

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Laboratorní diagnostika maligního melanomu se zpracováním sentinelové uzliny

VERONIKA ZASPALOVÁ

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Petra Fikrová, Ph.D.

Konzultant: MUDr. Arpád Szabó

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023/2024

Poděkování

Chtěla bych vyjádřit upřímné poděkování PharmDr. Petře Fikrové, Ph.D., za její skvělé vedení práce, úžasný přístup, rady, ochotu a trpělivost při zpracování mé bakalářské práce. Děkuji také MUDr. Arpádu Szabóovi za jeho odborné vedení a poskytování materiálních podkladů. Rovněž chci vyjádřit poděkování Katce Vadinské, vrchní histologické laboratoře, za poskytnutí materiálů, ochotu, pomoc a podporu během celého mého studia. Děkuji také Andree Musilové, vedoucí imunohistochemické laboratoře, za cenné rady, připomínky, ochotu a čas. Nemohou zapomenout ani na ostatní kolegyně z histologické laboratoře, které svou ochotou a podporou přispěly k mému úspěchu během studia.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 6.5. 2024

Zaspalová

1.	OBSAH	
2.	ÚVOD	7
3.	ABSTRAKT	8
4.	ABSTRACT	9
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	10
6.	OBEČNÁ MORFOLOGIE KŮŽE	11
6.1	Epidermis (pokožka)	11
6.1.1	Melanocyty.....	12
6.2	Dermis (korium, cutis, škára)	12
6.3	Tela subcutanea (subcutis, podkoží)	13
7.	ULTRAFIALOVÉ ZÁŘENÍ	13
7.1	Druhy záření	13
7.2	Kožní fototyp	14
8.	MALIGNÍ MELANOM	15
8.1	Definice a etiologie	15
8.2	Patogeneze	15
8.3	Klinický obraz a histopatologické typy	16
8.3.1	Melanoma in situ.....	16
8.3.2	Lentigo maligna melanom (LMM).....	17
8.3.3	Superficiálně se šířící melanom (SSM).....	17
8.3.4	Nodulární melanom (NM).....	18
8.3.5	Akrolentiginózní melanom (ALM).....	18
8.4	Incidence a mortalita v ČR	18
8.5	Terapie	19
8.6	Onkogenní mutace u melanomu	20
8.7	Prevence	21
8.7.1	Primární prevence.....	21

8.7.2	Sekundární prevence.....	21
9.	<i>KLINICKÁ DIAGNOSTIKA MALIGNÍHO MELANOMU</i>	22
9.1	Dermatoskopické vyšetření	22
9.2	Klinický průběh a prognóza	23
9.2.1	ABCD(E) pravidlo	24
10.	<i>SENTINELOVÁ UZLINA</i>	25
10.1	Detekce sentinelové uzliny	25
10.2	Lymfoscintigrafie sentinelové uzliny	26
11.	<i>IMUNOHISTOCHEMIE</i>	26
11.1	Imunohistochemické metody	27
11.1.1	Metody přímé.....	27
11.1.2	Metody nepřímé.....	27
11.2	Protilátky	28
11.2.1	Polyklonální protilátky	28
11.2.2	Monoklonální protilátky	29
12.	<i>LABORATORNÍ ZPRACOVÁNÍ BIOPSIE KŮŽE A SENTINELOVÉ UZLINY..</i>	30
12.1	Evidence (příjem) materiálu	30
12.2	Sampling (přikrojení) materiálu	31
12.3	Tkáňový procesor VIP6.....	32
12.4	Zhotovení parafínového bločku – zalévání.....	34
12.5	Zhotovení nativního preparátu – krájení	35
12.6	Barvení a montování preparátu	36
12.7	Mikroskopování a interpretace výsledků.....	38
12.8	Imunohistochemické barvení	39
12.8.1	Melan-A protilátka (MART-1)	42
12.8.2	Anti-PRAME	42
12.8.3	Melanosome HMB 45	43

12.8.4	SOX-10.....	43
12.9	Barvicí přístroj BENCHMARK ULTRA – VENTANA	44
13.	KAZUISTIKA.....	46
13.1	Pacient XY	46
14.	ZÁVĚR.....	50
15.	SEZNAM OBRÁZKŮ	51
16.	SEZNAM TABULEK	53
17.	POUŽITÁ LETERATURA	54

2. ÚVOD

Maligní melanom je agresivní forma kožního nádoru, který představuje vážný zdravotní problém s vysokou mírou morbidity a mortality. Tento typ nádoru se vyznačuje schopností rychle metastazovat a má potenciál se šířit do dalších částí těla, což ztěžuje jeho léčbu a prognózu pacientů.

Diagnostika maligního melanomu je klíčová pro úspěšnou léčbu a zlepšení prognózy pacientů. Mezi nejdůležitější diagnostické metody patří laboratorní postupy, které umožňují identifikaci maligních buněk a staging nádoru. Jedním z důležitých aspektů diagnostiky je také vyšetření sentinelových uzlin, což jsou první uzliny, kam se nádorové buňky mohou šířit.

3. ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zaměřuje na laboratorní diagnostiku maligního melanomu a zpracování sentinelové uzliny, přičemž poskytuje stručný přehled o tom, co maligní melanom je, jak se provádí jeho diagnostika a jaké existují typy tohoto zhoubného nádoru. Důraz je kladen na význam vyšetření sentinelových uzlin v diagnostice a stagingu melanomu. Hlavním cílem práce je popsat postupy laboratorního zpracování biopsie kůže a sentinelové uzliny, včetně využití imunohistochemických metod. Práce také obsahuje kazuistiku pacienta, která ilustruje význam a aplikaci laboratorní diagnostiky melanomu v klinické praxi. Tímto způsobem práce přináší komplexní pohled na diagnostické postupy v laboratorním prostředí související s maligním melanomem a přispívá k lepšímu porozumění této problematice mezi odbornou a laickou veřejností.

Klíčová slova: maligní melanom, sentinelová uzlina, laboratorní diagnostika, imunohistochemie

4. ABSTRACT

This bachelor thesis focuses on the laboratory diagnosis of malignant melanoma and the processing of sentinel lymph nodes, providing a brief overview of what malignant melanoma is, how its diagnosis is conducted, and the types of this malignant tumor. Emphasis is placed on the significance of sentinel lymph node examination in the diagnosis and staging of melanoma. The main aim of the thesis is to describe the procedures for laboratory processing of skin biopsy and sentinel lymph node, including the utilization of immunohistochemical methods. The thesis also includes a patient case study, illustrating the importance and application of laboratory diagnosis of melanoma in clinical practice. In this way, the thesis provides a comprehensive view of diagnostic procedures in the laboratory environment related to malignant melanoma and contributes to a better understanding of this issue among both professional and lay audiences.

Key words: malignant melanoma, sentinel lymph node, laboratory diagnostics, immunohistochemistry

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce je stručně popsat, co maligní melanom je, jaké máme typy a jak se vyšetřuje. Dále se zaměřuji na důkladný popis laboratorního zpracování biopsie kůže společně se zpracováním sentinelové uzliny dle protokolu, která je nedílnou součástí vyšetření v konkrétní akreditované histologické laboratoři Ústavu patologie FN Královské Vinohrady.

6. OBECNÁ MORFOLOGIE KŮŽE

Kůže, nazývaná také cutis, tvoří vnější obal těla a je největším orgánem lidského těla podle plochy, která se pohybuje mezi 1,5 až 2,0 m² v závislosti na postavě a konstituci jedince. Její tloušťka se pohybuje od 1 do 4 mm podle typu a místa v těle a její hmotnost dosahuje až 3 kg. Skládá se ze 3 hlavních částí, z pokožky (epidermis), škály (dermis, corium) a podkožního vaziva (subcutis, hypodermis). Nedílnou součástí jsou také deriváty epidermis, a to chlupy, vlasy, nehty a žlázové deriváty, včetně mazových, aromatických a mléčných žláz. (1, 2)

Kůže má specifickou roli v ochraně vnitřního prostředí organismu před mechanickými, chemickými a biologickými vlivy a zářením. Kromě toho plní také metabolické funkce, například produkci vitamínu D₃, a dále se účastní látkové výměny a slouží jako exkreční orgán díky svým žlázám. Důležitou funkcí kůže je mimo jiné i termoregulace, díky ní ovládá tepelné ztráty do okolí. (1, 2)

6.1 Epidermis (pokožka)

Epidermis, nejjemnější vrstva kůže má proměnlivou tloušťku od 0,04 mm (na víčkách) po 1,6 mm (na dlaních), s průměrnou tloušťkou kolem 0,1 mm. Je tvořena vrstevnatým dlaždicovým rohovějícím epitelem, který je metabolicky aktivní a skládá se ze dvou hlavních typů buněk: keratinocytů a dendritických buněk (melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. (3)

Epidermis se skládá z několika vrstev: *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*, *stratum lucidum* a *stratum corneum*. V těchto vrstvách můžeme pozorovat různá stadia maturace a uspořádání keratinocytů. V bazální vrstvě epidermis se také nacházejí dendritické buňky – melanocyty, ze kterých právě vychází maligní melanom. (3)

6.1.1 Melanocyty

Jsou to speciální buňky s četnými výběžky neuroektodermálního původu a jsou umístěny ve *stratum basale* (spodní vrstva epidermis) mezi keratinocyty, ve vlasovém folikulu a výjimečně v korii. Tyto buňky obsahují specifické organely nazývané melanosomy, ve kterých se syntetizuje a hromadí tmavý pigment melanin. Melanosomy jsou transportovány ve výběžcích melanocytů k jejich povrchu a dále jsou předávány do cytoplazmy keratinocytů. Každý melanocyt zásobuje pigmentem několik desítek keratinocytů. Jsou citlivé na ultrafialové paprsky a reagují na ně aktivací proliferace a stimulací syntézy melaninu. Jejich funkcí je ochrana před poškozením vyvolaným UV zářením. Melanin absorbuje a rozptyluje UV záření, čímž chrání buňky kůže před škodlivými účinky. (1, 4)

Melanin je složitý pigment, který se vytváří právě v melanocytech v epidermis pomocí melanosomů. Prostřednictvím speciálních výběžků se pak melanin transportuje do keratinocytů, kde se uplatňuje v procesu pigmentace. Množství melaninu v kůži je určeno geneticky a ovlivňuje variabilitu pigmentace u různých lidských ras, což se projevuje různými fototypy. Syntéza melaninu závisí na aktivitě enzymu zvaného tyrozináza, která je kontrolována geneticky. Melanosomy fungují jako struktury poskytující bílkovinnou matrix pro výrobu tyrozinázy, která přeměňuje aminokyselinu tyrosin pomocí různých prekurzorů na finální melanin. (5)

6.2 Dermis (korium, cutis, škára)

Dermis má tloušťku 0,6–3 mm a je 15–40krát silnější než epidermis, přestože má nižší energetické nároky než epidermis. Tato vrstva kůže se skládá z relativně nebuněčné pojivové tkáně zahrnující: kolagenní a elastická vlákna, základní hmotu, fibrocyty, dendrocyty, histiocyty, Langerhansovy buňky, žírné buňky a ojediněle lymfocyty. Také zde můžeme nalézt nervy, cévy, hladké svaly a epiteliální struktury adnex keratinocytů. Dermis lze dále rozdělit do dvou částí: adventiciální dermis a retikulární dermis. Tyto části se liší v uspořádání a síle svazků kolagenu a ve větvení elastických fibril. (3)

6.3 Tela subcutanea (subcutis, podkoží)

Podkoží vzniká z mezenchymu a obsahuje fibrocyty a adipocyty, které jsou základními složkami této vrstvy kůže. Adipocyty neboli tukové buňky, produkují tuk ve své cytoplazmě, což způsobuje, že jádro buňky je stlačeno k periférii. Základní strukturou podkoží je shluk adipocytů nazývaný primární mikrolalůček, který se dále agreguje do sekundárního lalůčku obklopeného fibrózní tkání, zvané septum nebo trabekula.

