



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Histologické vyšetření kožních nádorů na patologii Tábor

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [ZDRAVOTNÍ LABORANT](#)

Autor: Romana Křížovská

Vedoucí práce: prim. MUDr. Josef Kult

České Budějovice 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Histologické vyšetření kožních nádorů na patologii Tábor*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 3.5.2019

.....

podpis

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce prim. MUDr. Josefu Kultovi za cenné rady, připomínky a poskytnutí součinnosti při zpracování tématu mé bakalářské práce. Děkuji rovněž MUDr. Tíme Király za pomoc s hledáním informací při řešení náplně práce a kolektivu bioptické laboratoře patologického oddělení Nemocnice Tábor a.s. za vytvoření dobrých podmínek pro zpracování tématu.

Ráda bych poděkovala svým rodičům za velikou podporu v průběhu celého vysokoškolského studia.

Histologické vyšetření kožních nádorů na patologii Tábor

Abstrakt

Existuje řada typů kožních nádorů, pro jejichž určení je nutností správné provedení diagnostiky. Hlavní typy a modifikace je možno odlišit histologickými a imunohistologickými metodami. Hlavními typy maligních kožních nádorů jsou z hlediska výskytu bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom a melanom. Teoretická část popisuje typy kožních nádorů z hlediska morfologie, výskytu, cytostatické aktivity a dalších aspektů a popisuje faktory, které ovlivňují vznik a vývoj příslušných karcinomů.

V metodické části jsou popsány postupy pro přípravu preparátů odebraných kožních excízií. Detailně jsou popsány dostupné techniky histologického barvení preparátů a typy protilátek a technika zpracování imunohistologických preparátů.

Pomocí několika diagnostických metod připraveny preparáty vhodné pro spolehlivé stanovení diagnózy. V jedné excizi byl diagnostikován bazocelulární karcinom, v další spinocelulární karcinom. Pro diagnostiku melanomu byly použity dva typy histologického barvení a oba používané typy imunohistologického zobrazení. Na příkladu výše uvedených zobrazení bylo prokázáno, že lze připravit diagnostické preparáty standardní kvality, které umožní stanovit diagnózu s nejvyšší mírou spolehlivosti.

Z údajů v registru byly mapovány počty a typy diagnostikovaných maligních kožních karcinomů v pětiletých intervalech 2007 – 2017. Statistická analýza prokázala statisticky významný nárůst počtu diagnostikovaných kožních nádorů mezi lety 2012 a 2017, zatímco rozdíl mezi lety 2007 a 2012 nebyl statisticky významný.

Klíčová slova

Kožní excize; maligní nádory kůže; histologické vyšetření; imunohistologické metody; laboratorní techniky; barvení a vizualizace preparátů

Histological examination of skin tumors in pathology department Tábor

Abstract

There are many types of skin tumors that require proper diagnosis to determine. Major types and modifications can be distinguished by histological and immunohistological methods. The main types of malignant skin tumors are basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma. The theoretical part describes the types of skin tumors in terms of morphology, occurrence, cytostatic activity and other aspects and describes the factors that influence the formation and development of relevant cancers.

The methodical part describes procedures for preparation of samples of collected skin excisions. Available techniques of histological staining of specimens and types of antibodies and technique of processing of immunohistological preparations are described in detail.

Preparations suitable for reliable diagnosis are prepared using several diagnostic methods. Basal cell carcinoma was diagnosed in one excision, another squamous cell carcinoma was diagnosed. Two types of histological staining and both types of immunohistological imaging were used to diagnose melanoma. By way of example above, it has been shown that standard-quality diagnostic preparations can be prepared to allow diagnosis with the highest degree of reliability.

The data in the registry mapped the numbers and types of diagnosed malignant skin cancers at five-year intervals from 2007 to 2017. Statistical analysis showed a statistically significant increase in the number of diagnosed skin tumors between 2012 and 2017, while the difference between 2007 and 2012 was not statistically significant.

