

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



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

HISTOLOGICKÉ METODY POUŽÍVANÉ V DIAGNOSTICE
KOLOREKTÁLNÍHO KARCINOMU

Vedoucí bakalářské práce: Doc. PharmDr. MILOSLAV HRONEK, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Šárka Kowaliková

Poděkování

Touto cestou bych chtěla vyslovit poděkování Doc. PharmDr. Miloslavu Hronkovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, za cenné rady a čas, který mně věnoval. Dále bych chtěla poděkovat MUDr. Andělové, MUDr. Reiterové, MUDr. Slováčkové za poskytnutí informací a odborné literatury. Poděkování patří také mým spolupracovnícím, které mi svou vstřícností a pomocí umožnily realizaci bakalářské práce. Velké poděkování patří mé rodině za podporu a trpělivost při mém studiu.

„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, 9.6.2016

Obsah

1. OBSAH

2.	ABSTRAKT	8
3.	ABSTRACT	9
4.	ÚVOD	10
5.	ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE	11
6.	TEORETICKÁ ČÁST	12
6.1	Tlusté střevo – intestinum crassum	12
6.1.1	Základní anatomická stavba	12
6.1.2	Základní histologická stavba	14
6.1.3	Patologie	15
6.2	Kolorektální karcinom	18
6.2.1	Definice	18
6.2.2	Rizikové faktory (věk, dědičnost, životní styl)	19
6.2.3	Klinická manifestace – lokální, systémové	21
6.2.4	Prevence	21
6.2.5	Terapie	23
6.2.6	Prognóza při včasném zachytu	24
6.3	Odběr bioptického materiálu	24
6.3.1	Kolonoskopie	24
6.3.2	Kolektomie	25
6.4	Histologické zpracování tkáně	26
6.4.1	Příprava vzorku pro laboratorní zpracování	26
6.4.2	Odvodnění a prosycení tkáňového vzorku	28
6.4.3	Příprava preparátů pro mikroskopickou analýzu (zalévání, řezání, barvení) ..	29
6.4.4	Histochemická a imunohistochemická analýza	30
7.	PRAKTICKÁ ČÁST	32
7.1	První část	32
7.1.1	Zpracování	32

7.1.2	Vyhodnocení	37
7.2	Druhá část	39
7.2.1	Zpracování.....	39
7.2.2	Vyhodnocení	42
7.3	Třetí část.....	42
7.3.1	Zpracování.....	43
7.3.2	Vyhodnocení	46
8.	ZÁVĚR	47
9.	POUŽITÉ ZKRATKY.....	48
10.	SEZNAM TABULEK	49
11.	SEZNAM OBRÁZKŮ	50
12.	POUŽITÁ LITERATURA.....	51

2. ABSTRAKT

Bakalářská práce je zaměřena na nádorová onemocnění tlustého střeva, především na zpracování bioptického materiálu získaného odběrem při kolonoskopickém vyšetření a při kolektomii.

V teoretické části je popisována obecná anatomie střeva a dále předpoklady vzniku nádoru v této lokalitě. Zaměřena je zejména na rizikové faktory, které mohou být neovlivnitelné např. dědičnost a věk, ale i ovlivnitelné, jako jsou nedostatečná fyzická aktivita, nadměrná konzumace červeného masa, nízký příjem vlákniny, kouření, konzumace alkoholu, nadváha a další. Také na možnosti prevence, která úzce souvisí s rizikovými faktory. Dále pak jsou uváděny charakteristiky odběru bioptických vzorků a následného laboratorního zpracování.

V praktické části jsou popsány přesné metody používané ve zpracování tkání a v barvení histologických preparátů se zaměřením na výhody metody rychlejšího zpracování tkáně kontinuálním tkáňovým procesorem. Zabývá se i imunohistochemickým vyšetřením, které je neoddělitelnou součástí histopatologického diagnostického postupu.

Cílem bakalářské práce bylo porovnat, jak mohou určité metody v histologickém zpracování urychlit a hlavně upřesnit diagnózu a s tím spojenou následnou léčbu.

Klíčová slova: tlusté střevo, kolorektální karcinom, patologie, nádorové onemocnění, kolonoskopie, kolektomie, hemikolektomie, histologické zpracování, mikroskopická analýza, imunohistochemická analýza.

3. ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on tumor diseases of the colon, especially on the processing of biopsy material obtained by sampling during colonoscopy and colectomy.

The theoretical part of this thesis describes general anatomy of the colon and assumptions of tumor formation in this location. It deals mainly with the risk factors which may be unaffected, e.g. heredity and age, but also affectable, such as insufficient physical activity, excessive consumption of red meat, low fiber intake, smoking, alcohol consumption, overweight etc.

The thesis also describes the possibility of prevention, which is closely related to the risk factors. Finally, some ways of taking biopsy samples and subsequent laboratory processing are listed.

The practical part presents the methods used for tissue processing and staining histological slides with a focus on the advantages of faster tissue processing by continuous tissue processor. It also deals with immunohistochemical examination, which is an integral part of histopathological diagnostic procedure.

The aim of the thesis was to describe how certain methods of histological processing can accelerate and especially clarify the diagnosis and the associated follow-up treatment.

Keywords: colon, colorectal cancer, pathology, cancer, colonoscopy, colectomy, hemicolectomy, histological processing, microscopic analysis, immunohistochemical analysis.

4. ÚVOD

Nádorová onemocnění tračníku a konečníku, zejména kolorektální karcinom patří ve vyspělých státech mezi velice časté onemocnění a proto je zařazeno mezi civilizační onemocnění. Je nejčastějším zhoubným nádorem trávicího traktu.

Pro mou bakalářskou práci jsem si vybrala téma histologické zpracování, které je základní pro stanovení správné diagnózy. Několik let pracuji v laboratoři patologie a histologické vzorky pacientů s nádorovým onemocněním střev patří ke každodennímu zpracování.

V teoretické části jsem ve stručnosti popsala anatomii a histologii tlustého střeva. Rozdělení patologie střeva na benigní a maligní. Část své práce jsem věnovala rizikovým faktorům. Každý člověk může upravit stravovací zvyklosti a tím ovlivnit zevní rizikové faktory, které se podílí na vzniku kolorektálního karcinomu. Včasně zachycení nádoru znamená zlepšení možnosti léčby i prognózy. Pro tento typ prevence je prováděn test okultního krvácení. V teoretické části jsem také popsala kolonoskopické a endoskopické odstranění polypů tlustého střeva a kolektomii, kde dochází k resekci střeva. V další kapitole jsem vylíčila, jak probíhá zpracování tkáně.

V praktické části jsem se věnovala konkrétním případům a zpracování v naší laboratoři. Vyhodnotila jsem výhody, které se mi zdají z mého pohledu přínosné, zvláště pak pro pacientovu diagnózu.

V první části jsem se zaměřila na pacienty, kteří podstoupili kolonoskopické vyšetření s následným odběrem bioptického vzorku.

V druhé části jsem se zaměřila na zpracování materiálu z chirurgicky resekovaného střeva.

V třetí části jsem se věnovala pacientovi, kterému bylo ultrazvukovým vyšetřením nalezeno ložisko v játrech. A následným odstraněním a vyšetřením tohoto ložiska byla prokázána metastáza, s původem v kolorektální karcinomu.

5. ZADÁNÍ – CÍL PRÁCE

Cílem práce je popis odběrů tkání při kolorektálním karcinomu pro následnou histologickou analýzu.

Srovnání metodik ve zpracování bioptického materiálu a jejich posouzení. Jak mohou být přínosné v následné diagnostice.

Popis spojení metodik barvení histologických preparátů.

Zhodnocení velmi důležitého přínosu imunohistochemického vyšetření při určení objasnění primárního origa i jako ukazatele následné onkologické léčby.

6. TEORETICKÁ ČÁST

6.1 *Tlusté střevo – intestinum crassum*

6.1.1 Základní anatomická stavba

Tlusté střevo (intestinum crassum) je poslední část trávicího systému, která z tenkého střeva přijímá obsah, z něhož byly v tenkém střevě vstřebány živiny. V tlustém střevě jsou z tohoto obsahu vstřebány elektrolyty a voda. Vyprazdňování obsahu ve formě stolice je v konečném úseku tlustého střeva análním otvorem (ČIHÁK, R., 1988).

V počátečním úseku střeva se mísí a posouvá obsah potravy. V dalších dvou třetinách je peristaltika střeva velmi intenzivní a posouvá obsah směrem ke konečníku. Pomocí této peristaltiky se střevo vyprazdňuje a je umožněn přísun nové náplně z tenkého střeva (MERKUNOVÁ, A. a M. OREL, 2008).

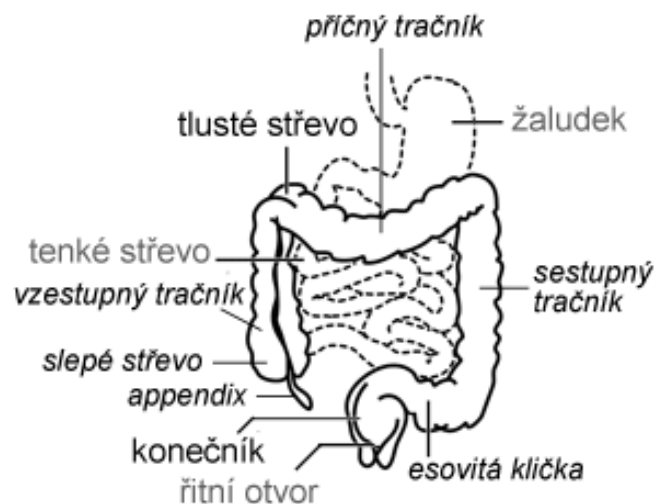
Tlusté střevo je dlouhé 1,2 – 1,5 m, široké od 4 do 7,5 cm a je tvořeno těmito úseky (Obrázek č. 1):

- Slepé střevo (ceacum) leží v pravé dolní části dutiny břišní, ve směru dolů je slepě zakončeno, do boční stěny ústí kyčelník, koncová část tenkého střeva, vstup uzavírá ileocekální chlopeň. V oblasti pod chlopní odstupuje tzv. červovitý výběžek (appendix vermiformis). Slepé střevo je 6 – 8 cm dlouhé, 6 – 7,5 cm široké. K nástěnnému peritoneu je slepé střevo přirostlé malou částí svého dorsálního obvodu. V případě, že přirostlé není a má zachovanou část mezenteria (mesocaecum), jde o perzistenci stavu z vývoje. Apendix je dlouhý 5 – 8 cm, válcovitého charakteru. Mesoapendix (mesenterium appendicis) je závěs, na kterém je apendix připojen.
- Tračník (colon) je hlavní část tlustého střeva, svými úseky obtáčí kličky tenkého střeva a člení se na:
 - a) Vzestupný tračník (colon ascendent) směřuje od slepého střeva vzhůru pod játra. Je dlouhý 12 – 16 cm a je užší než slepé střevo.

- b) Příčný tračník (colon transversum) jdoucí od jater napříč vlevo ke slezině. Tento úsek střeva je dlouhý 50 – 60 cm, což odpovídá asi dvojnásobku rozměru břišní dutiny.
- c) Sestupný tračník (colon descendens) sestupuje svisle dolů od sleziny ke hřebenu kosti kyčelní, v délce 22 – 30 cm. Je užší než příčný tračník cca 4 cm a postupně se ještě zužuje.
- d) Esovitá klička (colon sigmoideum) část střeva esovitě zakřivená, jdoucí od konce sestupného tračníku do středu malé pánve.
- e) Konečník (rectum) poslední úsek střeva, dlouhý 12 – 16 cm a široký bez náplně cca 4 cm. Rektum ústí do análního kanálu, který vyúsťuje řitním otvorem (anus) na povrch těla.