Arterie a žíly podkoží jsou umístěny v hlavních fibrózních septech, zatímco menší cévy se v těchto septech odvětvují z hlavních krevních cév a zásobují sekundární lalůčky. Každý adipocyt v podkoží je obklopen kapilárou. (3)

7. ULTRAFIALOVÉ ZÁŘENÍ

Celková expozice slunečnímu záření v lidské populaci roste v důsledku trávení dovolených v přímořských a vysokohorských oblastech a také využíváním solárií. Trend zvyšující se expozice slunečnímu záření souvisí s nárůstem incidence všech typů kožních nádorů, včetně melanomu. Historicky bylo UV záření využíváno k léčbě kožní tuberkulózy a ve fotochemoterapii psoriázy a kožních lymfomů. V roce 1928 byl experimentálně vyvolán kožní nádor působením UV záření u myši. Epidemiologické studie ve 40. – 50. letech minulého století prokázaly možnost indukce kožních nádorů působením tohoto záření. Expozice zářením má mnoho negativních účinků jako je spálení kůže, fotodermatózy, předčasné stárnutí kůže, imunosuprese a vznik kožních nádorů. (6)

7.1 Druhy záření

UV záření se dělí do tří hlavních kategorií podle vlnové délky: UVA, UVB a UVC.

- UVA (315-400 nm): Tvoří většinu slunečního UV záření, které dosahuje zemského povrchu. Toto záření proniká hluboko do kůže a je spojeno s fotostárnutím, protože může způsobit tvorbu reaktivních kyslíkových forem, které poškozují buňky. (7)

- UVB (280-315 nm): Mnohem menší část UVB proniká atmosférou, ale má významnější účinky na kůži. Toto záření je spojené s opálením, ale také s popálením sluncem a vznikem kožních nádorů. UVB může přímo poškodit DNA buněk kůže. (7)
- UVC (kratší než 280 nm): Má nejvyšší energii, ale prakticky neprochází atmosférou. Může být nebezpečné pro živé buňky, ale v přirozených podmínkách nám hrozí nepřímo. (7)

Hloubka průniku UV záření do kůže skutečně roste se zkracující se vlnovou délkou, což ovlivňuje, jak různé typy UV záření interagují s buňkami kůže a mohou způsobit poškození. Je důležité chránit kůži před nadměrným vystavením slunečnímu záření a používat opalovací prostředky s odpovídajícím faktorem ochrany před UV zářením. (7)

7.2 Kožní fototyp

Reakce kůže na sluneční záření není u všech jedinců stejná. Intenzita pigmentace po oslunění je ovlivněna celkovou dávkou záření a geneticky kontrolovanou funkční kapacitou melanocytů. Máme celkem pět základních kožních fototypů, kde se hodnotí odstín kůže na místech, která jsou trvale chráněna před působením slunečního záření. Hodnotí se také podle reakce neopálené a nechráněné kůže na dvouhodinovém slunění v průběhu letního bezoblačného dne. (6)

FOTOTYP	VZHLED	REAKCE KŮŽE NA SLUNCE
I.	Světlá až bílá kůže, rezavé vlasy, modré oči, četné pihy	Prakticky vždy se spálí, nikdy nezhnědně
II.	Světlá kůže, blond vlasy, zelené oči, mírný sklon k tvorbě pih	Zčervenání, většinou se spálí
III.	Přirozeně mírně pigmentovaná kůže, tmavé vlasy, různě zbarvené oči (často hnědé)	Zčervenání po intenzivním slunění, většinou přímé zhnědnutí kůže
IV.	Snědá kůže, tmavě hnědé až černé vlasy a hnědé oči	Velmi zřídka zčervená, po oslunění vždy ještě více zhnědne
V.	Přirozeně hnědá kůže, tmavě hnědé až černé vlasy, hnědé oči	Kůže se nikdy nespálí

Tab1. Kožní fototypy. (1)

8. MALIGNÍ MELANOM

8.1 Definice a etiologie

Maligní melanom je zhoubný nádor kůže, který vzniká invazivní neoplastickou proliferací melanoblastů (nezralých melanocytů) v kůži, očích nebo konjunktivách patřící k neuroektodermovým nádorům. Také se může primárně objevit i v jiných orgánech, jako jsou močový měchýř, trávicí ústrojí, v plicích, ovariích nebo žlučníku, ale jeho výskyt v těchto orgánech je vzácný. Nádory se mohou šířit prostřednictvím lymfatického i cévního systému. (8, 9)

Průměrný věk, ve kterém je diagnóza melanomu stanovena, je 56 let, ačkoli se onemocnění vyskytuje u obou pohlaví přibližně stejně, u žen se objevuje v mladším věku. Podle různých zdrojů z literatury vzniká melanom v 30–70 % případů na základě pigmentového névu, zatímco zbytek vzniká na zdravé kůži. (10)

8.2 Patogeneze

Příčiny maligního melanomu nejsou úplně známy. Nádor může vzniknout na normální kůži nebo na základě existujících melanocytových névů, zejména atypických névů, v ložisko lentigo maligna a vzácně i z modrého névu. Podpůrné faktory zahrnují imunosupresivní a kancerogenní účinky slunečního záření, zejména jeho UV složky, geneticky podmíněné fototypy I a II, a familiární výskyt atypických névů nebo melanomu. I krátkodobá expozice, zejména v dětském věku, je spojena se zvýšeným rizikem vzniku melanomu. (8)

Maligní melanom roste ve dvou fázích: horizontálně – radiální fázi anebo vertikálně. V horizontálně – radiální fázi pronikají atypické melanocyty do vyšších vrstev epidermis a vytvářejí klony s různou rychlostí růstu a tvorby melaninu. Ve fázi vertikálního růstu buňky pronikají do koria a dále se zde množí. (8)

8.3 Klinický obraz a histopatologické typy

Časné stádium melanomu nemá výrazné příznaky. Pigmentová léze může mít následující znaky: růst, změny okrajů, pigmentace. Později se může objevit svědění, a jako pozdní příznak i krvácení. Pacienti si mohou být vědomi melanomu až po zranění, kdy nádor začne rychleji růst. Pozdní příznaky zahrnují zvětšení lymfatických uzlin nebo vznik podkožních či vzdálených metastáz. Průběh a prognóza jsou ovlivněny pokročilostí primárního melanomu a časností jeho detekce. (11)

Histopatologické parametry určují závažnost melanomu:

- **Tloušťka nádoru:** Měří se od povrchu nádoru k nejhlubším partiím (hodnota dle Breslowa).
- **Hloubka invaze:** Hodnotí, jak hluboko nádor proniká do koria (označeno dle Clarka, stupně I-V).
- **Povrchová ulcerace:** Hodnotí se, zda vznikla spontánně bez předchozího poranění nádoru.
- **Stav sentinelových uzlin:** První uzlina, do které přitéká lymfa z primárního nádoru, průkaz metastáz zhoršuje diagnózu.

Kvalitní anamnestické informace a pozorování charakteristických znaků pigmentové léze jsou klíčové. Změny ve velikosti, tvaru, barvě a povrchu léze mohou signalizovat maligní charakter. Standardní vyšetření zahrnuje dermatoskopii sledující barevné a strukturální změny. (11)

8.3.1 Melanoma in situ

Melanom in situ reprezentuje počáteční stádium melanomu, kdy se nádor nachází pouze v epidermis a nepronikl bazální membránu do okolních tkání. Lentigo maligna je označení pro melanom in situ, která se vyvíjí na kůži poškozené dlouhodobým působením slunečního záření, převážně na obličeji u starších jedinců. Jeho klinický vzhled je makulózní, plochý, bez výrazných výstupků nebo uzlíků. Má výraznou a často skvrnitou pigmentaci. Okraje mohou být mírně nepravidelné. Jeho velikost je obvykle větší než běžné nezhoubné névy. V této fázi obvykle nezpůsobuje subjektivní obtíže.

Svědění, ulcerace nebo krvácení jsou minimální. Významné je, že melanom in situ trvale roste a může se postupně měnit v jinou klinickou variantu. Je důležité melanom in situ odstranit, aby se zabránilo jeho dalšímu růstu a potenciálnímu průniku do hlubších vrstev kůže a okolních tkání. (6, 12)

8.3.2 Lentigo maligna melanom (LMM)

Lentigo maligna melanom se častěji vyskytuje u starších jedinců, přičemž průměrný věk při diagnóze je 65 let. U mladých lidí je téměř nevýznamný a je velmi zřídka zjišťován až do věku 40 let. Nejčastěji se objevuje na obličeji, zejména tvářích a nose, a méně často na krku, s minimálním výskytem na hřbetech rukou a nohou. Klinicky je lentigo maligna melanom charakterizován vznikem nodulárního růstu v libovolné části původně ploché pigmentace. Histologicky dochází ke změnám v epidermis podobně jako u lentigo maligna, akorát s tím, že přibývá invazivní složka tvořená nepravidelnými shluky melanomových buněk v dermis. Pokud dojde k vertikálnímu růstu, nádor získává schopnost invazivního růstu a metastazování. (6, 12)

8.3.3 Superficiálně se šířící melanom (SSM)

Superficiálně se šířící melanom představuje nejčastější formu tohoto nádoru s ložisky atypických melanocytů hlavně v epidermis s jejich intraepidermálním šířením. Vyskytuje se zejména u lidí středního věku. Projevuje se pomalým zvětšováním, zpočátku stejnoměrně a později nerovnoměrně. Ložisko je světle či tmavě hnědě pigmentované, poměrně ostře ohraničené a obvykle větší než 6 mm. Ložisko se může zvýšit nad okolí, tvar se stává nepravidelným, a na obvodu vznikají nepravidelné výběžky a zářezy. V oblasti melanomu se mohou vyskytnout barevné rozdíly, jako jsou hnědá až černá, světlohnědá, modrošedá nebo modrá část. Barevné rozdíly mohou být způsobeny množstvím a hloubkou melaninu nebo dilatací krevních cév. U SSM je relativně častá spontánní regrese a považuje se za imunitní reakci organismu, která nemá vliv na prognózu nádoru. (6, 12)

8.3.4 Nodulární melanom (NM)

Nodulární melanom je invazivní forma melanomu, která se vyznačuje absencí výrazných intraepidermálních nádorových buněk za okrajem dermální invazivní složky. Převažuje zde vertikální fáze růstu. Je často diagnostikován až v pokročilém stádiu, což je spojeno s horší prognózou, kdy můžeme nacházet různě velké uzly v koriu, bez zastižení iniciální radiální fáze. Klinicky se NM projevuje jako pevné papuly nebo noduly, obvykle s ulcerací a menší pigmentací ve srovnání s jinými invazivními melanomy. Léze jsou často světlejší barvy. Pigmentované NM mohou mít specifické rysy, jako jsou symetrický pigmentový vzor, velké cévy, homogenní modrá pigmentace, symetrický tvar, modro – bílý závoj, růžová a černá barva, které je možné identifikovat pomocí dermatoskopie. Tento typ je charakterizován agresivním chováním a vysokou tendencí k metastazování. (6, 12)

8.3.5 Akrolentiginózní melanom (ALM)

Akrolentiginózní melanom je typ melanomu, který se vyskytuje na ploskách, dlaních a v oblastech nehtů, kdy postihuje obvykle starší jedince okolo 60 let. Je častější u tmavších ras, u bílé rasy je poměrně vzácný. Etiologie tohoto typu není jasná, neboť akrální části nebývají vystaveny UV záření. V patogenezi může hrát roli trauma, stres, macerace či jiná iritace. Často bývá diagnostikován až v pokročilém stádiu, protože mnoho jedinců si nádoru na ploskách všimne, až když je natolik velký, že způsobuje obtíže v botě nebo začíná krváčet. ALM začíná jako plošné, skvrnitě pigmentované, nepravidelné ložisko, které se obvykle invazivně rozrůstá do hlubších vrstev, což může vést k výrazné tloušťce i u zdánlivě ploché léze. Prognóza tohoto typu je špatná, obecně je horší než u melanomů jiných typů podobného stádia. (6, 12)

8.4 Incidence a mortalita v ČR

V České republice bylo v roce 2011 hlášeno celkem 2044 (1086 u mužů, 958 u žen) případů maligního melanomu a dalších 433 (179 u mužů, 254 u žen) případů melanoma in situ. Melanom byl v tomto roce devátou nejčastější diagnostikovanou onkologickou diagnózou. Oproti roku 1980, došlo k nárůstu incidence maligního melanomu na 3,6násobek. Melanoma in situ v roce 1980 nebyl hlášen, došlo tedy k nárůstu incidence

na 4,4násobek. Přibližně od roku 2007 je v absolutních i standardizovaných číslech patrná spíše stagnace incidence melanomu v ČR. (10)

