

Masarykova univerzita  
Lékařská fakulta

**Imunohistochemická diagnostika nemalobuněčných karcinomů plic  
v bronchiální mikroexcizi**

Bakalářská práce  
v oboru zdravotní laborant

Vedoucí diplomové práce:  
MUDr. Ondřej Souček

Autor:  
Aneta Teclová

Brno, duben 2014

**Jméno a příjmení autora:** Aneta Teclová

**Název bakalářské práce:** Imunohistochemická diagnostika nemalobuněčných karcinomů plic v bronchiální mikroexcizi

**Pracoviště:** Ústav patologie, Fakultní nemocnice Brno

**Vedoucí bakalářské práce:** MUDr. Ondřej Souček

**Rok obhajoby bakalářské práce:** 2014

**Anotace:**

Plicní karcinomy jsou medicínsky i společensky závažnou skupinou onemocnění. V současné době je z terapeutického hlediska nezbytná přesná histologická klasifikace v rámci skupiny tzv. nemalobuněčných plicních karcinomů. Práce je zaměřena na přínos imunohistochemického vyšetření v diferenciální diagnostice těchto nádorů v bronchiálních mikroexcizích.

**Annotation:**

Lung carcinomas are medically and socially significant group of diseases. Currently, the therapeutic aspects require precise histological classification within the group of non-small cell lung carcinomas. This work focuses on the contribution of immunohistochemistry in the differential diagnosis of these tumors in the bronchial endoscopy specimen.

**Klíčová slova:** imunohistochemie, nemalobuněčný karcinom plic, diagnostika, plíce, histologie

Souhlasím, aby má bakalářská práce byla půjčována ke studijním účelům a byla citována dle platných norem.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením MUDr. Ondřeje Součka a uvedla jsem v seznamu použité literatury veškerou literaturu a zdroje, ze kterých jsem čerpala.

V Brně dne .....

.....

(podpis Aneta Teclová)

## **Poděkování:**

Mé velké poděkování patří panu MUDr. Ondřeji Součkovi za jeho odborné profesionální vedení, lidské jednání, veškeré cenné připomínky a za pomoc při vypracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům a partnerovi za trpělivost a podporu.

## **Seznam použitých zkratek a jejich význam**

<b>Ab</b>	<b>Protilátka</b>
<b>AC</b>	<b>Adenokarcinom</b>
<b>Ag</b>	<b>Antigen</b>
<b>BAC</b>	<b>Bronchioloalveolární karcinom</b>
<b>CEA</b>	<b>Karcinoembryonální antigen</b>
<b>CK5/6</b>	<b>Cytokeratin 5/6</b>
<b>FITC</b>	<b>Fluorescein-iso-thio-kyanát</b>
<b>Ig</b>	<b>Imunoglobulin</b>
<b>LCC</b>	<b>Velkobuněčný karcinom</b>
<b>LCNEC</b>	<b>Velkobuněčný neuroendokrinní karcinom</b>
<b>NSCLC</b>	<b>Nemalobuněčný typ karcinomu plic</b>
<b>SCC</b>	<b>Spinocelulární karcinom</b>
<b>SCLC</b>	<b>Malobuněčný typ karcinomu plic</b>
<b>TPA</b>	<b>Tkáňový polypeptidový antigen</b>
<b>TTF1</b>	<b>Thyreoideální transkripční faktor 1</b>

## **Obsah**

<b>1 Úvod</b> .....	- 8 -
<b>2 Obecná část</b> .....	- 9 -
2.1 Stavba dýchacího systému .....	- 9 -
2.1.1 Nosní dutina .....	- 10 -
2.1.2 Hrtan .....	- 10 -
2.1.3 Průdušnice, průdušky .....	- 11 -
2.1.4 Plíce .....	- 11 -
2.2 Fyziologie plic .....	- 14 -
2.3 Patologické změny v plicích .....	- 14 -
2.3.1 Obecné vlastnosti nádorů .....	- 16 -
2.3.2 Vznik, prevence a terapie karcinomů .....	- 17 -
2.4 Karcinom plic .....	- 18 -
2.4.1 Epidemiologie karcinomu plic .....	- 18 -
2.4.2 Klinické projevy .....	- 19 -
2.5 Nermalobuněčný karcinom .....	- 19 -
2.6 WHO histologická klasifikace nermalobuněčného karcinomu plic .....	- 21 -
2.6.1 Spinocelulární karcinom (SCC) .....	- 21 -
2.6.2 Adenokarcinom (AC) .....	- 22 -
2.6.3 Velkobuněčný karcinom (LCC) .....	- 23 -
2.7 TNM klasifikace karcinomů plic .....	- 23 -
<b>3 Speciální část</b> .....	- 26 -
3.1 Histologická technika .....	- 26 -
3.2 Imunohistochemie .....	- 32 -
3.2.1 Protilátky .....	- 33 -
3.2.2 Monoklonální protilátky .....	- 35 -
3.2.3 Polyklonální protilátky .....	- 35 -
3.2.4 Antigen .....	- 35 -

3.3 Imunohistochemické metody .....	- 36 -
3.3.1 Přímé imunohistochemické metody.....	- 36 -
3.3.2 Nepřímé imunohistochemické metody .....	- 36 -
3.4 Nádorové markery karcinomů plic .....	- 38 -
3.5 Metody průkazu imunokomplexů.....	- 39 -
<b>4 Experimentální část .....</b>	<b>- 41 -</b>
4.1 Získávání a zpracování materiálu .....	- 41 -
4.2 Diagnostika nemalobuněčných karcinomů plic .....	- 41 -
4.2.1 Vyšetřovací algoritmus NSCLC .....	- 41 -
4.2.2 Použité protilátky .....	- 42 -
4.2.3 Diagnostika NSCLC .....	- 42 -
<b>5 Závěr .....</b>	<b>- 48 -</b>
<b>6 Použitá literatura .....</b>	<b>- 49 -</b>

# 1 Úvod

Problematika karcinomů plic je v současné době velmi diskutovaným tématem, protože se ukazuje, že z hlediska mortality je nejčastějším onkologickým onemocněním jak v České republice, tak i ve světě. V této statistice byly zahrnuty malobuněčné i nemalobuněčné karcinomy plic. Nemalobuněčné karcinomy ovšem tvoří 80% většinu případů onemocnění plicními karcinomy.

Nemalobuněčné karcinomy plic jsou rozsáhlou a heterogenní skupinou onemocnění s rozdílnou patogenezí. Dle klasifikace WHO rozlišujeme tři základní skupiny nemalobuněčných karcinomů plic: dlaždicobuněčný karcinom, adenokarcinom a velkobuněčný karcinom. Velká většina onemocnění karcinomem plic je způsobena pravidelným kouřením, ale vyskytuje se i u lidí, kteří nikdy nekouřili. Klinicky jsou příznaky karcinomů plic prakticky stejné, nemůžeme je od sebe odlišit. Nastává tedy problém ve zvolení účinné terapie, ke které je potřeba přesné diagnózy.

Metody imunohistochemie jsou dnes již neodmyslitelnou součástí klasické histologie, protože nám umožňují přesně klasifikovat podtypy nemalobuněčných karcinomů, které ze základního barvení v histologii někdy nelze spolehlivě rozpoznat. Mohou za to různé důvody, nejčastějším je však pokročilé stadium karcinomu nebo podtyp velkobuněčného karcinomu plic, který disponuje znaky jak malobuněčného karcinomu, tak znaky nemalobuněčných karcinomů (adenokarcinomu či dlaždicobuněčného karcinomu). Imunohistochemické metody se používají i v takovém případě, kdy máme k dispozici pouze malé množství biologického materiálu, což je případ nastávající velice často.

Imunohistochemické metody využívají značených protilátek namířených proti antigenu. V současné době se u karcinomů plic v diagnostice využívá kombinace protilátek proti různým antigenům. Zatím nebyl rozpoznán jeden spolehlivý marker, který by dostačoval k morfologické diagnóze karcinomu plic. Proto se k potvrzení diagnózy využívá kombinace protilátek, např. CK5/6, p63 a TTF1. V ideálním případě by jich bylo zapotřebí více, ale ty jsou pro běžnou klinickou praxi bohužel cenově nedostupné.

Hlavním úkolem mé bakalářské práce je tedy poukázat na nezbytnost využití imunohistochemických metod při diagnostice nemalobuněčných karcinomů, protože na správné diagnóze závisí volba vhodných terapeutických či paliativních postupů při onemocnění nemalobuněčným karcinomem plic.

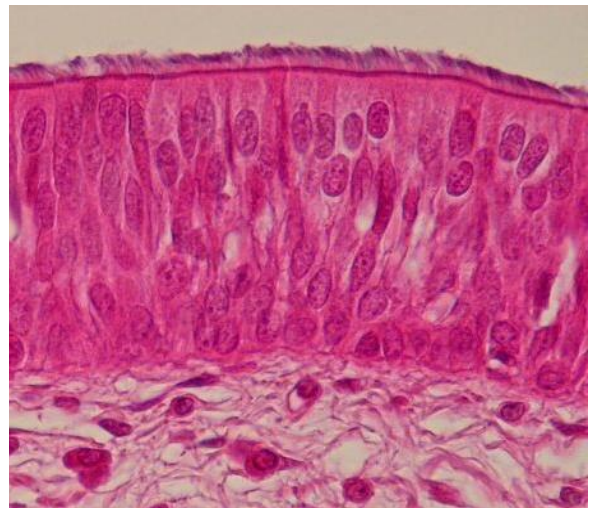
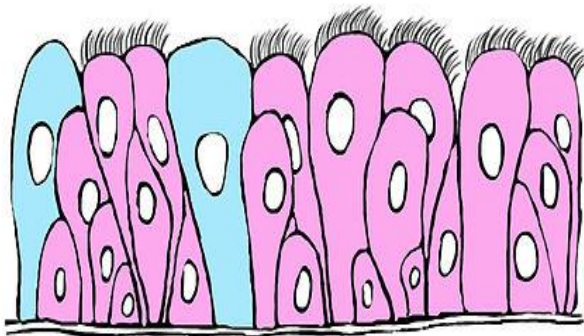


## 2 Obecná část

### 2.1 Stavba dýchacího systému

Dýchací soustava se skládá z horních a dolních dýchacích cest. Mezi horní cesty dýchací řadíme dutinu nosní, vedlejší nosní dutiny a nosohltan. Dolní dýchací cesty počínají hrtanem a končí plicními alveoly. Mezníkem horních a dolních cest je hrtanová příklopka (epiglottis). Dýchací systém zahrnuje cesty primárně určené k vedení vzduchu (sem řadíme dutinu nosní, nosohltan, hrtan, průdušnice, bronchy, bronchioly, terminální bronchioly) a respirační úsek, který zprostředkovávají respirační bronchioly, plicní sklípky, alveolární chodbičky a váčky. (Mescher, 2013)

Dýchací cesty jsou vystlány víceřadým cylindrickým řasinkovým epitelem (Obr. 1: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2a/Řasinkový\\_epitel.jpg/500px-Řasinkový\\_epitel.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/2/2a/Řasinkový_epitel.jpg/500px-Řasinkový_epitel.jpg), Obr. 2.: Upraveno dle Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze, <http://old.lf3.cuni.cz/histologie/atlas/demo/23/img00003.jpg>). Je to epitel, který se skládá z nízkých bazálních a trojbokých buněk, vřetenovitého tvaru, dosahujících do 2/3 výšky a vysokých válcovitých buněk, jejichž výběžky vytvářejí povrch epitelu a nesou pohyblivé řasinky, tzv. kinocilie. (Čech, a další, 2011)



Obr. 1, 2: Víceřadý cylindrický epitel s řasinkami

V epitelu dýchacích cest se také mezi buňkami řasinkovými vyskytují pohárkové buňky, které zodpovídají za tvorbu hlenu. Pod epitelem se nachází řídké kolagenní vazivo s četnými elastickými vlákny. Slizniční vazivo obsahuje smíšené žlázky, které vylučují

hlenovitý sekret. Tento sekret ze seromucinózních žlázek a sekret z pohárkových buněk chrání povrch sliznice před vysycháním a před vdechovanými mikročásticemi (prach, pyl). (Vacek, 1995) Řasinky se hlenu zbavují vlastním pohybem, a tudíž dochází k posunu hlenu do ústní dutiny, kde je hlen vykašlán nebo spolknut. Hlenová vrstva je také potřebná k saturaci vdechovaného vzduchu vodními párami, což napomáhá k odstranění škodlivin. Víceřadý cylindrický epitel s řasinkami přechází v místě větvení bronchů v bronchioly v epitel jednovrstevný cylindrický. (Jelínek, a další), (Horký, a další, 2011)

Další součástí dýchacích cest jsou chrupavky, které vystýlají jejich stěnu a poskytují mechanickou oporu. Mají různý tvar a jejich funkcí je především udržování průchodnosti dýchacích cest. Dýchací systém má tedy dvě důležité funkce: zajišťuje volný průchod vzduchu a současně upravuje jeho teplotu.

Poslední součástí dýchacích cest jsou četná elastická vlákna, která se podílí na pružnosti dýchacích cest a respiračního oddílu. Množství elastických vláken je nepřímo úměrné průměru v dýchacích cestách, to znamená, že nejvíce elastických vláken najdeme v bronchiolích. (Konrádová, 1993), (Horký, a další, 2011)

### **2.1.1 Nosní dutina**

Dutinu nosní řadíme mezi horní cesty dýchací. Dělí se na tři oddíly a to předsíň nosní, dýchací oblast a oblast čichová. V předsíni nosní je vrstevnatý dlaždicový epitel nerohovějící, který plynule přechází do epitelu dýchacích cest. Nacházíme zde i kožní chloupky, které zachytávají různé nečistoty. V oblasti dýchací je nejvýznamnější vrstvička slizničního vaziva na nosních skořepách. Na skořepách jsou totiž velmi četné venózní pleteně, které slouží jako topná tělesa (v pleteních dochází ke zpomalení krevního proudu) a ohřívají vdechovaný vzduch. Oblast čichová se skládá ze smyslového epitelu a ze slizničního vaziva. K dutině nosní ještě řadíme vedlejší dutiny nosní, které zvětšují objem nosní dutiny a také napomáhají k ohřívání vzduchu a k odstranění dalších nečistot. (Horký, a další, 2011)

### **2.1.2 Hrtan**

Hrtan (larynx) je trubicovitý orgán nepravidelného tvaru, velký přibližně 4 x 4 cm. Je to část mezi hltanem a průdušnicí. Sliznice hrtanu je pokryta víceřadým cylindrickým epitelem a slizniční vazivo obsahuje četné lymfatické uzlíky. Nacházíme zde chrupavky hyalinní i elastické, párové a nepárové. Mezi párové chrupavky řadíme hlasivkové chrupavky,

kteře napomáhají tvorbě hlasu a mezi nepárové patří prstencová chrupavka, štítná chrupavka a hrtanová příklopka (epiglottis). Společně zajišťují průchodné dýchací cesty a pomocí hrtanové příklopky zabraňují vniknutí potravy do průdušnice. Hrtanová příklopka se skládá z elastické chrupavky, která je pokryta na straně obrácené do hltanu vrstevnatým dlaždicovým epitelem, a na straně hrtanové víceřadým cylindrickým epitelem. (Mescher, 2013)

Pod hrtanovou záklopkou nacházíme dva páry slizničních řas, horní a dolní pár. Horní pár tvoří nepravé vazy hlasové a dolní pár pravé vazy hlasové. Pod nimi jsou husté svazky elastických vláken, které tvoří elastický vaz. Zároveň s elastickým vazem probíhají vlákna příčně pruhovaného svalstva ovládající napětí pravých hlasových vazů. Štěrbinou mezi vazy proudí vzduch, příčně pruhované svalstvo ovládá šířku štěrbinu a tím vznikají tóny o různé frekvenci (hlas). (Junqueira, 1995)

### **2.1.3 Průdušnice, průdušky**

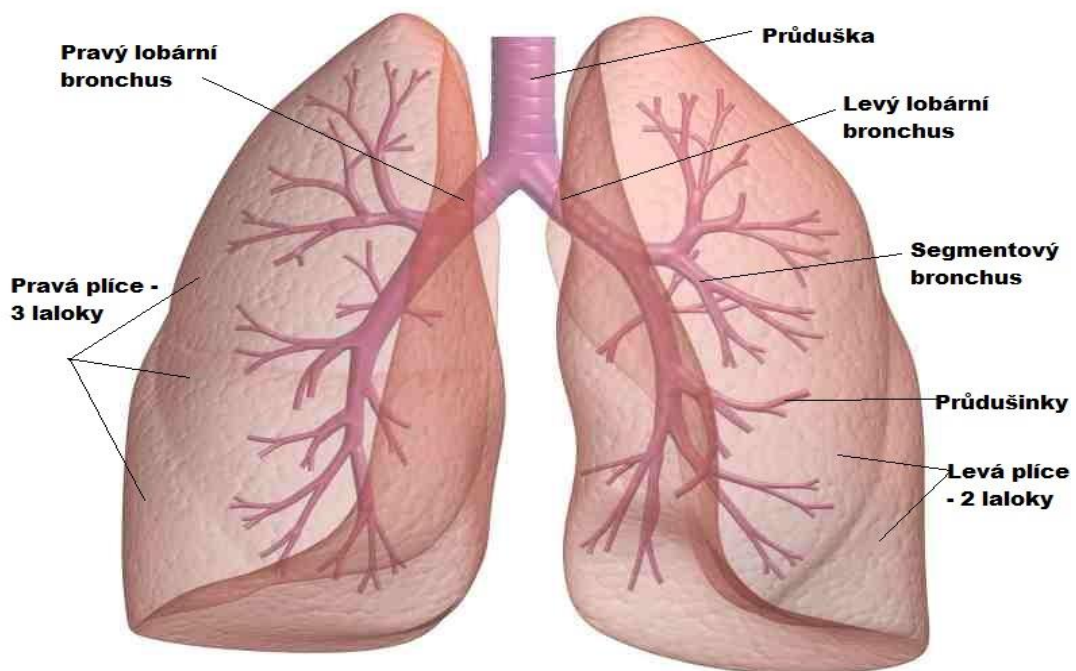
Průdušnice je tenkostěnná, 12 - 14 cm dlouhá trubice, která je vyztužena hyalinními chrupavkami prstencovitého tvaru. Tyto chrupavky slouží k udržování průchodnosti průdušnice. Její sliznice je typicky vystlána víceřadým cylindrickým epitelem s řasinkami a pohárkovými buňkami. Na dolním konci se větví ve dvě hlavní průdušky, kde jedna průduška je pro pravou plíci a druhá pro levou plíci. Označujeme je za primární bronchy, které do plic vstupují v místě plicního hilu. V plicích dochází k dalšímu dělení hlavních průdušek na malé průdušky a posléze průdušinky. Jejich stavba se v podstatě neliší od primárních průdušek, pouze u malých průdušek a průdušinek se postupně zmenšují hyalinní chrupavky až po jejich úplné vymizení. (Vacek, 1995), (Mescher, 2013)

### **2.1.4 Plíce**

Plíce jsou párovým orgánem umístěným v dutině hrudní. Jsou chráněné poplicnicí a malým množstvím serózní tekutiny, která se vyskytuje ve štěrbinovitém prostoru mezi poplicnicí a pohrudnicí. Plíce je složena z laloků, levá část ze dvou a pravá část ze tří (Obr. 3: Upraveno dle, <http://www.hsmc.co.uk/uploads/images/Lungs.jpg>).