Otvor uzavírají tzv. svěrače: vnitřní svěrač, tvořený hladkou svalovinou, která není vědomě ovládána. Jeho napětí ovlivňuje vegetativní nervový systém, zvyšuje jej sympatikus a naopak parasympatikus napětí snižuje. Zevní svěrač je tvořený příčně pruhovanou svalovinou a je ovládaný vědomě (ČIHÁK, R., 1988).

Obrázek č. 1 *Názorná stavba tlustého střeva* (Česká onkologická společnost, 2015)



6.1.2 Základní histologická stavba

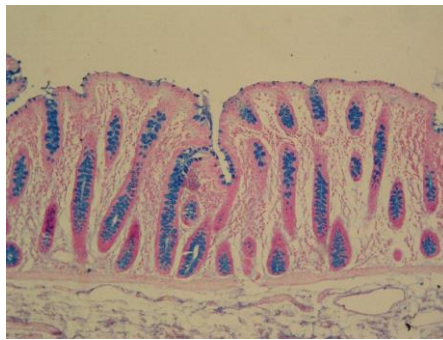
Sliznice tlustého střeva je pokrytá jednovrstvým cylindrickým epitelem. Enterocyty (epitelové buňky) mají apikálně vyvinuty četné a krátké mikrovilky. Jejich počet je menší a mají méně pravidelné uspořádání, než na apikálních částech enterocytů tenkého střeva. V epitelu nacházíme velký počet pohárkových buněk (Obrázek č. 2). Sliznice je bohatá na lymfoidní tkáň (LICHNOVSKÝ, V., J. MALÍNSKÝ a Z. MICHALÍKOVÁ, 2004).

Stěna střeva je tvořena čtyřmi vrstvami:

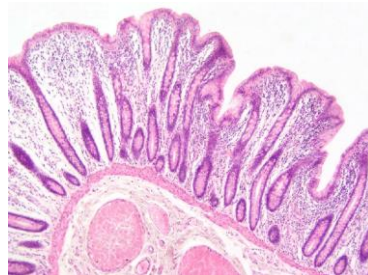
- Sliznice (tunica mucosa) se skládá ze tří vrstev (Obrázek č. 3). Epitel (lamina epitealialis) pokrývá povrch sliznice, je jednovrstvý a v anální oblasti přechází v epitel vrstevnatý dlaždicový. Vlastní vazivo slizniční (lamina propria mucosae), je tvořeno řídkým kolagenním vazivem, v němž probíhají krevní a lymfatické kapiláry a nervová vlákna. Slizniční svalovina (lamina muscularis mucosae) je úzká, tvořena vrstvou hladké svaloviny.
- Podslizniční vazivo (lamina submucosa) tvoří řídké kolagenní vazivo. Vazivem probíhají krevní a lymfatické cévy, nervová vlákna, ty tvoří podslizniční pleteň – *lexus submucosus Meissneri*. Tato pleteň tvoří intramurální ganglia autonomního nervového systému, ta jsou tvořena spleť nervových vláken, v nichž jsou uloženy gangliové buňky.
- Vrstva svalová (lamina muscularis propria) je nejsilnější vrstvou stěny střeva. Hladká svalovina je postupně v anální oblasti nahrazena příčně pruhovanou kosterní svalovinou. Vrstva svalová je rozdělena do dvou vrstev: vnitřní cirkulární svalovina a zevní longitudinální svalovina. Hladké svalové buňky jsou ve všech vrstvách uloženy spirálovitě, spirály mají rozdílnou výšku závitů, proto řez tvoří dojem probíhajících svazků cirkulárních a longitudinálních. Mezi těmito dvěma vrstvami se nachází řídké kolagenní vazivo, krevní a lymfatické cévy a nervová pleteň – *plexus myentericus Auerbachii*. V pleteni se nachází vegetativní a senzitivní nervová vlákna a vegetativní ganglia. Pleteň se podílí na kontrakci zevní svalové hmoty. Díky této kontrakci je zajištěno v trávicím traktu mísení a následný posun potravy.

- Zevní vrstva trávicí trubice je složena ze dvou vrstev. Lamina serosa, její volný povrch pokrývá mezenchymová výstelka. Tunica adventitia, nemá volný povrch a připojuje trávicí trubici k okolním orgánům. Obě vrstvy jsou tvořeny kolagenním vazivem a krevními a lymfatickými cévami a nervovými vlákny (LICHNOVSKÝ, V., J. MALÍNSKÝ a Z. MICHALÍKOVÁ, 2004).

Obrázek č. 2 Pohárkové buňky v epitelu tlustého střeva (barveno alcianovou modří) (ERDŐSOVÁ, B. a D. KYLAROVÁ, 2006)



Obrázek č. 3 Tlusté střevo (intestinum crassum) sliznice, podsliznice (ERDŐSOVÁ, B. a D. KYLAROVÁ, 2006)



6.1.3 Patologie

Nádorová onemocnění patří mezi relativně frekventované patologie tlustého střeva.

Rozdělení nádorů z onkologického hlediska má zásadní význam. Podle biologické povahy a jejich potenciálního vývoje je rozlišujeme na benigní a maligní.

Za benigní nádor je považován ten, který roste v místě svého vzniku, je ohraničen a nemá tendenci k metastazování. Lze jej chirurgicky odstranit, protože bývá ohraničen nebo opouzdřen. Benigní nádory jsou tvořeny diferencovanými nádorovými buňkami. Benigní nádory rostou pomalu, v období několika měsíců až let. Pro epitelové benigní nádory je zásadní, že neprorůstají bazální membránou. Vazivové pouzdro obvykle ohraničuje benigní nádory. Toto pouzdro je vytvořeno ve většině případů z vazivové tkáně v bezprostřední blízkosti nádoru. Existují i benigní nádory, které nejsou opouzdřené, jako např. tubulární adenomy střeva (POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER, 2011).

Maligní nádory jsou charakteristické neohrazeným růstem, mají tendenci se progresivně šířit v podobě metastáz (Tabulka č. 1). Tyto nádory se podle různého stupně malignity rozlišují na nádory s nízkým, středním a vysokým stupněm malignity. Maligní nádory jsou charakteristické širokou škálou diferenciace buněk. U určitého typu nádoru jednoho nemocného může být diferenciace nádorových buněk výrazně pokročilá, zatímco u druhého nemocného se stejným typem nádoru mohou být buňky značně nediferencované. Maligní nádory rostou rychle. Tato rychlost je různá, v závislosti na podmínkách. Maligní nádory ohraničené nebývají, ve většině případů nejsou opouzdřené a do svého okolí prorůstají. Maligní nádory, jejichž růst je pomalejší, bývají opouzdřeny, avšak pouzdro je přerušováno invazí nádorových čepů. Metastázy – vzdálené ložisko nádoru je charakteristické pro maligní nádory. Některé maligní nádory metastazují velmi brzy, metastázy bývají v těchto případech diagnostikovány s primárním nádorem. Oproti tomu existují nádory lokálně agresivní (Tabulka č. 2), ale nemetastazují. Metastázy se šíří třemi způsoby: cestou lymfatickou, cestou krevní a cestou implantace nádoru v tělních dutinách.

U některých nádorů ovšem nelze jednoznačně určit, zda se jedná o nádor benigní nebo maligní. V tomto případě lze provést rozdělení podle čtyř základních charakteristik: podle diferenciace nádorových buněk a anaplazie, podle rychlosti růstu nádoru, podle chování k okolní tkáním a podle schopnosti metastazování (POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER, 2011).

Karcinom tlustého střeva začíná maligní transformací adenomů a polypů. V případě, že jsou adenomy větších rozměrů či vícečetné, je riziko nádorové

transformace vyšší. Screeningové metody, i když jsou nedokonalé, mohou snížit incidenci kolorektálního karcinomu (STRUM W., 2016).

Tabulka č. 1 Hodnocení progresu podle mezinárodní klasifikace TNM (POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER, 2007)

T – primární nádor	
<i>pTis</i>	<i>karcinom omezený na sliznici tlustého střeva</i>
<i>pT1</i>	<i>karcinom postihující submukózu</i>
<i>pT2</i>	<i>karcinom postihující tunica muscularis</i>
<i>pT3</i>	<i>karcinom prorůstá přes tunica muscularis do subserózy nebo do neperitonealizované perikolické nebo perirektální tkáně</i>
<i>pT4</i>	<i>pT4 – karcinom prorůstá do jiných orgánů či struktur</i>
N – regionální mízní uzliny	
<i>N0</i>	<i>bez postižení uzlin</i>
<i>N1</i>	<i>postižené jsou 1-3 uzliny</i>
<i>N2</i>	<i>postižené 4 a více uzlin</i>
<i>NX</i>	<i>není možné stanovit, nebo nebyla provedena příslušná vyšetření</i>
M – vzdálené metastázy	
<i>M0</i>	<i>bez důkazů vzdálených metastáz</i>
<i>M1</i>	<i>vzdálené metastázy jsou přítomny v libovolném počtu</i>
<i>MX</i>	<i>nelze stanovit, nebo nebyla provedena příslušná vyšetření</i>

Nejlepší prognózu mají karcinomy pTis – nemetastazují a pT1, pokud u něj nejsou vytvořeny metastázy. Karcinomy pT3 a pT4 často tvoří uzlinové metastázy, nebo metastázy v jiných orgánech.

Tabulka č. 2 Histopatologický stupeň se určuje na základě diferenciací nádoru. Zpravidla to bývají čtyři stupně: (ANONYMOUS, 2016)

<i>G1</i>	<i>dobře diferenciovaný</i>
<i>G2</i>	<i>středně diferenciovaný</i>
<i>G3</i>	<i>špatně diferenciovaný</i>
<i>G4</i>	<i>nediferenciovaný nebo anaplastický</i>

Stupeň odráží nádorové chování od nejméně po nejvíce agresivní.

6.2 Kolorektální karcinom

6.2.1 Definice

Karcinom tlustého střeva a rekta je typické onemocnění západního životního stylu. U mužských a ženských pacientů je to druhá viscerální malignita ve Spojených státech amerických, s každoročním nárůstem 185 000 nových případů za rok (MILLS, S., 2010).

Na jeho vzniku se podílí genetické i epigenetické faktory. Geneticky podmíněné jsou karcinomy vznikající u nemocných s familiární adenomatózní polypózou a s Lynchovým syndromem. Častější jsou však karcinomy sporadické, u kterých nebyla zjištěna genetická predispozice. Kolorektální karcinomy vznikají ve většině případů z adenomů nebo z jiné formy intraepitelové neoplazie. Nádor se nachází nejčastěji v rektu (cca 40-60 %) a v sigmoideu (cca 20-30 %), méně často se nádor nachází ve zbývajících úsecích (Tabulka č. 3). Ve výjimečných případech se může karcinom objevit na dvou místech (POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER, 2007).

Makroskopicky lze kolorektální karcinomy rozdělit na exofytické (polypózní), vyhloubené (exulcerované) a ploché (infiltrující). Levostranné karcinomy často rostou cirkulárně po obvodu stěny, okraje těchto nádorů bývají oválné. Pravostranné karcinomy bývají častěji exofytické, v céku mohou tvořit objemné útvary. Pro tento způsob růstu zůstávají dlouho bez klinických příznaků. Mikroskopicky se jedná ve většině případů o adenokarcinom s různým stupněm diferenciaci. Dobře diferencované karcinomy sestávají z papilárních nebo z tubulárních formací. Nízce diferencované karcinomy jsou solidně uspořádané. Mucinózní adenokarcinom obsahuje buňky, které produkují ve velkém množství extracelulární hlen tvořící jezírka (POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER, 2007).