Nejvíce případů melanomu v absolutním počtu je diagnostikováno u mužů i žen ve věkové skupině 60–64 let. V přepočtu na 100 000 obyvatel daného věku a pohlaví je vidět rostoucí trend napříč všemi věkovými skupinami, od věkové skupiny 55–59 let dochází k nárustu případů u mužů oproti ženám, ve věkové skupině 85 a více let je výskyt na 100 000 osob u mužů oproti ženám trojnásobný. (10)

V roce 2011 se podařilo 84,1 % případů maligního melanomu zachytit v prvním nebo druhém stadiu onemocnění, kdy je prognóza léčby příznivá. V roce 2011 zemřelo v České republice celkem 365 lidí na základní příčinu úmrtí – maligní melanom, z toho 201 mužů a 164 žen. Absolutní počty úmrtí způsobených maligním melanomem mírně stoupají v dlouhodobém srovnání, avšak standardizovaná míra úmrtnosti zůstává stabilní. (10)

8.5 Terapie

Základní léčebnou strategií pro primární melanom je chirurgické odstranění nádoru. Při této proceduře je důležité odstranit nádor spolu s dostatečně širokým okolním okrajem zdravé tkáně, přičemž šířka tohoto okraje závisí na tloušťce nádoru. Například u nádorů s tloušťkou do 1,0 mm je postačující okraj o šířce 1 cm, u nádorů s tloušťkou do 4,0 mm se doporučuje okraj o minimální šířce 2 cm a u nádorů s tloušťkou nad 4,0 mm až 3 cm. Tato hloubka excize odpovídá šířce okraje zdravé tkáně, přičemž se neodstraňuje svalová fascie. (8)

U pokročilých melanomů se často provádí vyšetření sentinelové uzliny, která je první uzlinou drenující oblast nádoru, buď současně s odstraněním primárního nádoru nebo následně po potvrzení histopatologické diagnózy. V případě nejasné klinické diagnózy by měla být provedena úplná excize a rozsah dalšího chirurgického zákroku by měl být stanoven až na základě výsledků histologického vyšetření. Jestliže je doporučeno vyšetření sentinelové uzliny (SLN), mělo by být provedeno současně s reexcizí jizvy po neširoké excizi primárního nádoru. Rozsáhlá excize primárního nádoru vylučuje možnost následného vyšetření SLN. (8, 13)

V adjuvantní léčbě pokročilých melanomů s vysokým rizikem metastáz se nejčastěji využívá specifická imunoterapie interferonem α a testují se různé typy vakcín. Volba léčebné metody u metastazujícího melanomu závisí na lokalizaci metastáz a jejich velikosti. U metastáz v orgánech se nejčastěji používá chemoterapie nebo kombinovaná chemoimunoterapie a kostní metastázy se často léčí aktinoterapií, kdy účinnost léčby metastazujícího melanomu je obvykle omezená a průměrná doba přežívání pacientů je obvykle mezi 6 a 9 měsíci. Nejúčinnější léčbou melanomu zůstává jeho včasná diagnostika a chirurgické odstranění. (8)

8.6 Onkogenní mutace u melanomu

Vznik melanomu je složitý proces, který provází genetické a epigenetické změny, jež se mohou dědit nebo vznikat spontánně. Mezi klíčové genetické změny zapojené do vývoje melanomu patří mutace v genech CDKN2A, genové rodiny Ras/Raf, receptorové tyrosinkinázy c-KIT a aktivace signální dráhy PI3K/AKT. (3)

Rodinná predispozice pro melanom je považována za významný rizikový faktor, zejména v případě mutací v genu CDKN2A, které se vyskytují v zárodečné linii. Tyto mutace spojujeme s výskytem jak familiárního, tak sporadického melanomu. Přibližně 20–40 % hereditárních melanomů a 0,2–2 % sporadických melanomů vykazuje mutace v tomto genu. Mutace v CDKN2A mohou zvýšit riziko vzniku melanomu až 53krát v porovnání s běžnou populací. (3)

Genetické odchylky u melanomu často ovlivňují klíčové signální dráhy, které hrají důležitou roli v normální biologii melanocytů. Například mutace v genu BRAF, který kóduje protein zapojený do dráhy RTK-RAS-RAF-MEK-MAPK, jsou časté u melanomů. Další mutace v receptorových tyrosinkinázách, zejména v proteinu KIT, jsou také pozorovány, zejména u lézí v oblastech s malou expozicí UV záření. Aktivace PI3K signální dráhy je dalším mechanismem, který se podílí na vývoji melanomu, a to prostřednictvím regulace buněčné proliferace, růstu a invazivitu buněk. (3)

8.7 Prevence

Hlavní příčinou vzniku většiny kožních nádorů, včetně melanomu, je působení ultrafialového záření (UV). Nejvíce ohroženou skupinou jsou lidé s jasnou kůží, která se snadno spálí, světlými nebo rezavými vlasy a modrýma očima. Dalšími rizikovými faktory pro vznik melanomu jsou rodinná či osobní historie melanomu a přítomnost mnohočetných melanocytárních névů nebo névů dysplastických. (14)

8.7.1 Primární prevence

Primární prevence melanomu je zaměřena na minimalizaci expozice působením mutagenních faktorů na kůži, s důrazem na ochranu před UV zářením, včetně UVB a UVA složek. Základem primární prevence jsou edukační programy, které upozorňují na nebezpečí nadměrné expozice slunečnímu záření a poskytují návod, jak se chránit při pobytu na slunci. Větší pozornost je věnována také užívání solárií a zdůrazňuje se jejich škodlivost, zejména když je kombinováno s přirozeným slunečním zářením. (14)

8.7.2 Sekundární prevence

Sekundární prevence spočívá ve vyhledávání přednádorových lézí nebo časných forem nádoru. Většinu melanomů lze detekovat pouhým pohledem nebo pohmatem což zvyšuje šanci na jejich včasný záchyt. Sekundární prevence zahrnuje osvětu o možnosti sebevyšetřování a sebekontroly. Jednotlivec by měl být povzbuzován k pravidelné kontrole pokožky a návštěvě lékaře v případě podezřelých změn. (14)

Screeningové programy hrají důležitou roli v sekundární prevenci melanomu, buď pro celou populaci nebo zaměřené na specifické skupiny s vyšším rizikem. Úspěšné programy primární prevence by měly vést k postupnému snížení výskytu melanomu, zatímco sekundární prevence by měla vést ke snížení výskytu pokročilých nádorů a snížení úmrtnosti. (14)

9. KLINICKÁ DIAGNOSTIKA MALIGNÍHO MELANOMU

Vyšetření kůže a sliznic je běžně dostupné a prostým pohledem umožňuje rozlišení všech kožních nádorů včas, již v počínající fázi nádorového růstu. Častou a hlavní příčinou pozdě stanovené diagnózy bývá nedostatečná informovanost pacientů, kteří si neuvědomí, že růst a změna pigmentového ložiska mohou značit právě první fázi nádorového růstu. Další příčinou je, že ne každý lékař je schopen odlišit počínající fázi melanomu od benigní pigmentové léze. Pro včasný záchyt je nutné vyšetřené kůže celého těla, včetně dlaní, plosek, kštice a následné porovnávání pigmentových ložisek na trupu, rovněž je třeba provést palpaci spádových lymfatických uzlin. Klinické vyšetření by mělo být periodicky opakováno jako součást sledování pacienta. (6, 15)

V důsledku toho, že se melanom vyskytuje většinou solitárně, je velmi důležitou pomůckou jeho odlišnost od ostatních névů na těle. Melanom je v naprosté většině případů na první pohled výraznější, bývá sytější a nepravidelně pigmentován, větší než okolní projevy a téměř pravidelně je možné pozorovat osovou asymetrii ložiska. Dalším důležitým parametrem jsou anamnestické údaje pacienta o tom, zda předcházela nějaká pigmentová léze, jak dlouho ložisko roste, jestli svědí nebo jestli někdy krvácelo. U většiny nemocných se nelze spoléhat na anamnestické údaje, tudíž diagnóza melanomu často závisí na klinickém obrazu a osobní zkušenosti dermatologa. (6)

9.1 Dermatoskopické vyšetření

Dermatoskopie (epiluminiscenční mikroskopie) je neinvazivní vyšetřovací metoda používaná v klinické praxi. Slouží k detailnímu zkoumání morfologie lézí, což umožňuje lépe viditelné detaily díky zvětšení poskytovanému lupou nebo dermatoskopem. Dermatoskop umožňuje *in vivo* vizualizaci barevných změn a struktur až do papilární dermis, odhaluje strukturální detaily, které nejsme schopni rozeznat pouhým okem. Problémy s diagnostikou mohou vznikat v důsledku subjektivity hodnocení, nedostatku standardizovaných kritérií a obtížné reinterpretace výsledků. Digitální zpracování a uchování fotografií umožňuje sledování změn v čase a detailní analýzu léze. (3, 11)

K definitivní diagnóze je nutné zhodnotit klinické a případně histopatologické nálezy. Hlavním cílem dermatoskopického vyšetření pigmentových lézí je rozlišení melanocytárních od nemelanocytárních lézí, benigních melanocytárních od maligních a

rozhodnutí o tom, zda podezřelou lézi excidovat nebo sledovat, a také vyhodnocení bodovacího systému pro maligní melanom. (3, 11)

Vyšetření probíhá tak, že se dermatoskopická hlavice pevně přiloží na lézi a aplikuje se imerzní roztok pro lepší viditelnost. Díky imerznímu roztoku dochází k odstranění lomu světla na nerovném povrchu lézí a následně dojde k zprůhlednění rohové vrstvy. Jako imerzní roztok se obvykle používá 70 % etanol nebo gel určený pro sonografické vyšetření. Poté se podezřelá léze hodnotí po osvětlení diodovým světlem. (3, 11)

9.2 Klinický průběh a prognóza

Chování melanomu je často nepředvídatelné a často se projevuje agresivním způsobem s rozsáhlými a častými metastázami v těle (prakticky kdekoliv). Avšak jsou také relativně časté pozdní metastázy, které se mohou objevit i mnoho let po odstranění primárního nádoru, zejména do lymfatických uzlin, jater, plic, kostí, centrální nervové soustavy, a i do kůže. Mezi klinické a patologické znaky, které pomáhají rozlišit pigmentovaný névus od melanomu, spadají tzv. ABCDE kritéria. (10)

U přibližně 20 % primárních kožních melanomů dochází k přirozené regresi, která obvykle bývá částečná a zřídka kompletní. Klinický význam této regrese není úplně zřejmý, ale u těchto melanomů se předpokládá nižší riziko metastazování do sentinelových uzlin. (12)

Hloubka invaze	5leté přežití
<0,8	95–100 %
1–2 mm	80–95 %
2,1–4 mm	60–75 %
> 4 mm	50 %

Tab2. Prognóza pacientů s melanomem v závislosti na hloubce invaze nádorových melanocytů. (2)

9.2.1 ABCD(E) pravidlo

V roce 1985 byla představena pomůcka pro včasné rozpoznání kožního melanomu, která se stala široce využívanou jak ve zdravotnických kruzích, tak i mezi laickou veřejností, která se hojně využívá dodnes. Tato pomůcka je známá pod akronymem ABCD(E) a detailně popisuje charakteristiky typické pro začínající melanom. Pokud se vyšetřované pigmentové ložisko shoduje s následujícími parametry, je vždy nezbytné vzít v úvahu možnost melanomu a pacienta indikovat k vyšetření v melanomovém centru. (6)

	Běžné získané névy	Dysplastické névy	Melanom
A – tvar	symetrický	asymetrický	asymetrický
B – okraje	pravidelné	nepravidelné	nepravidelné
C – barva	uniformné	skvrnitá	skvrnitá
D – velikost	2–10 mm	> 10 MM	> 10 mm
E – vývoj	pouze dočasně symetrické zvětšování	pouze dočasně	vždy a trvale ABCD

Tab3. ABCDE charakteristika névů a melanomu. (3)

Akronym ABCD(E) znamená:

- **A (asymmetry)** – ložisko má asymetrický tvar, který se výrazně liší od ostatních pigmentových projevů na kůži.
- **B (border)** – okraje jsou nepravidelné s mnoha zářezy a výběžky, kterými se nádor postupně šíří do okolí.
- **C (color)** – barva začínajícího melanomu je obvykle výrazná, tmavě hnědá s častými barevnými nepravidelnostmi, v ložisku se vyskytují různé odstíny hnědé nebo černé barvy, často i růžové, červené nebo šedomodré a bílé plošky.
- **D (diameter)** – alespoň jeden rozměr ložiska přesahuje 6 mm, melanomy menší než 6 mm jsou velmi vzácné, spíše jsou začínající melanomy větší než 10 mm nebo se této velikosti blíží.