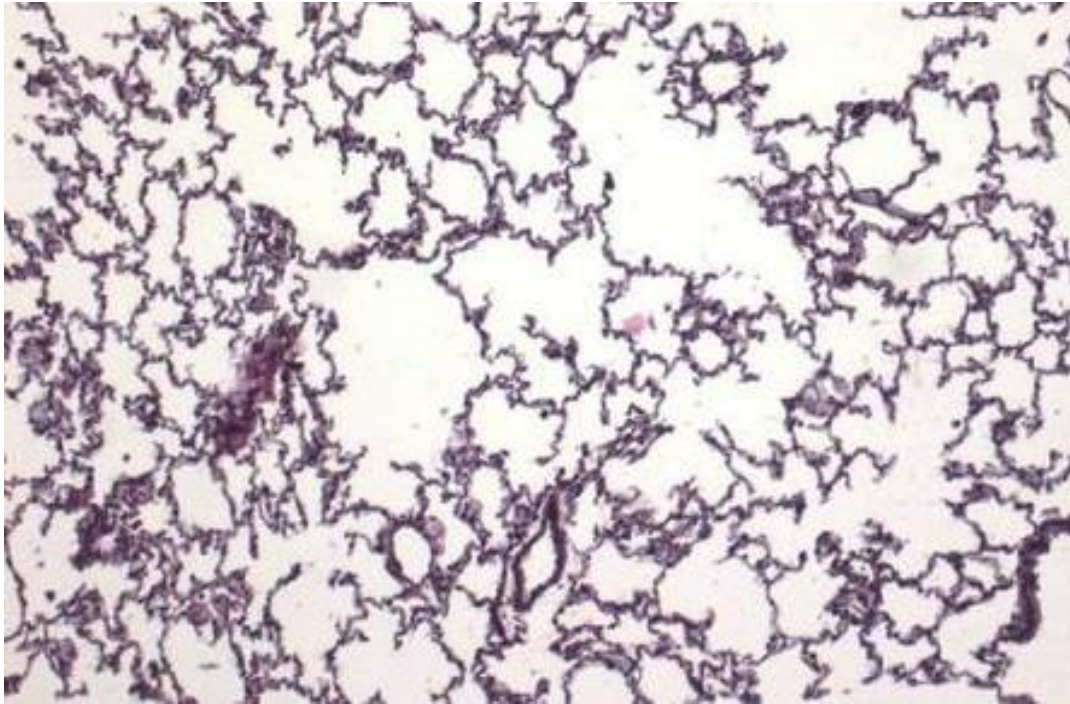
V místě plicního hilu vstupují do plic hlavní průdušky, které se v levé plíci dělí na dvě průdušky a v pravé na tři. Průdušky jsou určeny pro jednotlivé plicní laloky (lobární bronchy), a dále se dělí na segmentové bronchy. Segmentových bronchů je deset na každé straně, levé i

pravé. Segmentové bronchy se dále větví až na nejmenší bronchy (průměr asi 1 mm), těm říkáme bronchioly neboli průdušinky. Průdušinky se opět větví na pět až sedm terminálních (konečných) bronchiolů, které vstupují do plicních lalůčků. Terminální bronchioly se rozvětví na tři respirační bronchioly, které se rozdělí v mnoho alveolárních chodbiček, a ty se dále dělí v alveolární váčky, které přestupují do plicních sklípků. Epitel dýchacích cest se postupně snižuje a stává se z něj jednovrstevný kubický epitel a poté epitel plochý (plicní sklípky).



Obr. 3: Anatomie plic

Alveolární váčky, chodbičky a plicní sklípek tvoří útvar podobný hroznu, tzv. acinus. Každý plicní lalůček (základní jednotka plic) je složen z velkého počtu acinů. Alveolární váčky a chodbičky nemají vlastní stěnu, protože se vychlipují ve velký počet plicních sklípků. Plicní sklípky naléhají těsně na sebe, stěny sousedních váčků splývají a tvoří velmi tenké přepážky, interalveolární septa (Obr. 4: Upraveno dle, [http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/9/98/Plíce\\_9.jpg/500px-Plíce\\_9.jpg](http://www.wikiskripta.eu/images/thumb/9/98/Plíce_9.jpg/500px-Plíce_9.jpg)). (Vacek, 1995), (Junqueira, 1995)



Obr. 4: Histologický preparát z plic <sup>1</sup>

V plicních sklípcích probíhá vlastní výměna plynů, zejména  $O_2$  a  $CO_2$ , mezi krví a vzduchem. Vzduch v alveolu je oddělen od vlásečnic:

- a) cytoplazmou respiračních buněk alveolů
- b) bazální membránou
- c) cytoplazmou endotelových buněk.

Kyslík přechází přes všechny tyto vrstvy ze vzduchu v alveolu do vlásečnic a oxid uhličitý opačným směrem, tedy z vlásečnic do plicního sklípku. (Jelínek, a další)

Důležitou součástí plicních alveolů je také respirační epitel, který se skládá z membránových pneumocytů a granulárních pneumocytů. Membránovní pneumocyty jsou ploché buňky, které vysílají četné výběžky. Pokrývají až 97% vnitřního povrchu plicního sklípku. Granulární pneumocyty mají polyedrický tvar a nachází se v záhybech stěn alveolů. V jejich cytoplazmě nacházíme četná granula, která označujeme jako lamelární tělíska. Tato granula jsou zodpovědná za tvorbu tenkého filmu neboli surfaktantu, který snižuje povrchové napětí plicních sklípků a brání jejich kolapsu. (Horký, a další, 2011), (Konrádová, 1993)

---

<sup>1</sup> Na histologickém preparátu plicce vypadají jako rybářská síťovina, jejíž oka zde představují plicní sklípky.

## 2.2 Fyziologie plic

Anatomie plic je uzpůsobena k dýchání, které je bezpodmínečně nutné pro život. Dýchací systém získává pro tělo kyslík, předává ho oběhovému systému a ten ho distribuuje ke každé buňce v našem organismu.

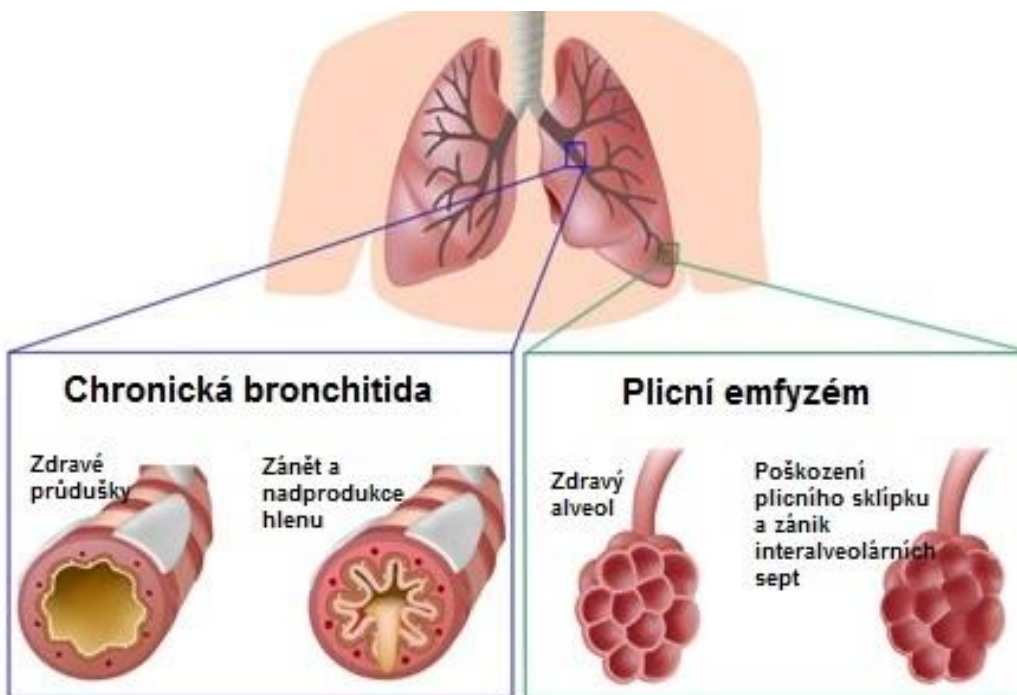
Základem dýchání je zvětšení objemu hrudníku, kdy dochází k poklesu bránice a ke kontrakci interkostálních svalů zdvihající žebra. Dochází k prodlužování bronchiolů a bronchů, alveolární chodbičky se rozpínají. Při výdechu se plíce dostávají do původního tvaru díky elastickým vláknům, ze kterých je plicní parenchym. Hlavními funkcemi plic je tedy výměna plynů, ke které dochází v alveolech, na rozmezí endotelu vlásečnic a respiračního epitelu. Dýcháním rozumíme výměnu plynů mezi vzduchem v plicních sklípcích a krví v dýchacím systému. Další funkcí plic je jejich obranná schopnost. Mezi obranné dýchací schopnosti řadíme kašlací reflex, přítomnost alveolárních makrofágů a imunologické reakce v lymfatické tkáni průdušek. Kašel je nejlepší ochranou před vdechnutím jakéhokoliv cizího tělesa, podílí se také na odstranění nahromaděného hlenu v dýchacích cestách a makrofágové v plicních sklípcích pohlcují prachové částice. (Jelínek, a další)

## 2.3 Patologické změny v plicích

Patologické změny znamenají poruchy funkce a změny vzhledu určité tkáně či orgánu v organismu. Patologie plic se týká neprůchodnosti dýchacích cest, selhání přenosu kyslíku mezi krví a tkáněmi či poškození plic. Neprůchodnost dýchacích cest může být způsobena cizími tělesy, otokem, zánětlivým exsudátem, stlačením dýchacích cest. Definici pro nedostatečnou výměnu plynů v plicích označujeme jako respirační insuficienci. Má různé stupně, přičemž nejtěžší formy mohou být příčinou smrti. (Stříteský, 2001)

Nejčastější patologickou změnou v plicích jsou záněty. Příčinou bývají virové či bakteriální infekce, alergie, vdechování nebezpečných chemických látek a mohou být i autoimunitní povahy. Řadíme sem především zánět nosohltanu, hrtanu, plicní tuberkulózu, zánětlivý edém. Zvláštním případem jsou záněty bronchů, které dělíme na akutní a chronické. Chronické bronchitidy (Obr. 5: Upraveno dle, <http://www.rozdychajto.sk/images/public/choc-hp-schema.jpg>) často vedou ke ztenčení sliznice a respirační epitel na povrchu sliznice se začne přeměňovat na epitel vrstevnatý dlaždicový (tzv. dlaždicová metaplazie). Další neméně častou poruchou plic je plicní emfyzém (Obr. 5) neboli rozedma plic. Definujeme ji jako

trvale zvýšenou vzduchovou náplní v konečných částech dýchacích cest spojenou se zánikem interalveolárních sept. Zničení přepážek mezi alveoly vede ke splnutí sklípků a tím pádem za vznik větších prostorů a dochází ke vzedmutí plíce. (Stříteský, 2001)



Obr. 5: Chronická bronchitida, plicní emfyzém

Za nejzávažnější patologii plic je považován karcinom plic. Je to nejčastější zhoubný nádor dýchacích cest. Jeho výskyt stále stoupá, jak u žen, tak i u mužů. Na vzniku karcinomu se podílí kouření cigaret, které prezentuje nejdůležitější rizikový faktor. Dle Stříteského, nádor plic vyrůstá téměř ve všech případech z bronchiálního stromu. Podle vzniku místa karcinomu rozlišujeme periferní a centrální typ. Centrální typ vychází z plicního hilu a invazivně vrůstá do plicní tkáně a ničí ji. Šíří se do pleury, začíná zužovat bronchiální větve a vytváří metastázy. Periferní typ pochází z bronchiálních větví nebo bronchiolů a vrůstá do pleury. Nález metastáz zhoubných nádorů plic jsou nálezem pokročilého stadia onemocnění. (Stříteský, 2001)

### 2.3.1 Obecné vlastnosti nádorů

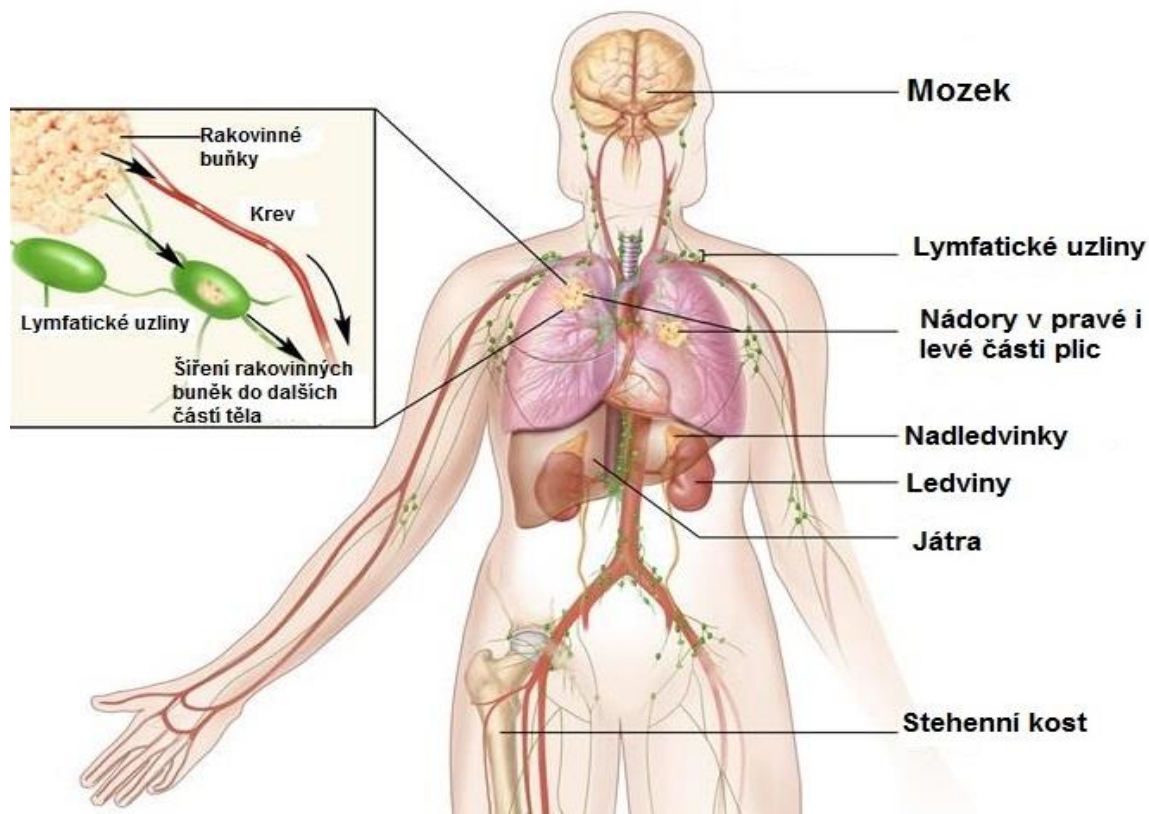
Nádor neboli tumor (karcinom, novotvar) je definován jako nadměrné zvětšování (bujení) tkáně. Je tvořen poškozenými abnormálními buňkami vlastního těla, které se nekontrolovatelně dělí a jsou nezávislé na řídicích vlivech organismu. Nezávislost karcinomu se projevuje morfológickou, funkční a biologickou odlišností. Základní morfológická vlastnost je zvětšení orgánu nádorem a odlišnost od okolí svým vzhledem. Funkční rozdílnost je v tom, že nádor žádnou prospěšnou funkci pro organismus nemá. Na základě své velikosti však vážně narušuje a utlačuje okolní orgány. Biologická odlišnost spočívá ve větší schopnosti dělení, růstu, vyšší odolnosti a životnosti de facto „nesmrtelnosti“ nádorové buňky. Dle biologických vlastností dělíme nádory na benigní (nezhoubné) a maligní (zhoubné). (Stříteský, 2001)

Znakem benigního nádoru je expanzivní (rozpínavý) růst, což znamená, že nádor na okolí působí jako celek, nerozpadá se a poškozuje své okolí tlakem. Mezi další znaky benigního nádoru patří ohraničený růst, hranice nádoru makroskopicky vidíme velmi ostře.

