jadérka jsou zvýrazněná. Dalším hodnoceným kritériem je poměr velikosti jádra k celému objemu buňky. (Mačák, 2012)

4.2 Pseudotumory

Patologické procesy, které svým růstem napodobují nádory, ale nemají neoplastickou povahu, se nazývají pseudotumory. Patří mezi ně hyperplasie, hypertrofie, poruchy embryonálního vývoje, cysty, ukládání patologického materiálu, zánětlivé pseudotumory a polypy. U hypertrofie dochází ke zvětšení buněk, tudíž i celých orgánů a tkání. Hyperplazie se vyznačuje celkovým pomnožením buněk. Tyto dva procesy se mnohdy kombinují společně, což znemožňuje přesné rozlišení úrovně hypertrofie a hyperplazie. Další skupinou jsou poruchy embryonálního vývoje, které se rozdělují na hamarcie a hamartomy. Cysty jsou dutiny, které vznikly chorobně a mají vlastní výstelku. Rozdělují se na několik podtypů (retenční, implantační, fetální, hormonálně podmíněné, nádorové, parazitární a pseudocysty). (Mačák, 2012)

4.3 Nádory

Nádor je místně neregulovaný růst tkáně, který má autonomní povahu, růst je tedy samostatný, bez ohledu na řídicí mechanismy organismu, ve kterém se novotvar nachází. Jedná se o shluk abnormálních buněk. Celá změna je nevratná, takže se patologická tkáň

nemůže zpětně přeměnit v tkáň fyziologickou. Celá chyba je zakódována v genomu a při dělení buňky je přenášena dále. Proces apoptózy (řízené buněčné smrti) je inaktivován. Nádorová buňka je tak vlastně nesmrtelná. (Otová, 2012; Kočárek, 2007)

Terminologie v oblasti nádorů je poměrně rozmanitá a je potřeba ji především v klinické praxi správně užívat, aby nedošlo ke špatnému operačnímu nebo léčebnému zákroku. Typy nádorů jsou rozlišovány podle tkáně, ze které nádor vzniká. Základem je kořen latinského slova a k němu se přidá přípona –om v případě benigního tumoru, -sarkom a –karcinom v případě maligních tumorů. (Mačák, 2012)

4.3.1 Rozdělení nádorů

Nejzákladnější (a pro širší veřejnost nejznámější) je rozdělení nádorů podle jejich biologické povahy na benigní, maligní a hraniční malignity (borderline tumory, intermediární nádory). Benigní nádory rostou pomalu a jsou ohraničené. Jejich růst je expanzivní a probíhá bez destrukce tkáně. Nedochozí zde ke tvorbě metastáz. Buňky jsou diferencované, zralé a podobné okolním. Naproti nim nádory maligní rostou rychle, invazivně, destruktivně a mají schopnost infiltrace. Nejsou ohraničené a fixují se k okolní tkáni. Tyto nádory recidivují a metastazují. Buňky mají různý stupeň diferenciace, dochází k četnému výskytu mitóz. Jejich celkové příznaky jsou zřetelné, protože vedou ke kachexii, anemii a paraneoplastickým syndromům. Poslední skupinou jsou nádory hraniční malignity, jejichž biologické chování je na rozhraní benignity a malignity. Jejich prognóza je pro pacienta lepší než u maligních nádorů, avšak často dochází k jejich recidivě a jsou lokálně destruktivní. Ke tvorbě metastáz zde ve většině případů nedochází. (Mačák, 2012; Taxy, 2010)

Schopnost rozlišit tyto 3 typy (benigní, maligní, border-line) je základním úkolem při hodnocení každé biopsie. Důvod je zřejmý - každý z nich se chová jinak, a tudíž i léčba je velmi odlišná. Dnes už u mnoha novotvarů fakticky neexistují přesné hranice mezi benigním a maligním, protože část z nich se nachází v tzv. šedé zóně, kde případnou malignitu ukáže až následný klinický průběh onemocnění. (Taxy, 2010)

Rozdělení na 3 výše zmíněné typy je pouze základní. Dále se nádory rozdělují na různé typy a podtypy - těch existuje v současné době několik tisíc. Všechny jsou uvedeny v klasifikaci WHO (World Health Organization - Světová zdravotnická organizace). Některé z nich mají své charakteristické znaky a jsou v mikroskopickém snadno rozeznatelné. Ve zbývajících

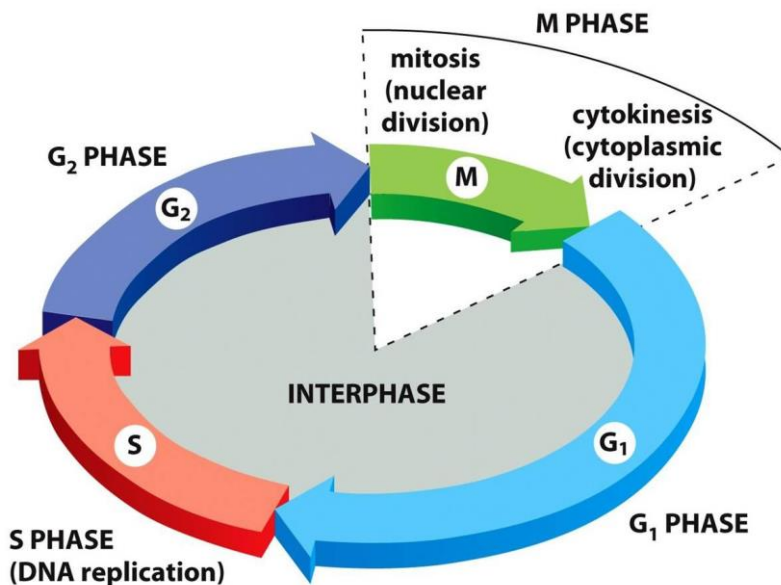
případech je nutné doplnit genetické a imunohistochemické vyšetření k získání finální diagnózy. (Krška, 2014)

4.3.2 Metastáza

Metastáza je ložisko nově vzniklých nádorových buněk, které se nachází mimo původní nádor a nemá s ním přímý kontakt. Metastazování rozdělujeme do tří fází. Nejprve dochází k uvolnění buněk z původního místa nádoru, následuje jejich transport a závěrečnou fází je nidace, neboli zahrnutí buněk nádorových na novém místě. Metastázy se rozdělují podle typu transportu na implantační, lymfogenní a hematogenní. Implantační jsou typické pro dutiny vystlané mesotelem (dutina břišní, dutina hrudní). Pro metastázy lymfogenního typu je typický průnik nádoru lymfatickými cévami do příslušných lymfatických uzlin, které postupně ničí a dále se šíří. Hematogenní metastázy jsou charakterizovány jako průnik nádorových buněk do cév, dochází k embolizaci a uchycení v tkáních, které jsou vhodné pro jejich růst. Toto je velmi typické pro hůře diferencované nádory. Zde záleží hlavně na malignitě tumoru. Nádorové buňky nacházející se v krvi mohou být v některých případech zničeny imunitním systémem nebo nemusí dojít k jejich navázání na tkáň. Důkazy lze hledat u pokusů na zvířatech, kdy při aplikaci nádorů i. v. nedošlo vždy ke vzniku metastáz. (Krška, 2014)

4.4 Genetické vlivy, porucha buněčného cyklu

Zcela zřejmá a dokázaná je skutečnost, že nádory jsou onemocnění, která jsou geneticky podmíněná. Základem je mutace v části úseku DNA, který kóduje růst a dělení buněk. Každá nádorová buňka vzniká z nenádorové. Lidský organismus má mechanismy, kterými se snaží tento děj minimalizovat. Jedná se o kontrolní body v buněčném cyklu. Ten je složen z částí G1, S, G2 a M. Nejdůležitější kontrolní bod se nazývá START a nachází se na konci G1 fáze, jeho úlohou je v případě zjištění poškození DNA zastavit buněčné dělení této buňky. Dochází ke kontrole signálů potřebných pro další vývoj. K pokračování dojde pouze v případě převahy pozitivních signálů nad negativními. Výjimku tvoří nádorové buňky, protože je v nich kontrolní funkce deregulována a buňka se tak může dále dělit a růst. (Mačák, 2012)



Obrázek 7 Buněčný cyklus

https://s3.amazonaws.com/classconnection/315/flashcards/5907315/jpg/cell_cycle-14A376FE6313ACBCB91.jpg

4.5 Protoonkogeny, onkogeny, tumor supresorové geny

Ve fyziologických buňkách se nachází protoonkogeny, které vytvářejí protein, ten omezuje růst a dělení bb. Patologická změna protoonkogenu na onkogen se vyskytne v závislosti např. kvůli mutagenním karcinogenům nebo retrovirům. Změněná bílkovina je nefunkční, dělení a růst se urychluje. K nádorové transformaci buněk může vést i zvýšená koncentrace protoonkogenů. (Mačák, 2012)

Přeměna může nastat i bodovými mutacemi, translokacemi nebo genovými amplifikacemi. Bodová mutace je změna jedné báze, která s sebou může nést funkční změnu, tj. změnu kódovaného proteinu. Změna nenastává v případě, že se nemění kódovaná bílkovina (některé proteiny jsou kódovány více kombinacemi). Rozlišujeme 4 základní báze v DNA: adenin (zkr. A), guanin (zkr. G), cytosin (zkr. C) a thymin (zkr. T). (Mačák, 2012)

Translokace může aktivovat protoonkogeny dvěma mechanismy. Prvním z nich je možnost přítomnosti genu v blízkosti jiného genu, který je tím aktivován. Nová genetická sekvence vzniká také spojením dvou genů. Typickým příkladem je vznik Philadelphského chromosomu - translokace t(9;22). Jeho výskyt je spojován s onemocněním chronické myeloidní leukémie. Amplifikace protoonkogenu může být příčinou pro zvýšení jeho aktivity a expresi. S tím souvisí i zvýšené množství příslušného proteinu a dochází ke stimulaci buněk. (Mačák, 2012; Nussbaum, 2004)

Zatímco onkogeny stimulují buněčné dělení, tak tumor supresorové geny jej potlačují. Vše musí být v rovnováze. Významnou roli zde hraje především gen p53, který je někdy nazýván jako “strážce genomu”. Mezi jeho funkce patří regulace transkripce, oprava DNA a zahájení apoptózy. Jeho inaktivace vede k nekontrolovanému buněčnému dělení. “Gen p53 je jedním z nejčastěji mutovaných genů v liniích lidských karcinomů, jeho somatické alterace nacházíme u zhruba 50% všech epitelálních zhoubných nádorů.” (Cibula, 2009, s. 57) Z tohoto důvodu se gen p53 stal oblíbeným předmětem bádání. (Lutz, 2002)