Obvykle je nutné, aby ložisko splňovalo 3–4 z uvedených parametrů, aby bylo vyjádřeno podezření na začínající melanom. K dalšímu zlepšení přesnosti byl k ABCD parametrům přidán nový ukazatel označovaný jako E (evolving), který označuje vývoj ložiska. Kromě změn velikosti jsou pro začínající melanom charakteristické i postupné změny ve všech typických rysů. (6)

10. SENTINELOVÁ UZLINA

Výskyt melanomu za poslední tři desetiletí značně vzrostl, s odhadem 106 110 nových diagnóz a 7180 úmrtí v roce 2021. Míra přežití je silně ovlivněna stádiem nemoci v době diagnózy, které je určeno zasažením lymfatických uzlin. Biopsie sentinelových lymfatických uzlin (SLN) – prvních uzlin zapojených do šíření lymfy – může předpovědět potenciál rakoviny v místním uzlinovém povodí nebo mimo něj. Histologie sentinelové uzliny odráží histologii zbývajících uzlin v lymfatickém povodí. Lymfatické mapování s biopsií SLN (SLNB) je spojeno s mnohem menším rizikem komplikací než regionální lymfadenektomie a doporučuje se u pacientů s vyšším rizikem metastáz. SLNB poskytuje důležité informace pro prognózu a léčbu. (16)

10.1 Detekce sentinelové uzliny

Detekce sentinelové uzliny může být provedena dvěma různými metodami. První z nich je vitální barvení, při kterém se používá lipofilní barvivo, nejčastěji lymfotropní patentní modř. Toto barvivo se rychle adsorbuje do lymfatického systému po aplikaci k primárnímu nádoru a zbarvuje lymfatickou cévu a první uzlinu. V případě šíření barviva ve více směrech od primárního nádoru jsou všechny první zbarvené uzliny označeny jako sentinelové. (17)

Druhou technikou je detekce gama záření po aplikaci značeného koloidu. Větší částice koloidu se šíří lymfatickým systémem pomaleji a jsou fagocytovány v první uzlině. Aplikace radiokoloidu musí být provedena s dostatečným předstihem, obvykle 2–24 hodiny před operací. (17)

I když obě metody jsou považovány za komplementární u řady nádorů, nejlepší výsledky při identifikaci sentinelové uzliny jsou dosaženy při jejich kombinovaném použití. Avšak tato vyšší úspěšnost je vyvážena zvýšenou technickou a finanční náročností procedury a zátěží pro pacienta. (17)

10.2 Lymfoscintigrafie sentinelové uzliny

Účelem lymfoscintigrafie sentinelové uzliny je identifikovat polohu sentinelové uzliny a určit, které spádové lymfatické uzliny odvádějí lymfu z oblasti primárního nádoru, což může naznačovat možnost vzniku lymfatických metastáz. Tato metoda také umožňuje vzniku hrubý odhad počtu sentinelových uzlin v různých oblastech, identifikaci tzv. intranzitních uzlin a/nebo signalizaci sentinelové uzliny v neobvyklých lokalitách. Označení polohy uzliny na kůži v jedné nebo dvou projekcích během lymfoscintigrafie usnadňuje chirurgovi její nalezení, což je zvláště důležité v případech, kdy má zdravotnické zařízení s detekcí sentinelových uzlin omezené zkušenosti. Tato technika lymfoscintigrafie také může pomoci rozlišit sentinelové uzliny od ostatních spádových lymfatických uzlin. (17)

11. IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemie je laboratorní metoda využívající principů imunologických metod při zkoumání buněk nebo tkání. Pokud definujeme histochemii jako identifikaci chemicky definovaných složek in situ, tedy přímo v buňkách, tkáňových kulturách nebo řezech tkáňových bloků, pak imunohistochemie, která je její součástí, využívá k této identifikaci specifické vazby mezi antigeny a protilátkami. Protilátky jsou obvykle spojeny s enzymem nebo fluorescenčním barvivem. Antigeny nebo jejich antigenní determinanty jsou detekovány v buňkách a tkáních pomocí protilátek, které se vážou na buňky a tkáňové řezy. (18, 19)

Poté, co se protilátky navážou na antigen ve vzorku tkáně, dojde k aktivaci enzymu nebo barviva a antigen pak lze vidět pod mikroskopem. Tyto antigeny mohou být přítomny ve tkáních buď endogenně, nebo exogenně. Když je v tkáni přítomná antigenní determinanta, proti níž je specifická protilátka namířena, protilátka se na ní připojí svou vazebnou částí. Tuto vazbu nebo navázanou protilátku lze zobrazit různými způsoby. (18, 19)

V posledních desetiletích se imunohistochemie stala užitečným nástrojem pro výzkum biologických objektů, který doplňuje histologické a elektronmikroskopické metody na jedné straně a biochemické a molekulárně genetické metody na straně

druhé. Imunohistochemie může být prováděna jak na úrovni světelné, tak elektronové mikroskopie. (18)

11.1 Imunohistochemické metody

Metoda detekce primární protilátky, která je navázána na požadovaný antigen v imunohistochemických metodách, může být buď přímá anebo nepřímá. Volba přímé nebo nepřímé detekce je často předepsána hladinou exprese cílového antigenu. (20)

11.1.1 Metody přímé

V metodách přímé detekce je primární protilátka přímo konjugována se značkou k detekci požadovaných antigenů ve tkáni. I přesto, že tyto metody jsou jednoduché a časově méně náročné, jsou obvykle méně citlivé a postrádají schopnost zesilovat slabé signály. Přímá detekce je vhodná pro detekci vysoce exprimovaných antigenů. Pro přímou detekci může být využita primární protilátka konjugována s enzymem, jako je křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza nebo fluorochrom. Výhodou přímé detekce je, že není nutný další inkubační roztok se sekundárním činidlem. (20, 21)

11.1.2 Metody nepřímé

Během nepřímé detekce je primární protilátka vázána značenou sekundární protilátkou, která byla vypěstována proti hostitelskému druhu primární protilátky. Nepřímé metody mohou také zahrnovat kroky zesílené pro zvýšení intenzity signálu. Tato detekce je vhodnější pro studie slabě exprimovaných antigenů, které těží z amplifikace signálu zajišťovaného sekundárním činidlem. Amplifikace signálu nastává prostřednictvím potenciálu dvou nebo více značených sekundárních protilátek vázat se na každou primární protilátku. Použití sekundární protilátky však vyžaduje další blokovací kroky a kontroly. Signál může být také zesílen použitím avidinu nebo streptavidinu s biotinylovanými sekundárními protilátkami. Amplifikace vzniká schopností každé molekuly avidinu nebo streptavidinu vázat se na 4 biotinylované sekundární protilátky. Použití metod založených na biotinu však vyžaduje další blokovací kroky, aby se zabránilo nespecifické vazbě na endogenní biotin. (21, 22)

11.2 Protilátky

Monoklonální a polyklonální protilátky se podstatně liší svým původem, specifičností a použitím. Monoklonální protilátky pocházejí z jediného buněčného klonu a projevují vysokou specifickou vazbu na jediný epitop na cílovém antigenu s konzistentní strukturní jednotformitou. Naopak polyklonální protilátky jsou odvozeny z mnoha klonů B buněk a mají širší schopnost rozpoznávat různé epitopy, což vede k větší strukturní diverzitě. (23)

Výroba monoklonálních protilátek často vyžaduje více času a je nákladnější, což je činí vhodnými pro specifické aplikace, jako je diagnostika a cílená terapie. Naopak polyklonální protilátky jsou rychleji dostupné a mají nižší náklady, což je činí vhodnými pro různé výzkumné aplikace. Volba mezi monoklonálními a polyklonálními protilátkami závisí na konkrétních požadavcích experimentu nebo aplikace, a to včetně faktorů jako je přesnost zaměření, cena a potřebný rozsah rozpoznávání epitopu. (23)

11.2.1 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky jsou séra získaná opakovanou imunizací zvířat specifickým antigenem a představují důležitý nástroj v biomedicíně výzkumu již po mnoho desetiletí. Široké spektrum makromolekul, jako jsou proteiny a polysacharidy, může sloužit jako antigeny, což znamená, že mohou vyvolat tvorbu specifických protilátek. Imunitní systém může rozpoznat i antigenní determinanty, které jsou si velmi podobné, a to díky specifitě protilátek, která je založena na komplementaritě mezi vazebným místem protilátky a epitopem. (18)

Každý klon B lymfocytů produkuje protilátku s jednou specifitou, která rozpoznává jednu antigenní determinantu, což vede k polyklonální odpovědi. Polyklonální sérum je směsí protilátek s různou specifičností a afinitou k antigenu, různých tříd a podtříd, a různých biologických a fyzikálně-chemických vlastností. Tyto protilátky se získávají odběrem krve po opakované imunizaci a jejich kvalita může být vylepšena čištěním. (18)

11.2.2 Monoklonální protilátky

V roce 1975 Köhler a Milstein vyvinuli techniku, která umožňuje růst buněčné populace jednoho klonu, který produkuje požadované monoklonální protilátky, in vitro. První fáze přípravy monoklonálních protilátek je podobná přípravě polyklonálního séra, kdy je zvíře, nejčastěji myš, imunizováno vybraným antigenem. Buněčná suspenze z imunizované sleziny je poté fúzována s relativně nesmrtelnými myelomovými buňkami, které jsou odvozené od mutantní buněčné linie nádorových B lymfocytů a ztratily schopnost syntetizovat molekuly Ig. (18)

Fúze buněk se provádí nejčastěji pomocí polyethylenglykolu, který stimuluje fúzi membrán, následovanou fúzí jader. Hybridní buňky jsou následně kultivovány v selekčním médiu obsahující hypoxantin, aminopterin a thymidin (HAT medium). Aminopterin blokuje hlavní cestu syntézy nukleotidů, takže buňky v HAT médiu přežívají jen pokud mají enzym hypoxantin nebo thymidinkinázu (TK), které jsou nezbytné pro alternativní metabolickou cestu syntézy nukleotidů. (18)

Tyto vybrané klony, známé jako hybridomy, jsou dále množeny a jsou vybírány záměrně tak, aby obsahovaly myelomové linie defektní v enzymu HGPRT nebo TK, čímž zajišťuje, že myelomové buňky v HAT médiu hynou. Vybrané hybridomy jsou dále testovány na produkci protilátek specifických pro daný antigen. Monoklonální protilátky produkované jedním hybridomem jsou identické, což znamená, že jsou jedné třídy (nebo podtřídy), váží se na stejnou antigenní determinantu s podobnou afinitou a mají stejné fyzikálně-chemické vlastnosti. (18)

12. LABORATORNÍ ZPRACOVÁNÍ BIOPSIE KŮŽE A SENTINELOVÉ UZLINY

V laboratorním zpracování se zaměřuji na histologické zpracování vzorků kůže a sentinelových uzlin týkající se interních standardizovaných postupů histologické laboratoře v Ústavu patologie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady.