Maligní nádor má, oproti benignímu, invazivní růst, tedy buňky nádoru pronikají do okolních tkání a ohraničení nádoru je tímto makroskopicky nezřetelné. Odstranění tohoto nádoru je proto velmi těžké, protože pokud by zbyl kousek nádorové tkáně v těle pacienta, je možné, že nádor vyrostе znovu (recidiva nádoru). Infiltrační růst je také ve velké většině známkou malignity. Nádorové buňky se od sebe oddělují a poškozují funkce zdravých buněk. Agresivní růst vždy svědčí pro malignitu a je charakterizován zničením tkání. (Stříteský, 2001)

Maligní nádor se může šířit buď spojitě, nebo nespojitě, metastázami (Obr. 6: Upraveno dle, <http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR521911-571.jpg>). Spojité šíření (povrchové) umožňuje nádoru vytvářet souvislé masy a tím se jakoby „plazit“ po povrchu. Metastazování je rozšiřování původního nádoru do vzdálenějších míst, kde zakládá další nádorová ložiska. Je znakem malignity a vyskytuje se v pokročilém stadiu maligního nádorového onemocnění. Rozšiřování primárního nádoru nastává tehdy, kdy nádorové buňky vniknou buďto do lymfatických cév nebo do krevního řečiště. Mikroskopicky odpovídají metastatická ložiska primárnímu nádoru. K dalším znakům maligního nádoru patří vyšší rychlost růstu a nádorová kachexie. Nádorová kachexie se vyskytuje při úplném vyčerpání organismu při nádorovém onemocnění. Projevuje se nechutenstvím a zvýšeným energetickým výdejem, což má za následek hubnutí. (Stříteský, 2001)





Obr. 6: Mnohočetné metastázy karcinomu plic

### 2.3.2 Vznik, prevence a terapie karcinomů

Buněčná diferenciace je velice spletitý mechanismus zahrnující mnoho kontrolních mechanismů, které zajišťují zrání zdravých buněk. Vznik rakovinných buněk je složitý proces, který ještě není zcela prozkoumán. Změna vlastností buněk na nádorové buňky je uskutečněna změnou genů (mutací). Mutace v genetické informaci jsou schopny inaktivovat tumor supresorové geny, které potlačují vznik nádorových buněk. Dalším způsobem vzniku nádorového bujení je selhání mechanismu, který zabezpečuje vlastní smrt poškozených buněk, tzv. apoptózu. Poškozené buňky ztratí schopnost apoptózy a nádor začne růst (dojde k postupnému hromadění nádorových buněk). Vznik a vývoj karcinomu je multifaktoriální a dlouhodobý proces. Za jednotlivé typy zodpovídá mnoho faktorů, můžeme si uvést několik z nich, které byly dosud prokázány jako kancerogenní. Mezi prvními je ionizační záření a chemické látky (nitrosloučeniny, toxiny plísní, nikotin), dále viry, dědičnost, hormonální vlivy.

Co se týče karcinomu plic, největším faktorem podílejícím se na jeho vzniku je aktivní i pasivní kouření. Dále sem patří další rizikové faktory jako vdechování radioaktivního radonu, například u osob, které pracují v dolech. Neméně významným faktorem je vystavení

se těžkým kovům (klasicky azbestu, arsenu, kadmiu) a různým chemickým látkám (beryliu) a záření. (Travis, a další, 2004)

Důležitou roli při předcházení vzniku nádorů hraje prevence. Rozlišujeme primární a sekundární prevenci, přičemž primární prevence se týká snížení těchto negativních vlivů (přestat kouřit, používání opalovacích krémů s UV filtrem jako prevence nádorů kůže apod.). Sekundární prevencí rozumíme zdravotní výchovu, pravidelné kontroly u lékaře a dlouhodobé sledování osob s vyšším rizikem rozvinutí nádorového onemocnění. Pokud je již nádorové onemocnění diagnostikováno, tak jeho účinná léčba závisí na stupni změn a typu nádoru. Obecně platí, že onemocnění, které je zachyceno v časném stadiu, můžeme úspěšně léčit. (Stríteský, 2001)

## **2.4 Karcinom plic**

Problematika karcinomů plic je v současné době velmi diskutovaným tématem, protože se ukazuje, že z hlediska mortality je vůbec nejčastějším onkologickým onemocněním jak v České republice, tak i ve světě. V této statistice byly zahrnuty malobuněčné i nemalobuněčné karcinomy plic. Nemalobuněčné karcinomy však tvoří 80% většinu případů onemocnění plicními karcinomy.

### **2.4.1 Epidemiologie karcinomu plic**

Epidemiologie je obor, který se zabývá rozložením nemoci v populačních skupinách v určitém čase a místě. Co se týče onemocnění karcinomem plic, tak plicní karcinom je celosvětově nejčastějším onkologickým onemocněním. Zatloukal píše, že ještě na začátku dvacátého století bylo onemocnění plicním karcinomem vzácné. Od konce dvacátých let se incidence této nemoci začala zvyšovat u mužů a posléze i u žen. Časový trend také ukazuje zvyšující se výskyt onemocnění i v mladších věkových skupinách. (Zatloukal, 2001)

Největší zastoupení této nemoci má Severní Amerika a západní Evropa. Česká republika také patří k zemím s velkou mortalitou na karcinom plic. Celosvětově bylo zjištěno, že v roce 2002 onemocnělo karcinomem plic 1,35 miliónu obyvatel a současně na tuto diagnózu zemřelo 1,18 miliónu lidí. Poměr zastoupení onemocnění u mužů a žen je asi 3:1. V České republice byla v roce 2010 incidence u mužů 90/100000, u žen 35/100000 a

mortalita u mužů 75/100000, u žen 27/100000.<sup>2</sup> Mortalita u mužů obecně mírně klesá (asi o 15% za posledních 25 let). I přesto je však velmi vysoká. V případě žen incidence i mortalita stoupá, za posledních 30 let se ztrojnásobily počty pacientek. Situace v České republice se čím dál více podobá nejvyspělejším státům, jako USA a Velké Británii.

Věkové rozmezí nejčastějšího výskytu karcinomu plic je mezi 55. - 80. rokem života (medián 70 let).

Bohužel ve většině případů karcinomu plic nejsou pacienti včas diagnostikováni a přežívání s karcinomem plic je kratší než u většiny jiných solidních nádorů. (Kolek, 2010)

#### **2.4.2 Klinické projevy**

Klinické projevy u nemalobuněčného karcinomu plic a obecně u všech karcinomů, závisí na velikosti a umístění nádoru. Typický je počáteční suchý kašel objevující se u 45% - 75% pacientů. U některých pacientů se také vyskytuje hemoptýza, což je vykašlávání krve z plic nebo z dolních cest dýchacích. S postupem času se objevuje také bolest na hrudi postihující ty pacienty, kteří mají periferně uložené nádory. Dušnost může vést až ke kolapsu plic a vyskytuje se pouze v pokročilém stádiu karcinomu plic. (Střítecký, 2001)

### **2.5 Nemalobuněčný karcinom**

V diagnostice plicních karcinomů rozlišujeme různé podtypy karcinomů. Rozdělujeme je na dvě hlavní skupiny, a to na malobuněčný karcinom a skupinu nemalobuněčných plicních karcinomů. Správné určení typu karcinomu je rozhodující při léčbě pacientů.

Malobuněčný plicní karcinom (SCLC, small-cell lung carcinoma) se odlišuje od nemalobuněčného agresivním a rychlým růstem buněk. Vzniká v hilové plicní oblasti a postihuje mediastální lymfatické uzliny. Velice často zakládá četné metastázy. Nádorové buňky SCLC jsou velké asi jako tři malé lymfocyty a mají kulatá, oválná nebo vřetenovitá jádra, která obklopuje minimum cytoplazmy. I přes vysokou mitotickou aktivitu buněk je SCLC ze začátku dobře léčitelný a stále citlivý na radiační léčbu či chemoterapii. Málo příznivou vlastností je však tendence k časně diseminaci a vysoké procento recidivy.

---

<sup>2</sup> www.svod.cz

Malobuněčným typem karcinomu přibližně onemocní asi 15% pacientů. Zbývá většina patří nemalobuněčnému typu karcinomu. (Travis, a další, 2004)

Nemalobuněčný typ karcinomu (NSCLC, non-small cell lung carcinoma) představuje 80% zastoupení onemocnění plicními karcinomy. Co se týče reakcí na radiační léčbu či chemoterapii, jsou nemalobuněčné karcinomy méně citlivé. NSCLC rozdělujeme nejčastěji do tří podtypů (Schéma 1): adenokarcinom, dlaždicobuněčný karcinom a velkobuněčný karcinom. Nemalobuněčné karcinomy jsou převážně spojovány s kouřením cigaret, ale mohou se vyskytovat i u nekuřáků, zejména v případě adenokarcinomu. NSCLC vznikají z epitelálních buněk plic a nacházejí se v oblasti od hlavních průdušek k terminálním alveolům. Jednotlivé histologické typy NSCLC mají svá specifická místa původu. Dlaždicobuněčný (spinocelulární) karcinom nacházejí obvykle u hlavních průdušek, adenokarcinom zpravidla pochází z periferních částí plic. (Travis, a další, 2004)

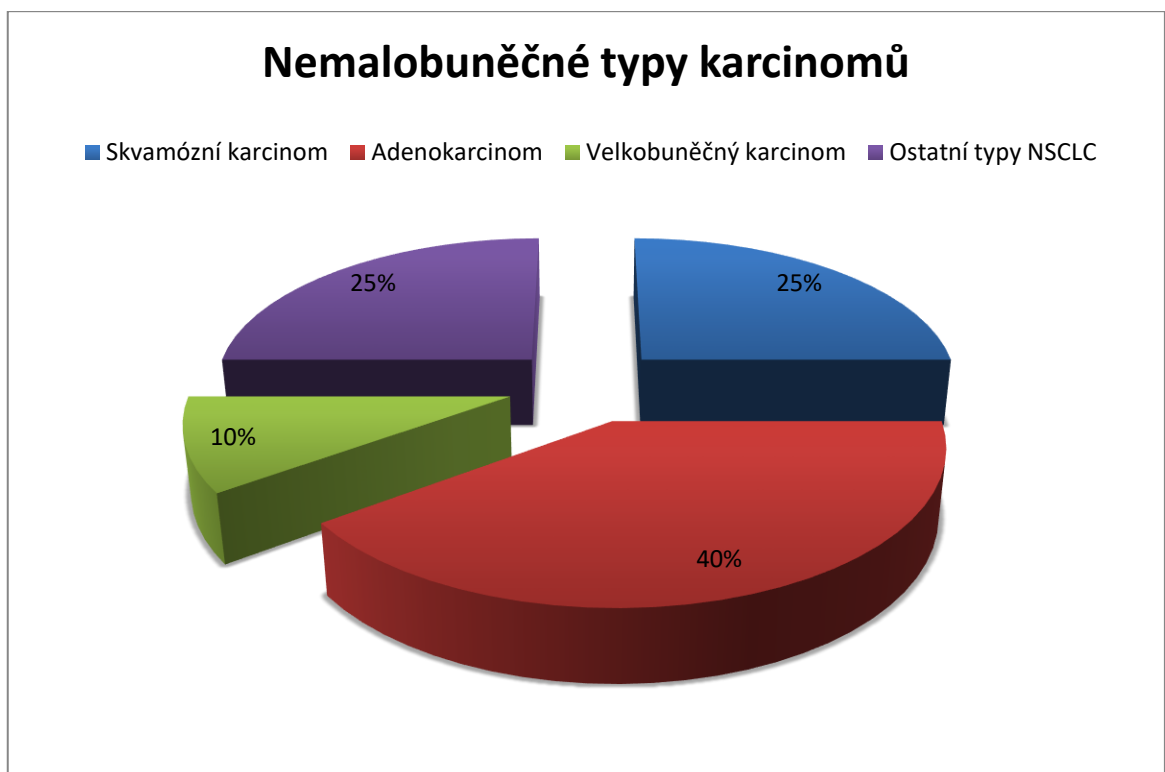


Schéma 1: Zastoupení jednotlivých typů NSCLC

## 2.6 WHO histologická klasifikace nemalobuněčného karcinomu plic

Tabulka maligních epiteliálních nádorů (Travis, a další, 2004):

<b>A) Spinocelulární (skvamózní) karcinom</b>
1. papilární
2. světlobuněčný
3. malobuněčný
4. z bazaloidních buněk
<b>B) Adenokarcinom</b>
1. acinární
2. papilární
3. bronchioloalveolární
<i>i. mucinózní</i>
<i>ii. nemucinózní</i>
<i>iii. smíšený mucinózní nebo nemucinózní či přechodný</i>
4. adenokarcinom, smíšený
5. solidní adenokarcinom s produkcí hlenu
<i>i. fetální adenokarcinom</i>
<i>ii. mucinózní adenokarcinom</i>
<i>iii. mucinózní cystadenokarcinom</i>
<i>iiii. adenokarcinom z buněk tvaru pečetiho prstenu</i>
<i>v. adenokarcinom z jasných buněk</i>
<b>C) Velkobuněčný karcinom</b>
1. velkobuněčný neuroendokrinní karcinom
<i>i. kombinovaný velkobuněčný neuroendokrinní karcinom</i>
2. bazaloidní karcinom
3. karcinom podobný lymfoepiteliomu
4. světlobuněčný
5. velkobuněčný karcinom s rhabdoidním fenotypem

### 2.6.1 Spinocelulární karcinom (SCC)

Spinocelulární (skvamózní, dlaždicobuněčný, epidermoidní) karcinom představuje asi 25% všech nemalobuněčných plicních karcinomů. SCC je maligní epiteliální tumor, jehož prekurzorem je dysplázie metaplastického dlaždicového epitelu. Diagnóza SCC spočívá v nálezů keratinizace buněk a/nebo přítomnosti mezibuněčných můstků. Ve velmi dobře histologicky diferencovaném nádoru můžeme také pozorovat tzv. rohové perly. Nejčastěji se spinocelulární karcinom vyskytuje v oblasti plicního hilu, nebo také postihuje lobární či

segmentální bronchy. Můžeme říci, že přes 98% SCC je silně asociováno s kouřením cigaret. (Travis, a další, 2004), (Dundr, 2013)

## 2.6.2 Adenokarcinom (AC)

Adenokarcinom představuje přibližně 40% všech nemalobuněčných plicních karcinomů. AC je maligní epiteliální tumor zpravidla spojený s tvorbou hlenu. WHO klasifikace z roku 2004 rozlišuje mnoho podtypů adenokarcinomu: acinární, papilární, bronchioloalveolární, solidní karcinom s produkcí hlenu nebo adenokarcinom smíšený. Prekurzorovou lézí je atypická adenomatoidní hyperplázie. Diagnóza AC je založena na žlázové diferenciaci, která je zpravidla doplněna o imunohistochemickou typizaci. Adenokarcinom se vyskytuje spíše na periferii plic a poté se šíří krví či lymfatickými uzlinami. Lze říci, že adenokarcinom roste pomaleji, ale zato jeho metastázy jsou rozsáhlé. AC je zvláštní typ nádoru s menší spojitostí s kouřením a se zvýšeným výskytem u žen. (Dundr, 2013), (Travis, a další, 2004). V současné době došlo k některým změnám v klasifikaci plicních adenokarcinomů, které přehledně shrnuje tabulka dle Dundra (Tab. 1).

<b>Preinvazivní léze</b>
Atypická adenomatoidní hyperplázie
Adenocarcinoma in situ ( $\leq 3\text{cm}$ , dříve BAC)
Nemucinózní
Mucinózní
Smíšený mucinózní/nemucinózní
<b>Minimálně invazivní karcinom (<math>\leq 3\text{cm}</math>, predominantně lepidický způsob růstu s <math>\leq 5\text{mm}</math> invazí)</b>
Nemucinózní
Mucinózní
Smíšený mucinózní/nemucinózní
<b>Invazivní adenokarcinomy</b>
Predominantně lepidický způsob růstu (dříve nemucinózní BAC, s invazí $> 5\text{mm}$ )
Predominantně acinární
Predominantně papilární
Predominantně mikropapilární
Predominantně solidní s hlenotvorbou
Variety invazivního adenokarcinomu
Invazivní mucinózní adenokarcinom (původně mucinózní varianta BAC)
Koloidní
Fetální (low grade a high grade)
Enterický

Tab. 1: Rozšířená klasifikace plicních karcinomů, (Dundr, 2013)

### 2.6.3 Velkobuněčný karcinom (LCC)

Velkobuněčný karcinom plic představuje takřka 10% všech nemalobuněčných karcinomů plic. LCC je maligní epiteliální tumor, který je tvořen velkými mnohojadernými anaplastickými buňkami. Nelze rozlišit, zda buňky LCC pochází malobuněčného karcinomu, žláзовého či dlaždicobuněčného epitelu. LCC se vyskytují jako velké periferní masy, které mohou zahrnovat také průdušky. Metastázy najdeme nejčastěji na mediastinálních uzlinách s následující expanzí do pohrudnice, perikardu, případně i vzdálené metastázy jater, kostí a mozku.