4.6 Mutagenní vlivy

4.6.1 Chemické vlivy

Mnohé otázky na téma vzniku nádorů ještě nejsou zodpovězeny, faktorů podílejících se na jejich vzniku je několik. První z nich jsou chemické látky nazývající se karcinogeny. Jako příklad lze uvést dehet a sloučeniny od něj odvozené, aromatické uhlovodíky, vinylchlorid, formaldehyd, azbest a další. Existují látky, které nelze přímo považovat za karcinogeny, ale vzhledem k dalším okolnostem přispívají ke vzniku nádorů. Nejtypičtějším příkladem je ethanol, který především v koncentrované formě poškozuje povrchové buňky krycí tkáň (epitelu). Dochází tedy k jejich obnově a zvýšená proliferace může vést k chybám v genetickém přepisu. Jedná se o tzv. mechanismus chronické iritace. Při zvýšené koncentraci těchto chyb dochází k přeměně v buňku nádorovou. (Mačák, 2012)

4.6.2 Fyzikální vlivy

Nezanedbatelné jsou i některé fyzikální vlivy, konkrétně rentgenové záření. Dochází zde ke zlomům v molekule DNA. Ionizující záření se přímo podílí na vzniku leukémií, důkazem jsou místa výbuchu atomových bomb v Nagasaki a Hirošimě v Japonsku. Tento konec 2. světové války má za následek smrt tisíců obyvatel na následky ozáření. Dalšími fyzikálními vlivy, které působí karcinogenně je plyn radon (Rn) a ultrafialové záření. Především nadbytek UV-B o vlnových délkách 290-320 nm má negativní vliv na kůži, kde způsobuje melanomy a další nádory. (Mačák, 2012)

4.6.3 Viry

Změnu genetické informace mohou způsobit i některé viry, například EBV (Epstein-Baarové virus) má vliv na vznik Burkittova lymfomu a některých T-lymfomů. Rousův vir je spouštěčem vzniku nádorů u kuru domácího. Dochází k zakódování do DNA hostitele, kterou následně řídí a transformuje zdravé buňky na nádorové. Lidé se syndromem získané

imunitní nedostatečnosti (AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrom, virus HIV) mají vysoký počet lymfomů. Zde se s největší pravděpodobností jedná o nepřímý vliv. Dalším onemocněním s nepřímým působením na vznik nádoru je virus žloutenky typu B (HBV). Chronická hepatitida vlivem zvýšené proliferace může mít za následek vznik jaterního karcinomu. Dalším virem způsobující změnu genetického kódu je například HPV (lidský papilomavirus, který způsobuje dysplazii nebo karcinom děložního čípku, anální oblasti, penisu, vulvy a dutiny ústní. (Mačák, 2012; Stanley, 2010)

4.6.4 Hormony

Poruchy hormonální rovnováhy jsou dalším možným činitelem, který se může zapojit do tvorby nádorů, konkrétně zvýšená hladina estrogenu u žen se poslední dobou stále častěji spojuje s karcinomy prsu, vaječnicků a endometria. K potvrzení toho, že hormony způsobují patologii, se používá stanovení hormonálních receptorů nádoru. V případě pozitivity předchozího vyšetření se provádí kastrace. (Raica, 2014)

4.6.5 Dědičnost, životní styl

Dědičnost je dnes aspektem, který se v laické veřejnosti velmi přeceňuje. Mnohem výraznější roli hraje životní styl. Kvalita ovzduší bydliště, konzumovaná potrava, pohybové návyky, pracovní podmínky, stres, délka a kvalita spánku (regenerace). Dědičné předpoklady jsou přeceňovány především z důvodu jejich těžké odlišitelnosti od životního stylu člověka. Nikdy nelze výše zmíněné aspekty dokonale izolovat a tudíž povést přesný, objektivní výzkum. Existují však i novotvary, které mají dokázanou genetickou souvislost. Jediná konkrétní změna DNA, která odpovídá konkrétnímu nádoru, je mutace obou alel genu RB1 způsobující zhoubný nádor sítnice – retinoblastom. V ostatních případech jsou nádorové markery společné pro určitou skupinu novotvarů (Lynchův syndrom, BRCA). (Mačák, 2012; Nussbaum, 2004)

5. HISTORIE ZPRACOVÁNÍ ZMRAZOVACÍ TECHNIKOU

Ke konci 19. století se díky vývoji mikroskopické techniky, především zlepšením rozlišovacích schopností, objevení nových přírodních i syntetických barviv, nalezení modernějších anestetik a operačních postupů naskytly nové příležitosti týkající se peroperačních vyšetření. Vše směřovalo ke snaze odlišit tkáně benigní, maligní, záněty a jiné. V případě malignity se dále neoperovalo a pacient v blízké době zemřel. To byl hlavní důvod pro chirurgy, aby se začali zajímat o per-operační vyšetření, nazvané “zmrazovací technika” (v angl. orig. “frozen section”). S těmito znalostmi se dokázali rozhodnout pro vhodný postup - paliativní nebo radikální léčbu. (Gal, 2005)

První zmínky o krájení biopsií pomocí zmrazovací techniky pochází z nemocnice Glasgow Western Infirmary z roku 1882. Tehdy sice šlo o určení diagnózy, nikoli však o peroperační zákrok. V následujících 20 letech bylo několik úspěšných i neúspěšných pokusů o využití zmrazovací techniky při per-operačním vyšetření. V roce 1891 použil lékař William Welch v John Hopkinsonově nemocnici mikrotom chlazený oxidem uhličitým k analýze prsní tkáně během operace, kterou prováděl proslulý chirurg William Halstead. Peroperační vyšetření trvalo natolik dlouho, že chirurg provedl celý zákrok bez výsledku biopsie. Kolem roku 1895 se o zmrazovací techniku zajímala odborná veřejnost v celém západním světě. V různých nemocnicích a univerzitách bylo popisováno několik metod, správných i nesprávných. (Gal, 2005)

Hlavní roli ohledně zpracování tkáně pomocí zmrazovací techniky měli bratři - lékaři William James Mayo a Charles Horace Mayo. Jejich klinika v Rochesteru v Minnesotě disponovala na přelomu 19. a 20. století tím nejmodernějším vybavením, ve velké míře byl podporován výzkum. Bratři Mayové hledali zkušeného patologa, který by všechn svůj čas věnoval diagnostické laboratoři. Na blízké Minnesotské univerzitě pracoval doktor Louis B. Wilson, který jejich nabídku na plný úvazek neodmítl. Na pozici vedoucího patologa nastoupil 1. ledna 1905. (Gal, 2005)

Doktor William Mayo jednou vyslovil všeříkající prosbu: “Přeji si, abyste vy patologové našli způsob, jak nám chirurgům říct, jestli se jedná o rakovinu, či nikoli, ještě ve chvíli, kdy pacient leží na sále.” (v angl. orig.: “I wish you pathologists would find a way to tell us

surgeons whether a growth is cancer or not while the patient is still on the table.''). (Clapesattle, 1941, s. 441-447)

Doktor Louis Wilson to viděl stejně. Vynalezení nové techniky krájení a barvení za tímto účelem. Vydal se tedy na dráhu výzkumů. Použil methylenovou modř, syntetické anilínové barvivo k obarvení různých preparátů. Zkoušel různé způsoby, jak ukrojit tkáň. Došel k závěru, že nejvýhodnější je umístění vzorku mezi 2 starší dřeně stromu, což umožnilo ruční krájení pomocí břitvy. Ke zmrazení použil venkovní teplotu -29 °C, která působila na tkáň po dobu několika minut. Řezy byly následně vloženy do methylenové modře, opláchnuty fyziologickým roztokem a montovány na podložní sklíčka pomocí směsi glukózy. Mikroskopický výsledek byl následující - červené, nachové a modré barvy (tradičně prováděné preparáty vypadaly jako směs hnědé a růžové). Výzkum pokračoval pozorováním různých tkání, porovnáváním takto připravených preparátů s těmi vytvořenými tradičními metodami. Doktor Wilson dále standardizoval a sepsal všechny jednotlivé kroky - zmrazení, krájení a barvení. Příchod Spencerova automatického zmrazovacího mikrotomu obsahující mrazení pomocí tekutého CO₂ zjednodušil proces včetně krájení. Od dubna roku 1905 byl celý postup natolik zdokonalen, že Doktor Wilson byl schopen sdělit chirurgům diagnózu do 5 minut. Vše bylo publikováno 2. prosince 1905 v časopise Journal of the American Medical Association. Ačkoli se nejednalo o první popis zpracování tkáně zmrazovací technikou, tak je doktor Wilson správně považován za zakladatele této metody. V následujících letech se stala neocenitelnou a uznávanou metodou pro chirurgy, práce patologa postupně nabývala na významu při určování finálních diagnóz. (Gal, 2005; Lechago, 2005)

První kryostat byl vyroben v Dánsku v roce 1938. Za jeho autory jsou považováni vědci Linderstrom-Lang a Morgensen. Poprvé zde bylo využito chlazení bloků suchým ledem, celý prostor byl temperován na požadovanou teplotu. (Ochei et al., 2000)

Další významná zmínka o zpracování histologických vzorků pomocí zmrazovací techniky pochází z roku 1949, kdy Američané Hazard a Stevenson, kteří vymysleli postup, při němž se nativní vzorek umístil do fixačního roztoku o desetinásobku svého objemu a následně byl zahříván na teplotu varu. Zfixovaný blok byl poté umístěn mezi dva kusy suchého ledu a nakrájen na šířku 10-15 µm. Každý řez se přemístil do kádinky s destilovanou vodou. Jednotlivé řezy se obarvily v kádince s karbol fuchsinem a toluidinovou modří. Následně došlo k oplachu v destilované vodě, byly přenášeny na podložní sklíčko a pokrývány 30%

sacharózou nebo třtinovým cukrem. Tento postup v roce 1953 mírně upravil Dockerty. (Jaafar, 2006)

Teloh H. A. vše zdokonalil v roce 1957, když nefixovaný nativní vzorek umístil přímo k mikrotomu a mrazil jej pomocí plynného oxidu uhličitého (CO₂) a krájel na řezy široké 25 µm. Barvení probíhalo pomocí vodného roztoku thioninu. Takto obarvená vydržela tkáň přibližně 48 hodin. Pro preparáty určené k trvalému obarvení se používalo barvivo hematoxylin-eosin (HE), které bylo obohaceno a několik kapek 95% alkoholu. (Jaafar, 2006)

V současnosti nejsou postupy krájení a barvení v jednotlivých laboratořích sjednocené. Důvodem jsou různé typy kryostatů, zkušenosti a zvyky na jednotlivých pracovištích. Každý patolog si sám určí, jak široký řez a jak obarvený preparát se mu dobře prohlíží v mikroskopu. (Paulsen, 2004; Daum, 2015)

6. CÍL PRÁCE, HYPOTÉZY

V rámci této bakalářské práce byly stanoveny následující hypotézy:

- Vzhledem k limitům peroperačního vyšetření není možná 100% shoda výsledků zmrazovací technikou s výsledky z parafinových řezů.
- Vzhledem k větším limitům zmrazovací techniky u některých tkání je vyšší nepřesnost výsledků peroperačních vyšetření.
- Kliničtí lékaři si ne vždy uvědomují omezení a limity týkající se peroperačního vyšetření, a tudíž je někdy prováděno zbytečně, ba dokonce kontraproduktivně.