Určení prognózy je podloženo znalostí histologického typu, stupněm diferenciaci a hloubkou nádorové infiltrace ve stěně střeva a přítomností metastáz.

Mezi komplikace spojené s kolorektálním karcinomem patří stenóza střeva, krvácení z exulcerovaného nádoru a perforace střeva. Metastázy vznikají hlavně lymfatickou cestou v regionálních uzlinách, hematogenní metastázy vznikají v játrech.

Často se setkáme s porogenním šířením nádoru po peritoneu (POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER, 2007).

Tabulka č 3 Anatomická lokalizace a sublokalizace

Tlusté střevo	C 18
Appendix	C 18.1
Ceacum	C 18.0
Colon ascendens	C 18.2
Flexura hepatica	C 18.3
Colon transversum	C 18.4
Flexura lienalis	C 18.5
Colon descendens	C 18.6
Colon sigmoideum	C 18.7
Rektosigmoideální přechod	C 19
Rektum	C 20

6.2.2 Rizikové faktory (věk, dědičnost, životní styl)

Zhoubné novotvary tlustého střeva a konečníku patří k nejčastějším nádorovým onemocněním v Evropě (Tabulka č. 4). Kolorektální karcinom je na začátku 21. století v České republice nejčastějším nádorovým onemocněním jak u žen, tak u mužů. U většinového typu kolorektálního karcinomu vznikajícího bez vazby na dědičnost v rodině byla popsána charakteristická kombinace v supresorových genech APC, DCC a p53, která spolu se zvýšenou expresí onkogenu ras tvoří sérii genetických událostí, jež mohou vytvořit maligní transformaci buněk a vznik zhoubného nádoru. Tato patogenetická skupina karcinomu se vyskytuje nejčastěji, riziko stoupá s věkem mezi 65 – 75 lety. Jiné formy kolorektálního karcinomu s prokazatelnou dědičnou vazbou vznikají v terénu vrozené familiární polypózy a karcinom při Lynchově syndromu. Oba tyto odlišné typy karcinomu se objevují jen asi v 10% a v mladších věkových skupinách do 50 let.

Podle některých studií má tělesná aktivita seniorů snižovat riziko vzniku kolorektálního karcinomu. Pohyb účinně přispívá k častějšímu a pravidelnějšímu vyprazdňování. Obteněná peristaltika seniorů zvyšuje dobu expozice střevní sliznice obsahu střeva, v němž se nacházejí prokazatelně i látky s kancerogenním potenciálem.

Mezi další rizikové faktory kolorektálního karcinomu patří strava s nízkým obsahem vlákniny, s vysokým obsahem živočišných tuků, červené maso, nadváha, konzumace alkoholu, projektivních látek, jako např. vitamínu C, kyseliny listové. Nedostačující konzumace čerstvého ovoce a zeleniny nepřináší organismu vitamíny, antioxidanty, stopové prvky a další látky, hromadně označovány jako mikronutrienty. Je také potvrzena spojitost mezi kouřením a vznikem kolorektálního karcinomu. Tato spojitost byla potvrzena i u uživatelů žvýkacího tabáku, kuřáků dýmky a doutníku. Výživa může obsahovat látky škodlivé, podporující karcinogenezi, ale na druhé straně obsahuje i látky projektivní. Riziko vzniku kolorektálního karcinomu vzniká při denní konzumaci vepřového, hovězího a jehněčího masa, a dále vysoká konzumace uzenin a stravy bohaté na maso upravované při vysokých teplotách, zejména grilování. Je prokázáno zvýšené riziko tohoto karcinomu u mužů, kteří konzumují 70 a více gramů etanolu denně, nebo 15 a více litrů piva měsíčně.

Další rizikový faktor je vysoká hodnota index tělesné hmotnosti (BMI). Jako projektivní faktor proti nádoru se objevuje pohybová aktivita, která ovlivňuje obezitu a celkový metabolismus a také se podílí na rychlosti pasáže v kolon. Klinické studie potvrdily 75% příznivý efekt vlákniny. Pozitivně proti nádorům působí strava s vysokým obsahem ovoce, zeleniny a ryb (VYZULA, R., J. ŽALOUĐÍK a KOLEKTIV, 2007).

Mezi další rizikové faktory patří přítomnost střevních divertiklů, některé parazitární onemocnění, některé stavy po chirurgických výkonech v oblasti kolem žaludku a střeva, hormonální vlivy, předchozí iradiace a přítomnost žlučových kamenů. Velký problém nastává u pacientů s idiopatickými střevními záněty.

Vysoká incidence kolorektálního karcinomu je dlouhodobě sledovaná v populaci se stravováním „západního typu“ (kaloricky bohaté potraviny s živočišnými tuky) spojeném se sedavým způsobem života. Epidemiologické studie ukázaly, že obezita, konzumace masa, kouření a alkohol jsou ovlivnitelnými rizikovými faktory. Etiologickými faktory pro vznik kolorektálního karcinomu jsou také chronické záněty střeva, zahrnující ulcerózní kolitidu, Crohnovu chorobu a infekci *Schistosoma mansoni*. Vzácným, ale jednoznačně prokázaným faktorem pro vznik kolorektálního karcinomu je i terapeutické ozařování malé pánve (BOSMAN, T., F. CARNEIRO, R. HRUBAN a N. THEISE, 2010).

Tabulka č. 4 Epidemiologie zhoubného novotvaru tlustého střeva a konečníku v Evropě (DUŠEK, L., D. MALÚŠKOVÁ, J. MUŽÍK a L. ŠNAJDROVÁ, 2014)

Parametr	Muži	Ženy	Celá populace
Incidence			
počet novotvarů	241 813	205 323	447 136
počet novotvarů na 100 000 osob	67,6	53,5	60,3
ASR(W)_(incidence a mortalita)	37,3	23,6	29,5
podíl ze ZN (zhoubný novotvar) kromě kožních	13,2 %	12,7 %	13,0 %
pořadí mezi ZN kromě kožních	3.	2.	2.
Mortalita			
počet úmrtí	113 246	101 620	214 866
počet úmrtí na 100 000 osob	31,7	26,5	29,0
ASR(W)	16,2	9,9	12,5
podíl z úmrtí na ZN kromě kožních	11,6 %	13,0 %	12,2 %
pořadí mezi ZN jako příčinou úmrtí	2.	2.	2.
Prevalence (žijící pacienti do 5 let od dg.)			
počet pacientů	656 384	547 559	1 203 943
počet na 100 000 osob	220,1	167,1	192,3
Kumulativní riziko vzniku nádoru			
do 75 let od narození	4,48 %	2,73 %	3,51 %

6.2.3 Klinická manifestace – lokální, systémové

Je podstatné věnovat pozornost dlouhodobější změně střevní činnosti, která se může projevit pocitem nedokonalého nebo obtížného vyprázdnění, zácpou či průjmem. Nejběžnější známkou nádoru je krev ve stolici nebo krvácení z konečníku. To může vést k pocitu plnosti, bolesti břicha, větší plynatosti a horšímu odchodu plynů. Střevní neprůchodnost může být vyvolána růstem nádoru, což se následně projeví křečovými bolestmi břicha, pocitem nafouknutí, zácpou, slabostí ale i zvracením. Kolorektální karcinom může růst dlouhodobě bez příznaků. Důležitý údaj je snížení hmotnosti. Proto je nutné při jakýchkoliv pochybnostech podstoupit vyšetření u praktického lékaře (ANONYMOUS A, 2015).

6.2.4 Prevence

Hlavním cílem primární prevence je snížit až eliminovat rizikové faktory, které mají prokazatelný vliv na vznik kolorektálního karcinomu. Pohybová aktivita přispívá k udržení optimální tělesné aktivity. Velmi důležitá je nutričně adekvátní a pestrá strava založená z velké části na potravinách rostlinného původu. Hodnoty BMI dospělých jedinců by se měly pohybovat v rozmezí 18,5-25. Při prevenci by se měl snížit příjem potravin s vysokým podílem cukrů, tuků a naopak zvýšit příjem vlákniny.

Nutné je omezit příjem sladkých nápojů. Konzumace alkoholu se nedoporučuje, v případě konzumace u mužů by alkohol neměl tvořit více než 5 % energetického příjmu a u žen 2,5 %. U konzumace masa je důležité limitovat konzumaci červeného masa, nahradit jej rybami, popřípadě drůbežím. Pro přípravu masa a ryb používat relativně nízké teploty, upřednostňovat vaření a dušení. Pouze příležitostně konzumovat grilované a rožněné maso. Omezit konzumaci slaných jídel a celkově snížit použití soli při vaření. Tyto doporučení snižují výskyt kolorektálního onemocnění ale i dalších nádorových onemocnění. Mají efekt i proti nenádorovým nemocem jako jsou nemoci srdce a cév, vysoký krevní tlak, cukrovka a obezita (VYZULA, R., J. ŽALOUDEK a KOLEKTIV, 2007).

Sekundární prevence spočívající v časném záchytu, což pro pacienta znamená vyléčení. Jde o kolorektální screening. Znamená zachycení léčitelného nádorového onemocnění v jeho časných stádiích, kdy pacient nepociťuje potíže ani žádné příznaky. Hlavní cíl kolorektálního screeningu (Tabulka č. 5) je snížit morbiditu (nemocnost) i mortalitu (úmrtnost). Přínos potom spočívá ve zlepšení prognózy, možnosti méně radikální a přitom účinnější léčby. Tento screening spočívá v pravidelných testech okultního krvácení do stolice (TOKS) nebo na primární screeningové kolonoskopii. Test okultního krvácení se provádí u bezpříznakových jedinců nad 50 let a v případě negativního výsledku by měl být opakován jedenkrát za rok. Lidé nad 55 let mohou zvolit pokračování v pravidelných testech TOKS, nebo mohou podstoupit primární screeningovou kolonoskopii, kterou stačí provést jednou za deset let, pokud je výsledek negativní. Screeningová kolonoskopie se také provádí v případě pozitivního testu TOKS a další terapeutický postup v tomto případě se řídí dle doporučení pro pacienty s vysokým rizikem tohoto onemocnění (ANONYMOUS B, 2015).

Tabulka č. 5 Přehledné výsledky screeningu kolorektálního karcinomu: 2006 – říjen 2015 (ANONYMOUS C, 2015)

Rok	Kolonoskopie	Adenomy	Podíl	Karcinomy	Podíl
2006	5 321	1 576	29,60 %	335	6,30 %
2007	5 675	1 635	28,80 %	337	5,90 %
2008	7 457	2 368	31,80 %	445	6,00 %
2009	13 072	4 124	31,50 %	623	4,80 %
2010	22 727	7 310	32,20 %	871	3,80 %
2011	24 708	8 301	33,60 %	776	3,10 %
2012	25 630	8 948	34,90 %	812	3,20 %
2013	26 938	10 119	37,60 %	867	3,20 %
2014	38 083	14 392	37,80 %	1 040	2,70 %
2015*	21 471	7 570	35,30 %	502	2,30 %

Zdroj: Registr screeningových kolposkopií

6.2.5 Terapie

Pro stanovení optimálního terapeutického postupu musí lékař znát výsledek histologického odběru a rozsah onemocnění. Velmi závažné je, jestliže tumor prorůstá střevní stěnou a následně zasáhne ostatní orgány.