LCC také zahrnuje velkobuněčný neuroendokrinní karcinom (LCNEC). Je to nádor, který má vysoký stupeň malignity a je lokalizován na periférii. Po histologické stránce tvoří velké atypické nádorové buňky se středně bohatou cytoplazmou. Buňky vykazují neuroendokrinní charakter, což značí pro organoidní uspořádání buněk, tvorba rozet, trabekul, palisádování a pro typický charakter chromatinu „pepř a sůl“ ve světelné mikroskopii. (Dundr, 2013) Vyskytují se zde četné mitózy (11 mitóz na 2 mm<sup>2</sup>) a běžně nacházíme i oblasti rozsáhlých nekróz. Další varianty velkobuněčného typu karcinomu jsou poměrně vzácné.

Všechny typy velkobuněčného karcinomu jsou spojeny s kouřením, přes 60% LCC se vyskytuje u mužů. (Dundr, 2013), (Travis, a další, 2004)

## 2.7 TNM klasifikace karcinomů plic

Klasifikace karcinomů se opírá o jeho biologické vlastnosti (benigní nebo maligní), stupni vývoje (přítomnost či nepřítomnost metastáz) a lokalizaci. Pro stanovení typu karcinomu je ale zásadní mikroskopický (histologický) obraz. (Stříteský, 2001)

TNM klasifikace obecně slouží k popisu rozsahu nádoru a k určení stádia onemocnění. T (tumor) je údaj o rozsahu primárního nádoru, N (nodus) je rozsah metastáz v regionálních mízních uzlinách, M (metastasis) je nepřítomnost či přítomnost vzdálených metastáz. Tato klasifikace je rozšířena o doplnění číslic k písmenům, např. T0, T1, T2, T3, T4 ale i N0-3, M0-1. (Travis, a další, 2004)

TNM klasifikace pro plicní nádory byla publikována Mezinárodní unií proti rakovině (UICC) a Americkým výborem proti rakovině (AJCC). K TNM klasifikaci také patří přiřazení písmene *c* pro klinické zhodnocení na základě nálezů, které jsme získali před léčením

(cTNM) a písmene *p* pro patologické zhodnocení materiálu získaného během operace (pTNM). (Wrona, a další, 2010)

#### TNM klasifikace karcinomů plic (Sobin, 2011):

<b>Primární tumor T</b>	
<b>TX</b>	Primární tumor nebyl prokázán, nelze hodnotit, nebo byl nádor prokázán na základě přítomnosti zhoubných buněk ve sputu nebo bronchiálním výplachu, ale není viditelný zobrazovacími metodami nebo bronchoskopicky
<b>T0</b>	Žádné známky primárního tumoru
<b>Tis</b>	Karcinom in situ
<b>T1</b>	Nádor o velikosti 3cm a menší, obklopený plící nebo viscerální pleurou, bez bronchoskopických známek postižení proximálněji od lobárního bronchu
<b>T1a</b>	Nádor o velikosti $\leq 2$ cm
<b>T1b</b>	Nádor o velikosti $> 2$ cm ale $\leq 3$ cm
<b>T2</b>	Nádor větší než 3cm ne však více než 7 cm; nebo nádor s některou z následujících charakteristik: postihuje hlavní bronchus, 2cm a distálněji od kariny; šíří se na viscerální pleuru; je spojen s atelektázou nebo obstrukční pneumonitidou, která se šíří k oblasti hilu, nepostihuje však celou plíci
<b>T2a</b>	Nádor o velikosti $> 3$ cm ale $\leq 5$ cm
<b>T2b</b>	Nádor o velikosti $> 5$ cm ale $\leq 7$ cm
<b>T3</b>	Nádory větší než 7 cm, nebo přímo postihující některou z následujících struktur: hrudní stěnu (včetně nádorů v oblasti sulcus superior), bránici, n. phrenicus, mediastinální pleuru, parietální perikard; nebo nádor v hlavních bronchu ve vzdálenosti 2cm od kariny, avšak bez postižení kariny; nebo přidružená atelektáza či obstrukční pneumonitida celé plíce nebo samostatný nádorový uzel (uzly) v témže laloku jako primární nádor
<b>T4</b>	Nádor jakékoliv velikosti, který postihuje některou z následujících struktur: mediastinum, srdce, velké cévy, trachea, n. laryngeus, recurrens, jícn, tělo obratle, karinu; samostatný nádorový uzel (uzly) v jiném stejnostranném laloku než primární nádor



<b>Postižení regionálních uzlin N</b>	
<b>NX</b>	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
<b>N0</b>	Žádné metastázy v regionálních mízních uzlinách
<b>N1</b>	Metastázy ve stejnostranných peribronchiálních a/nebo stejnostranných hilových uzlinách a intrapulmonálních uzlinách, včetně zahrnutí postižení přímým šířením
<b>N2</b>	Metastázy ve stejnostranných mediastinálních a/nebo subkarinálních mízních uzlinách
<b>N3</b>	Metastázy v druhostranných mediastinálních, druhostranných hilových, stejnostranných či druhostranných skalenických nebo supraklavikulárních mízních uzlinách

<b>Metastázy M</b>	
<b>MX</b>	Vzdálené metastázy nelze hodnotit
<b>M0</b>	Žádné vzdálené metastázy
<b>M1</b>	Vzdálené metastázy včetně nádorového uzlu nebo uzlů v odlišných lalocích (stejnostranných, druhostranných)
<b>M1a</b>	Samostatný nádorový uzel v druhostranném laloku; nádor s pleurálními uzly nebo maligním pleurálním či perikardiálním výpotkem
<b>M1b</b>	Vzdálené metastázy

<b>Stadium rakoviny plic</b>	
<b>0</b>	TisN0M0
<b>IA</b>	T1N0M0
<b>IB</b>	T2N0M0
<b>IIA</b>	T1N1M0
<b>IIB</b>	T2N1M0, T3N0M0
<b>IIIA</b>	T1N2M0, T2N2M0, T3N1-2M0
<b>IIIB</b>	T1-3N3M0, T4N1-3M0
<b>IV</b>	T1-4N1-3M1

## 3 Speciální část

### 3.1 Histologická technika

Úkolem histologie je schopnost zhotovit z různých orgánů i tkání preparáty, které poté vyšetřujeme pod mikroskopem. K tomu nám slouží různé histologické techniky (Schéma 2), bez nichž by to nebylo možné. Do histologické laboratoře patří mikroskop, sušárna preparátů, termostat, ploténka pro napínání řezů, mikrotomy a současně už ve všech laboratořích nacházíme autotechnikon, který umožňuje automatické zpracování dílčích kroků v histologii. (Vacek, 1995)



Schéma 2: Postup přípravy histologických preparátů

Materiál (orgány, tkáně), který zpracováváme v histologické laboratoři, získáváme buď biopsií, nebo nekropsií (po pitvě). Existují různé způsoby získání materiálu. Typy odběru jsou následující: punkce, excize, kyretáž, cytologické otisky, odběr dutou jehlou.

Ihned po odebrání materiálu musí být daná tkáň či orgán ihned fixována. Proč se materiál musí fixovat a k čemu vlastně slouží fixace? Fixace je rychlý postup při degradaci bílkovin, čímž zabráňujeme autolýze tkáně (samovolnému rozkladu). Slouží tedy k zachování struktury tkáně, kterou by měla v živém organismu. (Vacek, 1995)

Fixaci provádíme fixačními tekutinami, mezi které řadíme formol, fixační tekutiny s kyselinou pikrovou nebo se sublimátem a ostatní fixační tekutiny (např. etanol, oxid osmičelý). Méně rozšířené fixační prostředky jsou fyzikální fixační prostředky. Využíváme buď teplo, či var, nebo lyofilizaci, což je vysoušení tkáně za velmi nízkých teplot.

Všechny fixační tekutiny však musí splňovat určité podmínky - rychle pronikat do tkáně, zachovat strukturu tkáně a zachovat barvitelnost tkáně.

Metodika fixace je následující: kousek tkáně vložíme do fixační tekutiny. Fixační tekutiny musí být dostatek, asi tak 20x až 50x více než je objem tkáňového bločku. Doba fixace záleží na použité fixační tekutině a velikosti tkáňového bločku. Po fixaci následuje

vyprání buď ve vodě, nebo v etanolu, záleží na povaze použité fixační tekutiny. Vypíráme ve vodě (po fixaci formolem), v etanolu 80% (po fixaci Bouinovou tekutinou), v etanolu s Lugolovým roztokem (po fixaci fixační tekutinou se sublimátem). Doba vypírání se pohybuje mezi 15 minutami až jednou hodinou. (Šebestová, 2007)

Po fixaci a vyprání následuje další krok a to zalévání tkáně do parafínu. V laboratořích s rutinním provozem se k zjednodušení práce používá k zalévání tkáně přístroj autotechnikon, který pracuje automaticky, podle časového harmonogramu, který se nastaví. (Vacek, 1995)

Zalévání tkáňového bločku do parafínu se skládá z několika dílčích etap, a to:

1. etapa: odvodnění tkáně
2. etapa: prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín
3. etapa: prosycení tkáně parafínem
4. etapa: vlastní zalití

Zaléváme do rozpustných médií rozpustných ve vodě (želatina, celodal, vosky rozpustné ve vodě) i do médií nerozpustných (parafín, paraplax). Metoda zalévání tkáně do médií rozpustných ve vodě se používá v takovém případě, kdy zalévaná tkáň nesmí přijít do styku s organickými rozpouštědly. Tkáň se tudíž nemusí odvodnit a není vystavena vysokým teplotám a nedojde ke smrštění tkáně. (Šebestová, 2007)

Odvodněná tkáň je prosycena rozehřátým parafínem, při teplotě 56 - 58°C. Důvod, proč se používá parafín, je jeho schopnost pronikat do všech mikroskopických skulin ve tkáních, a proto můžeme tkáň krájet na velmi tenké řezy. Zalévání do parafínu je poměrně rychlá a snadná metoda. Nemůžeme ho však použít k zalití tkání tužší konzistence než má parafín, např. chrupavka, šlacha. K tomuto účelu se hodí celoidin. Parafín také nelze použít k zalití takových tkání, ve kterých chceme prokázat lipidy, protože bychom je extrahovali organickými rozpouštědly.

Po zalití tkáně následuje odvodňování, zpravidla etanolovou řadou o stoupající koncentraci (70%, 80%, 96%, 100%). Odvodnění se provádí z důvodu vyhnutí se smršťování tkáně, ke kterému by došlo, kdybychom tkáň ihned vložili do koncentrovaného etanolu. Doba, která je potřebná k odvodnění tkáňového bločku, opět závisí na jeho velikost a samozřejmě také struktuře tkáně, ale pohybuje se kolem jednoho až dvou dnů.

Odvodněná tkáň obsahuje etanol, který je nutno odstranit, protože parafín se v něm nerozpustí. Provádíme to takovou látkou, která je schopna rozpustit parafín a současně se mísí s bezvodým etanolem. Tento krok je neméně důležitý, protože pokud etanol zůstane ve tkáni,

tak tkáň po prosycení parafínem ztvrdne. Ztvrdnutí pak následuje špatné krájení a tudíž i možnost špatné diagnostiky. Prosycení tkání se používají látky s nižším bodem varu než parafín nebo látky s vyšším bodem varu, které se úplně odstranit nedají, ale dají se dobře krájet, což je důležité. Mezi látky s nižším bodem varu patří benzen nebo xylen. Látka s vyšším bodem varu je například nejužívanější metylbenzoát a metylsalicylát, či cedrový olej, který je však cenově hůře dostupný. (Vacek, 1995)

Pokud máme prosycenou tkáň benzenem či jinou látkou, tak následuje další krok, a to prosycení tkáňového bločku tekutým parafínem při 40°C. Tento krok lze provádět buď přímo zalitím parafínem, nebo šetrněji, kdy zaléváme přes benzen-parafín. Technika benzen-parafín je následující. Tkáňový bloček dáme do nádoby s benzenem a přidáváme parafín, který se začne rozpouštět. Prosycení trvá přibližně 30 minut. Při využití pouze parafínu, dáváme tkáň přímo do parafínu v termostatu, který je vyhříván na 56 - 58°C. Tkáňový bloček poté prochází třemi lázněmi čistého parafínu. Doba v jednotlivých lázních je různá. V první lázni se zpravidla tkáň nechává 2 - 4 hodiny, v druhé lázni 4 - 6 hodin, ve třetí 8 - 12 hodin. Požadavky na zalévání parafínem jsou velmi rozsáhlé, jednak záleží na bodu tání (podle toho rozlišujeme parafíny měkké-bod tání kolem 50°C, a parafíny tvrdé-bod tání kolem 55°C, k běžnému zalévání se používají spíše tvrdé parafíny), musí mít vhodnou strukturu a nesmí obsahovat plynné produkty. (Vacek, 1995)

Tkáňový bloček máme tedy odvodněný, zbavený benzenu a následuje poslední krok a to vlastní zalití do parafínu (Obr. 7, Dostupné na: <http://www.nemjbc.cz/cs/oddeleni/patologie-a-ordinariat-soudniho-lekarstvi/fotogalerie.html>). Používá se zkvalitněného a přefiltrovaného parafínu, který se liší od parafínu, kterým jsme prosycovali v předešlém kroku. Zalití provádíme tak, že do plastové nebo kovové komůrky pinzetou vložíme tkáňový blok a zalijeme zahřátým parafínem (60°C). Poté necháme parafín ztuhnout, ale musíme brát zřetel na stejnoměrné a rychle ochlazení parafínu. Postup je takový, že nejprve na parafín foukáme, až se nám vytvoří kůrka a až potom můžeme ponořit parafín do studené vody. Kůrka je důležitá proto, aby studená voda vnikla k zalévané tkáni. Po ztuhnutí parafínu odstraníme zalévací komůrku a parafínový bloček se ořízne do čtverce či obdélníčku, je vhodné, aby vrstva parafínu okolo tkáně byla přibližně 3-5mm. Vzniklý čtverec připevníme k dřevěnému špalíčku tak, že krátce nahřejeme parafínový bloček nožem a přitiskneme na podložku. Přitmelený bloček ještě poté ponoříme do studené vody. (Vacek, 1995)



Obr. 7: Příprava tkáně před zalitím do parafinu

Takto zhotovený tkáňový bloček je připravený ke krájení. Ke krájení tkáňových bločků se používají mikrotomy. Jsou to přístroje, ve kterých je zabudovaný nůž vedený v rovině proti bločku a bloček se po každém řezu posouvá šroubem do výšky. V jiném případě je zase nůž pevně připevněn a posouvá se bloček. Na takovémto principu pracují některé ultramikrotomy, které se využívají pro ultratenké řezy pro elektronmikroskopické účely. (Šebestová, 2007)

Rozlišujeme různé druhy mikrotomů:

- a) sáňkový mikrotom
- b) rotační mikrotom
- c) vibrační mikrotom
- d) diskový mikrotom
- e) kryostat

Mezi nejčastěji používaný řadíme sáňkový mikrotom (Obr. 8a, Dostupné na: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:SÁŇKOVÝ\\_MIKROTOM.jpg](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:SÁŇKOVÝ_MIKROTOM.jpg)). Sáňkový mikrotom slouží ke krájení jak celoidinových, tak parafinových bloků. U tohoto mikrotomu se posouvá hlava s nožem oproti pevně upevněnému bločku. Můžeme na něm měnit jak sklon nože ke směru řezu, tak i sklon nože k rovině řezu. Rotační mikrotom (Obr. 8b, Dostupné na: <http://medesa.testujeme.cz/article.asp?nDepartmentID=16&nArticleID=465&nLanguageID=1>

) slouží ke krájení výhradně parafinových bloků a zhotovení sériových řezů<sup>3</sup>. Zde je mikrotomový nůž pevně upevněn a proti němu se pohybuje bloček. Bloček se pohybuje tak, že pohybem ruky otáčíme setrvačnickové kolo. Svorka s bločkem se pohybuje ve svislé rovině, nahoru a dolů. Vibrační mikrotom je sestaven tak, že je ideální ke zhotovení velmi tenkých řezů živých tkání. Diskový mikrotom je inovativní přístroj, kdy je vzorek upevněn na disku mikrotomu a proti němu se pohybuje žiletka. Práci diskového mikrotomu řídí procesor. Kryostat neboli zmrazovací mikrotom krájí nezalité tkáně nebo tkáně zalité pouze do želatiny, zmrazené oxidem uhličitým. Má speciálně chlazenou komůrku (-20°C), ve které se krájí. Nůž i bloček mají samostatné chlazení. Krájení je obdobné jako na rotačním mikrotomu. Tento mikrotom se používá hlavně v histochemii. (Vacek, 1995), (Šebestová, 2007)



a) sáňkový mikrotom



b) rotační mikrotom

Obr. 8a,b: Manuální mikrotomy používané v histologických laboratořích

Neméně důležitá je také tloušťka řezů. Nejtenčí řezy se zhotovují pro cytologické preparáty. Jejich tloušťka se pohybuje okolo 2 – 5  $\mu\text{m}$ . Pro rutinní diagnostiku jsou

---

<sup>3</sup> „Sériové řezy umožňují získat představu o trojrozměrném uspořádání některých struktur ve tkáni a je toho využíváno zejména v embryologii. Série se nejlépe zhotovují z parafinových bloků na rotačním mikrotomu. Při krájení se tvoří souvislá páska řezů a zachovává se jejich pořadí při přenášení na podložní sklo.“ (Šebestová, 2007)

vhodné řezy šířky kolem 3 - 5  $\mu\text{m}$ . Pro výzkumné a speciální účely se zhotovují řezy celoidinové, zmrazené či zalité v jiných médiích v různých tloušťkách, 10 - 50  $\mu\text{m}$ . Pro zkoumání průběhu krevních kapilár nebo větvení nervových buněk je žádoucí zhotovení tloušťky řezů tak 100 - 200  $\mu\text{m}$ . (Šebestová, 2007)

Řezy se dále už nijak nezpracovávají, pouze je napínáme pomocí nádobek s teplou vodou, a to tak, že parafínové řezy opatrně položíme na hladinu teplé destilované vody (37° C-40° C). Účinkem tepla se řezy narovnejí. Z vody je vytáhneme pomocí podložního sklíčka natřeného směsí bílku s glycerinem. Sklíčko poté necháme odkapat a uložíme ho do sušárny. (Vacek, 1995)

Ze sušárny putuje vzorek buď pod speciální optické zařízení (mikroskop s fázovým kontrastem) nebo ho barvíme různými vhodnými barvivy pro zvýraznění toho, co chceme pozorovat. Při barvení využíváme toho, že se různé části buněk a tkání barví jinak, tudíž je v mikroskopu můžeme zřetelně rozpoznat. Rozlišujeme specifické barvení, které slouží k odlišení pouze jednoho elementu (jádra) a nespecifické barvení, které se používá k dobarvení ostatních struktur (cytoplazmy, kolagenu, ...).