Bakalářská práce si klade za svůj cíl posoudit možnosti a limity peroperačního vyšetření v závislosti na dodaném materiálu a diagnóze.

7. ZPRACOVÁNÍ HISTOLOGICKÉHO VZORKU - ZALITÍ DO PARAFÍNU

7.1 Odběr, fixace

Odebraná tkáň, která přijde do histologické laboratoře včetně žádanky s razítkem a podpisem lékaře se nejprve zapíše do laboratorního systému. Každý vzorek má své identifikační číslo, pod kterým jej lze kdykoliv dohledat. Materiál je již transportován ve 4% roztoku formaldehydu, který tkáň zfixuje. Díky tomuto procesu dojde k zachování struktury jednotlivých buněk a celých tkání. Rozpad, způsobený především bakteriemi a enzymy by byl v tomto případě nežádoucí. Tento proces také ochrání vzorek při dalším zpracování. Velký důraz je třeba klást na dostatečné množství 4% roztoku formaldehydu, aby byla tkáň jím byla tkáň dobře prosycena. I přes správně dodržžený postup zde mohou vznikat artefakty. (Daum, 2015; Paulsen, 2004)

7.2 Zpracování tkání

Všechny biopsie jsou prohlíženy a přikrajovány lékařem, který hned zaznamenává potřebné informace o tkáních do diktafonu. Po jeho pravé ruce sedí laborant, jehož práce je zde vkládání vzorků do předem číselně označených plastových bločků, které jsou ihned přesunuty do nádoby s výše zmíněným formaldehydem, aby se zabránilo lýze buněk. (Daum, 2015)

Dalším krokem je odvodnění, kterého dosahujeme organickým rozpouštědlem, nejčastěji ethanol. Využívá se zde postupného zvyšování koncentrace alkoholu (70%, 80%, 96%, 100%). Celý proces trvá 30 minut až několik hodin (v závislosti na velikosti a povaze tkáně). I zde je riziko znehodnocení tkáně, konkrétně k denuraci sledovaných proteinů nebo k nerovnoměrnému smrštění v závislosti na obsahu vody. Poté je vzorek přemístěn do směsi alkoholu a xylenu. Jejich poměr se postupně mění v neprospěch ethanolu. Následuje prosycení v xylen-acetonu, aceton-xylenu a acetonu. Proces od odvodnění (alkohol) až po prosycení (aceton) probíhá v přístroji - autotechnikonu. Jednotlivé časy je možné za předpokladu zvýšené teploty a tlaku zkrátit. Poté dochází k prosycení teplým parafínem. (Paulsen, 2004; Daum, 2015)

Následně je tkáň vložena do formy a může být zalita horkým parafínem. Zde je velmi důležité správné uložení vzorku a vhodné množství zalévacího média. Parafín se používá

díky své vlastnosti prostoupení tkáně včetně jejích nejmenších dutin a otvorů. Poté se vzorek vychladí a může být krájen na mikrotomu. (Paulsen, 2004)

7.3 Mikrotom, krájení parafínových řezů

Mikrotomy jsou přístroje používající se v histologické laboratoři ke krájení tenkých řezů. Rozdělujeme je na 2 základní typy - rotační a sáňkový. První jmenovaný má pohyblivý preparát a pevně uložený nůž. Sáňkový mikrotom je koncipovaný přesně obráceně, tudíž je zde nepohyblivý preparát a posouvá se nožem. Mezi základní součásti rotačních i sáňkových mikrotomů patří podstavec, nůž, část na upevnění bloku a zařízení sloužící k posunu. Podmínek pro získání kvalitního řezu z biopsie nebo nekropsie je hned několik. V první řadě je to již výše zmíněné - správný odběr biologického materiálu, dostatečná fixace, odvodnění, kvalitní zalití do parafínu. Dále je velmi důležité dostatečné vychlazení bločku s parafínem, protože měkký parafin nelze ukrojit dle požadavků. To platí i pro tupou žiletku nebo pro nečistoty na ní zůstávající. Většinou se jedná o zbytky parafínu z předchozích řezů. (Vacek, 1995; Paulsen, 2004)

Krájení musí být prováděno plynule a dostatečně rychle. V opačném případě dochází k trhání a "smršťování" parafínu. Důležité je i nastavení správné tloušťky řezů. Pro ideální zobrazení tkáně v mikroskopu se doporučuje šíře 1-2 μm . U hodnot 3 a více mikrometrů se mohou jednotlivé buňky při prohlížení v mikroskopu překrývat a dochází tak ke zhoršenému odečítání. V krajním případě k nutnosti opakování provedení celého nového preparátu. Řez je přenesen na studenou vodu, kde je pomocí preparačních jehel vyrovnán a následně na vodu teplou, kde je "položen" na podložní sklíčko. Preparát je nutné ještě usušit, než dojde k jeho obarvení. K procesu krájení na mikrotomu a natahování na skla je zapotřebí dvou laborantů, aby došlo k urychlení práce a především, aby nedocházelo k měknutí parafínového bločku. (Vacek, 1995; Paulsen, 2004)

7.4 Barvení parafínových řezů

Aby bylo možné jednotlivé buněčné struktury pozorovat, je nutné tkáň před pozorováním ještě obarvit. Barviva jsou látky, které absorbují světlo jistých vlnových délek. V optické mikroskopii se používají od 2. poloviny 19. století. Tehdy se jednalo především o barviva přírodní, tzn., že se získávaly z přírodních zdrojů (např. karmín, indigo, šafrán). Vzhledem k vývoji (především na poli chemie) se od nich postupně upustilo v prospěch syntetických barviv, které mají velkou výhodu ve své stálosti a neměnnosti. Dalším důvodem byl značný

vzrůst vyšetřovaných vzorků a tudíž nutnost standardizace a zjednodušení práce. V neposlední řadě zde velkou roli hrála cena. (Paulsen, 2004)

7.5 Hematoxylin-eosin

V současnosti se nejčastěji používá barvení hematoxylin-eosin (dále také jako HE). Hematoxylin má bazický základ a barví jádra modrofialově. Získává se (jako dnes jeden z mála) přírodní cestou ze dřeva stromu Hematoxylon campechianum. Takto vyizolovaná látka nemá sama o sobě barvicí vlastnosti. Ty se získají až oxidací, při které vznikne hematein, který je nutno smíchat s mořidlem (soli Al, Fe, W), díky čemuž vznikne potřebný barvicí komplex. Eosin má vlastnosti acidofilní a barví cytoplazmu růžově, svaly a vazivo červeně. Kombinace hematoxylinu s eosinem je velmi výhodná pro výrazný kontrast, který usnadňuje prohlížení. Z takového preparátu lze vypožorovat všeobecné informace o stavu tkáně. V případě, že se jedná o nedostačující k hodnocení, je potřeba využít selektivního barvení. (Paulsen, 2004)

Preparáty určené k barvení HE se skládají do stojánku, který se vloží do barvicího automatu. Rameno se stojánkem se poté řídí podle předem navoleného programu. K dispozici je i spuštění jednotlivých částí. (Daum, 2015)

V prvním kroku dojde k odparafinování díky postupnému působení xylenu, 100% a 96% alkoholu. Poté je na řadě oplach v destilované vodě a samotné barvení, které začíná kádinkou s Hematoxylinem, kde jsou preparáty po dobu 5 minut. Poté následuje velmi krátké diferencování v kyselém alkoholu a praní ve vodě. Další částí je barvení v roztoku eosinu a diferencování v 80% alkoholu. Na závěr dochází k odvodnění vzestupnou řadou alkoholů zakončenou projasněním v roztocích acetyleny, acetyl-xylenu, xylen- acetyleny a xylenu. Zde končí práce barvicího automatu. K získání trvalého preparátu je potřebné montování, které může být prováděno ručně nebo pomocí montovacího automatu, který přilepí krycí skličko zcela samostatně a v případě většího množství vzorků rychleji než laborant. (Daum, 2015)

Samotné barvení HE je přehledně zobrazeno v následující tabulce.

Chemikálie	Výsledek	Čas
Gillův hematoxylin	Obarvení jader	5 min.
Diferenciační roztok	Diferenciace struktur	oplach
Voda	Odmytí přebytečné barvy	vyprání v tekoucí vodě
Eosin	Obarvení cytoplasmy	1 - 2 min.
Voda	Odmytí přebytečné barvy	vyprání v tekoucí vodě
70, 80, 96, 100% alk.	Odvodnění	5-10 sek. oplach
Ac., ac.-xyl., xyl.-ac., xyl.	Prosycení	5-10 sek. oplach

Tabulka 1 Barvení HE

DAUM, Ondřej. *Laboratorní příručka ŠÚP: Přehled laboratorních vyšetření, referenčních mezí a doporučení*. Směrnice 8/004/07. Plzeň, 2015.

Doba od odebrání tkáně až po vydání výsledné diagnózy je otázkou přibližně 2-3 dní. Tento rutinní proces je na dennodenním pořádku každé histopatologické laboratoře, podle velikosti spádové oblasti se na těchto pracovištích zpracují desítky až stovky parafinových bločků za den. (Daum, 2015; Paulsen, 2004)

8. ZPRACOVÁNÍ HISTOLOGICKÉHO VZORKU PRO PEROPERAČNÍ VYŠETŘENÍ

8.1 Transport a příprava vzorku

Biopsie je sanitářem nebo zdravotní sestrou (popř. potrubní poštou) zaslána do laboratoře, zapsána do systému a hned zpracovávána. Tkáň musí být uložena v gáze, která je navlhčena ve fyziologickém roztoku (0,9% vodný roztok NaCl), nesmí být transportována ve fixačním roztoku (formaldehydu), protože by již nebylo možné ji peroperačně zpracovat. Lékař vzorek změří a popíše (na žádanku i do diktafonu), skalpelem přikrojí podle potřeby a rozhodne o dalším zpracovávání (část je zalita do parafínu a krájena mikrotomem, chirurg rovněž může zažádat o genetické nebo imunohistochemické vyšetření). Tkáň určená k rychlému peroperačnímu vyšetření je položena na kovový disk (tzv. “stoleček”), kde je předem umístěna voda nebo “lepidlo” Cryomount (vzhledem k velikosti a povaze vzorku) a zmrazena, ve FN Plzeň nejčastěji stlačeným plynem ve spreji (tetrafluoretan). Již při přijímání vzorku je nutné natemperování a připravení kryostatu, který se dostává na řadu nyní. (Daum, 2015; Paulsen, 2004)