Je to důležitý proces, který zahrnuje příjem, přikrojení, zpracování, krájení, základní přehledné barvení, imunohistochemické barvení a mikroskopické vyhodnocení tkáňových vzorků získaných z biopsie nebo chirurgického zákroku. Tento proces umožňuje detailní zkoumání struktury a morfologie tkání, což nám poskytuje informace o možných patologických změnách nebo diagnóze onemocnění. (24)

- V průběhu procesu zpracování tkání až po konečnou kompletaci průvodky lékaři i laborantka průběžně provádějí:
 - Shodu a kvalitu značení materiálu, průvodky, bloku a podložního skla.
 - Průběžnou kontrolu kvality zpracování (prosycení, tloušťky řezu, kvality barvení). (24)

12.1 Evidence (příjem) materiálu

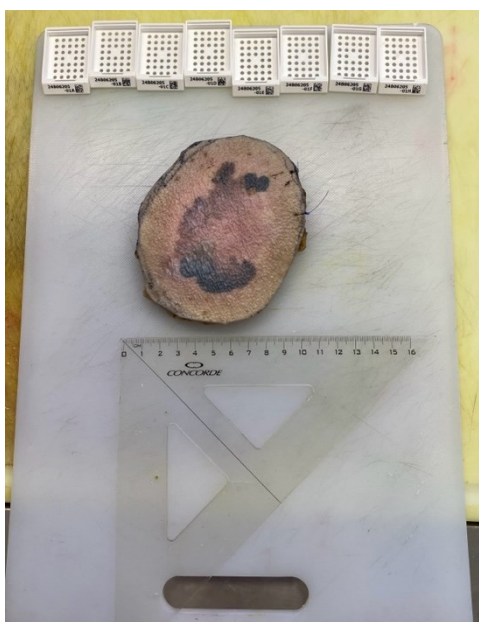
Vzorky jsou do příjmové části laboratoře dopravovány z jednotlivých klinik a oddělení FNKV a dalších zdravotnických zařízení: pracovníky dopravního oddělení FNKV, pracovníky jednotlivých oddělení a klinik FNKV, externím přepravcem – vzorky z jednotlivých ordinací, biopsie ke konzultaci, příbuznými pacientů, případně pacientem, kteří byli posláni ošetřujícím lékařem.

Odběr a fixaci primárního vzorku provádí lékař klinik na klinickém pracovišti mimo Ústav patologie. Veškerý materiál k vyšetření je doprovázen elektronickou papírovou průvodkou, kde je uvedena identifikace. Spolu s materiálem, který je dodán do laboratoře, je možné předávat přejímajícímu laborantovi k podpisu knihu odběrů z odesílajícího oddělení v níž je laborant provádějící prvotní příjem a kontrolu povinen otisknout svoje identifikační razítko a potvrdit tak správnost a kompletnost dodávky. Laborant každou průvodku označí pořadovým číslem a doplní je i na nádobu s materiálem. (24)

12.2 Sampling (přikrojení) materiálu

Laborant nebo THP doplňuje ve spolupráci s lékařem tzv. makropopis (vzhled tkáně, velikost, barva apod.), který je v součinnosti s určováním mikroskopického hodnocení. Během procesu se zapisuje v elektronické podobě (diktování do programu), popřípadě na průvodku nebo přiložený list papíru označený číslem případu. Na přední stranu průvodky vpravo se z důvodu přehlednosti doplňuje počet bloků, které se zpracovávají. Na zadní stranu průvodky do razítkového vzoru se píšou kódy pro pojišťovnu. (24)

V průběhu přikrajování, či makroskopického posouzení materiálu lékařem vytiskne laborant kazetku s číslem materiálu s pořadovým písmenem, do které je přikrojený materiál vložen. Malé kožní excize se ukládají ještě do filtračních papírků z důvodu eliminace ztráty materiálu při zpracování. Další barvicí metody a požadavek na přikrojení určuje lékař. Pečlivě uzavřené kazetky následně vkládá do košů, které zavěsí do tkáňového procesoru. Zbývající materiál, který se nezpracoval v celém rozsahu, je podle čísel uskladňován do skříní na materiál s odtahem. Jeho likvidace je možná až po stanovení konečné diagnózy. (24)



Obr. 1 Přikrajování (vlastní zdroj)

Malé vzorky, u kterých se nevyžaduje přikrojení lékařem, je popis a příprava vzorků úkolem laboranta, a to popis a naložení do kazet. Laborant vytiskne kazetku s příslušným číslem a pořadovým písmenem, do které je přikrojený materiál vložen. Údaje o počtu bloků a speciálních metodách se zapisují ručně do bioptické knihy. (24)

12.3 Tkáňový procesor VIP6

Tkáňový procesor Sakura VIP6 je výkonný automatický přístroj určený ke zpracování vzorků tkání procesem odvodnění a následného prosycení tkáně parafínem postupným přečerpáváním reagentů do reakční nádoby dle nastaveného programu. Cirkulace reagentů okolo vzorků je zajištěna přečerpáváním roztoků v reakční nádobě, proces lze zkvalitnit a urychlit nastavením teploty, vakua nebo přetlaku v reakční nádobě. Tkáňový procesor je určený jak k rutinní práci, tak pro aplikace v lékařském a technickém výzkumu. Maximální počet zpracovaných kazet v 1 cyklu je 300. (24)

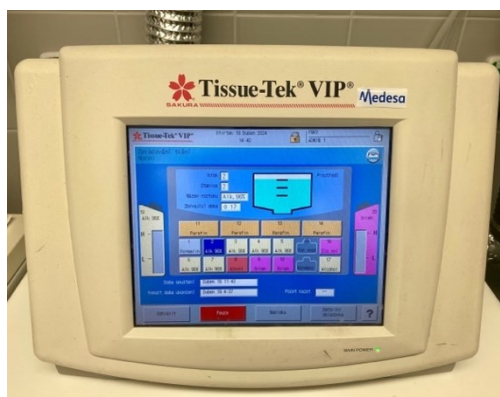


Obr.2 Tkáňový procesor VIP 6 (vlastní zdroj)

Kroky v procesu zpracování tkání:

1) Fixace tkáně

Proces fixace tkáně probíhá v 10 % formolu okamžikem startu přístroje, v případě nastavení opožděného startu tkáně v tomto roztoku čekají na spuštění vlastního procesu nebo při krátkém programu se tento krok vynechává (tkáně jsou vkládány již fixované). (24)



Obr.3 Tkáňový procesor VIP 6 (vlastní zdroj)

2) Odvodnění tkáně

Odvodnění tkání se provádí řadou 6 lázní alkoholů (96 % lihobenzín). (24)

3) Prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafín

Prosycení tkání se provádí: roztok alkohol xylen 1:1, xylen, xylen. (24)

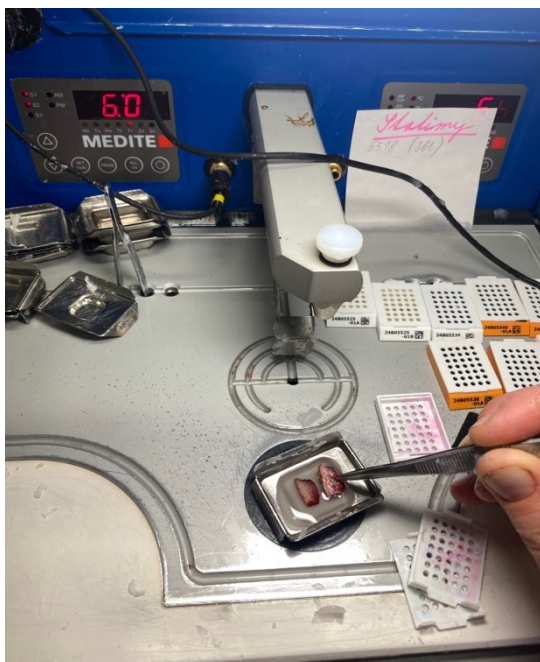
4) Prosycení tkání parafínem

K prosycení tkání je používán parafín ve 3 lázních předem rozpuštěný v zásobnících parafínu při teplotě 58–60 stupňů. (24)

5) Ukončení procesu zpracování tkání (24)

12.4 Zhotovení parafínového bločku – zalévání

Zalévání histologického vzorku provádíme v parafínové lince TES 99, která se dále skládá z předehřívacího modulu a chladicího modulu. K zalévání používáme parafín pro histologii, který je předem rozpuštěn v termostatech a přefiltrován. Přefiltrovaný parafín lijeme do tankeru v parafínové zalévací stanici. Stanice je naprogramovaná tak, aby byla za pomoci časového spínače vždy dvě hodiny před používáním zapnuta, a to za účelem rozpuštění parafínu. Před vlastním zaléváním zapneme chladicí modul. Vyjmeme kazety s materiálem z tkáňových procesorů a přeneseme do vyhřívané nerezové vany (parafín nesmí ztuhnout). Následně na vyhřívané části linky otevřeme víčko kazety, zkontrolujeme vzorek, dle velikosti tkáně vybereme vhodnou zalévací formičku. (28) Používají se kovové formičky (podle rozměrů tkáně různé velikosti), na dno formičky nalijeme parafín. Poté do parafínu orientujeme tkáň. Tkáň musí být zalita na řeznou plochu a lehce přitlačena ke dnu vaničky. U vícečetných vzorků kontrolujeme počet kousků s údajem na hraně kazety. Dále formičku společně s tkání prudce zchladíme na chladícím bodu (zafixování polohy vzorku). Na formičku se přitlačí kazetka, dolije se parafín a takto připravený bloček se přenesse na chladící desku eventuálně do mrazničky. Po zchlazení se bloček z formičky vyklopí. (24)



Obr.4 Zalévání (vlastní zdroj)



Obr.5 Zalévání (vlastní zdroj)

12.5 Zhotovení nativního preparátu – krájení

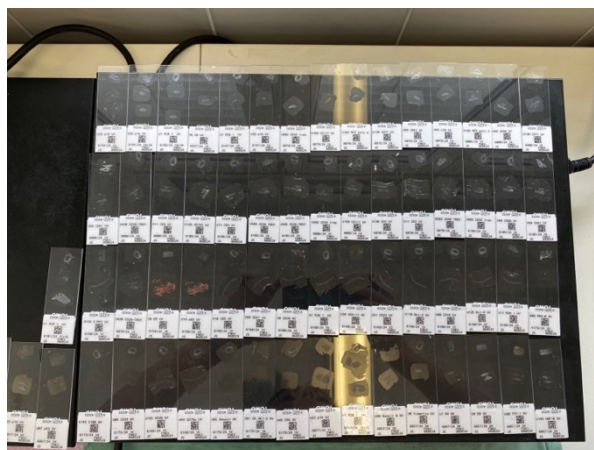
Parafínové bloky krájíme na sáňkových mikrotomech. Před samotným krájením je nutné blok zchladit, pro tento účel používáme chladicí plotny, které jsou součástí pracovního stolu. Parafínový bloček se pevně upne do neapolské svorky mikrotomu. Nejprve se nahrubo odstraní přebytečný parafín a to tak, aby byla celá tkáň v řezu. Tloušťka krájených řezů je 0,5–1 μm . Pro krájení používáme výhradně mikrotomové držáky na mikrotomové žiletky. U označení „prokr“ prokrojíme bloček ve více řezech, do hloubky tkáně, na jedno podložní sklo. (24)

Ukrojené řezy se přenesou na vodní hladinu, kde dochází k narovnání řezů. Na sklo natahujeme jeden nebo více řezů a dbáme na to, aby byly umístěny uprostřed skla ve správné orientaci. Před napnutím se zkontroluje shoda v čísle bloku a skla. Skla osušíme, necháme okapat a dosušit na vyhřívaných ploténkách, poté je vkládáme do stojánků, které rozlišujeme na základní a speciální barvicí metody.

Stojánky se skly se suší automaticky přímo před barvením v barvicím automatu. (24)



Obr.6 Krájení (vlastní zdroj)



Obr.7 Nativní preparáty (vlastní zdroj)

12.6 Barvení a montování preparátu

Základním přehledným barvením pro histologický materiál v preparátech je barvení metodou hematoxylin – eosin. Jádra buněk jsou hematoxylinem obarvena modře, cytoplazma buněk a vazivo jsou eosinem obarveny růžově, svalovina červeně. Barvení a montování preparátu provádíme výhradně v barvicím automatu PRISMA FILM. (24)

POSTUP BARVENÍ:

1. Deparafinace – řezy se musí zbavit parafínu před barvením ve vodných roztocích.

To se provádí sestupnou alkoholovou řadou.

Xylen 5 minut

Xylen 5 minut

96 % etanol 3–5 min

80 % etanol 3–5 min

70 % etanol 3–5 minut

2. Zavodnění
3. Vlastní barvení – odparafinované a zavodněné řezy se barví nejprve roztokem hematoxylinu 3–10 minut.
4. Prání v tekoucí vodě 5 minut.
5. Následuje barvení eosinem 1–3 minuty.
6. Oplach ve vodě.
7. Odvodnění.