Existuje mnoho druhů histologických barviv. Jejich nejzákladnější rozdělení je na barviva kyselá a barviva zásaditá (bazická). Barviva zásaditá jsou barviva, jejichž molekuly obsahují bazické složky. Barví jádra buněk (jaderný chromatin), a proto se někdy zásaditá barviva nazývají jaderná (např. hematoxylin, jádrová červeň). Kyselá barviva mají ve svých molekulách kyselou složku a obvykle barví cytoplazmu buněk. Podle toho jim říkáme také plazmatická barviva či eozinofilní barviva, dle nejčastěji používaného kyselého barviva eozinu. Barviva dále dělíme na přírodní, což jsou extrakty rostlinného nebo zvířecího původu (šafrán, orcein, karmín, hematoxylin, ...) a syntetické (anilínová barviva).

Podle toho, zda se zbarví tkáňové složky zásaditými či kyselými barvivy, vyhodnocujeme barvitelnost tkáně. Bazofilii myslíme vlastnost těch složek tkáně, které se barví zásaditými barvami (jaderný chromatin, specifická granula bazofilní granulocytů,...). Oxyfilně či eozinofilně se barví určité struktury jako koloid štítné žlázy, eozinofilní granula, vlákna příčně pruhovaného svalu. Neutrofilii se rozumí takové struktury, které se barví jak kyselými tak zásaditými barvami (např. neutrofilní granula leukocytů).

Mezi nepoužívanější z kyselých barviv patří eozin, ze zásaditých barviv je nejpoužívanější hematoxylin. Společně tvoří dvojice hematoxylin-eozin nejčastější metodu

pro přehledné barvení. K metodám pro přehledné barvení se též řadí barvení dle Weigert van Giesona, Azan, Dominici, trichromová barvení. K cytologickému průkazu se používá Heidenhain či znázornění mitochondrií. U histopatologických metod je zase nejpoužívanější barvení amyloidu, bakterií v řezech, Papanicolaou.

Při působení některých barviv můžeme pozorovat určitý jev, říkáme mu metachromázie. Metachromázie znamená to, že se určité struktury tkáně barví jiným tónem, než je základní tón barviva. Vacek uvádí, že se tak děje při použití roztoku toluidinové modři, který má sice modrou barvu, ale hlen se barví růžově až do fialova. Mezi neznámější metachromatická barviva patří dále thionin nebo metylová violet'. (Šebestová, 2007), (Vacek, 1995)

Obecný princip barvení je následující. Řezy přeneseme do barvicího roztoku a poté je vypíráme buď pramenitou, nebo destilovanou vodou, dle použitého barviva. Dále se dobarvují další struktury vhodnými doplňkovými barvivami. Po dalším důkladném vyprání se řezy odvodňují etanolem o stoupající koncentraci (80%, 96%, 100%). Po odvodnění následuje projasnění v xylenu a poté řez zamontujeme do vhodného média a pozorujeme buď světelným, nebo elektronovým mikroskopem. Montováním se rozumí uzavření obarvených řezů mezi podložní a krycí sklíčko do uzavíracího média. Uzavírací médium musí být průhledné, mít vysoký index lomu a nesmí poškodit zbarvení tkáně. Látky, které k uzavírání používáme, se dělí na dvě skupiny. První skupina zahrnuje látky nemísitelné s vodou, ale rozpouštějící se v xylenu (kanadský balzám, syntetická pryskyřice, hustý cedrový olej). Ve druhé skupině jsou látky mísící se s vodou (glycerinová želatina, glycerin, sirup z arabské gumy či levulózový sirup). Řezy, které uzavíráme do látek mísících se s vodou, používáme pouze tehdy, pokud tkáň nesmí být kontaktována koncentrovaným etanolem a xylenem (průkaz lipidů).

### **3.2 Imunohistochemie**

Imunohistochemické metody představují spojení imunologických principů a histochemie. Základem imunologických metod je specifická reakce antigenu a protilátky. Histochemie dokazuje pomocí chemické reakce přítomnost určitých látek (např. enzymy, polysacharidy, lipidy) přímo v buňkách či tkáních. Imunohistochemie je tedy vyšetřovací



metoda, která používá specifické protilátky s navázanými chemickými sloučeninami, k průkazu antigenu, který je přítomen ve zkoumaných tkáních, buňkách. (Lukáš a další, 1997)

Protilátky, které se v imunohistochemii používají, jsou buď monoklonální povahy nebo polyklonální.

### 3.2.1 Protilátky

Protilátka je specifický protein (glykoprotein), který vzniká jako odpověď na antigen. Protilátky neboli imunoglobuliny jsou produkty plazmatických buněk, které jsou konečným stadiem B lymfocytů. Protilátky mají strukturu molekuly uspořádanou do písmene Y a nacházíme je v krvi vyšších obratlovců. Rozlišujeme 5 tříd imunoglobulinů a to IgM, IgG, IgA, IgE, IgD. (Lukáš, a další, 1997)

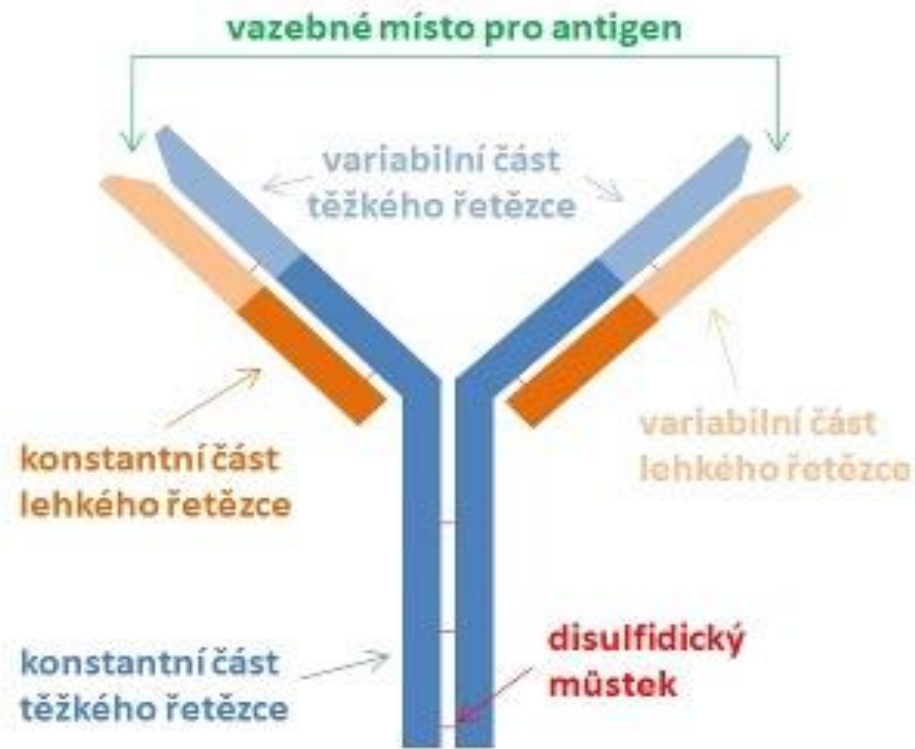
Imunoglobuliny (Obr. 9: [http://www.biomach.cz/\\_/rsrc/1285952949075/biologie-cloveka/imunitni-system/protilatka.jpg](http://www.biomach.cz/_/rsrc/1285952949075/biologie-cloveka/imunitni-system/protilatka.jpg)) se skládají z dvou lehkých řetězců a ze dvou těžkých řetězců (do již zmíněných 5 tříd je rozdělujeme podle typu těžkého řetězce). Těžké řetězce jsou mezi sebou spojeny disulfidickými vazbami. Oba řetězce, jak lehké tak těžké, se skládají z části variabilní (Fab) a z části konstantní (Fc). Variabilní části řetězců slouží jako vazebná místa pro antigen a zajišťují tedy specifitu protilátky. Protilátky se vážou na antigen na základě komplementarity „klíče a zámku“. Antigen má na svém povrchu tzv. antigenní epitopy, místa, kam se váže protilátka svojí variabilní doménou. Lehké řetězce jsou dvojího druhu a to  $\kappa$  (kappa) a  $\lambda$  (lambda). Těžké řetězce existují v 5 typech:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ . Pro imunoglobulin G ( $\gamma$  řetězce), pro IgM ( $\mu$  řetězce), IgA ( $\alpha$  řetězce), IgE ( $\epsilon$  řetězce), IgD ( $\delta$  řetězce). (Penka, a další, 2012)

V největším množství jsou v séru zastoupeny protilátky třídy IgG (asi 75%). Jsou produkovány během sekundární imunitní odpovědi, což znamená, že hladina IgG stoupá později, ale po infekci nadále zůstává v organismu jako součást imunitní paměti. IgG se vyskytují ve formě monomeru (Obr. 10: <http://www.symbinatur.com/obrazky/texty/60/igg2.gif>) a dělí se ještě na 4 podtřídy.

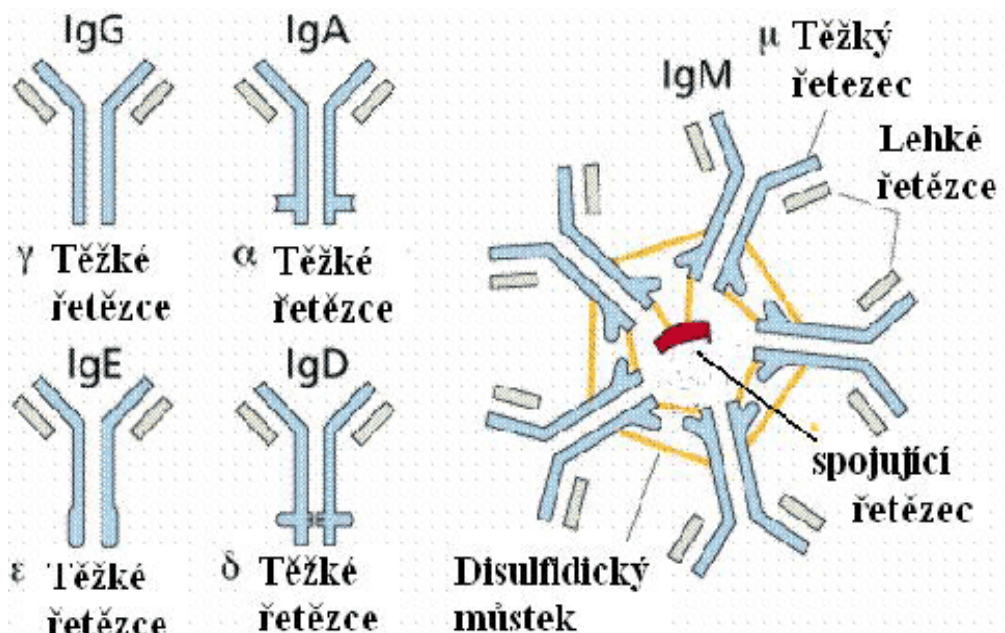
Druhou nejvíce zastoupenou třídou je IgM (asi 10%). IgM se vyskytuje v krvi jako první, při setkání organismu s antigenem. Po vyléčení infekce se v krvi nadále nevyskytuje. Je považován za ukazatele probíhající infekce. Vyskytuje se ve formě pentameru, který je složen z pěti monomerů. (Lukáš, a další, 1997)

IgA je dimer, který má své uplatnění ve slizniční imunitě a jsou produkovány B lymfocyty ve slizničních vrstvách. Účastní se opsonizace a ochrany sliznic. Vyskytuje se ve

dvou podtypech. IgE se účastní při alergických reakcích a u parazitárních onemocnění. V séru je ve velmi malém množství (méně než 100IU/ml). IgD tvoří především receptor pro antigen BCR. Jeho koncentrace v séru je jinak velmi nízká a jeho stanovení nemá téměř žádnou diagnostickou hodnotu. (Litzman, a další, 2011)



Obr. 9: Struktura imunoglobulinu



Obr. 10: Vyskytující se formy protilátek

### 3.2.2 Monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky vznikají, oproti polyklonálním protilátkám, z jednoho klonu B lymfocytů. Monoklonální protilátky připravujeme hybridomovou technologií. Nejprve imunizujeme myš specifickým antigenem. Poté z myší sleziny izolujeme B lymfocyty. B lymfocyty z myší sleziny inkubujeme s buňkami myšího myelomu. B lymfocyty spolu s buňkami myelomu fúzí a vytváří tzv. hybridom. Tento hybridom má schopnost neomezeně se dělit a produkovat Ig (charakteristika myelomové buňky) a od slezinných B lymfocytů získá genetickou informaci o variabilní oblasti Ig. Tyto hybridomy je ještě potřeba oddělit od protilátek, které si myš vytvořila proti různým antigenům a vyselektovat klon, který produkuje pouze námi žádané protilátky. (Litzman, a další, 2011)

Výhodou takto připravených protilátek je specifita protilátky proti určitému antigenu a možnost pěstovat klon v kultivačním médiu. Nevýhodou zůstává náročnost metody, jak po technické tak finanční stránce. (Lukáš, a další, 1997)

### 3.2.3 Polyklonální protilátky

Polyklonální protilátky získáváme hyperimunizováním zvířat (např. myší, králíků), což provádíme opakovaným podáním antigenu. Po antigenní stimulaci se zvířeti odebírá krev. Takto získané protilátky označujeme jako antiséra. Antiséra obsahují heterogenní směs protilátek, které jsou namířeny proti mnoha různým epitopům antigenu. (Litzman, a další, 2011)

Tedy každý klon B lymfocytů produkuje protilátku specifickou pro určitý antigen, který vyvolal jeho množení. Jeden antigen je schopný aktivovat více klonů B lymfocytů a to vede k polyklonální sekreci protilátek. Proto tyto antiséra dále afinitně čistíme a to tak, že je izolujeme vazbou na antigen s následným uvolněním. Poté jsou již připravena k použití v imunohistochemických metodách. (Lukáš, a další, 1997)

### 3.2.4 Antigen

Antigenem se stává jakákoliv substance, která je schopna vyvolat imunitní reakci. Antigeny jsou převážně proteiny či glykoproteiny. Mezi antigeny řadíme také hapteny, které ovšem samy o sobě nejsou schopny spustit imunitní reakci. Imunitní odpověď vyvolají pouze při navázání se na nějaký makromolekulární nosič (např. albumin). Antigen se skládá z nosiče a epitopů. Epitopů může být hned několik, každý je specifický pro určitou protilátku. Antigeny mohou být exogenního a endogenního původu. Mezi antigeny exogenního původu řadíme součásti bakterií (pouzdra, bičíky) či virové kapsidy, části nukleových kyselin.

Dělíme je na exoantigeny (Ag je zevního původu) a autoantigeny (struktury vlastních tkání). Zvláštním případem je alergen, patřící do skupiny exoantigenů, který je schopen vyvolat přehnanou imunitní reakci - alergickou reakci. Řadíme sem pyl, potraviny (kasein v mléce) či zvířecí srst. (Bartůňková, a další, 2011)

### **3.3 Imunohistochemické metody**

Imunohistochemické metody využívají značených protilátek namířených proti antigenu. K detekci komplexu antigen-protilátka se využívají různé metody, které se odvíjí od charakteristiky použité značky navázané na protilátku. Obecný postup při diagnostice imunohistochemickými metodami je následující: Odběr tkáně, její fixace, zalití do parafínu, krájení tkáně, barvení (průkaz exprese příslušného antigenu), montování a poté pozorování mikroskopem. Metody v zásadě dělíme na přímé a nepřímé.