8.2 Kryostat

Kryostat je v podstatě velmi podobný klasickému mikrotomu pro krájení parafinových řezů. Oproti němu se jedná o uzavřenější systém s chlazením, díky němuž dochází k nepřetržité teplotě celého prostoru - chlazená je podložka, nůž i samotný vzorek určený ke krájení. Teplota se nastavuje na hodnotu kolem $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T = 253\text{ K}$). I zde je možná různá šíře řezu, která se volí vzhledem k typu a velikosti tkáně. Nastavení na moderních kryostatech se provádí elektronicky přes ovládací panel. Nejnovější modely obsahují barevný dotykový displej s údaji o šíři řezu a teplotě uvnitř boxu. Ve Fakultní nemocnici Lochotín na Šiklově ústavu patologie v Plzni se nacházejí 2 kryostaty - Modely od společnosti Leica. Starší model Leica CM1850 je využíván především pro krájení ledvinových štěpů a je zde jako záložní, kdyby došlo k poruše novějšího modelu - Leica CM1950. V případě problémů je na telefonu k dispozici technik, který je zodpovědný za funkčnost celého kryostatu. Při drobných poruchách je možné seřízení “na dálku” pouze za pomoci instrukcí, u větších potíží je nutný jeho zásah - seřízení stroje nebo výměna některé součástky. (Daum, 2015; Leica Biosystems Nussloch, 2014)



Obrázek 8 Kryostat Leica CM1950

Zdroj:

http://drp8p5tqcb2p5.cloudfront.net/typo3temp/_processed_/csm_Leica_CM1950_Cryostat_05_021ed72d08.jpg

8.3 Krájení

Laborant určený k této práci si prohlédne zmrazený vzorek a rozhodne se, z jaké strany bude nejvýhodnější jej krájet, podle toho upevní stoleček s biopsií. Výrobce kryostatu doporučuje při krájení sedět, jde však o zvyk a každý laborant má zažitý jiný postup. Vzhledem k povaze a celistvosti tkáně upraví šířku řezu. Vždy je nutné se pokoušet o co nejtěsnější preparát, aby byl pro lékaře snadno hodnotitelný. Pomocí makroposunu se vzorek zkracuje do té doby, než je celá plocha tzv. “v řezu”. Krájení probíhá velmi pomalu, řez je “chytán” štětečkem nebo pod antirolovací sklíčko, které je umístěno přímo v kryostatu. Někdy je nutné několikanásobné prokrajování způsobené necelistvostí vzorku. Dalším důvodem je fakt, že hodnotící lékař si sám přesně určí vrstvu k prohlížení v mikroskopu. Ukrojená tkáň je přímo z destičky v kryostatu přitisknuta na podložní sklíčko a dále zpracovávána. (Daum, 2015; Leica Biosystems Nussloch, 2014)

8.4 Barvení preparátů z peroperační biopsie

Tkáň na podložním sklíčku se přibližně na 1 min. vloží do skleněné kyvety se 70% alkoholem, kde dojde k její fixaci. Následuje oplach ve vodě a 1 min. barvení jader v Harrisově hematoxylinu (hotový dodávaný lékárnou), poté je nutné důkladné opláchnutí ve vodě a pokračuje se 1 min. diferenciací ve Scottově vodě, což je vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného (3,5g NaHCO₃ + 500 ml H₂O), síranu hořečnatého (20g MgSO₄ + 500 ml H₂O) a 40% formaldehydu (1 ml HCHO). Tento roztok se připravuje přímo v laboratoři z příslušných chemikálií. Krátký oplach a cca 5 sek. barvení v roztoku eosinu (10g eosinu žlutavého, 5g dvojchromanu draselného, 800 ml deionizované vody, 100 ml nasyceného roztoku kyseliny pikrové, 100 ml 100% alkoholu). Po odstranění přebytečného barviva vodou se vzorek blíží do závěrečné fáze, kdy projde oplachem v 96% alkoholu, acetoneu, aceton-xylenu, xylenu-acetonu a xylenu (zapsání chemické sloučeniny na první místo v názvu značí její větší objemové množství, v přibližném poměru 60/40% až 70/30%). Díky krycímu sklíčku a montážnímu lepidlu solakrylu vznikne trvalý preparát vhodný k prohlížení a dlouhodobému skladování. Eosin, roztoky aceton-xylenu a xylenu-acetonu se stejně jako Scottova voda připravují až v histopatologické laboratoři. Výsledek tohoto barvení je následující: modrá jádra, růžový kolagen, růžový hyalin, červený fibrin, růžovo-červená svalovina. Kvalita barviv a nutnost jejich výměny je pozorována na kontrolních řezech, které se připravují do zásoby a v pravidelných intervalech (zpravidla každý den) jsou barveny příslušnými roztoky. (Daum, 2015; Vacek, 1995; Paulsen, 2004)

8.5 Komplikace při krájení na kryostatu

Prvním problémem, který může nastat při krájení zmražené tkáně, je rozmazávání preparátu. Důvodem je nedostatečné namrazení vzorku nebo antirolovacího sklíčka. Je tedy nutná opakovaná aplikace spreje "Cryo spray" (tetrafluorethanu) a vyčkání na vytemperování prostoru kryostatu. Třepící se preparáty se objeví v opačném případě, řešením je zvýšení teploty. Při špatném seřízení antirolovacího sklíčka dochází ke zkroucení krájené tkáně. Problémy způsobují nečistoty zůstávající na noži nebo v jeho blízkosti. Práci komplikuje také tupý nebo nedostatečně upevněný nůž, špatně uložený vzorek na disk před zmrazením, nesprávný úhel hřbetu nože, mastné antirolovací sklo nebo nevhodná teplota pro danou tkáň. Výrobce kryostatu uvádí tabulku teplot pro krájení jednotlivých typů vzorků, které má spíše informativní charakter. Komplikace při krájení s sebou může nést i sama tkáň, která např.

obsahuje kalcifikace nebo velké množství tuku. (Leica Biosystems Nussloch, 2014; Daum, 2015)

8.6 Zmrazovací technika - výhody

První a zároveň hlavní neodmyslitelnou výhodou zpracování tkání pomocí zmrazovací techniky je bezpochyby čas. Zrychlení celého procesu je již téměř nemožné. 15 – 30 min. od transportu tkáně až po telefonování výsledku na operační sál je opravdu to nejnižší možné minimum, které není pro stabilizovaného pacienta omezující. Z tohoto důvodu již vlastně ani není snaha o pokusy ještě zkracující tento časový interval, který je k celému peroperačnímu vyšetření potřebný. (Daum, 2015; Peters, 2010; Argani, 2013)

8.7 Zmrazovací technika - nevýhody, omezení

I tato metoda má ovšem svá jistá omezení. V prvé řadě se jedná o samotnou technickou stránku věci. Materiál musí být dokonale rovnoměrně namrazen, aby bylo možné získání co nejlepšího řezu, který je tenký, ale zároveň celistvý. Široká tkáň je těžko hodnotitelná z důvodu překrývání jednotlivých vrstev, potrhání preparát by mohl vytvářet zkreslený výsledek, který zhoršuje interpretaci výsledku. (Daum, 2015; Peters, 2010; Argani, 2013)

Zmrazovací technika je specifická v tom, že tkáň je fixována až po nakrájení, což zvyšuje riziko poškození hodnocených buněk. Diagnóza z takového vzorku se může odlišovat od skutečnosti. Hodnotící lékař má specializovanou způsobilost v oboru patologické anatomie, je tedy odborníkem v dané problematice, díky čemuž by mělo docházet k eliminaci takových chyb. V případě nejasností se z důvodu možných konzultací nachází více patologů. Výsledek vyšetření je dále diskutován s operujícím chirurgem, k dispozici je kompletní lékařská zpráva z předchozích vyšetření, která může podporovat nebo vyvracet nejasný histologický nález. (Argani, 2013; Taxy, 2010)

Důležitá je zkušenost s jednotlivými typy tkání, protože některé s sebou nesou jistá specifika, která je nutno brát při zpracování a hodnocení v potaz. Vzorky obsahující velké množství tuku jsou obtížnější na krájení a potřebují delší čas k fixaci. U malých částí (většinou se s nimi setkáme u vzorků zasílaných z neurochirurgie) je potřeba zmrazování na dostatečné vrstvě lepidla, jinak by došlo k jejich “zapadnutí” do struktury “stolečku” pro kryostat a celé krájení by tak bylo znemožněno a tkáň znehodnocena. Zde je potřeba zdůraznit, že odebrání biopsie pro histologické vyšetření je vysoce invazivní a není tudíž tak opakovatelné, jako například odběr krve ze žíly nebo výtěr z krku. (Argani, 2013; Taxy, 2010)

8.8 Další využití zmrazovací techniky

Zmrazení vzorku nemusí být vždy z důvodu urychlení celého procesu v rámci peroperační biopsie, ale využívá se i při zpracování tkání, které by byly poškozeny některým krokem při tvorbě parafinového bločku. Typickým příkladem jsou kožní biopsie, kde by došlo ke znehodnocení vzorků z důvodu účinku chemikálií (formaldehydu, acetonu, alkoholu atd.) Zmrazovací technika se využívá u biopsiích ledvin, u vzorků svalové tkáně, obecně pro důkaz enzymů aj. (Vacek, 1995; Paulsen, 2004)

9. ZPRACOVÁNÍ VÝSLEDKŮ DAT

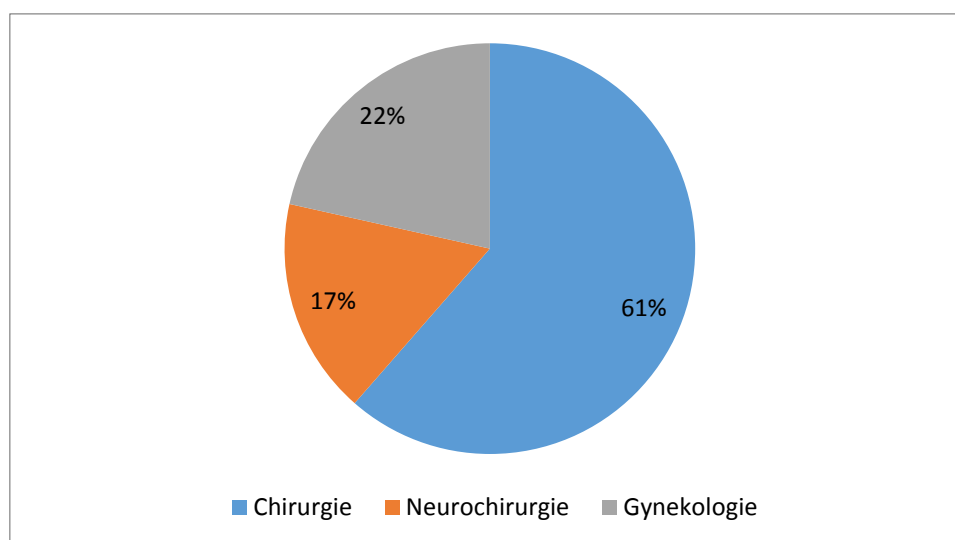
V rámci této práce byla zpracovávána data per-operačních biopsií z histopatologické laboratoře FN Plzeň - Šiklova ústavu patologie na Lochotíně. Šetření se týkalo kalendářních roků 2013-2015 a bylo v něm shrnuto celkem 1390 biopsií. Žádajícím pro vyšetření byla oddělení chirurgie, neurochirurgie a gynekologicko-porodnické oddělení. Zpracování tkání zmrazovací technikou pro další oddělení (např. kožní nebo ortopedické oddělení), není v této studii zahrnuto, protože se jednalo o ojedinělé případy, které sloužily především pro výzkumné účely, popř. se jednalo o speciální vyšetření.