Chirurgická resekce střeva může být v nepokročilém stavu zcela kurativní, tedy má pacienta vyléčit. Při operaci je zcela odstraněn nádor i s okolním makroskopicky zdravým lemlem tkáně. Zda byl výkon zcela úspěšný, je zjištěno histologickým zpracováním tkáně odebrané z okolí, omenta a pánevních lymfatických uzlin.

Ozařování tlustého střeva se neprovádí, protože v blízkosti se nachází vysoce radiosenzitivní tenké střevo.

Chemoterapie znamená užívání cytostatik. Pro adjuvantní podání je základní kombinace 5 – fuorouracil (5-FU) a leukovorin. Adjuvantní léčba je určena po kurativní léčbě, ve většině případů po chirurgické a je směřována proti skryté nádorové nemoci. Klinicky se nádor nenachází, ale je předpoklad mikrometastatického rozsevu a proto musí být léčba zahájena včas, obvykle do tří týdnů (KONOPÁSEK, B. a L. PETRUŽELKA, 2003).

6.2.6 Prognóza při včasném záchytu

Prognóza závisí na včasném záchytu a včasném zahájení léčby. Zlepšení lze očekávat od primární a sekundární prevence. Úspěšná onkologická léčba je závislá na tom, aby pacient přišel včas. Včasně zachycená onemocnění jsou vyléčitelná. Pokročilé nádory nemusí být léčitelné a často se šíří do okolí a metastázuje.

Do skupiny se zvýšeným rizikem je zařazena familiární adenomová polypóza (FAP), syndrom hereditárního nepolypózního karcinomu (HNPCC), osoby s kolorektálním karcinomem (CRC) v rodinné anamnéze, nespecifické střevní záněty, osoby po endoskopické polypektomii adenomových polypů (VYZULA, R., J. ŽALOUDÍK a KOLEKTIV, 2007).

Podezření na dědičnou formu by mělo vzniknout, jestliže se onemocnění v rodině vyskytlo v předešlých generacích.

6.3 Odběr bioptického materiálu

6.3.1 Kolonoskopie

Kolonoskopie a endoskopické odstranění adenomů tlustého střeva je účinná metoda sekundární prevence tlustého střeva. Pomocí ohebné trubice může lékař nahlédnout dovnitř tlustého střeva a konečníku. Kolonoskopie umožňuje přesně a úplně zobrazit dutý prostor tlustého střeva a nahrazuje dříve používané rentgenové vyšetření. Kolonoskop je přístroj, kde na jednom konci je obvykle okulár, kterým lékař vyšetřuje. Některé přístroje umožňují přenos na monitor. Přístroj dále obsahuje ovládací zařízení na regulaci zakřivení a otáčení přístroje. Hadice obsahuje světlovod přivádějící studené teplo, pracovní kanál a kanálky na oplachování vodou a napouštění vzduchu (asi 1,5 – 2 l). Při vyšetření proudí vzduch do střeva a roztahuje stěny. Náplň střeva pacient většinou pociťuje jako střevní pnutí a plnost. Pracovní kanál je nezbytný pro zavedení miniaturních přístrojů. Před kolonoskopií by mělo dojít k vyprázdnění střeva a to lačněním, kdy poslední jídlo by mělo být v poledne den před vyšetřením a následné užití předepsané dávky projímadla. Vyšetření obvykle trvá 15 -20 minut.

Pro odstranění polypů slouží různě tvarované polypektomické klíčky. Zásadou je, aby byl polyp celý odstraněn, tzn. nasadit klíčku tak, aby stopka byla pevně zachycena a elektrickým řezným proudem byl polyp celý odstraněn. U vícečetných polypů je nutné provést několik polypektomií. Získané polypy jsou zaslány k histologickému zpracování a u vícečetných polypů je dbáno na to, aby došlo k oddělení materiálu podle úseků střeva, kde byly polypy odstraněny (nejčastěji se nacházejí v oblasti sigmoidu - 20 %, v oblasti vzestupného tračnicku – 15 %, v příčném a sestupném tračnicku – 7 %, ostatní připadají na rektum). Objemné polypy jsou odstraněny po částech.

Histologické vyšetření v laboratoři bioptického materiálu je nesmírně důležité při rozlišení mezi hyperplastickými a adenomatózními polypy. Hyperplastické polypy, které bývají i vícečetné a jsou obvykle menší než 5 mm, nevykazují známky dysplazie, nemají tedy maligní potenciál. Adenomatózní polypy tvořené dysplastickým epitelem jsou různě velké, v některých případech i několikacentimetrové. Maligní potenciál mají obvykle polypy velikosti dvou a více cm. Jestliže se nádor nachází v hlavičce stopkatého polypu, má polypektomie kurativní charakter, což znamená pacienta zcela zbavit nádorové nemoci.

Součástí kolonoskopie může být endoskopická mukozální resekce (EMR) nebo endoskopická submukózní disekce (ESD) k odstranění patologického ložiska. Při těchto výkonech nedochází k poruše kontinuity střeva. Veškerá odebraná tkáň, tzv. bioptický materiál musí být podroben histologickému zpracování. Výsledek biopsie je pro lékaře rozhodující z důvodu stanovení následné léčby, zda bude pacient sledován nebo podstoupí chirurgický zákrok (VYZULA, R., J. ŽALOUDÍK a KOLEKTIV, 2007).

6.3.2 Kolektomie

Chirurgická resekce je primární forma léčby pro časná stadia CRC. Patologická analýza resekovaných vzorků je důležitý nástroj pro zhotovení prognózy a další léčby pacienta. Parametry, které určují patologické stadium jsou nejsilnější prediktivní faktory pro zhodnocení chirurgického výkonu, ostatní klinické, molekulární a imunohistochemické znaky mají také vliv na prognózu (COMPTON, C., 2016).

Kolektomie je chirurgický zákrok, při kterém dochází k odstranění celého tlustého střeva a následným vyústěním tenkého střeva do konečníku. Totální kolektomii lékař

volí v případě, že se u pacienta vyskytuje familiární polypóza nebo nádor roste v různých místech tračníku současně.

Velmi často ale chirurgové přistupují k hemikolektomii, která pro pacienta znamená odebrání poloviny tlustého střeva. Dochází k radikální resekci postiženého úseku střeva, současně s odstraněním většího množství lymfatických uzlin a odstranění i potencionálně poškozené tkáně nádorem. U nádorů by aborální vzdálenost resekčních okrajů neměla být menší než 5 cm od tumoru. Hemikolektomii můžeme rozlišit na:

- pravou hemikolektomii – odstraněna pravá polovina střeva,
- levou hemikolektomii – odstraněna levá polovina střeva,
- resekci sigmatu – odstranění esovitého tračníku,
- resekci rekta – provádí se, pokud je nádor nalezen pouze v rektu (ŠIMŠA, J.,2016).

Po hemikolektomii dochází k histologickému zpracování odebrané tkáně. Pokud je tumor málo diferencovaný, jsou zastiženy metastázy v uzlinách nebo jsou nádorové buňky zastiženy v resekčních okrajích, podstupuje pacient adjuvantní chemoterapii. Jako paliativní léčba může být zvolena radioterapie, která ovšem nemá léčebný efekt, ale zlepšuje kvalitu pacientova života.

6.4 Histologické zpracování tkáně

6.4.1 Příprava vzorku pro laboratorní zpracování

Odebraná tkáň pro histologické zpracování musí být vložena do fixační tekutiny. Fixace zabraňuje samovolnému rozkladu tkáně (autolýze) tím, že vysráží bílkoviny. Nejběžnější fixační prostředek používaný v laboratořích je 10% formaldehyd. Pro účely imunohistochemické je nejvhodnější pufrovaný formaldehyd. Při následném cytogenetickém a molekulárním vyšetření tkáně je doporučeno použití pufrovaného formaldehydu, který šetrně uchovává struktury DNA.

Při fixaci dochází vždy ke změně struktury tkáně. Cílem je, aby tyto změny byly co nejmenší, proto je důležité zvolení vhodného fixačního roztoku. Dále musí být zachována barvitelnost tkáně. Fixační tekutina musí rychle proniknout do tkáně, množství tekutiny souvisí s velikostí dané tkáně. Doba fixace se pohybuje od 24 do 48 hodin v závislosti na velikosti tkáně. Malý polyp odebraný při kolonoskopii bude potřebovat kratší čas pro fixaci, než část střeva odebraná při hemikolotomii (VACEK, Z., 1996).

Po fixaci následuje blokování tkáně do bioptických kazet několika typů. Bioptická kazetka typu Mikrotwin je vhodná pro zpracování tkáně menších velikostí v rozsahu 1 - 5mm. Kazetka Mikrotwin má malé otvory na svém povrchu a tím je zaručeno bezpečné zpracování velmi drobných částic a zároveň se ke zpracovávané částici dostanou reagentie, které působí na tkáň ve tkáňovém procesoru. Bioptická kazeta BIO-AMP je určena pro zpracování částic střední velikosti, v rozsahu 5 - 10mm, kazetka Standard je určena pro zpracování částic větších rozměrů, v rozsahu až do maximální velikosti 2x2,5cm (Obrázek č. 4).

Obrázek č. 4 Bioptické kazetky (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)



6.4.2 Odvodnění a prosycení tkáňového vzorku

Tkáňový vzorek v bioptické kazetě je následně zpracován v tkáňovém procesoru. Tento přístroj zajistí odvodnění a prosycení vzorku, který je určen ke zpracování formol-parafínovou metodou. Standardní tkáňový procesor s využitím xylenu zpracovává tkáň obvykle v časovém rozmezí 14-ti a více hodin, kontinuální tkáňový procesor bez využití xylenu zpracovává tkáň v časovém rozmezí 60 - 120 minut. U obou typů procesorů dochází v prvním kroku k odvodnění tkáně a v poslední fázi k prosycení tkáně v tekuté parafínové lázni.

Standardní tkáňový procesor zpracovává tkáň postupem odvodnění etanolem, prosycení xylenem a prosycení parafínem.

Odvodnění tkáně se provádí vzestupnou řadovou etanolu. Znamená to, že koncentrace etanolu se postupně zvyšuje. Je to důležité proto, aby nedošlo ke smrštění tkáně, což by nastalo, kdybychom tkáň vložili naráz do koncentrovaného etanolu (VACEK, Z., 1996).

Následuje mezistupeň v lázni acetonu, nebo izopropylalkoholu. Předposledním krokem zpracování je prosycení tkáně xylenem, který se mísí s bezvodou formou reagensů a zároveň rozpouští parafín.

Kontinuální tkáňový procesor Tissue-TeX Xpress umožní zpracování tkáně v kratším časovém horizontu. Pokud je tkáň blokována přesně stanoveným postupem, v určité tloušťce a ve správné velikosti dle topografie odběru, je zvolena doporučená délka zpracování a je v preanalytické části ošetřena roztokem Pre-Processing Solution (PPS). Roztok PPS je na bázi acetonu, který zahajuje dehydrataci tkáně. Následně procházejí vzorky v transportním koši dalšími dvěma retortami, které jsou naplněny komerčně dodávanými reagensy. Tyto roztoky zajišťují fixaci, dehydrataci a prosycení tkáně. Retorty jsou vyhřívány mikrovlnným zářením, proces probíhá při teplotě 51°C. Následují dvě vakuové stanice, kde dochází k parafínové impregnaci vzorků. Vakuum zvyšuje odstranění reagensů použitých v mikrovlnných retortách a zlepšují pronikání parafínu do tkáně. Takto zpracované vzorky odebíráme z poslední výstupní stanice procesoru.