#### **3.3.1 Přímé imunohistochemické metody**

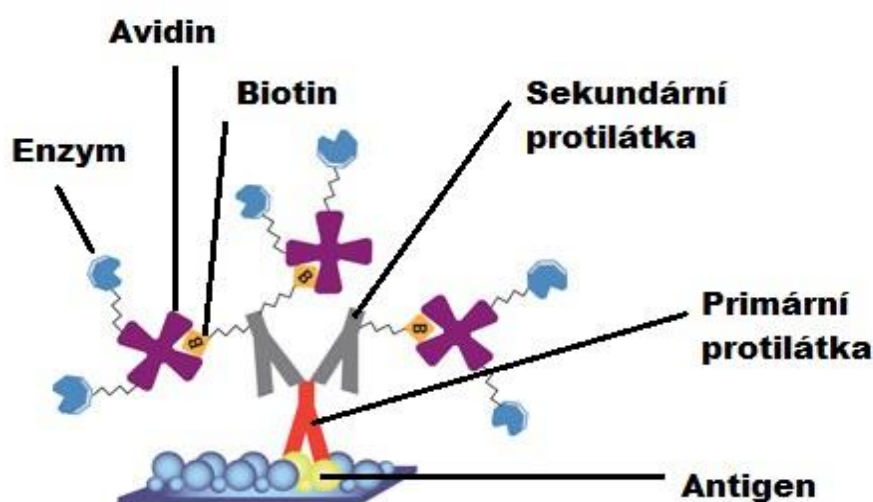
Přímé imunohistochemické metody využívají značené protilátky proti antigenu, který stanovujeme. Primární protilátka je přímo značená nejčastěji fluoresceinem (FITC) či enzymem a to například peroxidázou, alkalickou fosfatázou. Přímá imunohistochemická diagnostika je sice lehce proveditelná metoda, ale dnes se prakticky nepoužívá.

#### **3.3.2 Nepřímé imunohistochemické metody**

Nepřímé imunohistochemické metody také využívají reakce protilátky a antigenu. Výhodou této metody je její vyšší citlivost a několik možností jejího provedení. Lze využít „sendvičový“ test nebo nepřímý test, kde se značené protilátky navážou na specifickou protilátku, která je namířená proti antigenům ve tkáni. V „sendvičovém“ testu se značená protilátka neváže na specifickou protilátku, ale na antigeny, které jsou namířeny proti protilátce ve tkáni. Specifický antigen je tedy v „sendviči“ mezi protilátkou ze tkáně a značenou protilátkou. Protilátka je opět značená FITC, fluorochromem, tetrametyl rhodaminem, glukozo-oxidázou nebo  $\beta$ -galaktozidázou. Mezi nejnovější metody řadíme označení protilátky komplexem avidin-biotin-peroxidáza, přičemž biotin funguje jako zesilovač signálu. (Lukáš, a další, 1997)

Nepřímé imunohistochemické metody můžeme dále rozdělit na dvojestupňové a trojstupňové. Dvojestupňová metoda využívá navázání značené protilátky proti specifické protilátce, která je navázaná na antigenech tkáně (již zmiňovaný nepřímý test). Trojstupňová metoda odpovídá „sendvičovému“ testu. Mezi trojstupňové metody řadíme PAP komplex (peroxidáza - antiperoxidáza), APAAP komplex (alkalická fosfatáza – anti-alkalická fosfatáza) a metodu ABC (avidin-biotin-komplex). (Lukáš, a další, 1997)

Metoda ABC (Obr. 11: Upraveno dle, [http://www.piercenet.com/media/LSABmethod\\_NO\\_legend.jpg](http://www.piercenet.com/media/LSABmethod_NO_legend.jpg)) je založena na tvorbě pevné vazby mezi avidinem a biotinem. Avidin je glykoprotein vaječného bílku a je schopen vázat až čtyři molekuly biotinu (biotin je vitamín ze skupiny B). Principem metody ABC je navázání sekundární protilátky značené biotinem na specifickou protilátku. Dále se na komplex avidin-biotin naváže enzym (nejčastěji peroxidáza), který výrazně zesiluje signál. Posledním krokem je vizualizace, kterou provádíme stejnými metodami, jakými prokazujeme endogenní enzymy. (Lukáš, a další, 1997)



### 3.4 Nádorové markery karcinomů plic

„Nádorové markery jsou chemické substance, jejichž výskyt a změny koncentrace jsou ve vztahu se vznikem a růstem maligního nádoru. Jsou ve zvýšeném množství vytvářeny v organismu buď zdravými tkáněmi jako reakce na přítomnost nádoru, nebo vlastním nádorem. Biochemicky se jedná především o makromolekuly, bílkoviny a glykoproteiny.“ (Zatloukal, 2001)

Požadavky na nádorové markery jsou následující:

- a) vysoká specifita
- b) vysoká senzitivita (detekovatelný v počátečních stádiích karcinomu)
- c) orgánová specifita
- d) korelace se stadiem nemoci nebo velikostí nádoru
- e) korelace s prognózou nemoci
- f) dostatečná prediktivní hodnota

V současné době bohužel neexistuje jediný marker karcinomů plic, podle kterého bychom určili, zda se jedná právě o karcinom plic. V pokročilém stadiu onemocnění se markery dají zachytit jednoduššími histologickými metodami, ale pro úspěšnou léčbu je však nutná včasná diagnóza. Nejčastěji se studují markery (Tab. 2 dle Zatloukala) CEA, TPA, CYFRA21-1, K-ras, CK5/6, TTF-1 a p63. Protein p63 je člen rodiny genu p53, který je lokalizován na chromozomu 3. Protein TTF-1 je exprimovaný epiteliálními buňkami jak embryonálními, štítnými, tak i zralou plicní tkání. Je důležitý při rozlišování metastazujícího a primárního adenokarcinomu. Cytokeratiny 5 a 6 patří do skupiny cytokeratinů exprimovaných především v bazální buněčné vrstvě epitelu a v keratinocytech. (Lukáš, a další, 1997) Výskyt K-ras mutace je nejčastější u mucinózních bronchioloalveolárních karcinomů a ve 30% případů byly popsány u adenokarcinomů. CEA je karcinoembryonální antigen (glykoprotein), který se u zdravých dospělých jedinců vyskytuje ve velmi nízké koncentraci. Zvýšené koncentrace se objevují u nemocných s bronchogenním karcinomem, ale opět pouze u 30%. Naopak průkaz antigenu TPA je u bronchogenního karcinomu průkaznější než u CEA. TPA je uvolňován proliferujícími buňkami a jeho biologické funkce nejsou dosud objasněny. CYFRA21-1 jsou fragmenty intermediálních filament rozpustné v séru, kde je lze detekovat.

Je dokázáno, že se cytokeratin 19 vyskytuje v plicní nádorové tkáni a my ho jsme schopni rozpoznat užitím monoklonálních protilátek namířených proti epitopům ve vodě rozpuštěných filament cytokeratinu19. Tento marker je senzitivní až v 60% bronchogenního karcinomu plic. (Petruželka, 2012), (Zatloukal, 2001)

	CEA (%)	TPA (%)	CYFRA 21-1 (%)
<b>Dlaždicobuněčný karcinom</b>	50	60	55
<b>Adenokarcinom</b>	70	60	28
<b>Velkobuněčný karcinom plic</b>	/	80	35

Tab. 2: Přehled produkce některých nádorových markerů NSCLC, (Zatloukal, 2001)

Jak už bylo řečeno, podle pozitivivity nebo negativity jednoho markeru nelze blíže specifikovat určitý typ nádoru. Proto se v imunohistochemické detekci zpravidla používají kombinace protilátek, které nám umožňují rozpoznat antigeny identifikující základní typy tkání a buněk. (Lukáš, a další, 1997)

### 3.5 Metody průkazu imunokomplexů

Metodiky průkazu imunokomplexů antigenu a protilátky jsou velmi rozmanité. Většina metod je již také automaticky naprogramována. Nejenže to usnadňuje práci s biologickým materiálem, ale také je minimalizována možnost lidské chyby.

Lze říci, že nejpoužívanější a současně jednoduchou metodou k ověření vzniku imunokomplexů je imunoblotting. Imunoblotting je metoda, která spočívá v elektroforetickém dělení proteinů (v závislosti na náboji a velikosti molekuly). Po elektroforetickém dělení následuje přenos na nitrocelulóзовou membránu a detekce proteinů pomocí protilátek. Důležitým krokem před aplikací protilátek je zablokování prázdných míst, kde nedošlo k přenosu proteinů. Důvodem je inhibice nespecifické reakce protilátky s nosičem. K zablokování se používají buď neimunní séra, nebo neiontové detergenty. Zbytek nitrocelulóзовé membrány je inkubován s protilátkou, která se poté naváže na antigen.

Následuje promytí a další inkubace s již druhově specifickou protilátkou, která je značená enzymem. Přidáme substrát a chromogen, výsledkem reakce je nerozpustný barevný produkt.

Další metodou je ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay) test. Patří také mezi nejužívanější metody v klinické praxi. Slouží k detekci a kvantifikaci protilátek a antigenů.

Základní postup je následující:

- a) navázání antigenu (či protilátky) na nosič
- b) promytí a blokáda nespecifických míst
- c) inkubace s primární protilátkou (antigenem)
- d) promytí
- e) inkubace se sekundární protilátkou značenou enzymem
- f) přidání substrátu
- g) vznik barevného produktu
- h) spektrofotometrické měření

Neméně významnou metodou v detekci imunokomplexů je také průtoková (flow) cytometrie. Metodika průtokové cytometrie je založena na kvalitativním fotometrickém vyhodnocení fluoroforu, který je navázán na buňky, obsahující imunokomplex. Je to vhodná metoda k měření fixované tkáně i čerstvých tkání, nadále i buněčných suspenzí z tkáňových kultur. Na měřené buněčné struktury jsou navázány protilátky s fluoroforem. Dle vazby protilátky můžeme klasifikovat v tumorech jednotlivé buněčné frakce, podle fází mitotického cyklu. Princip průtokové cytometrie je takový, že buněčnou suspenzi necháme protékat velmi tenkou kapilárou tak, aby se buňky seřadily jedna za druhou. Po průchodu tryskou jsou ozářeny laserovým paprskem a my měříme excitované záření fotometricky. Průtoková cytometrie se nejvíce uplatňuje při klasifikaci maligních lymfomů a leukémií.

Další velmi přesnou metodou je metoda PCR neboli metoda polymerázové řetězové reakce. Připomíná proces replikace DNA v našich buňkách, in vitro. Reakce probíhá v termocykleru, který sám řídí potřebnou teplotu. Základním principem je opakovaná řízená denaturace a denaturace oddělených řetězců s oligonukleotidy.

Princip PCR je následující:

- a) denaturace templátové dvouvláknové DNA (při 94°C)
- b) hybridizace jednovláknových DNA s primery (37°C-55°C)
- c) syntetická fáze (65°C-75°C), oligonukleotidy slouží jako primery pro DNA polymerázu, která je schopna syntézy nového řetězce (Lukáš, a další, 1997)



## **4 Experimentální část**

### **4.1 Získávání a zpracování materiálu**

Ke správné diagnóze je potřeba získat a také kvalitně zpracovat materiál. V našem případě jsme k získání biologického materiálu použili mikroexcizi bronchiální sliznice, což znamená odběr vzorku vyříznutím části podezřelé tkáně (či spíše ložiska). Excizi lze provést jak ambulantně, tak i v průběhu operačního výkonu. Odběr provádíme pomocí speciálních klíštěk. Odebranou tkáň poté ihned položíme do fixačního roztoku formolu a dále zpracováváme klasickou metodou zalití do parafínu.

### **4.2 Diagnostika nemalobuněčných karcinomů plic**

#### **4.2.1 Vyšetřovací algoritmus NSCLC**

Vyšetřovací algoritmus nemalobuněčných nádorů plic je následující:

- a) histologický nález
- b) klasifikace karcinomu na skvamózní nebo nonskvamózní
- c) pokud se vyskytne nález, který je není zcela jednoznačný pro skvamózní karcinom, tak by tento nález měl být považován za nonskvamózní
- d) nádorové buňky skvamózních karcinomů jsou CK5/6 pozitivní, p63 pozitivní a TTF-1 negativní
- e) adenokarcinomy jsou TTF-1 pozitivní (70 %), CK5/6 negativní a p63 negativní
- f) v případě negativity všech tří markerů se provádí další metodiky průkazu (buď pomocí dalších protilátek, nebo vhodným barvením)

#### 4.2.2 Použité protilátky

Expres příslušných antigenů byla vyšetřena metodou nepřímé imunohistochemie dle postupů stanovených jednotlivými výrobci.

CK5 je v normálních tkáních exprimován bazálními, intermediálními a povrchovými buňkami vrstevnatých epitelů, v bazálních buňkách bronchiální sliznice, v bazálních buňkách epitelu prostaty a v mezotelu. Jedná se o základní typ cytokeratinu s molekulovou hmotností 58kDa. Z nádorů je CK5 přítomen v dlaždicobuněčném a velkobuněčném karcinomu plic (adenokarcinomy jsou negativní), v karcinomu uroteliálním a mezoteliomech. CK6 je rovněž základní typ cytokeratinu s molekulovou hmotností 56kDa a nachází se v proliferujícím dlaždicovém epitelu. Jako pozitivní hodnotíme průkaz exprese CK5/6 v cytoplazmě. (Bishop, 2012) Expres CK5/6 byla vyšetřena protilátkou Anti-Human cytokeratin 5/6 firmy Dako, klon D5/16 B4.

p63 je transkripční faktor o molekulové hmotnosti 63kDa vysoce homologní k p53. Jeho gen je lokalizován na chromozomu 3. V průběhu embryogeneze je nezbytný k diferenciaci různých typů epitelů. V normálních tkáních je jeho expres omezena na vrstevnaté epitely (kůže, děložní čípek, močový měchýř apod.). V respiračním traktu je exprimován v bazálních buňkách bronchiálního epitelu, cylindrické řasinkové epitelie a pohárkové buňky jsou negativní. Z nádorů je p63 exprimován především v bazocelulárním a spinocelulárním (dlaždicobuněčném) karcinomu a v karcinomu uroteliálním ve vývodných cestách močových. Jako pozitivní hodnotíme průkaz exprese p63 v jádrech. (Bishop, 2012) Expres p63 byla vyšetřena protilátkou Mouse anti-p63 firmy Zytomed, klon 4A4.

TTF1 je exprimován v různých normálních tkáních – ve folikulárních buňkách štítné žlázy, v granulárních pneumocytech, části bronchiálních epitelových buněk, v hypofýze a v příštítných těliscích. Z nádorů je TTF1 exprimován zejména v adenokarcinomu plic a nádorech štítné žlázy. Jako pozitivní hodnotíme průkaz exprese TTF1 v jádrech. (Bishop, 2012) Expres TTF byla vyšetřena protilátkou NCL-TTF-1 firmy Novocastra™, klon SPT24.

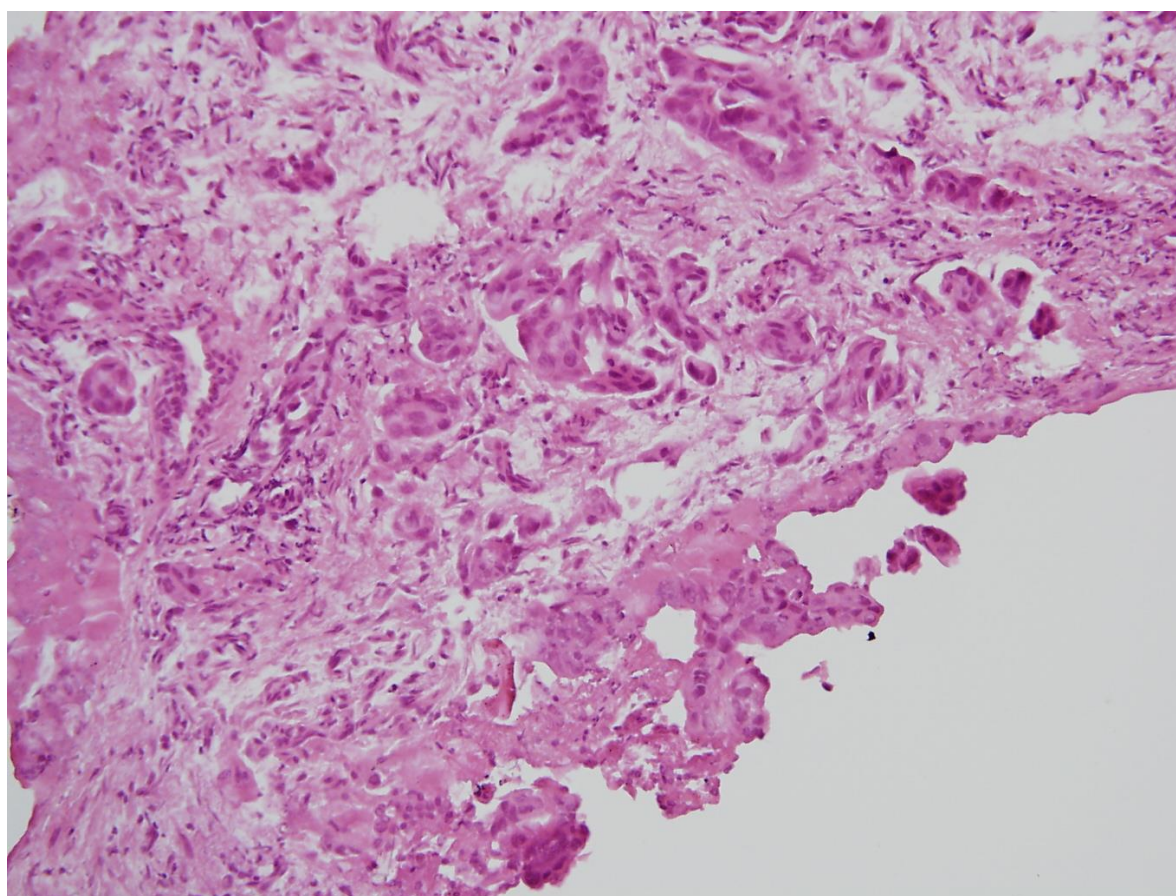
#### 4.2.3 Diagnostika NSCLC

Na Ústavu patologie FN Brno bylo v rozmezí od 1. 1. 2013 do 31. 3. 2014, primárně z mikroexcize za použití kombinace tří protilátek (CK5/6, p63 a TTF1), diagnostikováno celkem 35 nemalobuněčných plicních karcinomů, z toho se ve 21 případech (60%) jednalo o karcinom spinocelulární a ve 14 případech (40%) o adenokarcinom.