9.1 Souhrn peroperačních biopsií (ŠÚP Lochotín, 2013 - 2015)

Nejčastěji žádajícím oddělením o peroperační vyšetření na Šiklově ústavu patologie na Lochotíně v letech 2013-2015 byla chirurgie s 854 biopsiemi (61,4 %), následovalo gynekologicko-porodnické oddělení s 299 žádostmi (21,5 %) a neurochirurgie, která potřebovala využít zpracování pomocí zmrazovací techniky celkem 237krát (17,1 %). Vše je přehledně graficky znázorněno níže.

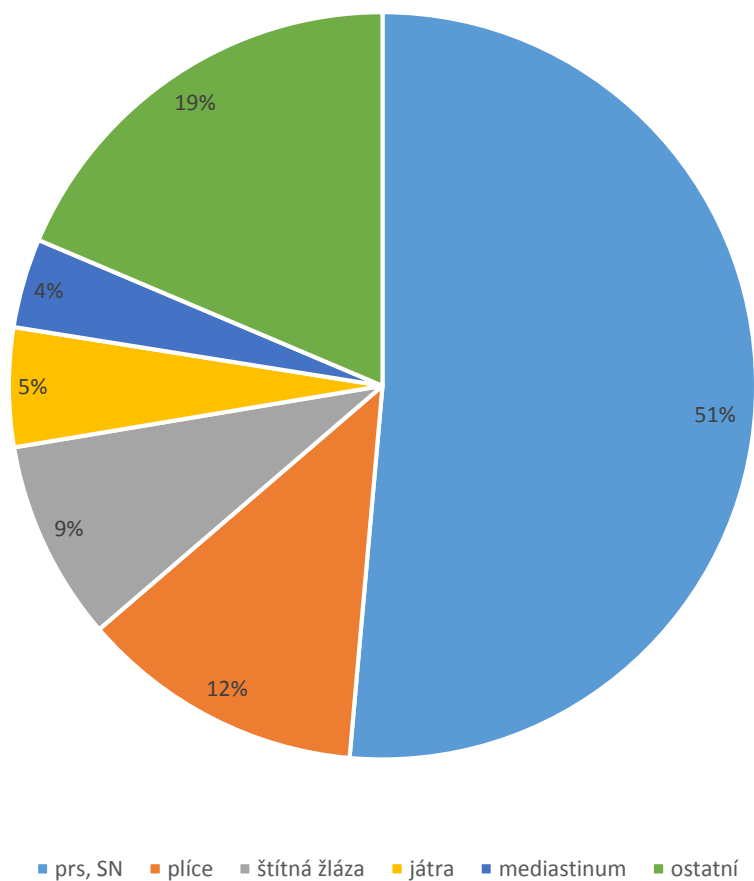
ROK	2013	2014	2015	CELKEM
CHIRURGIE	285	272	297	854
NEUROCHIRURGIE	67	68	102	237
GYNEKOLOGIE	104	112	83	299
CELKEM	456	452	482	1390

Tabulka 2 Souhrn žádajících oddělení o preoperační vyšetření



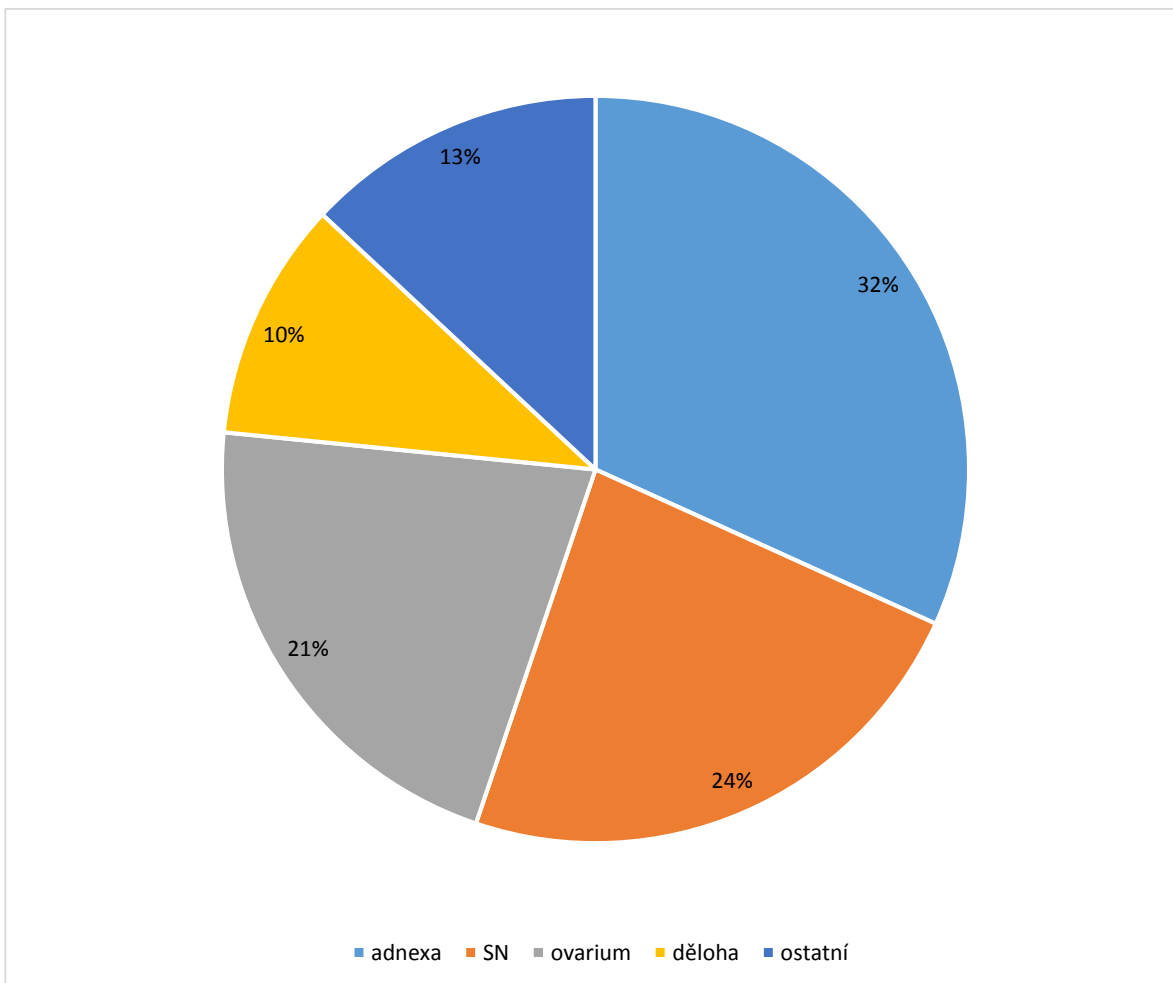
Graf 1 Rozdělení tkání podle oddělení

Z chirurgického oddělení byly nejčastěji zasílány vzorky prsu a sentinelových uzlin (439 případů), plic (105), štítné žlázy (74), jater (44) a mediastina (33). Ostatní vzorky (159) pocházely z oblasti žlučníku, střeva aj.



Graf 2 Biopsie z chirurgického oddělení

Gynekologicko-porodnické oddělení žádalo ŠÚP o peroperační vyšetření adnexe (95 případů), sentinelových uzlin (70), ovaria (64) a dělohy (31). Zbýlých 39 biopsií pocházelo z tkáně vejcovodů, břišní stěny aj.



Graf 3 Biopsie z Gynekologicko-porodnického oddělení

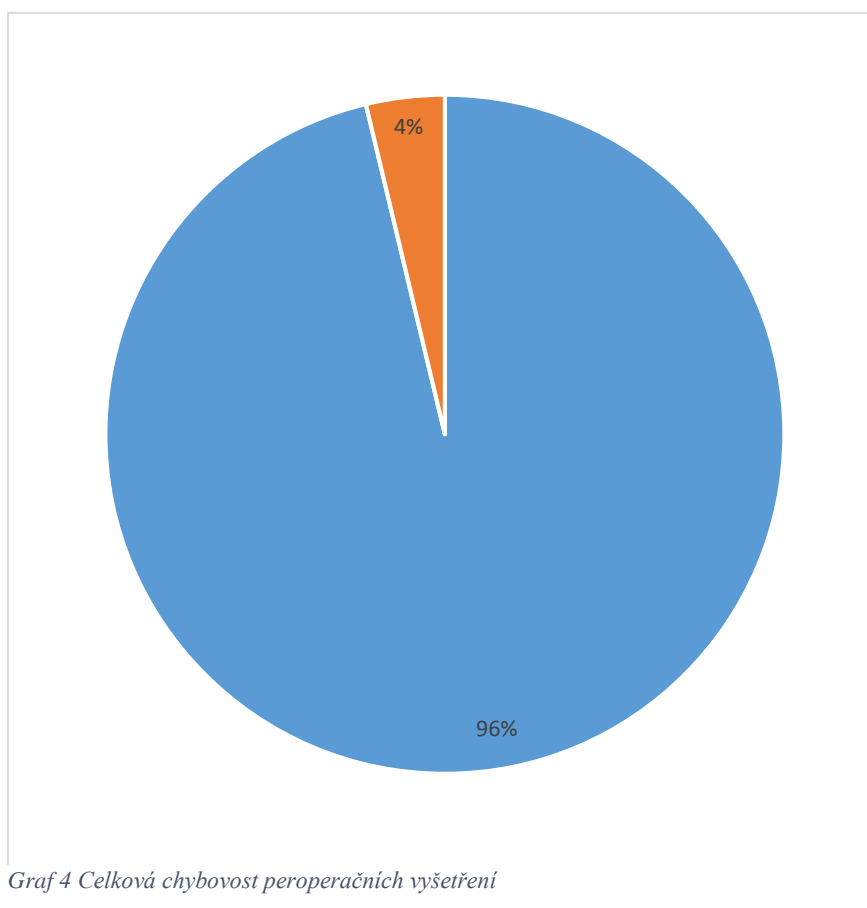
Oddělení neurochirurgie zasílalo žádosti o peroperační vyšetření týkající se (podle očekávání) centrálního nervového systému, ž čehož mícha byla vyšetřována pouze v ojedinělých případech (celkem tři biopsie míchy).