6.4.3 Příprava preparátů pro mikroskopickou analýzu (zalévání, řezání, barvení)

K zalévání bločků se používá zalévací linka, zkvalitněný a rozpuštěný 58-60°C parafín, zalévací formička. Bioptickou kazetku se zpracovanou tkání otevřeme, odlomíme víčko a dále využíváme pro zpracování pouze spodní část kazetky s popisnou částí, kde je uvedeno vyšetřovací číslo vzorku. Zalévací formička se naplní z části parafínem, pinzetou umístíme tkáň do formičky a orientujeme průřez tkáně. Správná orientace tkáně v parafínovém bloku je stěžejní pro následnou mikroskopickou analýzu. Na formičku přiložíme spodní část bioptické kazetky, doplníme kazetku parafínem a formičku se zalitým vzorkem umístíme na chladicí modul zalévací linky. Po několika minutách lze hotový parafínový blok oddělit od zalévací formičky a vzorek tkáně je připraven k řezání na mikrotomu.

Mikrotom je základní přístrojové vybavení pro řezání parafínového bloku. Parafínový blok se upne do pevné svorky a parafínová část je řezána tenkým mikrotomovým nožem. Blok je nejdříve prořezán do větší hloubky sérií hrubších řezů a následně se nastaví řezání tenkých řezů, obvyklá tloušťka je okolo 2 μm . Tyto řezy přeneseme na vodní hladinu, která umožní napnutí řezu na podložní sklo preparátu. Tímto způsobem vznikne histologický preparát s tkáňovým vzorkem, který se dále zvýrazní barvicí histologickou metodou.

Histologický preparát před začátkem barvení prochází krokem sušení. Při manuálním barvení preparátů je barvicí koš s preparáty uložen do termostatu po dobu 20-30 minut, při barvení barvicím automatem je první fáze barvení nastavena startem v sušící stanici.

„Pozorujeme-li neobarvený preparát v obyčejném světelném mikroskopu, nerozeznáme jednotlivé složky tkáně, protože se vzájemně mnoho neliší lomivostí světla. Z tohoto důvodu barvíme řezy vhodnými barvivy, využívající toho, že různé součásti buněk a tkáni vážou různá barviva, takže se pak dají v mikroskopu zřetelně rozlišit“ (VACEK, Z., 1996).

K barvení používáme zpravidla barviva rozpustná ve vodě. Barvení histologického řezu začíná xylenovou lázní, xylen odstraní parafínovou část. Následuje sestupná řada alkoholových lázní v koncentraci 96% alkohol, 80% alkohol a 70% alkohol. Po poslední

alkoholové lázni následuje opláchnutí preparátu vodou. Nyní je preparát připraven pro fázi barvení barvicí metodou, která zvýrazní struktury tkáně pro mikroskopickou analýzu.

K základnímu barvení tkání používáme barviva zásaditá. Nejpoužívanější v histologickém barvení je hematoxylin. A dále barviva kyselá, z nichž nejpoužívanější je eozin. Spojením získáme základní a nejpoužívanější metodu hematoxylin-eozin. V preparátu potom vidíme modrá jádra a růžové vazivo (VACEK, Z., 1996).

Po ukončení barvení preparáty odvodníme vzestupnou alkoholovou řadou, následuje lázeň acetonu, lázeň aceton-xylen, dvě až tři lázně xyleny. Provedeme montáž preparátu, abychom zabránili mechanickému poškození obarvené tkáně. Manuální montáž je provedena použitím montážního média Solakryl a přiložením tenkého krycího skla na histologický řez. Automatická montáž překryje obarvený tkáňový řez montážní páskou, která má montážní médium již na svém povrchu. Po zaschnutí montážního média je histologický preparát dostatečně chráněn před vnějšími mechanickými vlivy.

6.4.4 Histochemická a imunohistochemická analýza

Základní barvicí metoda Hematoxylin – Eosin je v případě potřeby doplněna speciální histochemickou, nebo imunohistochemickou analýzou.

Histochemická metoda zvýrazní další látky a enzymy přítomné ve tkáni. Pro diagnostiku biopsie odebrané při kolonoskopii používáme speciální barvení na přítomnost mukopolysacharidů. Nejčastěji používané metody jsou metody Periodic Acid Schiff (PAS), metoda Alcian, kombinovaná metoda PAS-Alcian. Metoda Alcian zvýrazní mukopolysacharidy modrozeleným zbarvením, metoda PAS nabarví neutrální mukopolysacharidy růžovofialově. U obou speciálních metod jsou jádra buněk zvýrazněna hematoxylinem modře. Metoda může být barvena manuálně, nebo barvicím automatem.

Imunohistochemie (IHC) je pokročilejší metoda, která pomáhá diagnostikujícímu lékaři určit přesně příčinu nemoci, nebo její původ a jeho závěr dále ovlivní optimální terapii pacienta. Principem této metody je vazba antigen – protilátka. Přímá IHC

využívá postupu: detekce (odhalení) antigenu, aplikace primární značené protilátky, reakce se specifickým substrátem, vznik barvené reakce. Citlivější a přesnější je nepřímá IHC, která využívá v postupu primární i sekundární protilátku. Provedení IHC analýzy je v posledních letech prioritou větších histologických laboratoří a je tedy převážně prováděna automaty. Automat aplikuje všechny reagenty v přesně stanoveném množství a zaručí, aby byl vždy pokryt celý povrch diagnostického preparátu.

Histochemické i imunohistochemické zpracování je stejně jako základní barvení ukončeno odvodněním, projasněním a montáží histologického řezu.

7. PRAKTICKÁ ČÁST

7.1 První část

Pro hodnocení v první části jsem si vybrala tyto biopsie odebrané pacientům při kolonoskopickém vyšetření:

Pacient **A**, žena, 82 let, základní diagnóza - zácpa.

Pacient **B**, muž, 46 let, základní diagnóza – zhoubný novotvar esovitého tračníku (colon sigmoideum).

Pacient **C**, muž, 90 let, základní diagnóza - zhoubný novotvar konečníku (rekta).

Ve všech třech případech byl bioptický materiál dopraven do laboratoře v přepravních nádobách s 10-% formalínem. Po dodržení správné doby fixace byla biopsie následně zpracována dle standardních operačních postupů našeho oddělení.

7.1.1 Zpracování

Po příjmu materiálu, kontrole označení nádoby a všech základních údajů na žádance je přiděleno bioptické číslo. Toto číslo je tištěno na průvodní list k materiálu a dále na kazetky, do kterých lékař zablokuje materiál, a následně i skla se zpracovanými histologickými preparáty. Zároveň je pod tímto číslem vytvořen záznam v elektronické kartě pacienta v softwarovém systému našeho oddělení. Je tak zamezeno případné záměně materiálu během celého průběhu zpracování a hodnocení materiálu.

V případě **A** byla dodána jedna částička polypku colon ascendens velikosti do 3mm, která byla kompletně zpracována v jednom bloku.

V případě **B** bylo dodáno deset částek z místa původního stenozujícího adenokarcinomu sigmoidea, kde t. č. dle klinického nálezu bylo po chemoterapii ložisko fragilní exulcerované sliznice. Částičky byly šedohnědé barvy, velikosti do 3 mm a zpracovány kompletně ve dvou blocích.

V případě **C** byl dodán tumor rekta umístěn a orientován na korkové desce, kde orální směr byl označen šipkou. Patolog, který tuto biopsii přikrajoval, si orální směr

označil zelenou tuší a ostatní plochy černě. Toto označení umožní lékaři orientaci odebraného materiálu při mikroskopickém hodnocení preparátu, kde zůstane barva zachovaná. Lékař dále ve svém makroskopickém nálezu zaznamenal, že tumor má velikost 5x4x1cm. Ve vzdálenosti 1,5cm od nejorálnější části okraje a 0,7cm od nejkaudálnějšího okraje prominuje nad stěnou střešní knoflíkovitý tumor lehce zrnité struktury velikosti 2,6x3cm s tloušťkou do 0,5cm. Materiál byl sériově prokrojen. Na řezu v místě tumoru byly zřetelné jemně žíhané tuhé šedobílé homogenní hmoty, které pronikaly sliznicí i submukosou. Lékař tento materiál zpracoval do deseti bloků.

V případě **A** a **B** byl bioptický materiál zpracován v dopoledních hodinách kontinuálním tkáňovým procesorem. Tento materiál vyhovuje požadavkům pro toto zpracování. Zpracování proběhlo v časovém intervalu 90 minut. Následně byly biopsie zality do parafínových bloků a ještě týž den připraveny k dalšímu zpracování.

Materiál **C** byl zpracován standardním tkáňovým procesorem, vzhledem k větší tloušťce a rozměru biopsie. V našem případě to znamená, že materiál je po přikrojení umístěn do zásobního koše i s dalšími biopsiemi a ponechán ve formalínu. V odpoledních hodinách byl koš umístěn do tkáňového procesoru, kde začíná odvodnění a následné prosycení. Zpracování proběhlo během 14 hodin. Následující den byl materiál zalit do parafínového bloku.

Na našem oddělení máme typ kontinuálního tkáňového procesoru Sakura Tissue-Tek® Xpress® x 120. Největší výhodou je zpracování týž den, což znamená, že lékař který tkáň přikrojí, dostane obarvený preparát již za 5 hodin.

Pro zjištění, zda tento způsob zpracování není na úkor kvality preparátů, bylo na našem pracovišti provedeno porovnání v období 18 měsíců a bylo vyhodnoceno 53 279 parafínových bloků. Při hodnocení histologických řezů barvených hematoxylin-eozinem jsme neshledali kvalitativní odchylky oproti materiálu zpracovaném ve standardním tkáňovém procesoru. Stejně tak při imunohistochemickém vyšetření nedocházelo ke vzniku falešné positivity či negativy ve srovnávacím vzorku materiálu zpracovaném v standardním tkáňovém procesoru.

Díky tkáňovému procesoru Sakura Tissue-Tek® Xpress® x 120 umožňujícímu kontinuální vkládání vzorků a jejich průběžné zpracování je možno velkou část

výsledků expedovat v den příjmu materiálu, jedná-li se o diagnózy bez nutnosti imunohistochemického vyšetření. V případě materiálu, kde je k diagnóze či jejímu potvrzení nutné provést následně jiné speciální barvení či imunohistochemické vyšetření jsou výsledky expedovány do tří dnů od přijetí materiálu.

Výhodou barvicí metody PAS-Alcián je spojení dvou barvicích metod do jedné. Lékaři tak usnadňuje orientaci v mikroskopickém preparátu při stanovení diagnózy.

Po zalití bioptického materiálu do parafínu, jsou bločky připraveny ke zhotovení preparátů. Ke krájení tkáňových řezů používáme rotační mikrotomy s nastavenou tloušťkou řezu 2 μm . Podložní sklo je označeno bioptickým číslem a barvicí metodou. Pro stanovení diagnózy u kolonoskopických odběrů připravíme jeden preparát určený k základnímu barvení hematoxylin-eozin a jeden preparát ke speciálnímu barvení PAS-Alcián. Preparáty jsou následně sušeny v termostatu při 60°C nebo při použití barvicího automatu umístěny do sušící stanice.

Barvicí automat slouží k nabarvení až šedesáti preparátů najednou. Na něj navazuje lepící automat, který zamontuje obarvené preparáty. Na barvicím automatu na našem oddělení máme nastaveny nejčastěji používané barvicí metody hematoxylin-eozin, PAS a PAS-Alcián.

Preparáty jsou vloženy do barvicích košíků podle barvicí metody. Na barvicím automatu zvolíme požadovanou metodu a vložíme košík s preparáty do startovací retorty. Automat si sám košík vloží na 30 minut do sušící stanice. Následně probíhá barvení.