Alkohol 70 %

Alkohol 80%

Alkohol 96%

Aceton 5 minut

Aceton 5 minut

Xylen 5 minut

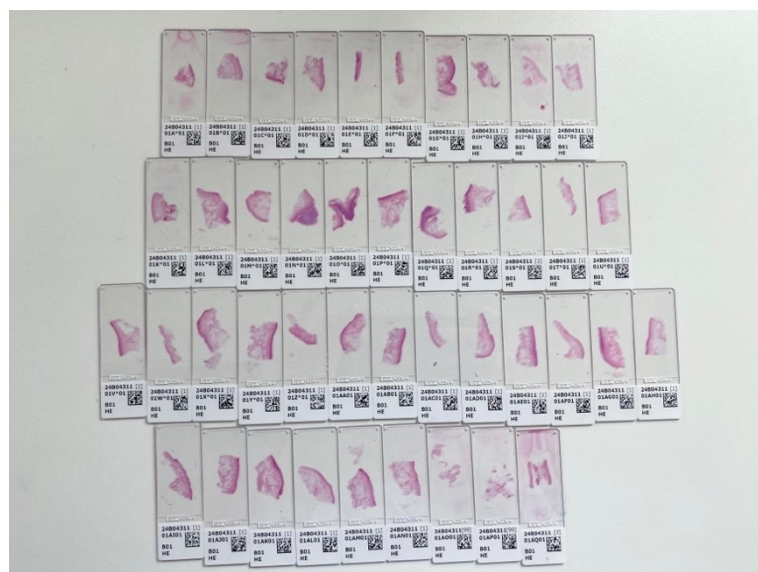
Xylen 5 minut

Řezy se v xylenu zároveň projasní. Po projasnění musí být zcela průhledné, nesmí na nich zůstat bělavě zakalená místa, to by bylo známkou špatného odvodnění. (25) Projasněné řezy montujeme pomocí montovacího média (umělá pryskyřice např. pertex). Jsou to látky rozpustné v xylenu a vyznačují se vysokým indexem lomu světla. Koš s preparáty je transportován z barvícího automatu PRISMA přímo do montovacího automatu FILM, v programu bez montování končí v transportní lázni xylenu. (24)



Obr.8 Barvící automat PRISMA FILM (vlastní zdroj)

Montování je prováděno pomocí folie. Hotové preparáty dále řadíme k průvodkám podle čísel s průvodkami do desek. Takto zkompletované preparáty s průvodkou expedujeme lékaři k posouzení, určení diagnózy. (24)



Obr.9 Obarvené preparáty hematoxylin-eosin (vlastní zdroj)

12.7 Mikroskopování a interpretace výsledků

Histologickou diagnózu melanomu lze určit prostřednictvím podrobného posouzení struktury a vlastností buněk nádoru, oblasti, kde se nacházejí melanocyty a způsobu, jakým se šíří. (13)

Hodnotí se:

- Breslow – měří tloušťku primárního nádoru (udává se v milimetrech – ve vertikálním směru, od povrchu stratum granulosum až po nejhlubší část nádoru)
- Hodnocení podle Clarka – posuzuje hloubku invaze (hodnocetí podle stupnice od I do V; stupeň I: buňky nádoru jsou omezeny pouze na epidermis, stupeň V: nádorové buňky pronikají až do podkožní tukové tkáně)
- Počet mitóz – hodnotí se stanovováním tzv. mitotického indexu, což je hodnota stanovená na základě počtu mitóz na milimetr čtvereční.
- Ulcerace – představuje druhý nejvýznamnější prognostický faktor, který ovlivňuje rozsah onemocnění.
- Vzdálenost od spodiny
- Vzdálenost od laterálního okraje
- Regresi
- Angioinvazi
- Perineurální šíření
- Satelity
- Póly (s nádorem, bez nádoru)

Pokud lékař potřebuje lépe určit diagnózu, může použít speciální barvení tkáně, což poskytne důležité informace o typech buněk v nádoru nebo tkáni a jejich vlastnostech. V případě, že nádor dosahuje velikosti 1 mm nebo větší, nebo pokud tenký tumor vykazuje nepříznivé prognostické znaky, jako je například ulcerace nebo vyšší počet mitóz, lékaři provádějí biopsii sentinelové uzliny, což pomáhá určit rozsah nemoci. (26, 27)

12.8 Imunohistochemické barvení

Na našem pracovišti je možné vzorek vyšetřit imunohistochemicky: manuální metodou anebo pomocí přístroje VENTANA BMK ULTRA. Imunohistochemické barvení obecně umožňuje vizualizaci antigenů prostřednictvím sekvenční aplikace specifické protilátky (primární protilátka) proti antigenu, sekundární protilátky (spojovací protilátka) proti primární protilátce, komplexu enzymů a chromogenního substrátu, která je proložena promývacími kroky. Enzymatická aktivace chromogenu vede k viditelnému reakčnímu produktu v místě antigenu. Vzorek pak musí být doplňkově obarven a zakryt krycím sklíčkem. (28)

- 1) Deparafinace
 - 3 x xylén.....5 minut
 - 3 x alkohol.....5 minut
- 2) Destilovaná voda.....oplach
- 3) Odmaskování antigenu – vodní lázeň, pufr dle datasheetu.....30 minut
- 4) Chladnutí při RT v pufru mimo vodní lázeň.....25 minut
- 5) Destilovaná voda.....oplach
- 6) Blok endogenní peroxidázy pomocí 3 % H₂O₂.....10 minut
- 7) TRIS pufr.....oplach
- 8) Primární protilátka.....60 minut
- 9) Destilovaná voda.....oplach + 5 minut
- 10) TRIS pufr.....oplach + 5 minut
- 11) Sekundární protilátka konjugovaná s enzymem.....30 minut
- 12) Destilovaná voda.....oplach + 5 minut
- 13) TRIS pufr.....oplach + 5 minut
- 14) Aplikace substrátu s chromogenem (DAB).....do zhnědnutí popř. 0,5 – 3 min
- 15) Vodovodní voda.....oplach
- 16) HE.....1-3 minut
- 17) Modrání v teplé vodovodní vodě.....5 minut
- 18) Odvodnění, projasnění
 - 3 x alkohol.....2 minuty
 - 2x aceton.....1 minuta
 - 1x aceton-xylén.....1 minuta
 - 3 x xylén.....2 minuty
- 19) Montování

6) Deparafinace

Deparafinace znamená odstranění parafinu z vyšetřovaného řezu pomocí tří lázní xylenu a tří lázní alkoholů. (28)

7) Odmaskování (odkrytí) antigenu

Antigeny a jejich antigenní determinanty (vazebná místa pro protilátky) mohou být po fixaci hůře dostupné některým protilátkám, proto je odmaskování antigenu nezbytné pro navázání protilátky s antigenem. K odmaskování antigenu lze použít vodní lázeň, mikrovlnou troubu, tlakový hrnec, případně autokláv. U některých protilátek se doporučuje enzymatické odkrytí. (28)

8) Zablokování endogenní peroxidázy

Je důležitým krokem imunohistochemického vyšetření. Endogenní peroxidáza je enzym, který je přítomný ve všech tkáních těla. Ovšem peroxidázou je také značena sekundární protilátka. Proto je třeba zablokovat endogenní peroxidázu ve tkáni pomocí 3 % H₂O₂ (10 ml 30 % H₂O₂ dolít do 100 ml destilované vody, puftrem nebo metanolem), aby nedocházelo k falešně pozitivním výsledkům a nespecifickému zabarvení pozadí. (28)

9) Primární protilátky mohou být buď dodávány ve formě koncentrátů nebo komerčně naředěné ve formě RTU (Ready to use). Koncentráty se ředí pomocí ředícího roztoku, na našem pracovišti využíváme Antibody Diluent (AD) od firmy DAKO. (28)

10) Sekundární protilátka konjugovaná s polymerem značeným peroxidázou je dodávána firmou DAKO – HRP EnVision. (28)

11) Chromogen DAB (3,3'-diaminobenzidin) je dodáván firmou DAKO spolu s puftrovaným substrátem a ředí se v poměru 1 ml substrátu a 1 kapka chromogenu. Aplikuje se na dobu 30 vteřin až 3 minuty dle typu protilátky a přiměřeně reakci. (28)

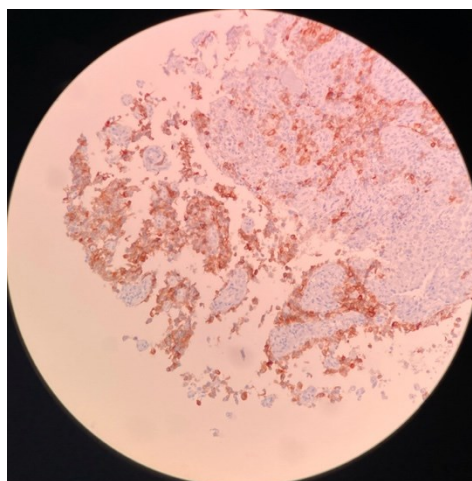
KONTROLY

V rámci interní kontroly kvality má naše pracoviště nastavenou frekvenci používání kontrol a konkrétní kontrolní tkáně pro určité skupiny protilátek. Kontrolní tkáň používáme na každé vyšetřované sklo. Barvením vyšetřované tkáně současně s kontrolní tkání se ubezpečíme, že proces imunohistochemického barvení proběhl správně. Můžeme si být jisté jak pracovním postupem, tak kvalitou použitých roztoků a také tím, že i v BMK ULTRA proběhl pracovní proces bezchybně. (28)

Na našem pracovišti se maligní melanom a sentinelová uzlina vyšetřuje imunohistochemicky pomocí několika monoklonálních protilátek: (28)

12.8.1 Melan-A protilátka (MART-1)

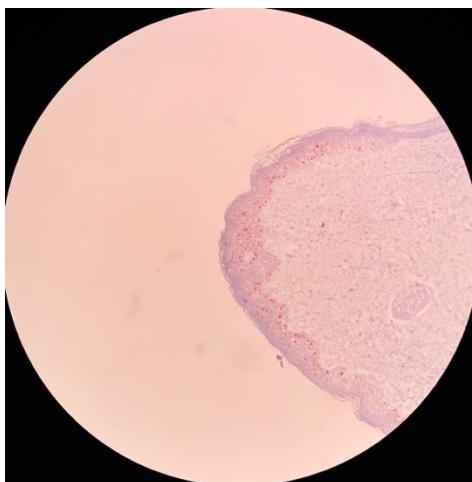
Melan-A je proteinový antigen nacházející se na melanocytech. Protilátky proti tomuto antigenu, které jsou myšího původu, se používají k rozpoznání buněk melanocytární diferenciace, což je užitečné pro diagnostiku melanomu. Protilátka MART-1 je specifická pro linii melanocytů nacházející se v normální kůži, sítnici a melanocytech, ale ne v jiných normálních tkáních. Je to tedy velmi užitečný marker pro melanocytární nádory, s výhradou, že se normálně vyskytuje také v benigních névech. Tato protilátka je zásadní pro diagnostiku metastatického melanomu. (29)



Obr.10 Pozitivní protilátka Melan – A
(vlastní zdroj)

12.8.2 Anti-PRAME

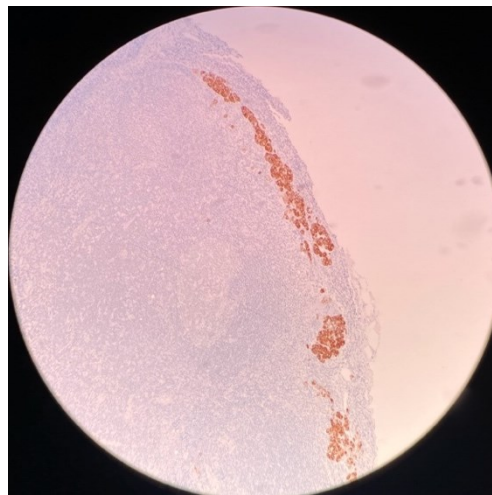
Králičí monoklonální protilátka Anti-PRAME je nádorový biomarker exprimovaný u většiny kožních a očních melanomů a také různých dalších maligních novotvarů. Exprese PRAME ve formolem fixované tkáni zalité v parafínu je detekována imunohistochemicky a často prokazuje difúzní nukleární imunobarvení in situ a invazivní melanom. Pomocí imunohistochemie může doplnit nálezy z rutinně používaným barvením hematoxylin-eosin. (30)



Obr.11 Pozitivní protilátka Anti-PRAME (vlastní zdroj)