Z celkového počtu 1390 biopsií byly zaznamenány následující chyby a nepřesnosti. Ve 24 případech byl výsledek peroperační biopsie hlášen jako negativní, ale definitivní vyšetření prokázalo známky malignity. Týkalo se to 10 sentinelových uzlin, 6 prsů, 3 štítné žlázy, 2 vzorků střev a po jednom případě ovaria, dělohy a jater. Většinou se jednalo o výskyt mikrometastáz, malých reziduálních tumorů nebo o izolované nádorové buňky (ITC).

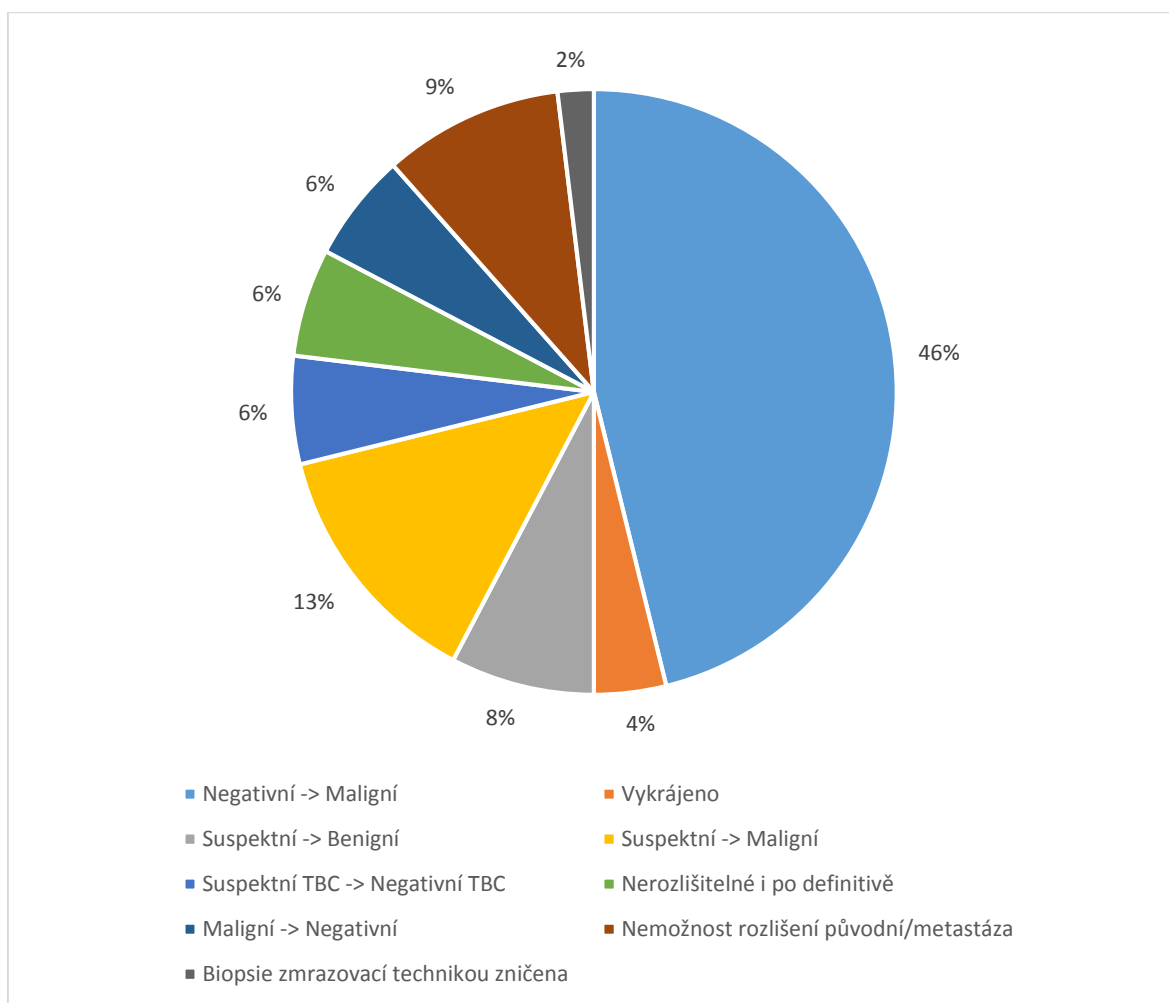
V ojedinělých případech byla tkáň těžko hodnotitelná z důvodu vazivových srůstů a vysokému prokrvácení.

Při 2 peroperačních vyšetřeních (prs a uzlina) byl materiál z důvodu přítomnosti velmi malých nálezů zcela vykrájen, což znemožnilo další zpracování. Celkem 4 biopsie (2x prs, hrudní stěna, játra) byly po zpracování zmrazovací technikou suspektní z malignity, kterou definitivní řezy vyvracejí. U 7 vzorků (2x sentinelová uzlina, prs, ovarium, adnexa, mozek, peritoneum) se suspektní malignita v definitivě potvrdila. 3 vzorky plic byly peroperačně suspektní z tuberkulózy, ta byla následně vyvrácena. Hodnocení jako maligní, které bylo v definitivních řezech vyvráceno, se týkalo prsu (regresivně změněná tkáň) a 2 plic (zánět, hyperplazie). U 5 peroperačních vyšetřeních (3x mozek, žlučovod, ovarium) nebylo možné rozlišit, zda se jedná o původní tumor nebo o metastázu. Zmrazovací technika definitivně zničila 1 varle. Diagnóza nebyla zřejmá ani v definitivních řezech u biopsie temporálního laloku mozku, příštítného tělíska (z většiny pouze tuk) a jater (pouze miniaturní infiltráty, doporučeno hematologické vyšetření).

Následující graf znázorňuje procentuální chybovost veškerých výsledků peroperačních vyšetření na ŠÚP Lochotín v letech 2016-2015. Z celkového počtu 1390 biopsií došlo k neshodě v 52 případech, což odpovídá přibližně 4 %.



Tento graf se zaobírá neshodami zmíněných 52 případů peroperačních biopsií.



Graf 5 Konkrétní příčiny neshod peroperačních vyšetření

9.2 Vybrané biopsie (ŠÚP Lohotín, 2013 - 2015)

V rámci této bakalářské práce bylo vybráno 10 biopsií, které byly blíže popsány. U každé z nich se nachází diagnóza dle MKN (mezinárodní klasifikace nemocí), pohlaví a věk pacienta. Poté je krátce přiblížen postup peroperačního vyšetření a porovnání s finálním výsledkem.

- **Biopsie č. 1 (MKN C788)**

Žena ve věku 54 let s bilaterální adnexectomií pro karcinom ovária. Nyní s podezřením na metastázu na peritoneu. Pravděpodobně generalizace po peritoneu orrigo karcinomu ovaria. Do laboratoře poslán z chirurgie vzorek peritonea. V peroperační biopsii nelze jednoznačně prokázat známky malignity. V definitivní biopsii objevena část hladké svaloviny s metastázou dobře diferencovaného adenokarcinomu s kribriformní strukturou. Po

provedení revize preparátu peroperační biopsie bylo potvrzeno, že maligní nádorové struktury byly zastiženy jen v dalších řezech definitivní biopsie.

Zhodnocení: Peroperační biopsie je limitována časem, není možné prokrajování do hloubky. Malignita nebyla přítomna v peroperačně vyšetřované tkáni.

- **Biopsie č. 2 (MKN C508)**

Žena ve věku 42 let. Do laboratoře byly odeslány 2 vzorky z chirurgie. První částice obsahovala excizi prsu o rozměrech 5,2 x 2,4 x 1 cm. Je zde viditelný tumor o průměru 0,7 cm, který nedosahuje k okraji. Tkáň zpracována v 1 bloku zmrazovací technikou a v 1 bloku standardně. Jedná se o dobře diferencovaný ductální invazivní karcinom, grade 1. V okolí se nachází objemná ložiska fibrózní mastopatie, dále ložisko o průměru 1,2 cm, které je tvořeno fibrózní mastopatií s apokrinní metaplasíí. Ložisko bylo zpracováno v 1 bloku zmrazovací technikou a ve 2 blocích standardně. Druhý vzorek byla částice o rozměrech 1 x 0,5 x 0,7 cm obsahující lymfatickou uzlinu o průměru 0,9 cm. Polovina uzliny zpracována peroperačně, polovina standardní technikou. Materiál byl také prokrájen v sériích, provedena byla imunohistochemie. Výsledek per-operační biopsie hodnotí uzlinu jako negativní, v definitivních řezech nalezena po prokrájení ve 2 řezech mikrometastáza menší než 1 mm dobře diferencovaného tubulárního adenokarcinomu lokalizovaného subkapsulárně.

Zhodnocení: Mikrometastázy nejsou viditelné makroskopicky, v případě uzlin je vždy nutné zpracovat a prokrájet celý materiál, což během peroperačního vyšetření není možné.

- **Biopsie č. 3 (MKN C508)**

Excize prsu a uzlina z chirurgie od 71 leté ženy. První vzorek o rozměrech 4,5 x 7 x 1,5 cm obsahuje tumor o rozměrech 0,7 x 0,5 x 0,1 cm, který nedosahuje do okrajů. Materiál byl zpracován v 1 bloku per-operačně a ve 3 blocích standardně. Histologicky se jedná o dobře diferencovaný ductální invazivní karcinom, grade 1. Druhý vzorek o rozměrech 1,3 x 0,7 x 0,5 cm byl tvořen objemnou lymfatickou uzlinou. Polovina byla zpracována zmrazovací technikou, zbytek převeden do parafínu. Provedena imunohistochemie. Per-operačně hlášena uzlina jako negativní. Sériovým prokrajováním parafinových řezů objeveny minimálně 4 miniaturní ložiska mikrometastázy, každé ložisko je menší než 0,5 mm. Jedno ložisko je lokalizováno vně uzliny v sinusu před kapsulou. Ostatní jsou lokalizována intraparenchymatózně-subkapsulárně. Histologicky se jedná o totožné struktury ductálního

invazivního karcinomu. Dále provedeno vyšetření exprese HER2/neu s negativním výsledkem, nádor má skóre 1+.

Zhodnocení: Další příklad výskytu mikrometastázy, kde je nutné prokrájení celého bloku.