Metoda hematoxylin-eozin (Obrázek č. 5):

Odparafinování řezů - 2 lázně xylenu po 3 minutách, 96 % alkohol 3 minuty a 70 % alkohol 3 minuty.

Barvení

- oplach tekoucí vodou 1 minutu
- Koďouskův hematoxylin 5 minut
- oplach tekoucí vodou 5 minut – barvení jader
- eozin 3 minuty
- oplach tekoucí vodou 3 minuty

Odvodnění řezů -70 % alkohol 3 minuty, 96 % alkohol 3 minuty, aceton 1 minutu, aceton /xylen 2 minuty, 2 lázně xylenu po 3 minutách.

Obrázek č. 5 Výsledek barvení hematoxylin-eozin (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)



Metoda PAS-Alcián (Obrázek č. 6):

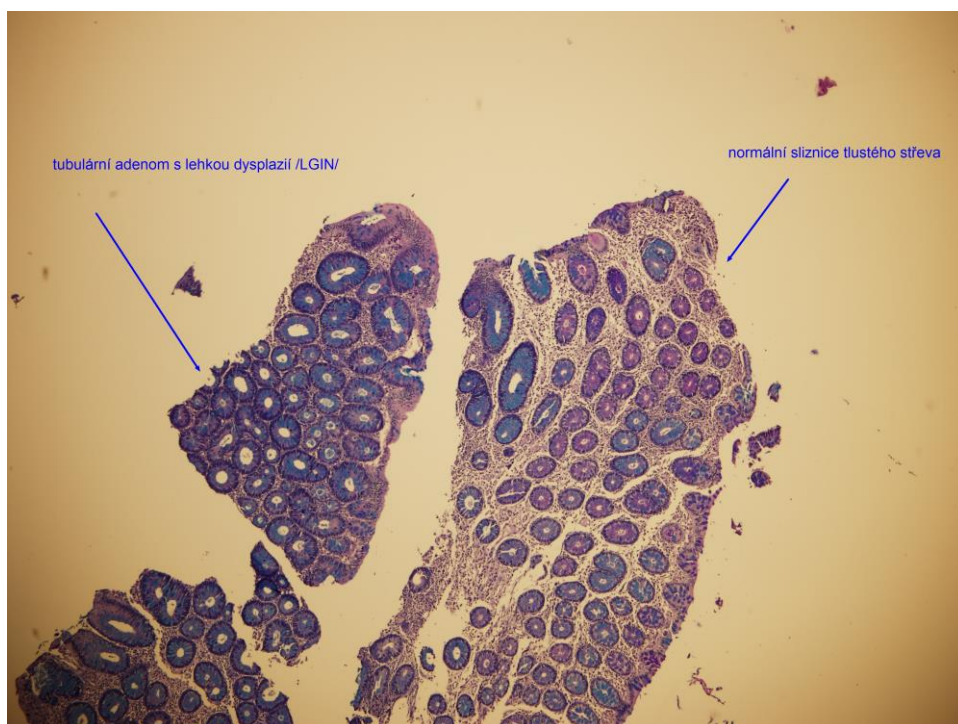
Odparafinování řezů - 2 lázně xylenu po 3 minutách, 96 % alkohol 3 minuty a 70 % alkohol 3 minuty.

Barvení

- 1% alciánová modř 5 minut
- oplach tekoucí vodou 1 minutu
- 0,5 % kyselina jodistá 2 minuty
- oplach tekoucí vodou 1 minutu
- Schiffovo reagens 12 minut
- oplach tekoucí vodou 10 minut
- Koďouskův hematoxylin 8 minut
- tekoucí voda 5 minut

Odvodnění řezů -70 % alkohol 3 minuty, 96 % alkohol 3 minuty, aceton 1 minutu, aceton /xylen 2 minuty, 2 lázně xylenu po 3 minutách.

Obrázek č. 6 Výsledek barvení PAS-Alcián barvení (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)



7.1.2 Vyhodnocení

Patolog na základě histologických preparátů zpracovaných výše popsaným způsobem zhodnotí případné změny v daných tkáních a určí diagnózu. Ta je následně odesílána žádajícímu lékaři (zpravidla lékaři odebírajícímu materiál k histologickému vyšetření, popř. dále obvodnímu lékaři) a na jejím základě je rozhodnuto o následné léčbě či sledování pacienta.

Pacientovi **A** byl diagnostikovaný adenom ascendentu.

Pacientovi **B** byla diagnostikována reziduální infiltrace strukturami neadjuvantní terapií poškozeného adenokarcinomu v re-biopsii sliznice esovité kličky.

Pacientovi **C** byl diagnostikován v místě původního tubulárního adenomu vyrůstající středně diferencovaný tubulární adenokarcinom GII, který invaduje na hranici se svalovinou, okraje jsou bez nádoru.

V těchto daných případech mohla být histologická diagnóza stanovena z preparátů se základním barvením HE a Pas-Alcián. Nebylo nutné provádět následné imunohistochemické vyšetření.

Bioptický materiál z kolonoskopických odběrů mívá různý morfologický vzhled. Velikost se pohybuje od milimetrových polypů až po polypy velikosti několika centimetrů. Proto je při přikrajování velice důležité rozhodnutí lékaře, zda ponechá materiál celý a neporušený (milimetrové polypy) a materiál je zablokován do jedné kazetky nebo se ho rozhodne naexcidovat (větší centimetrové polypy) a materiál je zablokován do více kazetek podle velikosti polypu.

Dalším důležitým krokem ve zpracování je rozhodnutí laborantky, zda zvolí rychlejší metodu v kontinuálním procesoru nebo metodu zpracování standardním procesorem. Kontinuální zpracování je rychlejší a tkáň projde procesorem asi za hodinu a půl, není však vhodné pro všechny typy tkání. U materiálu větší velikosti a vzhledu tukové tkáně reagentie neproniknou za krátký časový interval tkání. Proto znalost morfologie materiálu je pro práci laborantky jednou z nejdůležitějších (Tabulka č. 6).

Tabulka č. 6 Porovnání zpracování bioptických vzorků (vlastní zpracování, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)

Kontinuální zpracování	Nákladnější, finanční náročnost se odvíjí od cen reagensů, které jsou určeny pouze pro tento typ přístroje a jsou dodávány dvorní firmou
	Není vhodná pro všechny typy tkání
	Možné kontinuální vkládání cca 20 minut s maximem 30 kazetek v transportním koši
	Možné stanovení diagnózy v den zpracování
	Erudovanost laborantky
	Vysoká pořizovací cena procesoru
Standardní zpracování	Méně finančně náročné, používání standardních reagensů
	Vhodné pro všechny typy tkání
	Vkládání vzorků jednou denně s maximem 300 kazetek, které se zpracovávají do následujícího dne
	Požizovací cena ve srovnání s kontinuálním procesorem je méně finančně náročná

Největší výhodou kontinuálního zpracování spočívá v možnosti stanovení diagnózy a odeslání výsledku v den zpracování. Kontinuální zpracování je vhodné pro laboratoře s větším objemem denního příjmu bioptického materiálu.

Všechny materiál po zpracování v procesorech je zaléván do parafínu. Zde nejvíce záleží na správné orientaci tkáně. Materiál musí být správně nasměrován a zalitý do roviny. Proto kromě znalosti morfologie je zde také důležitá zručnost a zkušenost laborantky. Správná orientace tkáně se projeví na nabarvených preparátech.

Při zhotovování histologických preparátů pro mikroskopickou analýzu používáme mikrotomy a zhotovujeme řezy o tloušťce 2 µm. Laborantka musí být zručná, ale také musí poznat, zda dostatečně zachytila tkáň.

Pro speciální barvení používáme metodu PAS-Alcián, spojením dvou metod barvení došlo k úspoře času, kdy místo barvení dvou skel se barví pouze jedno sklo.

Úspora v menším počtu barvených preparátů je také výhodnější po stránce finanční. Pro lékaře to znamená, že v jednom preparátu může vyhodnotit současně dvě barvicí metody. Pro mikroskopickou analýzu se v patologii používají optické mikroskopy.

7.2 Druhá část

Pro hodnocení v druhé části jsem si vybrala biopsii odebranou při kolektomii. Sedmdesátiletá pacientka podstoupila kolonoskopické vyšetření, při kterém jí bylo odebráno 6 částic bílé barvy z tumoru rekta. Ve dvou z nich byly zachyceny žlázy tubulovilózního adenomu s těžkými dysplastickými změnami žlázovitého epitelu, které v jedné z částic přecházejí ve žlázy infiltrativně v desmoplastickém stromatu se šířícího dobře diferencovaného adenokarcinomu.

Závěrečná diagnóza: v terénu tubulózního adenomu vyrůstající adenokarcinom G1.

Na základě této diagnózy stanovené patologem z histologického vyšetření chirurg odebral resekát rektosigmatu.

7.2.1 Zpracování

Materiál od pacientů, kteří byli indikováni onkologickou komisí k resekci střeva, neboť u nich byl prokázán předchozím vyšetřením nádor, se nezalévá na operačním chirurgickém sále fixační tekutinou a je dodáván na naše pracoviště v nerozstřiženém a nativním stavu (Obrázek č. 7). Po přijetí je nádoba s resekátem střeva označena bioptickým číslem a zavedena do systému.

Lékař střevo prohlédne a změří jeho celkovou délku, označí, zda byl nalezen tumor (ve většině případů je tumor nalezen) a popíše celkovou morfologii tumoru. Dále zaznamenává minimální vzdálenost dolního okraje od aborální resekční linie, minimální vzdálenost horního okraje tumoru od orální resekční linie, maximální délku, šíři a tloušťku tumoru. Všechny údaje jsou zaznamenány na speciální průvodní list

určený pro tyto odběry. Střevo je lékařem zdokumentováno fotografií a následně zalito fixační tekutinou.

Po dodržení dostatečné doby fixace lékař zhotoví sériové průřezy v místě tumoru a opět zdokumentuje (Obrázek č. 8). Následuje blokování do bioptických kazetek. U této biopsie bylo blokováno: tumor v blocích 1 – 9, aborální resekční okraj v blocích 10 – 14, orální resekční okraj v bloku 15. Ze střeva byla ponechána rezerva tukově vazivové tkáně, která byla zalita do speciálního uzlinového roztoku. Jeden litr uzlinového roztoku je směs 600 ml metylalkoholu, 300 ml chloroformu a 100 ml kyseliny octové. Tento roztok po 4 a více hodinách (podle velikosti tkáně) zvýrazní lymfatické uzliny. Po fixaci v uzlinovém roztoku bylo u této biopsie lékařem nalezeno 23 lymfatických uzlin do velikosti 6mm v průměru a byly zablokovány v blocích 16 – 23 vždy po jedné uzlině. Blokování uzlin má velký význam pro výslednou diagnózu. V případě, že v uzlinách nejsou zastiženy metastázy, znamená to pro pacienta příznivější prognózu.

Po přikrojení následuje zpracování v standardním tkáňovém procesoru, zalití tkáně do parafínu a zhotovení preparátů. Z každého bloku je připraven jeden preparát a nabarven základní barvicí metodou hematoxylin-eozin. Mikroskopickou analýzou lékař stanoví diagnózu.

Obrázek č. 7 Resekát střeva v nativním stavu (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)



Obrázek č. 8 Sériové průřezy v místě tumoru (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)



7.2.2 Vyhodnocení

V našem případě šlo o diferencovaný adenokarcinom tlustého střeva. Ve vyšetřených uzlinách nebyly zastiženy metastázy.