Key words

Cutaneous excision; malignant skin tumors; histological examination; immunohistological methods; laboratory techniques; staining and visualization of slides

Obsah

1. Úvod	7
2. Teoretická část	8
2.1. Anatomie kůže	8
2.2. Biochemie a patofyziologie nádorů	9
2.3. Rozdělení kožních nádorů a prekancerosy	10
2.4. Bazocelulární karcinom	12
2.5. Spinocelulární karcinom	13
2.6. Melanom	15
2.7. Rizikové faktory kancerogeneze	16
2.7.1. Neovlivnitelné rizikové faktory kancerogeneze	17
2.7.2. Ovlivnitelné faktory	17
2.8. Přirozené sloučeniny s antikancerogenním účinkem	19
2.8.1 Fenolové sloučeniny s antikancerogenním efektem	20
2.8.2 Další bioaktivní látky	23
3. Cíle práce a hypotézy	26
4. Metodika	27
4.1. Chemikálie	27
4.2. Histologické vyšetření tkáně	27
4.2.1. Odběr, předpříprava a transport odebraného preparátu	27
4.2.2. Zpracování vzorku v laboratoři	27
4.2.3. Vyhodnocení hotového preparátu	39
4.3. Imunohistologické vyšetření antigenů	40
5. Výsledky a diskuse	44
5.1 Kožní nádory	44
5.2. Diagnostické preparáty kožních nádorů	46
5.3. Kožní nádory v Nemocnici Tábor a.s.	51
6. Závěr	54
7. Literatura	56
8. Seznam příloh	61

1. Úvod

Oddělení patologie Nemocnice Tábor a.s. vyšetřuje kožní nádory z excizi z pracovišť chirurgického zaměření nemocnice a z vybraných externích pracovišť v okrese Tábor. Existuje řada typů kožních nádorů, pro jejichž určení je nutností správné provedení diagnostiky. Hlavní typy a modifikace je možno odlišit histologickými a imunohistologickými metodami, jejichž uspořádání, možnosti a omezení budou náplní této práce. Hlavními typy maligních kožních nádorů jsou z hlediska výskytu bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom a melanom. Z těchto tří typů nádorů má jednoznačně nejhorší prognózu maligní melanom, naopak nejčastěji se vyskytující bazocelulární karcinom má, při správné a včasné terapii, velmi dobrou prognózu.

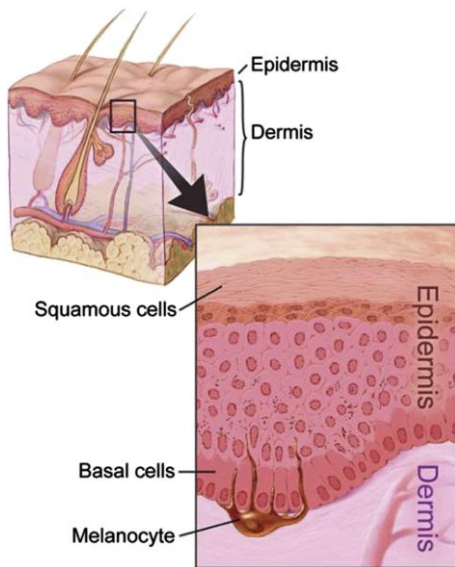
Pro správné určení diagnózy a následnou vhodnou terapii je naprostou nutností provedení kvalitní diagnostiky. Celý proces začíná optimálně provedeným odběrem kožní excize. Další úpravy vzorku se provádějí již v laboratoři, kde je nutno tuto excizi dále vhodným způsobem zpracovat, tak aby byla zachována celá struktura a vypovídací schopnost preparátu. Diskuze k celému laboratornímu procesu je náplní této bakalářské práce.

2. Teoretická část

2.1. Anatomie kůže

Kůže (*cutis lat.*; *derma řec.*) je největším orgánem těla, tvoří přibližně 5 - 16% tělesné hmotnosti. Plocha kůže dospělého člověka se pohybuje obvykle v rozmezí 1,5 – 2 m². Tloušťka kůže se liší v jednotlivých částech těla – od 0,4 mm např. na očních víčkách až po 4 mm na zádech. Kůže má několik významných funkcí, z nichž nejvýznamnější je funkce ochranná (proti výkyvům teploty, ztrátám tekutin, ochrana před expozicí patogenních mikroorganismů a toxinů) a funkce termoregulační (Gordon, 2013; [www.linkos](http://www.linkos.com), 2019). (Poznámka autorky: [www.linkos](http://www.linkos.com) jsou web stránky České onkologické společnosti při ČLS JEP).

Skladba kůže umožňuje co nejlépe vykonávat ochrannou funkci jako orgánu na rozhraní mezi organismem a zevním prostředím. Kůže je rozdělena do tří základních vrstev, epidermis (pokožka), dermis (korium, *cutis*, škára) a subcutis (*tela subcutanea*; podkoží), které se skládají z několika složek, jako epiteliální, mesenchymální, glandulární a neurovaskulární tkáň (Gordon, 2013; Simoes et al, 2015; [www.linkos](http://www.linkos.com), 2019). Základní stavba kůže je znázorněna na obr. 1.