- **Biopsie č. 4 (MKN C508)**

Žena ve věku 68 let, do laboratoře zaslány 2 částice z oddělení chirurgie. První má rozměr 2,5 x 0,7 x 0,3 cm a obsahuje lymfatickou uzlinu o průměru 0,5 cm. Druhá částice (rozměry 1,3 x 0,5 x 0,4 cm) obsahuje lymfatickou uzlinu o průměru velikosti 0,6 cm. Obě uzliny zpracovány z poloviny zmrazovací technikou, zbytek kompletně prokrájen v parafínu. Vše je doplněno o imunohistochemické vyšetření. Per-operačně nebyla prokázána žádná metastáza ani v jedné z uzlin. V definitivních řezech se v první uzlině nachází subkapsulární mikrometastáza o průměru 0,2 – 0,3 cm. Jedná se o metastázu ductálního invazivního karcinomu, grade 1.

Zhodnocení: Sentinelová uzlina obsahující mikrometastázu o velikosti 2 - 3 mm. Nutnost prokrájení celého bloku.

- **Biopsie č. 5 (MKN C508)**

Žena ve věku 72 let, z chirurgie obdrženy 2 vzorky. První o velikosti 3,7 x 4,5 x 2 cm obsahující tumor o rozměrech 1,5 x 1,3 x 1 cm. Tumor je vzdálen cca 2 mm od resekční linie. Materiál zpracován v 1 bloku zmrazovací technikou a ve 2 blocích standardně. Dále odebrána část na vyšetření molekulární genetikou. Histologicky nalezen tumor, který má z velké části obraz ductálního invazivního karcinomu, na části roste jako lobulární invazivní karcinom, včetně lobulárního carcinoma in situ. Grade 2. Druhá částice má rozměry 3 x 2 x 0,5 cm a obsahuje lymfatickou uzlinu o velikosti 2,2 x 1 x 0,5 cm. Její velká část je tukově atrofická. Polovina zpracována zmrazovací technikou, polovina standardně. Uzlina peroperačně hodnocena jako negativní. V sériových řezech díky imunohistochemickému barvení nalezena mikrometastáza o průměru menším než 1 mm, která se nachází v pouzdře uzliny.

Zhodnocení: Mikrometastázy lze prokázat pouze imunohistochemickým vyšetřením, v peroperačním vyšetření nejsou viditelné.

- **Biopsie č. 6 (MKN N859)**

Z gynekologicko-porodnického oddělení zaslány vzorky 51leté ženy. Děloha o rozměrech 7,5 x 5,5 x 9 cm je deformována četnými bělavými tumory o průměrech 0,3 – 5 cm, které jsou lokalizovány subserózně, intramurálně i submukózně. Druhá tkáň se skládá z levé tuby (délka 5 cm a průměr 0,3 cm) a ovaria (vel. 2,8 x 1 x 0,5 cm). Tuba obsahuje tenkostěnnou cystu o průměru 0,3 cm. Dále zaslána pravá tuba o délce 9 cm a průměru 0,2 – 0,5 cm. Makroskopicky není patrný žádný tumor, peroperačně provedeny 2 velmi objemné řezy. Nádorové struktury neprokázány, pouze nekróza na povrchu. V definitivních řezech se nachází atypická hyperplasie (stupeň před karcinomem) a v 1 bloku již i karcinom.

Zhodnocení: Nádor není vidět makroskopicky. Peroperačně vyšetřena pouze malá část dělohy, která nedává odpovídající výsledek. Zmrazovací technika je zde nevhodně zvolena.

- **Biopsie č. 7 (MKN C798)**

Z gynekologicko-porodnického oddělení obdržen materiál od 56leté ženy, preparát hysterektomie a adnexektomie. Operace prováděna z důvodu suspektní malignity z biochemických výsledků, kde byly zvýšené nádorové markery. Peroperační vyšetření odhalilo pouze benigní leiomyom a folikulární cystu. V definitivní biopsii zastižen ve 2 blocích primární high-grade serózní karcinom tuby, jinde tento nález neobjeven.

Zhodnocení: Peroperační vyšetření nevhodně indikováno. Vyšetření náhodné části tkáně.

- **Biopsie č. 8 (N61)**

Z chirurgie zaslána excize prsu 57leté ženy. Materiál o rozměrech 7 x 5,5 x 4 cm obsahoval chirurgické stehy pro lepší orientaci. Při peroperačním zpracování prokrájen v tenkých lamelách, vyšetření proběhlo v 5 objemných zmrazovacích řezech. Peroperační náález hlášen tak, že jeden řez obsahuje ložisko duktálního karcinomu in situ. Ložisko nedosahuje okrajů excize a je zde nutné definitivní histologické vyšetření. Zpracována téměř celá excize (bez čistě tukové tkáně). V původním řezu z peroperační biopsie se nachází duktus, který je vystlaný dysplastickým epitelem. Tento duktus byl vykrájen, takže toto ložisko již není přítomno. Ani v dalších 23 blocích nejsou dysplastické změny a nádorové struktury. Ve 3 blocích zastiženy změny pop předchozím odběru materiálu. Závěr: duktální karcinom in situ zastižen jen v 1 zmrazovacím řezu, dále nenalezen.

Zhodnocení: Nebylo zváženo vykrájení malého ložiska. Došlo k jeho zničení pro další vyšetření, nemožné dále vyšetřit imunohistochemicky. Ložiska o minimální velikosti je vždy nutné vyšetřit definitivně vč. Imunohistochemie, což zmrazovací technika nesplňuje.

- **Biopsie č. 9 (MKN C509)**

Biopsie 66leté ženy, 2 vzorky z chirurgie. Jednalo se o excizi prsu a lymfatickou uzlinu. Prsní žláza o velikosti 5,5 x 4,3 x 2,5 cm s tumorem vel. 1,7 x 1,3 x 2,2 cm. Druhý vzorek byl tuková tkáň s průměrem 1,1 cm obsahující lymfatickou uzlinu o průměru 0,7 cm. V prsní žláze objeven peroperačním i definitivním zpracováním invazivní duktální karcinom. Uzlina hodnocena peroperačně jako negativní, v definitivním výsledku se však objevují izolované nádorové buňky (ITC).

Zhodnocení: Izolované nádorové buňky jsou ještě menší částice než mikrometastázy, které bez imunohistochemie není možné zjistit.

- **Biopsie č. 10 (MKN R890)**

Z neurochirurgie zaslány 2 drobné částice temporálního laloku 72leté ženy s diagnózou suspektního gliomu. Peroperačně hlášen výsledek jako suspektní gliom grade 2, v definitivních řezech zastižena pouze reaktivní glióza („jizva“), o nádor se tedy nejedná.

Zhodnocení: Low grade gliální tumory není často možné bez imunohistochemie odlišit od reaktivních změn gliální tkáně. Indikace peroperačního vyšetření zde byla správná, ale jednalo se o lézi, kterou lze hodnotit pouze z definitivních preparátů.

10. DISKUZE

Krájení zmrazeného vzorku se za více než 100 let své existence vyvinulo do bodu, kdy již téměř není možný technický posun kupředu a „zlatým standardem“ histopatologické laboratoře bude i nadále zalévání vzorků do parafínu.

V rámci této bakalářské práce byly porovnávány výsledky 1390 peroperačních biopsií s finální diagnózou, která vždy vzniká až z parafinového bločku. Šetření se týkalo FN Plzeň - ŠÚP Lochotín za kalendářní roky 2013 – 2015. Nejčastěji žádajícím oddělením byla ve více než polovině případů chirurgie, následovalo gynekologicko-porodnické oddělení a neurochirurgie. Z tkání měl největší zastoupení prs a sentinelové uzliny.

První stanovená hypotéza („Vzhledem k limitům peroperačního vyšetření není možná 100% shoda výsledků zmrazovací technikou s výsledky z parafinových řezů.“) se potvrdila, protože shoda zmrazovací techniky s finální diagnózou byla 96%. Největší chybovost vykazovaly biopsie obsahující mikrometastázy nebo izolované nádorové buňky, protože je u takových vzorků nutné sériové prokrájení, které v průběhu peroperačního vyšetření není, především z časových důvodů, proveditelné. Dalším velmi důležitým aspektem je nezbytnost takto malé novotvary vyhodnotit až pomocí imunohistochemického vyšetření.

Druhá stanovená hypotéza („Vzhledem k větším limitům zmrazovací techniky u některých tkání je vyšší nepřesnost výsledků peroperačních vyšetření.“) se potvrdila, jelikož např. tkáně obsahující velké množství tuku (prs) nebo jinak nevhodné pro zpracování pomocí využití zmrazovací techniky (např. štítná žláza) vykazovaly větší neshodu s výsledky z definitivních řezů.

Třetí stanovená hypotéza („Kliničtí lékaři si ne vždy uvědomují omezení a limity týkající se peroperačního vyšetření, a tudíž je někdy prováděno zbytečně, ba dokonce kontraproduktivně.“) se také potvrdila, protože u určitých typů tkání docházelo k opakování se neshod s finální diagnózou. Vyskytovaly se i případy, kdy tkáň byla zmrazením částečně nebo úplně znehodnocena a přínos této techniky byl záporný.

Z výše zmíněného plyne, že je nutnost zvýšit informovanost klinických lékařů o limitech a omezeních použití zmrazovací techniky. Ta v určitých případech ztrácí význam a může být i kontraproduktivní. Dále by měla být zlepšena komunikace mezi lékaři na operačním sálem a v laboratoři, protože hodnotící patolog je lépe seznámen s možnostmi laboratoře při jednotlivých vyšetřeních. Na zvážení je i skutečnost, zda by patolog neměl mít možnost

odmítnout peroperační biopsii a rovnou ji zpracovat zalitím do parafínu v případech, že je přesvědčen o následné nevypovídající hodnotě ze zmrazeného řezu, nebo že by tento proces nenávratně znehodnotil celou tkáň.

V ČR i ve světě existuje množství prací zabývajících se problematikou shody a neshody peroperačních vyšetření s diagnózou z finálních řezů. Například Veronika Motlochová ve své práci uvádí nejnižší shodu u sentinelových uzlin a plic, což pouze částečně koresponduje s výsledky této bakalářské práce. Autorka například nezmiňuje neshodu u tkání prsu, štítné žlázy a mozku. (Motlochová, 2014)

Většina prací podobného tématu se však zabývá konkrétní tkání nebo onemocněním, z tohoto důvodu jsou takové výzkumy koncepčně probírány do větších detailů u konkrétních případech, na druhou stranu nezhodnocují zpracování bioptického vzorku zmrazovací technikou jako souhrn. (Tan, 2014)

ZÁVĚR

Zpracování tkáně zmrazovací technikou sloužící k rychlému vydání výsledku při peroperačním vyšetření je dnes rutinní součástí histopatologické laboratoře. Přináší s sebou i některá omezení, která ovšem ne vždy berou v potaz kliničtí lékaři, a může tak docházet k využívání této techniky i v případech, kdy výsledek peroperační biopsie nepomůže diagnóze nebo dokonce dojde k jejímu zkreslení. Při zpracování vzorku pomocí zmrazovací techniky totiž může dojít k jejímu trvalému poškození, tudíž ani vzorek z parafínu nebude mít vypovídající hodnotu. V takovém případě záleží na možnostech odebrání dalšího bioptického vzorku.