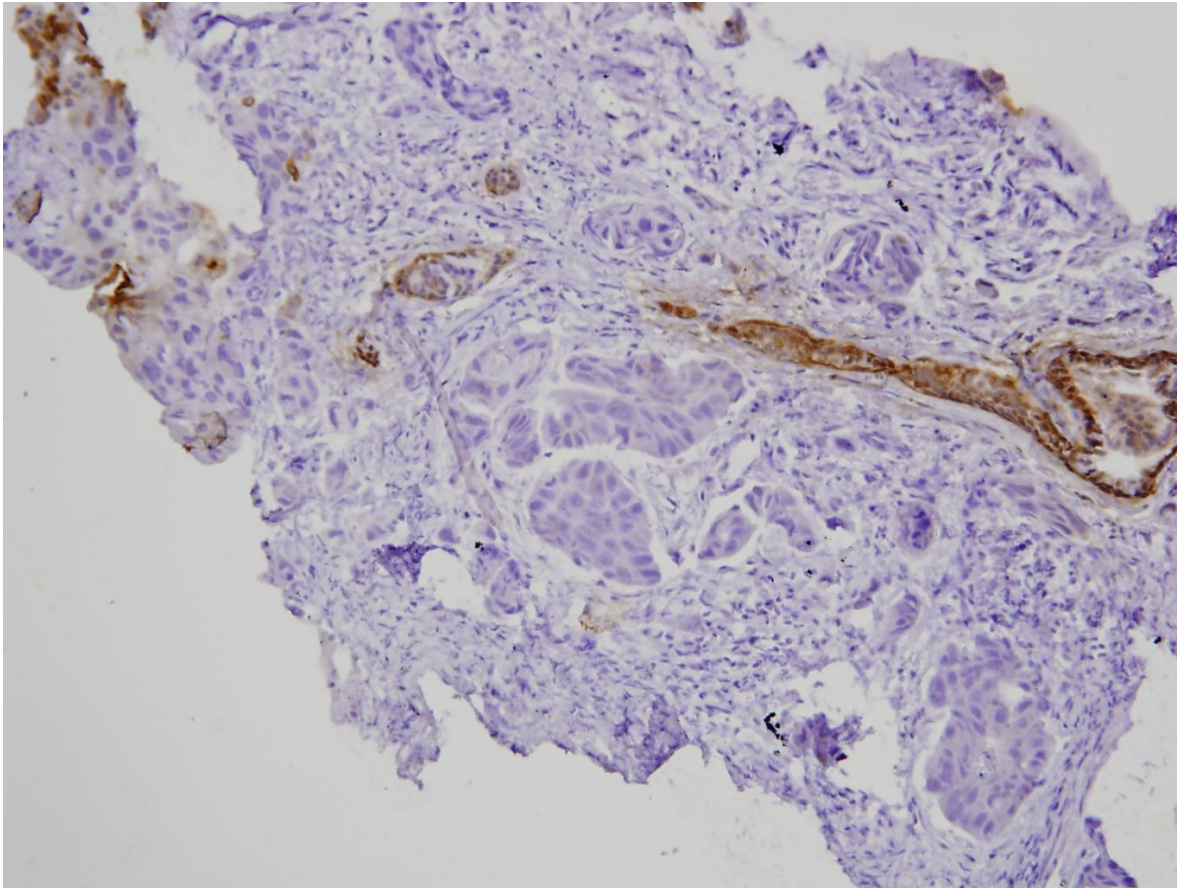
Smyslem použití těchto tří protilátek v kombinaci je jejich schopnost diferencovat karcinom spinocelulární (skvamózní) od karcinomů nonskvamózních, zejména v případě špatné diferenciace tumoru – spinocelulární karcinom je pozitivní v průkazu CK5/6 a p63, adenokarcinomy jsou pozitivní v průkazu TTF1. Naše výsledky přehledně shrnuje následující tabulka.

	CK5/6+	p63+	TTF1+
Spinocelulární karcinom	<b>21/21 (100%)</b>	<b>21/21 (100%)</b>	<b>2/21 (9,5%)</b>
Adenokarcinom	<b>0/14 (0%)</b>	<b>0/14 (0%)</b>	<b>12/14 (86%)</b>

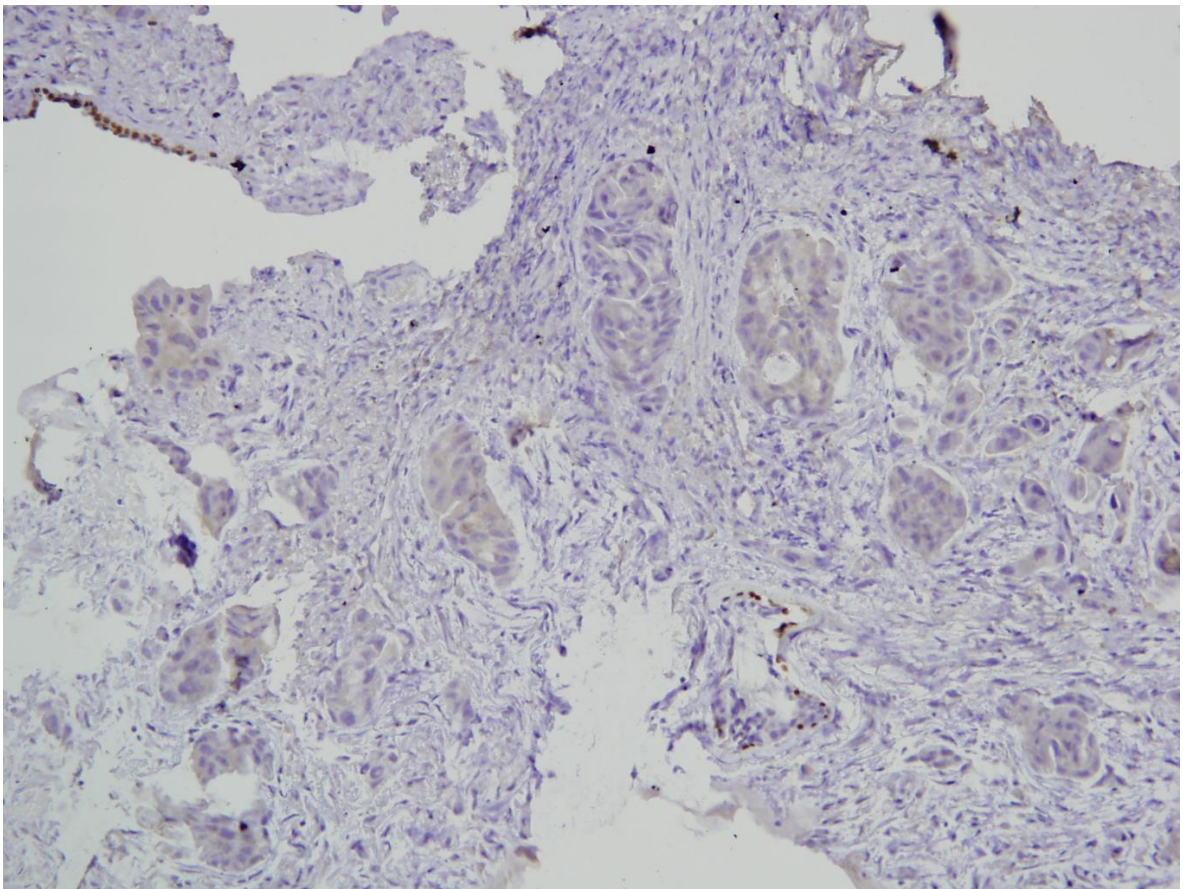
Výsledky imunohistochemického vyšetření jsou demonstrovány na následujících obrázcích. Ve dvou případech TTF1 negativního adenokarcinomu plic byla jeho diferenciace potvrzena použitím dalších dostupných protilátek a speciálních barvení (např. CK7, průkaz hlenotvorby metodou PAS nebo barvením alciánovou modří apod.).