12.8.3 Melanosome HMB 45

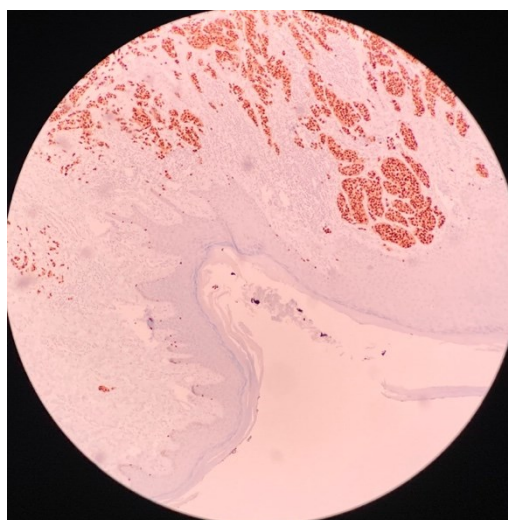
Tato myší monoklonální protilátka je určena pro použití in vitro. Imunogenem jsou purifikované metastázy pigmentového melanomu z lymfatických uzlin. HMB-45 reaguje proti antigenu přítomnému v nezralých melanosomech a kožních melanocytech. Tato protilátka byla vytvořena k extraktu melanomu. (31)



Obr.12 Pozitivní protilátka Melanosome HMB-45 (vlastní zdroj)

12.8.4 SOX-10

Protilátka SOX-10 je primární monoklonální protilátka králičího původu a je určena k laboratornímu použití pro detekci proteinu SOX-10 ve formalínem fixované, v parafínu zalité lidské tkáni obarvené oři kvalitativním imunohistochemickým vyšetřením na barvicích automatech BenchMark Ventana. Tato protilátka je určena pro diagnostiku in vitro a dále slouží jako transkripční faktor podílející se na vývoji neurální lišty a periferního nervového systému a působí také jako nukleocytoplazmatický shuttle protein. SOX-10 se exprimuje v melanocytických buněčných liniích a je citlivým markerem melanomu konvenčního a desmoplastického podtypu. Ve zdravých tkáních se SOX-10 exprimuje v melanocytech a myoepiteliálních buňkách. (32)



Obr.13 Pozitivní protilátka SOX-10 (vlastní zdroj)

12.9 Barvicí přístroj BENCHMARK ULTRA – VENTANA

BMK ULTRA je barvicí automat využívaný na vizualizaci vazby antigen-protilátka imunohistochemickými metodami nebo vazbou sondy na nukleovou kyselinu. Systém je platformou pro analýzu přítomnosti markerů nádorových buněk ve tkáních. (24)

HLAVNÍ VÝHODY:

- Zpracování vzorku od sušení a deparafinace (bez použití xylenu) po dobarvení jader
- Minimální časové nároky na práci obsluhy
- Intuitivní obsluha v českém jazyce jednoduše ovládaného SW
- Individuální pozice pro jednotlivé preparáty umožňují flexibilitu volby protokolu na dané pozici v daném
- Délka protokolů pro IHC je 2,5 – 3,5 hodiny
- Dokáže zpracovat až 180 vzorků během jednosměrného provozu

SYSTÉM BenchMark ULTRA PRACUJE NÁSLEDOVNĚ:

- Sklíčko s tkáňovým řezem označené štítkem a QR kódem, pod kterým je v SW nastavený protokol pro příslušnou protilátku, se vloží do přístroje
- Proces začíná sušením a pokračuje deparafinací při teplotě 72 °C za současného působení roztoku EZ PREP. Dochází k odstranění parafínu a rehydrataci tkáně
- Revitalizací proteinů roztoky ULTRA CC1 (TRIS pufr), ULTRA CC2 (citrátový pufr) nebo enzymaticky se obnovuje struktura antigenů, které byli fixací ukryté do složitých komplexů
- Aplikací primární protilátky (1°Ab) na tkáň dochází k vazbě na příslušný antigen.
- Za použití detekčního systému obsahujícího chromogen dojde k zviditelnění vazby mezi Ab a Ag (barevný nerozpustný komplex)
- Jádra buněk se kontrastně barví hematoxylinem (24)



**Obr.14 Barvicí automat BENCHMARK
VENTANA ULTRA (vlastní zdroj)**



**Obr.15 Barvicí automat BENCHMARK
VENTANA ULTRA (vlastní zdroj)**

13. KAZUISTIKA

13.1 Pacient XY

U pacienta byla zaznamenána přítomnost pigmentových projevů na vnější straně levé nohy a na plosce po dobu přibližně šesti měsíců. Před asi dvěma měsíci si pacient všiml sekrece z tohoto místa. Pro další diagnostiku byla provedena magnetická rezonance mozku, která neukázala žádné patologické nálezy, a CT vyšetření krku, hrudníku, břicha a pánve, které také neprokázalo žádné patologické změny. Sonografické vyšetření lymfatických uzlin v oblasti třísel odhalilo zvětšené uzliny na levé straně.

Vzhledem k progresi onemocnění byl pacient odeslán na klinickou demonstraci kvůli pokročilému akrolentiginóznímu melanomu na levé plosce, který se začal projevovat krvácením. Na plosce levé nohy od čtvrtého meziprstí po polovinu plosky byla pozorována rozsáhlá nepravidelná hnědá pigmentace s šedomodrým nádechem a ulcerací. Rodinná a osobní anamnéza pacienta neukázala žádné významné souvislosti s tímto onemocněním.

Pacient podstoupil chirurgický zákrok, během něhož mu byla provedena amputace čtvrtého a pátého prstu levé nohy, amputace třetího prstu levé nohy a extirpace sentinelové uzliny z levého třísla pro histologické vyšetření.

Klinicky: akrolentiginózní melanom nohy vlevo

1. Amputát – IV. A V. paprsek L nohy

Makroskopicky: amputát distálního IV. A V. paprsku levé nohy, celkových rozměrů 105x43x40 mm. Amputát obsahuje celý IV. A V. paprsek s navazujícími distálními částmi IV. A V. a metastázu s okolními měkkými tkáněmi. Na kožním krytu v oblasti laterální hrany chodila těsně u V. prstu je nepravidelně mapovitě tvarovaný hnědočerně nestejně pigmentovaný, místy ulcerovaný tumor o rozměru 60x65mm. Jeho vzdálenost od proximálního resekčního okraje je makroskopicky nejméně 20 mm, od mediálního resekčního okraje v kůži a přilehlém podkoží nejméně 17 mm na dorsální straně nohy, 6 mm od mediálního okraje kůže na chodidlové straně. Distálně tumor dosahuje na chodidlové straně do rýhy na basi IV. A V. paprsku.

Značení bloků při zpracování:

A–C = proximální resekcční okraj v kůži a podkožních měkkých tkání.

Značeno od hřbetní strany přes hranu na chodidlovou stranu.

D–G = resekcční okraj na chodidlové straně.

Značeno od proximálního okraje směrem distálně.

H–K = mediální resekcční okraj na hřbetní straně (od distální části směrem proximálně).

L – AN = nádor v sérii příčných rovin značených od jednoho distálního okraje směrem proximálním.

Patří k sobě bloky: L+M, N-O, Q-S, T-V, W-Y, Z-AB, AC-AE, AF-AH, AI-AK, AL-AN

AO – periost a přilehlé tkáně na chodidlové straně

AP – periost a přilehlé tkáně na hřbetní straně

Odděleně v nádobě distální dva články 3. prstu s délkou 30 mm, v ostatních rozměrech 10-15 mm (v bloku AQ).

Mikroskopicky: výše popsaný nádor v amputátu je tvořený melanomem akrolentiginózního typu, zastižený již v pokročilé fázi s vertikálním způsobem růstu, s infiltrativním růstem do hlubokých vstev koria až místy těsně k rozhraní s podkožními měkkými tkáněmi, do kterých ještě nádor nevrůstá. Na povrchu je nádor místy ulcerovaný, hloubka nádorové invaze je do 3,2 mm (při ulceraci). V nádoru je výrazná mitotická aktivita, v úrovni okolo 15 mitóz na 10 zorných polí.

V amputátu je nádor obsažený celý, se vzdálenostmi od okrajů obdobnými jako v makroskopickém popisu. Hluboké měkké tkáně včetně periostu kosti jsou bez nádorových struktur, obdobně oddělené distální 2 články 3. prstu jsou bez nádoru.

Tabulka prognostických významných morfologických rysů nádoru:

Breslow – 3,2 mm

Clark – IV.

Ulcerace – ano.

Regrese – ne.

Počet mitóz – více než 1 na 1 mm², 15 mitóz na 10 zorných polí HPF.

Lymfocytární lem – nesouvislý, v periferních částech místy výrazný, místy slabý až téměř žádný.

Lymfatická a venózní invaze: nezastižena.

Perineurální propagace – nenalezena.

Satelity a metastázy – v rozsahu amputátu ne.

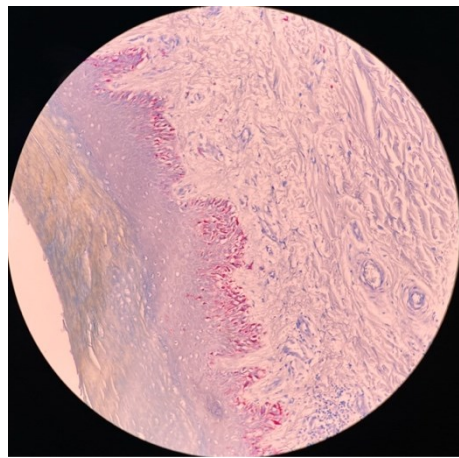
Vzdálenost od obvodových okrajů – 6 mm.

Vzdálenost od spodiny – neměřitelně veliká – amputát distální části končetiny.

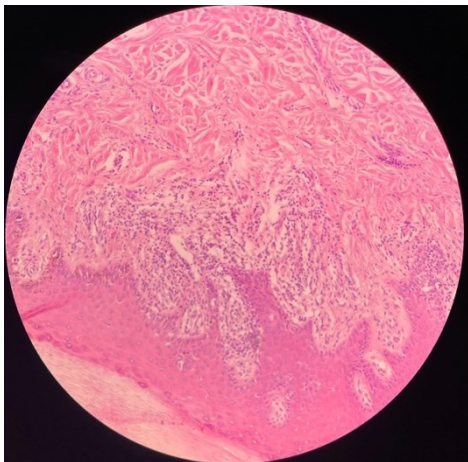
Pro ilustraci jsem si vybrala z celé biopsie kůže dva preparáty (AB, AD) u kterých byl potvrzen maligní melanom. Preparáty byly nejprve obarveny základním přehledným barvením hematoxylin–eosin a dále byly barveny imunohistochemickým barvením, kdy byla použita protilátka Melan-A, která vyšla v obou preparátech pozitivně.



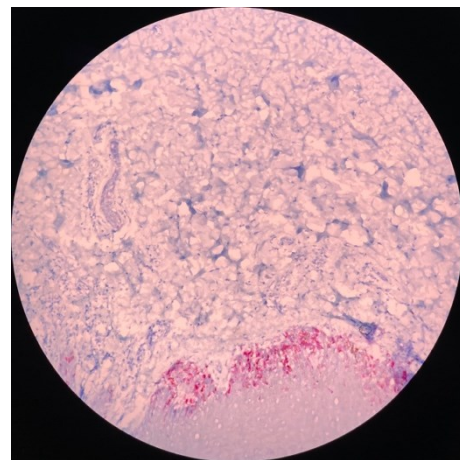
Obr.16 Preparát kůže – blok AB, obarvený hematoxylin – eosinem (vlastní zdroj)



Obr.17 Preparát kůže – blok AB, obarvený imunohistochemickým barvením (vlastní zdroj)



Obr.18 Preparát kůže – blok AD, obarvený hematoxylin – eosinem (vlastní zdroj)



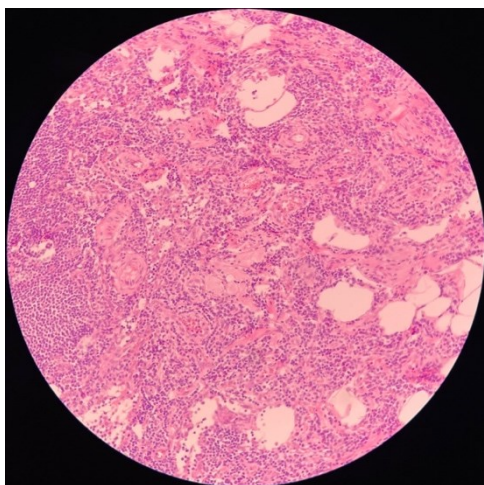
Obr.19 Preparát kůže – blok AD, obarvený imunohistochemickým barvením (vlastní zdroj)

2. SLN z L třísla

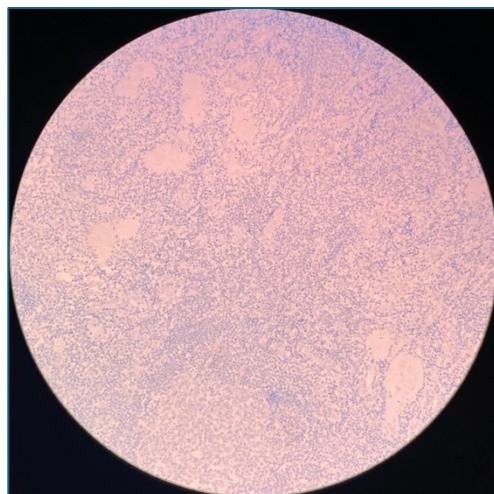
Makroskopicky: mízní uzlina s drobnými útržky tukové tkáně, rozměrů 12x10x9 mm.