K nejčastějším chybám docházelo ve vzorcích obsahující mikrometastázy a izolované nádorové buňky (ITC). Při odebrání tkáně „naslepo“ bez viditelného tumoru je nalezení takto malých novotvarů spíše věcí náhody. Z důvodu nutnosti prokrajování celého vzorku (které je při peroperačním vyšetření nemožné) není využití zmrazovací techniky na místě.

Další špatně zpracovatelnou tkání je tuk, který téměř není možné zmrazit a dochází k ničení vzorku, což velmi ztěžuje celý následující diagnostický proces. Nutno poznamenat, že existují onemocnění, která jsou od sebe těžko rozlišitelná i v parafínovém řezu (např. sklerozující adenoza a duktální invazivní karcinom). Ve většině případů poté pomáhá diagnostice imunohistochemické vyšetření.

POUŽITÁ LITERATURA

- ALBERTS, Bruce a kol. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vydání. Ústí nad Labem: Espero Publishing, s. r. o., 1998. ISBN 80-902906-2-0.
- ARGANI, Pedram a Ashley CIMINO-MATHEWS. *Intraoperative Frozen Sections: Diagnostic Pitfalls*. 1. vyd. New York: Demos Medical Publishing, 2013. ISBN 978-1936287970.
- BENEŠ, Jiří a kol. *Základy fyziky pro lékařské a zdravotnické obory*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2015. ISBN 978-80-247-4712-5.
- CIBULA, David a Luboš PETRUŽELKA. *Onkogynekologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2009. ISBN 978-80-247-2665-6.
- CLAPESATTLE H. *The Doctors Mayo*. Minneapolis, Minn: University of Minnesota Press; 1941; 441-447.
- DAUM, Ondřej. *Laboratorní příručka ŠÚP: Přehled laboratorních vyšetření, referenčních mezí a doporučení*. Směrnice 8/004/07. Plzeň, 2015.
- DVOŘÁK, Karel, Zdeňka DVOŘÁKOVÁ, Josef FEIT, Zdeněk LUKÁŠ a Jana ŠMARDOVÁ. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod*. Brno, 2008.
- GAL, Anthony A. The centennial anniversary of the frozen section technique at the Mayo Clinic. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2006, 12. DOI: 10.1043/1543-2165. ISSN 1543-2165.
- JAAFAR, Hasnan. Intra-Operative Frozen Section Consultation: Concepts, Applications and Limitations. *The Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2006, 4-12.
- JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 1. vydání. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-7262-263-3.
- JUNQUEIRA, L. Carlos, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. 7. vydání. Jinočany: Nakladatelství a vydavatelství H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
- KITTNAR, Otomar a kol. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, a. s., 2011. ISBN 978-80-247-3068-4.
- KOČÁREK, Eduard. *Klinická cytogenetika I. - úvod do klinické cytogenetiky: vyšetřovací metody v klinické cytogenetice*. 2. upravené vydání. Praha: Karolinum, 2010. ISBN 978-80-246-1880-7.
- KOČÁREK, Eduard. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2007. ISBN 978-80-7013-450-4.
- KONRÁDOVÁ, Václava, Luděk VAJNER a Jiří UHLÍK. *Histologie: přednášky pro bakalářské studium*. 1. vydání. Praha: H & H Vyšehradská, s. r. o., 2005. ISBN 80-7319-009-5.
- KRŠKA, Zdeněk, David HOSKOVEC a Luboš PETRUŽELKA. *Chirurgická onkologie*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2014. ISBN 978-80-247-4284-7.
- LECHAGO, Juan. The Frozen Section: Pathology in Trenches. *Arch Pathol Lab Med*. 2005.
- LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 1. české vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.

- LUTZ, W. Gene p53 mutations, protein p53, and anti-p53 antibodies as biomarkers of cancer process. *International journal of occupational medicine and environmental health*. 2002.
- MAČÁK, Jirka. *General pathology*. 1. vydání. Brno: Masarykova Univerzita, 2008. ISBN 978-80-210-4549-1.
- MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie*. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.
- MOTLOCHOVÁ, Veronika. *Kryostatové zpracování histologického materiálu*. Bakalářská práce. Ostrava: Ostravská Univerzita, 2014.
- MOUREK, Jindřich. *Fyziologie*. 2., doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2012. ISBN 978-80-247-3918-2.
- NUSSBAUM, Robert L. et al. *Klinická genetika*. 6. vydání. Praha: Triton, 2004. ISBN 80-7254-475-6.
- OCHEI, J. et al. *Medical laboratory science: theory and practice*. 1. vyd. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company, 2000. ISBN 978-0-07-463223-9.
- OTOVÁ, Berta a Romana MIHALOVÁ. *Základy biologie a genetiky člověka*. 1. vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-2109-8.
- PAULSEN, Douglas F. *Histologie a buněčná biologie: Opakování a příprava ke zkouškám*. 1. vydání. Praha: Nakladatelství H & H, 2004. ISBN 80-7319-024-9.
- PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a. s., 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.
- PETERS, Stephen R. *A practical guide to frozen section technique*. 1. vyd. New York: Springer, 2010. ISBN 978-1-4419-1233-6.
- RAICA, M. Hormone receptors and HER2 expression in primary breast carcinoma and corresponding lymph node metastasis: do we need both? *Anticancer research*. 2014.
- STANLEY, Margaret. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic oncology*. 2010, S5 - S10.
- TAN, Mona. *The Value of Intraoperative Frozen Sections Analysis for Margin Status in Breast Conservation Surgery in a Nontertiary Institution*. *International Journal of Breast Cancer*. 715404. 2014.
- TAXY, J. B., A. N. HUSAIN a A. G. MONTAG. *Biopsy interpretation: the frozen section*. 1. vyd. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2010. ISBN 978-1451186796.
- VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika: Histologie I. část*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1995. ISBN 80-7013-201-9.
- VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika: Histologická technika II. část*. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví v Brně, 1995. ISBN 80-7013-202-7.

SEZNAM ZKRATEK

μm – mikrometr

ac. – acetylen

aj. – a jiné

Al – hliník

angl. orig. – anglický originál

b. – buňka

bb. – buňky

BRCA – breast cancer

CO₂ – oxid uhličitý

DNA – deoxyribonukleonová kyselina

Fe – železo

FN – Fakultní nemocnice

FSB – frozen section biopsy

H₂O – voda

HBV – hepatitida B

i. v. – intra venózní

ITC – izolované nádorové buňky

MKN – mezinárodní klasifikace nemocí

NaCl – chlorid sodný

SOPV – standardní operační postup pro vyšetření

ŠÚP – Šiklův ústav patologie

tzv. – takzvaný

W – wolfram

WHO – Světová zdravotnická organizace

xyl. - xylen

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Barvení HE.....	31
Tabulka 2 Souhrn žádajících oddělení o preoperační vyšetření.....	37

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Rozdělení tkání podle oddělení.....	37
Graf 2 Biopsie z chirurgického oddělení.....	38
Graf 3 Biopsie z Gynekologicko-porodnického oddělení.....	39
Graf 4 Celková chybovost peroperačních vyšetření.....	40
Graf 5 Konkrétní příčiny neshod peroperačních vyšetření.....	41

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Buňka.....	11
Obrázek 2 Tkáň epitelová	14
Obrázek 3 Tkáň pojivá.....	14
Obrázek 4 Tkáň nervová	15
Obrázek 5 Tkáň svalová.....	16
Obrázek 6 Krev	17
Obrázek 7 Buněčný cyklus.....	21
Obrázek 8 Kryostat Leica CM1950	33

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 FSB dle Wilsona	56
---------------------------------	----

PŘÍLOHY

A METHOD FOR THE RAPID PREPARATION OF FRESH TISSUES FOR THE MICROSCOPE.

LOUIS B. WILSON, M.D.

Pathologist St. Mary's Hospital.

ROCHESTER, MINN.

While engaged in general pathologic work I shared the common distrust of frozen sections of fresh tissues for microscopic diagnosis. On taking charge recently of the laboratories of the Drs. Mayo, surgeons, I carefully tested the various methods hitherto published and found them either too slow for results while the patient waits under the anesthetic or else giving poorly differentiated cell detail. After considerable experimentation the following technic was discovered, and for the last six months it has given uniformly excellent preparations:

1. Bits of fresh tissue not more than 2x10x10 mm. are frozen in dextrin solution and cut in sections of from 10 to 15 microns thick.
2. The sections are removed from the knife with the tip of the finger and allowed to thaw thereon.
3. The sections are unrolled with camel's-hair brushes in 1 per cent. NaCl solution.
4. The sections are stained from 10 to 20 seconds in neutral Unna's polychrome methylene blue.
5. They are washed out in 1 per cent. NaCl solution.
6. They are mounted in Brun's glucose medium.

The microtome which I use is the Spencer automatic with a CO₂ attachment in which vulcanite is substituted for brass in the wall of the freezing chamber, thus insulating the freezing plate. Thawing the section on the finger prevents to a great extent the formation of bubbles. The well-made camel's-hair brushes used by artists are much more useful for handling tissues than those usually furnished by laboratory supply houses. A heavy, shallow watch glass over a black surface is the best receptacle in which to unroll sections. Sections are best handled in the stain folded over a lifter made of a small glass rod drawn out and bent at convenient angle. The section is kept constantly moving while it is in the stain. The stain is contained in a minute cup to facilitate the rapid recovery of the section should it slip from the lifter. Washing out is done in several ounces of salt solution in a white porcelain dish and is continued only while the stain comes away freely. Brun's glucose medium (which is made by mixing distilled water 140 c.c., glucose 40 c.c., and glycerin 10 c.c., then adding camphorated spirit 10 c.c. and filtering), is held in an oval dish of porcelain (an "undecorated match safe") of such a size that a three-inch slide will rest in a slanting position, with one end in the bottom of the dish and the other on its edge. The section is spread out on the slide while it is in this position. The slide is then carefully withdrawn from the dish, the excess fluid removed, a cover-slip dropped over the section and the specimen is ready for the microscope.

The whole process can be gone through in one and a half minutes from the time the tissue is placed on the freezing plate of the microtome until the stained specimen is on the stage of the microscope. The resulting coloring is uniformly good with the tissue elements sharply contrasted in red, purple and dark blue.

A diagnosis may be made from such preparations in a large percentage of surgical cases in which a diagnosis is possible by a study of sections of the same thickness cut from fixed tissues and stained with hematoxylin and eosin.

Příloha 1 FSB de Wilsona

Zdroj: GAL, Anthony A. The centennial anniversary of the frozen section technique at the Mayo Clinic. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2006, 12. DOI: 10.1043/1543-2165.