V případě metastazování karcinomu do uzlin odesílají lékaři materiál z tumoru na vyšetření mutace K-ras genu. Výsledky tohoto genetického vyšetření jsou rozhodující pro následnou léčbu.

Výhodou fotografické dokumentace je používání k případným potřebám prezentace či publikace. Nativní preparát střeva je zdokumentován ještě před fixací, která zpravidla ve tkáni způsobuje změnu tvaru, velikosti, barvy a konzistence.

Tyto změny mohou rovněž ovlivnit charakter resekcí linií preparátu, jejichž hodnocení je velmi důležité pro následnou léčbu pacienta, proto může být fotodokumentace nativního preparátu důležitou částí reportu pro klinického lékaře. Rentgenolog si může dle fotografií sériových řezů resektátu srovnat hloubku nádorové invaze do stěny střevní se svým endosonografickým nálezem.

Mezi rozhodující ukazatele při tomto vyšetření patří lymfatické uzliny. Po fixaci střeva ve formalínu nebývají uzliny zřetelné, proto se materiál přelívá do uzlinového roztoku, který za 4 a více hodin uzliny zvýrazní. Lékař s jistotou nalezené uzliny zablokuje. Po zpracování formolparafínovou technikou je důležité, aby laborantka při řezání parafínových bloků na mikrotomu zachytila průřez uzlinou a preparát mohl být správně vyhodnocen.

7.3 Třetí část

Pro hodnocení třetí části jsem si vybrala biopsii muže 65 let, kterému byl v loňském roce po odebrání 5 vzorků při kolonoskopii diagnostikován adenokarcinom colon sigmoideum grade 2 – 3. Následně pacient podstoupil chirurgický výkon, při kterém mu bylo resekováno colon descendens a sigma s nádorem. Adenokarcinom byl potvrzen, ve vyšetřených šesti lymfatických uzlinách nebyly zastiženy metastázy.

V rámci pravidelné onkologické kontroly bylo ultrazvukovým vyšetřením zjištěno ložisko v játrech.

7.3.1 Zpracování

Při laparoskopické revizi dutiny břišní bylo toto ložisko resekováno a zasláno na peroperační vyšetření. Při tomto vyšetření je biopsie z operačního sálu zaslána v nativním stavu a zpracována patologem zmrazovací technikou – frozen section.

Lékař materiál prohlédne a nadiktuje makropopis vzorku. Poté podle velikosti zvolí zpracování celé částice nebo jen části, a to nádoru a resekčních okrajů. Na speciální zmrazovací terčík je aplikováno tkáňové lepidlo a orientovaná tkáň správného průřezu. V mrazícím přístroji cryocut se terčík s tkání namrazí na teplotu -10 až -35°C podle typu tkáně a zhotoví se preparáty o tloušťce řezu 3 – 5 µm, preparáty se barví rychlou metodou MGG QUICK STAIN:

- reagent A sloužící pro fixaci – 20 sekund,
- reagent B + C pro zvýraznění struktur – 20 sekund,
- oplach vodou.

Patolog mikroskopickou analýzou vyhodnotí nabarvený preparát a telefonicky informuje operátora o výsledku vyšetření tkáně zasláné na pooperační vyšetření. Operátor čeká na výsledek patologa, který je pro něj směrodatný v dalším postupu operace.

V případě mého posuzovaného vzorku byl na naše pracoviště dodán resekát jater o velikosti 4,0 × 3,8 × 2,2 cm, ve střední části pod pouzdem nalezeno tumorové ložisko velikosti 1,2 × 0,8 × 0,2 cm. Nejbližší resekční okraj byl vzdálen 6 mm od tumoru a byl z něj zhotoven preparát „nazmrzlo“. Histologicky pak patolog potvrdil nepřítomnost nádoru v resekčních okrajích, což telefonicky sdělil operátorovi. Ten mohl operaci ukončit.

Zbylá část nezpracované jaterní tkáně se naložila do fixační tekutiny a po dodržení správné doby fixace byla zablokovaná do bloků. Do bloku číslo 1 byl zablokován zbytek resekčního okraje z preparátu „nazmrzlo“, v bloku číslo 2 další tkáň resekčního okraje, nádor v bloku číslo 3 a 4, okolní zdravá jaterní tkáň v blocích 5 a 6. Bloky byly následně zpracovány formolparafínovou technikou. Byly odvodněny a prosyceny ve standardním tkáňovém procesoru, zality do parafínu. Vždy z jednoho

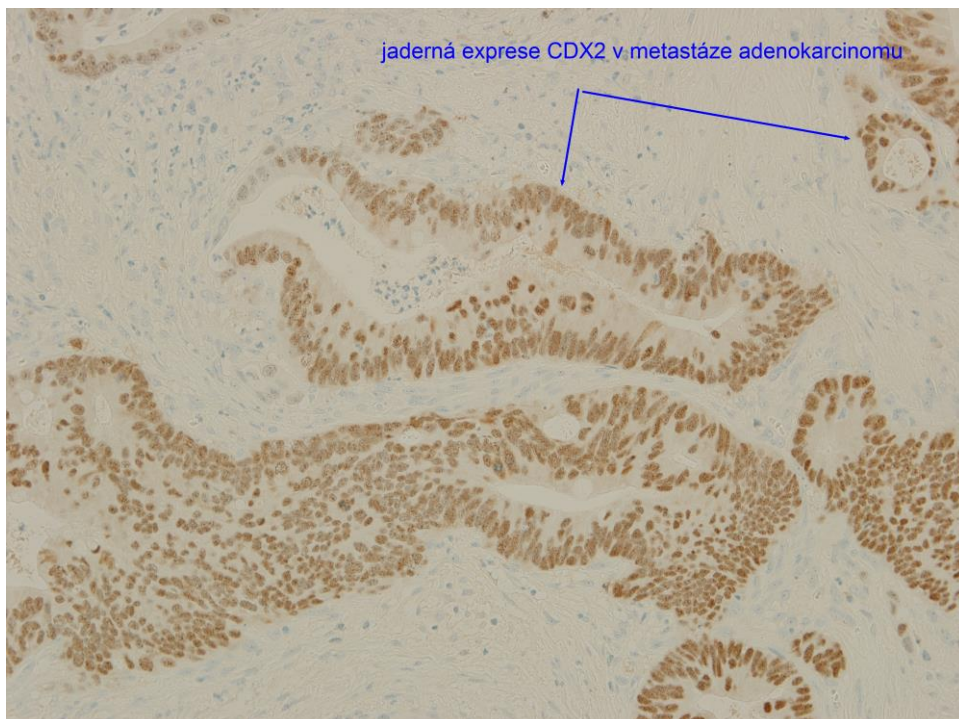
bloku byl zhotoven jeden preparát, který byl nabarven základní barvicí metodou hematoxylin-eozin.

Po mikroskopickém zhodnocení dal patolog zhotovit imunohistochemické vyšetření, které mu pomohlo rozhodnout, zda tumor v játrech je primární nebo sekundární. Jelikož byl pacientovi již v minulosti diagnostikován adenokarcinom střeva, rozhodl se lékař zhotovit z preparátů nádoru imunohistochemické vyšetření protilátek CK7, CK20 a CDX2, jejichž pozitivita by potvrdila kolorektální původ buněk. Pokud by nádorové buňky byly jaterního původu, byly by tyto protilátky negativní.

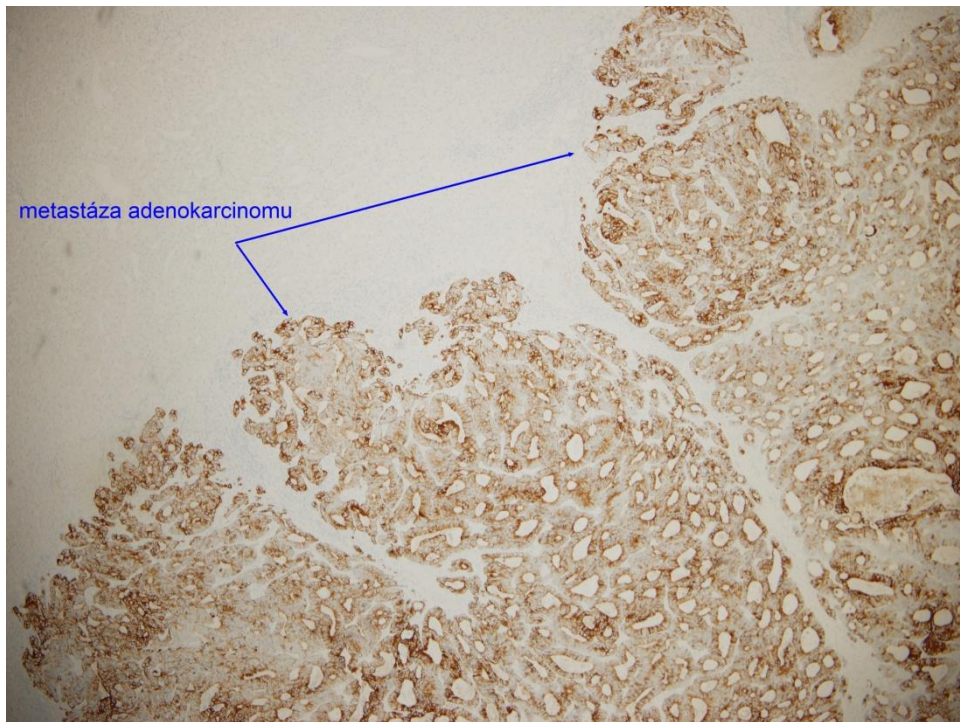
CDX2 (Obrázek č. 9) - je transkripční faktor specifický pro střevní epitel. Je využíván k odlišení metastáz kolorektálního karcinomu od jiného primárního zdroje

CK20 a CK7 (Obrázek č. 10, Obrázek č. 11) - jsou cytokeratiny, které tvoří skupinu proteinu cytoskeletu epitelálních buněk. Používají se k diagnostice epitelálních buněk a nádorů z nich odvozených.

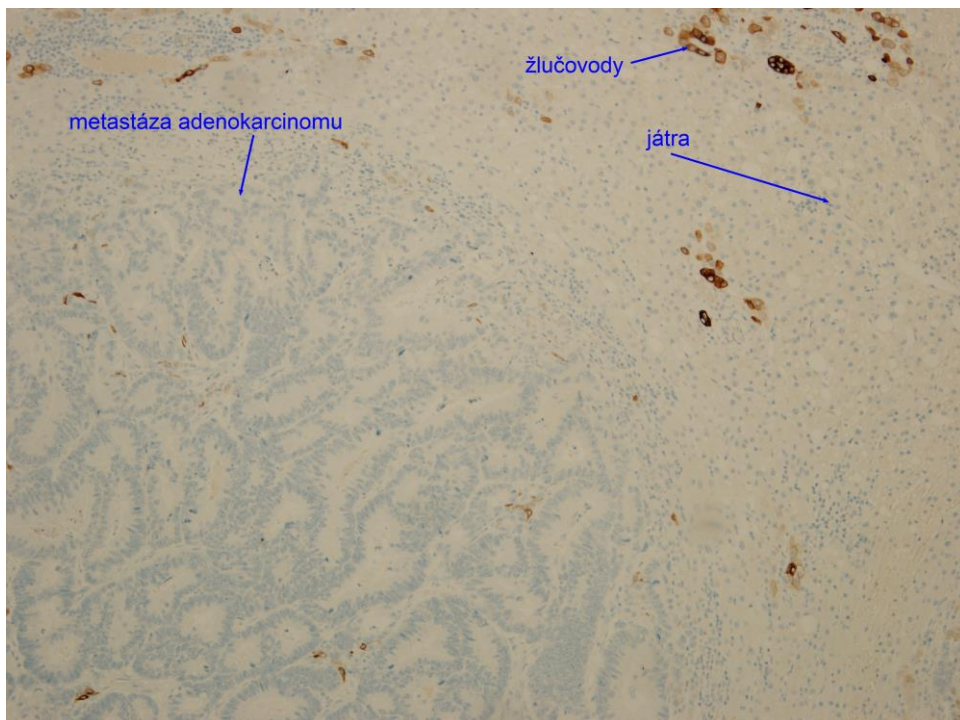
Obrázek č. 9 Protilátka CDX2 (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)



Obrázek č. 10 Protilátka CK20 (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)



Obrázek č. 11 Protilátka CK7 (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)



7.3.2 Vyhodnocení

V imunohistochemickém barvení byly všechny tři protilátky difuzně pozitivní, nádorové buňky byly tedy střevního původu a případ byl uzavřen jako metastáza středně diferencovaného tubulárního adenokarcinomu kolon sigmoideum.