Mikroskopicky: mízní uzlina s částečnou tukovou atrofií a s fokální fibrotizací, ve zbývajících lymfatické tkáni s reaktivní sinusovou histiocytózou a s folikulární hyperplazií, bez nádorové infiltrace. Uzlina byla zpracována podle zavedeného protokolu s použitím imunohistochemickým barvením HMB45, nález v ní zůstává i po tomto zpracování onkologicky negativní.

Stejně jako u předchozí biopsie kůže se také u sentinelové uzliny preparát nejprve obarvil základním přehledným barvením hematoxylin–eosin a dále bylo provedeno imunohistochemické barvení, kdy byla použita protilátka HMB45. Imunohistochemické barvení vyšlo jako negativní, což je pozitivním prognostickým faktorem pro pacienta.



Obr.20 Preparát sentinelové uzliny obarvený hematoxylin – eosinem (vlastní zdroj)



Obr.21 Preparát sentinelové uzliny obarvený imunohistochemickým barvením (vlastní zdroj)

VYHODNOCENÍ LÉKAŘE: akrolentiginózní melanom distální části levé nohy v oblasti IV. A V. prstu, v amputátu obsažený celý, s nejmenší vzdáleností od okraje 6 mm (mediální okraj kůže na chodidlové straně), s výše popsanými morfoloickými detaily. Sentinelová uzlina z levého třísla je bez nádorové infiltrace.

14. ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsme provedli rozsáhlou rešerši týkající se laboratorní diagnostiky maligního melanomu a zpracování sentinelové uzliny. Kromě toho jsme také využili poznatky a zkušenosti získané přímo z praxe histologické laboratoře. Na základě našich informací jsme potvrdili význam laboratorních metod při diagnostice tohoto kožního nádoru, včetně vyšetření sentinelových uzlin. Moderní laboratorní metody, zejména imunohistochemické techniky, jsme identifikovali jako efektivní prostředky pro identifikaci a charakterizaci maligních buněk. Výsledky této práce přinášejí komplexní pohled na diagnostické postupy spojené s maligním melanomem a sentinelovou uzlinou, které přispívají k lepšímu pochopení této problematiky jak mezi odbornou, tak laickou veřejností.

15. SEZNAM OBRÁZKŮ

1. Přikrajování (vlastní zdroj)
2. Tkáňový procesor VIP 6 (vlastní zdroj)
3. Tkáňový procesor VIP 6 (vlastní zdroj)
4. Zalévání (vlastní zdroj)
5. Zalévání (vlastní zdroj)
6. Krájení (vlastní zdroj)
7. Nativní preparáty (vlastní zdroj)
8. Barvicí automat PRISMA FILM (vlastní zdroj)
9. Obarvené preparáty hematoxylin-eosinem (vlastní zdroj)
10. Pozitivní protilátka Melan-A (vlastní zdroj)
11. Pozitivní protilátka Anti-PRAME (vlastní zdroj)
12. Pozitivní protilátka Melanosome HMB-45 (vlastní zdroj)
13. Pozitivní protilátka SOX-10 (vlastní zdroj)
14. Barvicí automat BENCHMARK ULTRA VENTANA (vlastní zdroj)
15. Barvicí automat BENCHMARK ULTRA VENTANA (vlastní zdroj)
16. Preparát kůže – blok AB, obarvený hematoxylin–eosinem (vlastní zdroj)
17. Preparát kůže – blok AB, imunohistochemickým barvením (vlastní zdroj)
18. Preparát kůže – blok AD, obarvený hematoxylin–eosinem (vlastní zdroj)
19. Preparát kůže – blok AD, obarvený imunohistochemickým barvením (vlastní zdroj)

20. Preparát sentinelové uzliny, obarvený hematoxylin–eosinem (vlastní zdroj)
21. Preparát sentinelové uzliny, obarvený imunohistochemickým barvením (vlastní zdroj)

16. SEZNAM TABULEK

1. Kožní fototypy. KRAJSOVÁ, Ivana. *Melanom*. Praha: Maxdorf, c2006. Str. 31–32. ISBN 80-7345-096-8.
2. Prognóza pacientů s melanomem v závislosti na hloubce invaze nádorových melanocytů. ZÁMEČNÍK, Josef. *Patologie*. Praha: LD Prager Publishing, 2019. Str. 796. ISBN 978-80-270-6457-1.
3. ABCDE charakteristika névů a melanomu. KRAJSOVÁ, Ivana. *Melanom*. Praha: Maxdorf, c2006. Str. 86. ISBN 80-7345-096-8.

17. POUŽITÁ LITERATURA

1. GRIM, Miloš; DRUGA, Rastislav, et al. Základy anatomie. 4 b., Periferní nervový systém, smyslové orgány a kůže. Druhé, přepracované vydání. Praha: Univerzita Karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, 2014. Str. 158–163. ISBN 978-80-7492-156-8.
2. ČIHÁK, Radomír. Anatomie 3. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada Publishing, 2016. Str. 719–720. ISBN 978-80-247-5636-3.
3. TŘEŠŇÁK HERCOGOVÁ, Jana. Klinická dermatovenerologie. Praha: Mladá fronta, 2019. Str. 71–77; 94; 685. ISBN 978-80-204-5321-1.
4. ARENBERGER, Petr a OBSTOVÁ, Iva. Obecná dermatovenerologie. Praha: Czechopress Agency, 2001. Str. 9–10. ISBN 80-902632-4-0.
5. MALINA, Lubor. Fotodermatózy. 2., rozš. vyd. Praha: Maxdorf, c2005. Str. 40–42. ISBN 80-7345-039-9.
6. KRAJSOVÁ, Ivana. Melanom. Praha: Maxdorf, c2006. Str. 15–16; 30-32; 84–94; 107–124. ISBN 80-7345-096-8.
7. BENCKO, Vladimír, et al. Hygiena: Učební texty k seminářům a praktickým cvičením. 2. přepracované a doplněné vydání vydání. Praha: Karolinum, 2002. 205 s. s. 126–128. ISBN 80-7184-551-5.
8. ŠTORK, Jiří. Dermatovenerologie. Praha: Galén, 2008. Str. 393–399. ISBN 978-80-246-1360-4.
9. MAČÁK, Jirka. Patologie 3., doplněné a přepracované vydání. Grada, 2022. Str. 152–153. ISBN 978-80-271-6620-6.
10. ÚZIS. Vývoj incidence a mortality zhoubného melanomu v České republice v letech 1980–2011 [online]. [cit. 20-3-2024]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=record&id=6597>

11. LÍBALOVÁ, Monika. U maligního melanomu je nejdůležitější prevence [online]. [4-11-2013] [cit. 20-3-2024]. Dostupné z: <https://www.florence.cz/casopis/archiv-florence/2013/11/u-maligniho-melanomu-je-nejdulezitejsi-prevence/>
12. KRAJSOVÁ, Ivana. Maligní kožní nádory: průvodce diagnostikou a léčbou nemelanomových kožních nádorů a melanomu. Praha: Mladá fronta, 2017. Str. 215–227. ISBN 978-80-204-4186-7.
13. ZÁVADOVÁ, Eva. Onkologická imunologie. Praha: Mladá fronta a. s., 2015. Str. 135–138. ISBN 978-80-204-3756-3
14. ZÁMEČNÍK, Josef. Patologie. Praha: LD Prager Publishing, 2019. Str. 794–796. ISBN 978-80-270-6457-1.
15. ARENBERGEROVÁ, Monika; PÁSEK, Marek a ARENBERGER, Petr. Maligní melanom: diagnostika a léčba na základě aktuálního doporučeného postupu. Praha: Maxdorf, 2023. Str. 22. ISBN 978-80-7345-750-1.
16. MEDSCAPE. Sentinel Lymph Node Biopsy in Patients With melanoma [online]. [cit. 24-2-2024]. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/854424-overview>
17. ŠIMŠA, Jaromír. Sentinelová uzlina: lymfadenektomie u solidních nádorů. Praha: Maxdorf, 2010. Str. 30–47. ISBN 978-80-7345-213-1.
18. LUKÁŠ, Zdeněk. Imunohistochemické metody v biologii a v biotické diagnostice. Brno: Masarykova univerzita, 1997. Str. 7–10. ISBN: 80-210-0620-X
19. MAGAKI, Shino et al. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. Methods Mol Biol. 2019; 1897:289-298. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5_25
20. JANARDHAN, Kyathanahalli S et al. Immunohistochemistry in Investigative and Toxicologic Pathology. Toxicologic pathology vol. 46,5 (2018): 488-510. doi:10.1177/0192623318776907

21. BALZER, Amy H. A., and WHITEHURST Christopher B. An Analysis of the Biotin-(Strept)avidin System in Immunoassays: Interference and Mitigation Strategies. *Current issues in molecular biology* vol. 45,11 (2023): 8733-8754. doi:10.3390/cimb45110549
22. RAMOS-VARA, José. A. Technical aspects of immunohistochemistry. *Veterinary pathology*, vol. 42,4 (2005): 405–426. <https://doi.org/10.1354/vp.42-4-405>
23. VOSKUIL, Jan L. A. et al. The Antibody Society's antibody validation webinar series. *mAbs* vol. 12,1 (2020): 1794421. doi:10.1080/19420862.2020.1794421
24. Literatura: SMĚRNICE ÚSTAVU. Histologické zpracování tkání, příjem vzorků, přikrajování, tkáňový procesor VIP 6, zalévání, zhotovení preparátu, barvení PRISMA FILM, montování, barvicí automat Ventana Ultra. Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Šrobárova 50, Praha 10. Ústav patologie.
25. VACEK, Zdeněk. Histologie a histologická technika. Díl 2, Histologická technika. 1. vydání. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996. 184 s. ISBN 80-7013-202-7.
26. BĚLOBRÁDEK, Michal. Kožní nemoci: repetitorium pro praxi. Praha: Maxdorf, 2011. Str. 202–203. ISBN 978-80-7345-221-6.
27. SWETTER, Susan M. Cutaneous melanoma [online]. 1994-2024, [cit. 14-4-2024] Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1100753-workup>
28. STŘÍTECKÁ, Dana; JEŘÁBKOVÁ, Lucie. Základní imunohistochemické metody. Brno: Laboratoř MDgK-plus, spol. s r.o., 2028. Str. 7–16. ISBN 978-80-7013-595-2.
29. BUSAM, Klaus J and JUNGBLUTH, Achim A. Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Advances in anatomic pathology* vol. 6,1 (1999): 12-8. doi:10.1097/00125480-199901000-00002
30. LEZCANO, Cecilia et al. Immunohistochemistry for PRAME in the distinction of nodal nevi from metastatic melanoma. *Am J Surg Pathol* (2020); vol. 44(4):503-508. doi:10.1097/PAS.0000000000001393

31. TINCA, Andreea Cătălina et al. Actualities in the Morphology and Immunohistochemistry of Cutaneous and Ocular Melanoma: What Lies Ahead A Single-Centre Study. *Biomedicines* vol. 10(10) (2022): 2500. doi:10.3390/biomedicines10102500
32. CRONIN, Julia C et al. SOX10 ablation arrests cell cycle, induces senescence, and suppresses melanomagenesis. *Cancer research* vol. 73,18 (2013): 5709-18. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4620