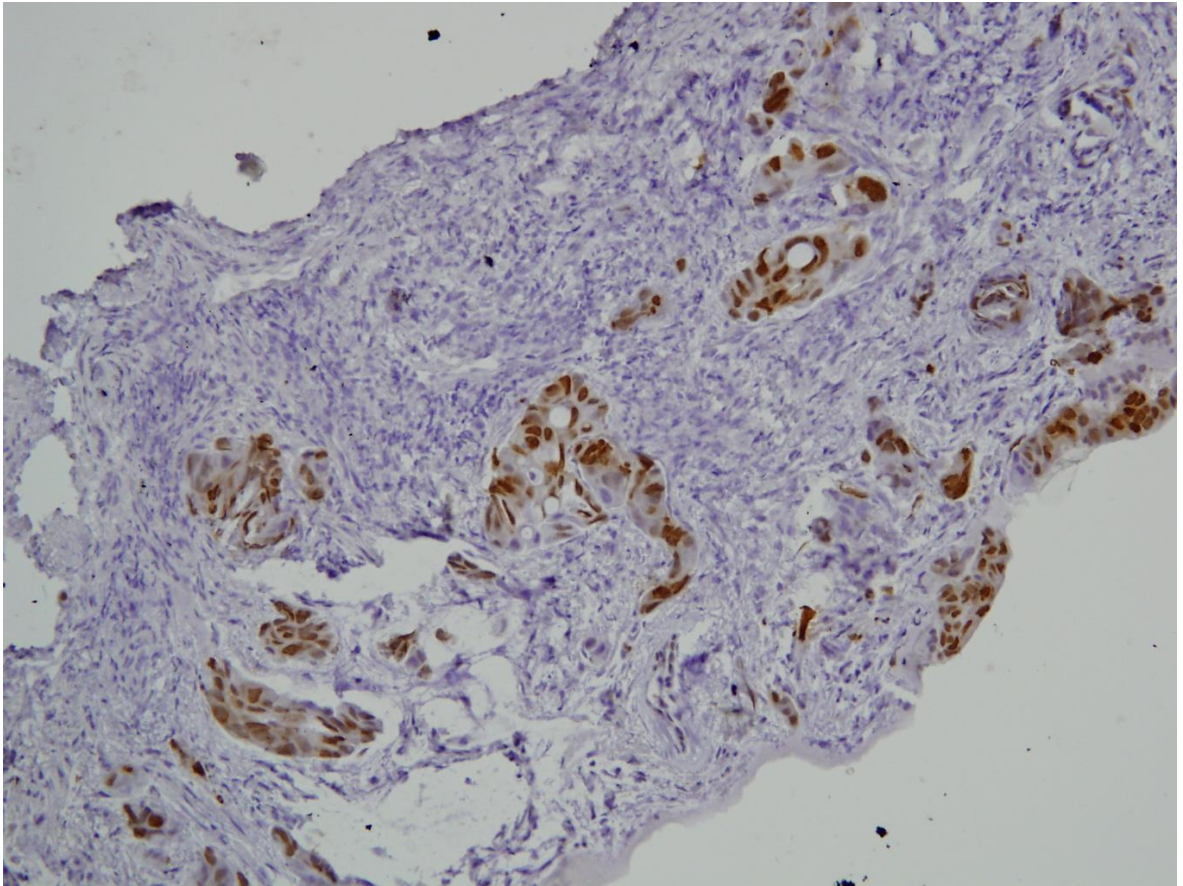
Obr. a: adenokarcinom, HE, 200x



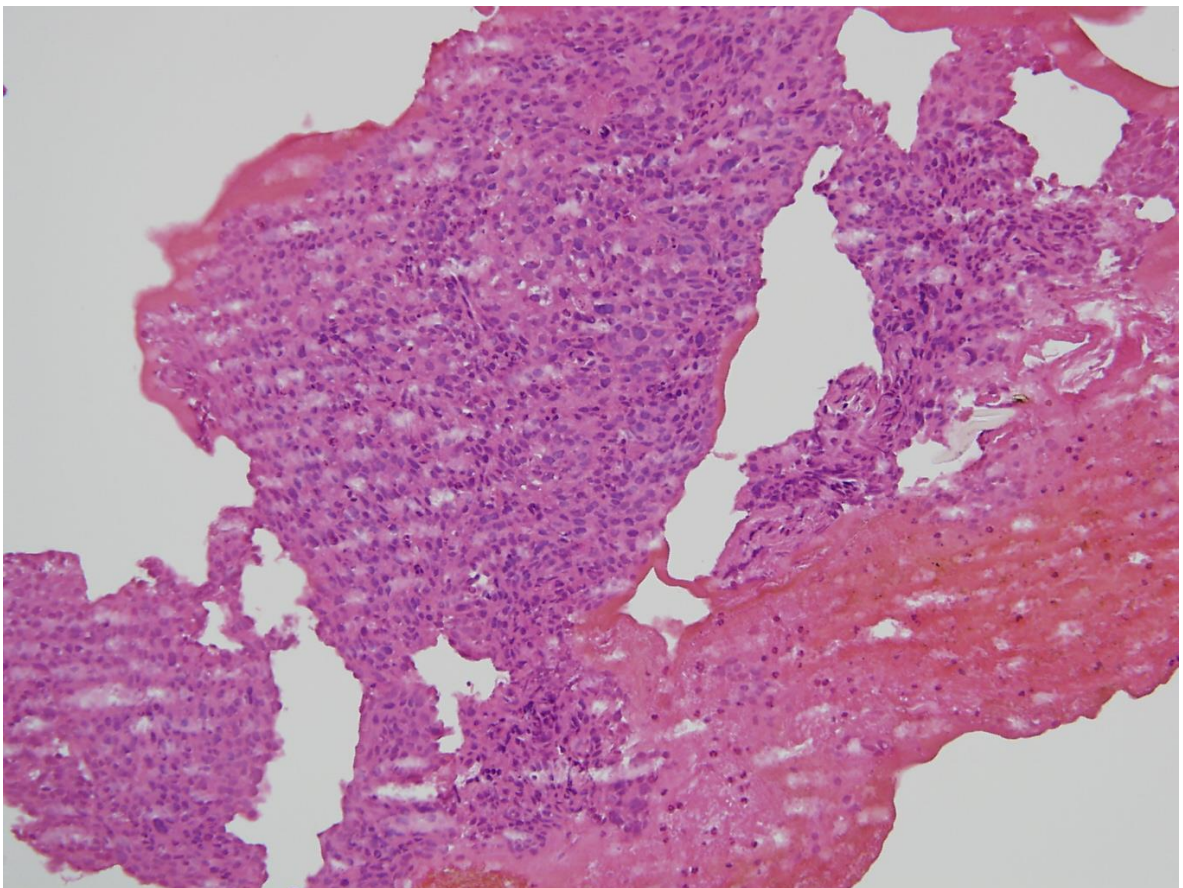
Obr. b: adenokarcinom, CK5/6, 200x



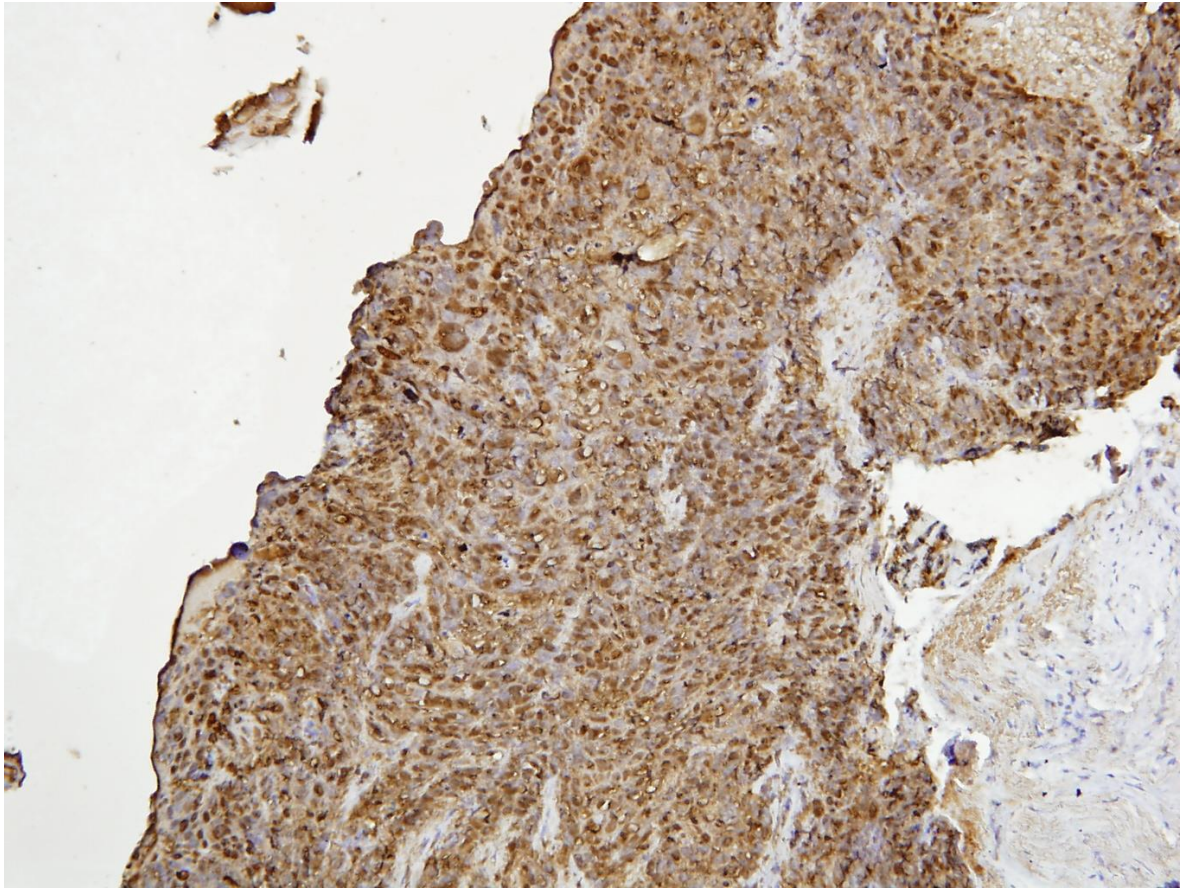
Obr. c: adenokarcinom, p63, 200x



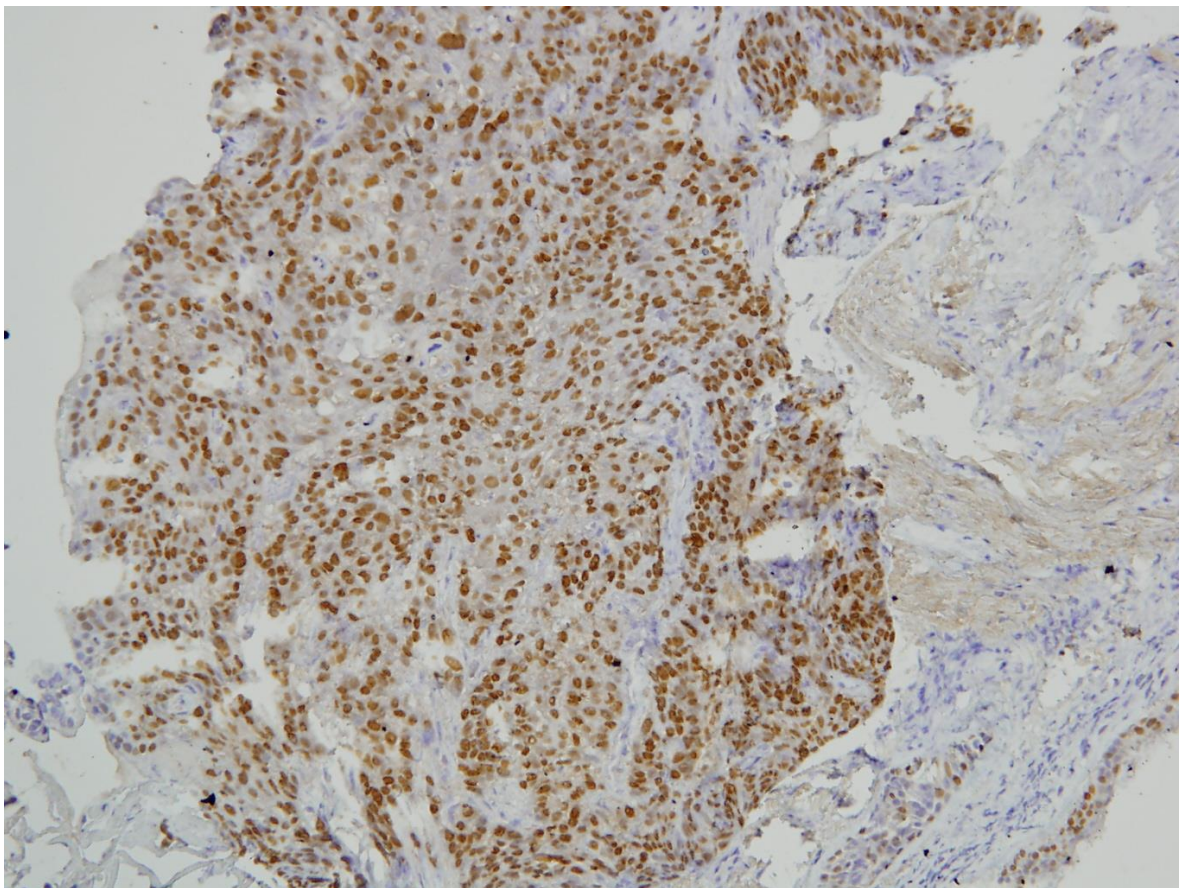
Obr. d: adenokarcinom, TTF1, 200x



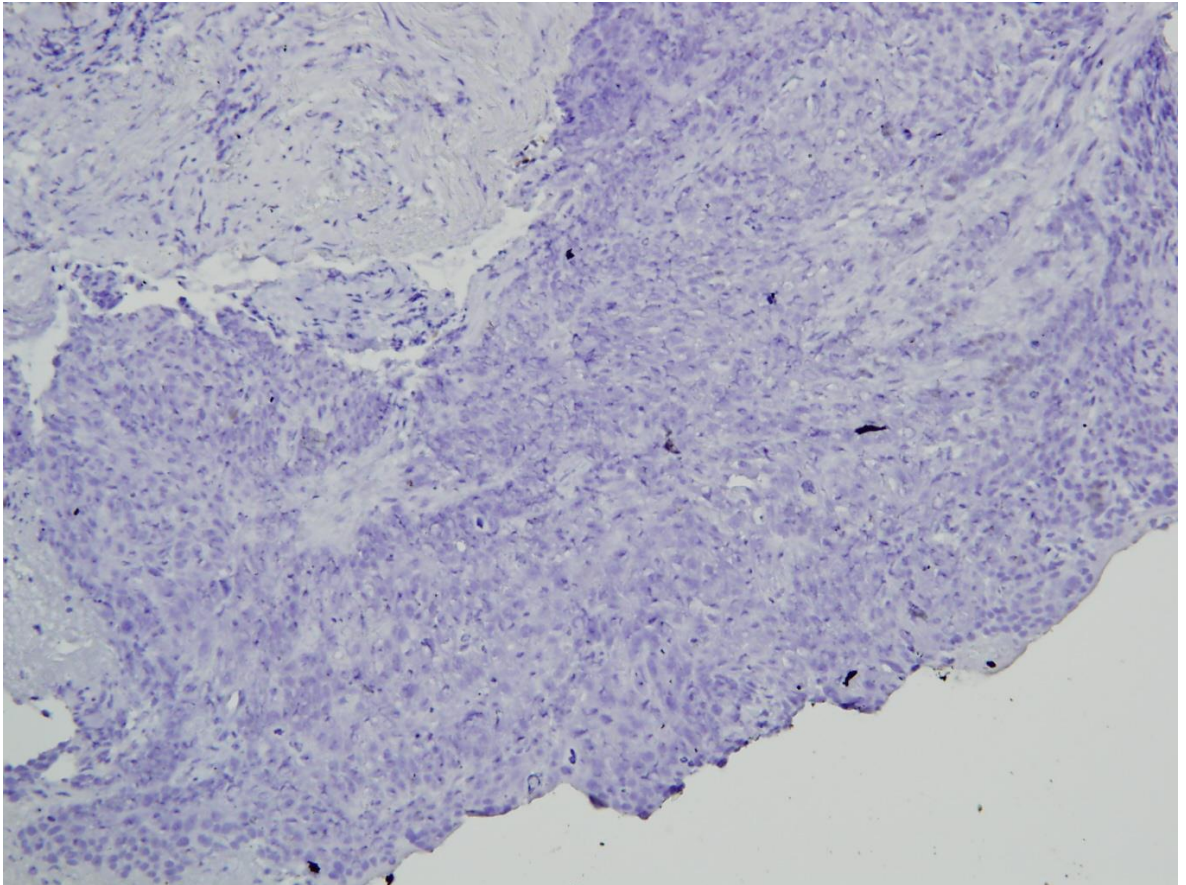
Obr. e: spinocelulární karcinom, HE, 200x



Obr. f: spinocelulární karcinom, CK5/6, 200x



Obr. g: spinocelulární karcinom, p63, 200x



Obr. h: spinocelulární karcinom, TTF1, 200x

## 5 Závěr

Moje práce je věnována imunohistochemické diagnostice NSCLC, která je nezbytná pro správné morfologické zařazení karcinomu plic. V diagnostice karcinomů plic jde především o rozlišení skvamózních a nonskvamózních karcinomů, protože pro oba typy těchto karcinomů volíme jinou terapii. Zavedení imunohistochemie jako doplňujícího vyšetření ke klasické histologii a stanovení biomarkerů je základem správné morfologické diagnózy a následně i správně zvolené terapie pro oba typy karcinomů. Podle pozitivity nebo negativity jednoho markeru však nelze bezpečně blíže specifikovat určitý typ nádoru. Proto se v imunohistochemické detekci zpravidla používají kombinace protilátek. Použitím kombinace průkazu různých antigenů (CK5/6, p63, TTF1) při diagnostice nemalobuněčných karcinomů plic jsme byli schopni rozpoznat, i v případě nízké diferenciaci tumoru, karcinom spinocelulární (skvamózní) od adenokarcinomu (nonskvamózní). Případné diferenciálně diagnostické rozpaky (např. TTF1 negativní adenokarcinom plic) se řeší použitím dalších protilátek či speciálních barvení (např. CK7, průkaz hlenotvorby metodou PAS, apod.).

Přesná histologická klasifikace nemalobuněčného karcinomu plic (skvamózní vs. nonskvamózní) je základní předpokladem pro zvolení vhodné a správné terapie, která pacientům alespoň zlepší a prodlouží kvalitu života s tímto (bohužel závažným) onemocněním.



## 6 Použitá literatura

BARTŮŇKOVÁ, Jiřina, PAULÍK, Milan, *Vyšetřovací metody v imunologii 2., přepracované vydání*, Praha: Grada Publishing, 2011, ISBN 978-80-247-3533-7

BISHOP, Paul, *An immunohistochemical vade mecum*, [online], South Manchestr, [datum aktualizace 16. 2. 2006], [cit. 24. 4. 2014], Heslo: CK5/6, Dostupné na: [http://e-immunohistochemistry.info/web/Antigens/ck\\_5\\_6.htm](http://e-immunohistochemistry.info/web/Antigens/ck_5_6.htm)

BISHOP, Paul, *An immunohistochemical vade mecum*, [online], South Manchestr, [datum aktualizace 20. 2. 2007], [cit. 24. 4. 2014], Heslo: p63, Dostupné na: <http://e-immunohistochemistry.info/web/p63.htm>

BISHOP, Paul, *An immunohistochemical vade mecum*, [online], South Manchestr, [datum aktualizace 16. 4. 2011], [cit. 24. 4. 2014], Heslo: TTF1, Dostupné na: [http://e-immunohistochemistry.info/web/Thyroid\\_transcription\\_factor-1.htm](http://e-immunohistochemistry.info/web/Thyroid_transcription_factor-1.htm)

ČECH, Svatopluk, HORKÝ, Drahomír, *Přehled obecné histologie*, Brno: Masarykova univerzita, 2011, ISBN 978-80-210-5543-8, str. 52-57

DUNDR, Pavel, HORNYCHOVÁ, Helena, MATĚJ, Radoslav, RYŠKA, Aleš, STANĚK, Libor, TICHÝ, Tomáš, *Doporučený postup pro histologické vyšetření karcinomu plic*, [online], Společnost českých patologů: 2013, Dostupné na: <http://www.patologie.info/vyhledavani.php?cx=partner-pub-9356994226814995%3Aadsd6t8-xwdv&cof=FORID%3A9&ie=windows-1250&q=doporu%ED+postup+pro+histologick%ED+vy%9Aet%F8en%ED+karcinomu+plic&sa=Hledat&siteurl=www.patologie.info%2Fvyuka.php&ref=www.patologie.info%2Fpatologie.php&ss=12781j5448873j59>

HORKÝ, Drahomír, ČECH, Svatopluk, *Mikroskopická anatomie*, Brno: Masarykova univerzita, 2011, ISBN 978-80-210-5550-6, str. 66-75

JELÍNEK, R., DOSTÁL, M., LIKOVSKÝ, Z, HALAŠKOVÁ M, a další, *Histologie, embryologie-skripta*, Dýchací systém, str. 114-122

JUNQUEIRA, Carlos, CARNEIRO, José, KELLEY, Robert, *Základy histologie*, překlad Richard Jelínek, 7. vyd., Jihlava: H&H, 1999, ISBN 80-85787-37-7, s. 319-338

KOLEK, Vítězslav, *Karcinom plic-současná léčebná strategie z pohledu pneumoonkologa*, [online], Postgraduální medicína, Roč. 12, č. 3, 2010, [cit. 10. 4. 2014], s. 315-329, Dostupné na: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/karcinom-plic-soucasna-lecebna-strategie-z-pohledu-pneumoonkologa-450125>

KONRÁDOVÁ, Václava, ZAJÍCOVÁ, Anna, UHLÍK, Jiří, ANTALÍKOVÁ, Libuše, *Poznámky k přednáškám z histologie*, 1. vyd., Jinočany: H+H, 1993, ISBN 80-85787-15-6, s. 155-171

LITZMAN, Jiří, FREIBERGER, Tomáš, KRÁL, Vlastimil, THON, Vojtěch, *Základy vyšetření v klinické imunologii*, Brno: Masarykova univerzita, 2011, ISBN 978-80-210-4227-8, str. 8-10

LUKÁŠ, Zdeněk, DRÁBEROVÁ, Eduarda, FEIT, Josef, VOJTĚŠEK, Bořivoj, *Imunohistochemické metody v biologii a bioptické diagnostice*, Sborník prací lékařské fakulty v Brně č. 112, Brno: Masarykova univerzita, 1997, ISBN 80-210-0620-X

MESCHER, Anthony, *JUNQUEIRA'S Basic Histology*, 13. vydání, New York: McGraw-Hill Medical, 2013, ISBN 978-007-127190-5, s. 298-315

NATIONAL CANCER INSTITUTE AT THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *National Cancer Institute at the National Institutes of Health: PDQ® Non-Small Cell Lung Cancer Treatment*. Bethesda, MD: National Cancer Institute [online]. 2014-02-21 [cit. 2014-04-02]. Dostupné z: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/healthprofessional>

PENKA, Miroslav, TESAŘOVÁ, Eva, *Hematologie a transfúzní lékařství II*, Praha: Grada Publishing, 2012, ISBN 978-80-247-3460-6, str. 17-19

PETRUŽELKA, Luboš, VOCKA, Michal, *Personalizovaný přístup k farmakoterapii nemalobuněčných karcinomů plic v éře cílené (terčové) biologické léčby*, 2012, [cit. 11. 4. 2014], Dostupné na: <http://zdravi.e15.cz/clanek/postgradualni-medicina/personalizovany-pristup-k-farmakoterapii-nemalobunecnych-plicnich-karcinomu-v-ere-cilene-tercove-biologicke-lecby-464244>

RYŠKA, Aleš, *Cílená molekulární biologická léčba z pohledu molekulárního patologa*, In Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, [online], Praha: Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně, 2011, [cit. 8. 4. 2014], Dostupné na: <http://www.linkos.cz/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/abstrakta/cislo/4817/>

SOBIN, L., GOSPODAROWICZ, M., WITTEKIND, Ch., *TNM klasifikace zhoubných novotvarů*, [online], 7. vyd, překlad J. Novák, Praha: Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky, 2011, ISBN 987-80-904259-6-5, Dostupné na: [uzis.cz/system/files/tnm-7.pdf](http://uzis.cz/system/files/tnm-7.pdf)

STŘÍTESKÝ, Jan, *Patologie*, Olomouc: EPAVA, 2001, ISBN 80-86297-06-3, str. 11-61, str. 125-162, str. 205-220

ŠEBESTOVÁ, Romana, *Histologické návody a praktická cvičení studijního oboru „Zdravotní laborant ZDRL“*, Brno: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Ústav histologie a embryologie, 2007

TRAVIS, William, BRAMBILLA, Elisabeth, MUELLER-HERMELINK, Konrad, HARRIS, Curtis, *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics, Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*, Lyon: IARC Press, 2004, str. 9-122

VACEK, Zdeněk, *Histologie a histologická technika, Histologie 1. část*, Brno: PROTISK Slavkov, 1995, ISBN 80-7013-201-9, str. 252-260

VACEK, Zdeněk, *Histologie a histologická technika, Histologická technika 2. část*, Brno: PROTISK Slavkov, 1995, ISBN 80-7013-202-7

WRONA, A, JASSEM J., The new *TNM classification in lung cancer*. *Pneumonol Alergol Pol*, 2010;78(6):407-417, překlad Nová TNM klasifikace nádorů plic, cit. [18. 2. 2014], Dostupné na www: <http://www.prolekare.cz/onkologie-novinky/nova-tnm-klasifikace-nadoru-plic-1836>

ZATLOUKAL, Petr, PETRUŽELKA, Luboš, *Karcinom plic*, 1. vyd., Praha: Grada Publishing, 2001, ISBN 80-7169-819-9, s. 29-43. s. 145-154