Výhodou imunohistochemického vyšetření je možnost objasnění primárního původu nádorových struktur.

Výhodou vyšetření zmrazovací technikou je, že operatér se již při výkonu dozví od patologa, zda nádor je odstraněn v celém rozsahu s dostatečnými okraji, nebo musí resekci rozšířit. Pokud by byla tkáň vyšetřena definitivním histologickým vyšetřením a zjistily by se nádorové buňky v resekčním okraji, musel by pacient znovu podstoupit operaci, což by pro něj bylo zatěžující. Ne vždy je to však vzhledem k anatomickým poměrům možné.

Poměrně často se setkáváme s pacienty, kteří mají metastázy v játrech, plicích nebo zřídka i v jiných orgánech, ale původ metastazujícího tumoru není jasný. Proto je imunohistochemie velkou výhodou a pomocí při objasnění primárního origa, jehož znalost je nutná pro léčbu a zabránění dalšímu metastazování.

Imunohistochemie patří mezi speciální a doplňkové vyšetření v patologii.

IHC je jasný a přesný ukazatel, nepostradatelný v diagnostice.

Finanční náročnost je daná pořizovací cenou speciálních přístrojů a protilátek.

Každá nově dodaná protilátka je před uvedením do rutinní diagnostické praxe ověřena na kontrolních preparátech. Orientační ředění protilátky provede kvalifikovaná laborantka, konečné ředění stanoví lékař. Vše je zapsáno v elektronické formě v PC systému a preparáty jsou archivovány.

Bez imunohistochemického vyšetření by bylo těžké v některých případech přesné stanovení diagnózy.

IHC je rozhodující ukazatel pro následnou onkologickou léčbu.

8. ZÁVĚR

- Při podezření na kolorektální karcinom je prvotně vyšetřena tkáň odebraná při kolonoskopii. Kolonoskopie je vyšetřovací, ale zároveň i léčebná metoda, která dovoluje prohlédnout část trávicí trubice a zároveň z této oblasti odebrat vzorky. Následuje zpracování bioptických vzorků formolparafínovou technikou a stanovení diagnózy. Kolonoskopický odběr s následným stanovením diagnózy je rozhodující ukazatel pro případný odběr části postiženého střeva nádorem. Kolektomie je chirurgický zákrok, při kterém dochází k odstranění části nebo i celého tlustého střeva. U těchto odběrů je velmi důležité správné zpracování a vyhodnocení lymfatických uzlin.
- Bioptický materiál odebraný při kolonoskopii lze zpracovat dvěma metodikami. Hlavním rozhodujícím ukazatelem, zda zvolit zpracování kontinuální nebo standartní technikou, je struktura tkáně. Dalším faktorem, který ovlivní, jak je tkáň zpracována, je erudovanost laborantky. Kontinuální zpracování je finančně nákladnější, což se odvíjí od pořizovací ceny přístroje a používaných reagensů. Čas může být pro pacienta při stanovení diagnózy důležitý, proto kontinuální zpracování, které znamená stanovení diagnózy v den zpracování, je v těchto případech velmi přínosné.
- Lékař patolog stanovuje diagnózu z histologických preparátů ze základního barvení hematoxylin-eozin a barvení na PAS a Alcian. Spojení barvicí metody PAS-Alcian znamená pro lékaře snadnější orientaci v preparátech.
- Imunohistochemické zpracování upřesní diagnózu. Objasní typ a primární původ nádorových struktur, určí stupeň nádorového postižení. To je rozhodující pro lékaře onkologa, jakou následnou léčbu pro pacienta určí.

Karcinom tlustého střeva a konečníku je nejčastějším zhoubným nádorem trávicího ústrojí a druhým nejčastějším nádorem vůbec. Proto je třeba tomuto onemocnění věnovat zvýšenou pozornost v informovanosti populace, a to v primární prevenci - změně stravovacích zvyklostí, dále v informovanosti o sekundární prevenci - vyšetření stolice na okultní krvácení .

9. POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky
ASR(W)	incidence a mortalita
BMI	index tělesné hmotnosti
CRC	kolorektálním karcinomem
EMR	endoskopická mukozální resekce
ESD	endoskopická submukózní disekce
FAP	familiární adenomová polypóza
HNPCC	syndrom hereditárního nepolypózního karcinomu
IHC	Imunohistochemie
PAS	Periodic Acid Schiff
PPS	Pre-Processing Solution
TOKS	okultní krvácení do stolice
ZN	zhoubný novotvar
5-FU	5 – fuiorouracil

10. SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Hodnocení progresu podle mezinárodní klasifikace TNM (POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER, 2007).....	17
Tabulka č. 2 Histopatologický stupeň se určuje na základě diferenciacie nádoru. Zpravidla to bývají čtyři stupně: (ANONYMOUS, 2016)	17
Tabulka č. 3 Anatomická lokalizace a sublokalizace	19
Tabulka č. 4 Epidemiologie zhoubného novotvaru tlustého střeva a konečníku v Evropě (DUŠEK, L., D. MALÚŠKOVÁ, J. MUŽÍK a L. ŠNAJDROVÁ, 2014)	21
Tabulka č. 5 Přehledné výsledky screeningu kolorektálního karcinomu: 2006 – říjen 2015 (ANONYMOUS C, 2015)	23
Tabulka č. 6 Porovnání zpracování bioptických vzorků (vlastní zpracování, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)	38

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Názorná stavba tlustého střeva (Česká onkologická společnost, 2015)	13
Obrázek č. 2 Pohárkové buňky v epitelu tlustého střeva (barveno alcianovou modří) (ERDŐSOVÁ, B. a D. KYLAROVÁ, 2006).....	15
Obrázek č. 3 Tlusté střevo (intestinum crassum) sliznice, podsliznice (ERDŐSOVÁ, B. a D. KYLAROVÁ, 2006)	15
Obrázek č. 4 Bioptické kazetky (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)	27
Obrázek č. 5 Výsledek barvení hematoxylin-eozin (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)	35
Obrázek č. 6 Výsledek barvení PAS-Alcián barvení (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)	36
Obrázek č. 7 Resekát střeva v nativním stavu (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)	41
Obrázek č. 8 Sériové průřezy v místě tumoru (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)	41
Obrázek č. 9 Protilátka CDX2 (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)...	44
Obrázek č. 10 Protilátka CK20 (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016)	45
Obrázek č. 11 Protilátka CK7 (foto autora, Laboratoře Agel a.s., Laboratoř Patologie, 2016) ...	45

12. POUŽITÁ LITERATURA

ANONYMOUS A. *Jaké jsou příznaky onemocnění?* [online]. Linkos, 2015 [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-verejnost--kolorektalni-karcinom--priznaky-onemocneni>

ANONYMOUS B. *Screeningový proces* [online]. 2015 [cit. 2016-03-20]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--organizace--screeningovy-proces>

ANONYMOUS C. *Populační screening kolorektálního karcinomu v ČR: nejnovější výsledky* [online]. IBA MU: Časopis lékařů českých, 2015 [cit. 2016-03-24]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky&aid=414>

ANONYMOUS. *Histopatologický stupeň (grade)* [online]. Linkos, 2016 [cit. 2016-04-16]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/slovnicek/histopatologicky-stupen-grade/>

BOSMAN, T., F. CARNEIRO, R. HRUBAN a N. THEISE. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*. Geneva: WHO PRESS, 2010:418. ISBN 978-92-832-2432-7.

COMPTON, C. *Pathology and prognostic determinants of colorectal cancer* [online]. 2016 [cit. 2016-04-06]. Dostupné z: <http://www.uptodate.com/contents/pathology-and-prognostic-determinants-of-colorectal-cancer>

Česká onkologická společnost. *Rakovina tlustého střeva a konečníku: Co je tlusté střevo a jaká je jeho funkce?* [online]. 2015 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-verejnost--kolorektalni-karcinom>

ČIHÁK, R. *Anatomie 2*. 1. Praha 1: Avicenum, 1988:388. ISBN 08-060-88

DUŠEK, L., D. MALÚŠKOVÁ, J. MUŽÍK a L. ŠNAJDROVÁ. *Epidemiologie kolorektálního karcinomu v mezinárodním srovnání* [online]. Brno: Institut biostatistiky a analýz, 2014 [cit. 2016-03-16]. Dostupné z: <http://www.kolorektum.cz/index.php?pg=pro-odborniky--epidemiologie->

ERDŐSOVÁ, B. a D. KYLAROVÁ. *Atlas světelné mikroskopie* [online]. 2006 [cit. 2016-03-13]. Dostupné z: <http://heu.upol.cz/Atlas/trav/tr00.html>

KONOPÁSEK, B. a L. PETRUŽELKA. *Klinická onkologie*. Univerzita Karlova v Praze: Karolinum, 2003:382. ISBN 80-246-0395-0.

LICHNOVSKÝ, V., J. MALÍNSKÝ a Z. MICHALÍKOVÁ. *Přehled histologie člověka v obrazech II. díl*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2004:190. ISBN 80-244-0850-3.

MERKUNOVÁ, A. a M. OREL. *Anatomie a fyziologie člověka pro humanitní obory*. 1. Praha 7: Grada, 2008:328. ISBN 978-80-247-1521

MILLS, S. *Sternberg's diagnostic surgical pathology*. Philadelphia: Wolters Klower Health, 2010:20703. ISBN 10:0-7817-7942.

POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER. *Obecná patologie*. 1. Praha 5: Galén, 2011:290. ISBN 978-80-7262-773-8.

POVÝŠIL, C. a I. ŠTEINER. *Speciální patologie*. 2. Praha 5: Galén, 2007:430. ISBN 978-80-7262-494-2

STRUM, W. *Colorectal Adenomas* [online]. M.D., N Engl J Med 2016, , 374:1065-1075 March 17 [cit. 2016-04-06]. Dostupné z:
<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1513581>

ŠIMŠA, J. *Kolorektální karcinom/terapie: Resekce tračniku* [online]. 2016 [cit. 2016-03-29]. Dostupné z:
http://www.wikiskripta.eu/index.php/Kolorekt%C3%A1ln%C3%AD_karcinom/terapie

VACEK, Z. *Histologie a histologická technika*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1996:185. ISBN 80 – 7013 – 202 -7.

VYZULA, R., J. ŽALOUDEK a KOLEKTIV. *Rakovina tlustého střeva a konečníku*. Praha 4: Maxdorf, 2007:287. ISBN 978-80-7345-140-0.