Obr. 1 Anatomie kožní tkáň (Gordon, 2013)

Epidermis je periferní vrstva kůže, která přechází do kontaktu s životním prostředím, funguje jako fyziologická bariéra proti environmentálním stresorům, jako jsou patogeny, chemikálie a UV záření. Nejrozšířenějšími buňkami epidermis jsou keratinocyty, které jsou navzájem těsně spojeny, což umožňuje funkci environmentální

bariéry. Dermis, pocházející z mesodermu, je podkladem epidermis a jsou v ní lokalizovány různé struktury, jako jsou vlasové folikuly, nervy, mazové žlázy a potní žlázy. Dermis také obsahuje imunitní buňky a fibroblasty, které se aktivně účastní mnoha fyziologických reakcí kůže (Simoes et al, 2015).

2.2. Biochemie a patofyziologie nádorů

Nádory (novotvary, neoplasmata) jsou zvláštním uskupením buněk s nadměrným autonomním růstem a někdy i s autonomním metabolismem. Zhoubné (maligní) nádory prorůstají zdravou tkání obvykle invazivně nebo infiltrativně. Poněkud odlišným nádorovým onemocněním je potom leukemie. Velkou komplikací pro terapii maligních nádorů je to, že se nádorové buňky mohou odštěpovat a dostávat se krevním nebo lymfatickým oběhem do jiných tkání nebo orgánů, kde mohou vytvářet autonomní dceřinné nádory – metastázy (Karlson et al., 1987; Mareš, 2015).

Vznik nádorů je vždy spojen se ztrátou kontroly dělení buněk. Vždy je poškozena primární buněčná regulace růstu nebo (častěji) buňka nereaguje na faktory regulující její růst. Faktory tlumící růst (asi nejvýznamnější je retinoblastom – protein, který tlumí a inaktivuje transkripční faktory E2F a DP1) u zdravé tkáně přerušují patologické buněčné dělení, např. při poškození DNA, kdy by dělení vedlo k tvorbě genetických efektů. Aktivitu faktorů tlumících růst negativně ovlivňuje přílišná tvorba onkogenů nebo naopak mutace tumor supresorových genů. Právě dysbalance onkogenů a tumor supresorových genů spouští vznik transformované buňky tvořící primární nádor. Produktem funkce onkogenů jsou onkoproteiny, které spouštějí proliferaci buněk. Existuje několik typů onkoproteinů s odlišným fyziologickým působením. Patří mezi ně tyrozinkinázy, serin-threoninkinázy, růstové faktory tvořené nádorovými buňkami, malé G-proteiny a další (Silbernagl a Lang, 2012; Mareš, 2015).

Zásadní pro vznik nádorů jsou mutace genů. Tyto mutace bývají velmi často geneticky podmíněné, ale spouštěčem mutací mohou být i chemické karcinogeny (např. arsen, polycyklické aromatické uhlovodíky, některé mykotoxiny a další) nebo záření, přičemž u kožních nádorů je záření považováno za hlavní spouštěč. Významným rizikovým faktorem je i věk. Poruchy reparace („vystřížení“ poškozené části) DNA podporují přetrvávající mutace. Jediná mutace k vytvoření nádoru nikdy nestačí, musí dojít mnohokrát k mnoha mutacím. Buňky jsou náchylné k mutacím především během mitózy. Proliferující tkáň je k mutacím daleko náchylnější než tkáň, která nediferencuje. Tím se vysvětluje zvýšené riziko vzniku nádorů při zánětech nebo lézích tkání, protože

v těchto případech je dělení buněk silně stimulováno (Vosmík, 2008; Silbernagl a Lang, 2012; Mareš, 2015; Didona et al, 2018; Fernandes et al, 2018).

Kromě reparace DNA má organismus další obranné mechanismy proti vzniku nádorů. Patří sem buněčná apoptóza (řízená smrt buňky) a funkce imunitního systému. Existují např. tzv. „zabíječské“ buňky (NK-buňky; killer cells), které rozpoznávají a likvidují „neznámý povrch“, tyto buňky dokáží rozeznat zejména buňky infekčního agens, ale i nádorové buňky. Ochranný mechanismus mohou zprostředkovat např. i cytotoxické T-buňky (T-killers) (Silbernagl a Lang, 2012; Mareš, 2015).

2.3. Rozdělení kožních nádorů a prekancerosy

Nádory kůže jsou v populaci velmi běžné. Existuje řada benigních nádorů (fibromy a další), které jsou prakticky neškodné a řeší se zpravidla jen tehdy, pokud pacientovi vadí kosmeticky, psychicky nebo funkčně, např. tím, že je strhává při oblékání a dochází ke krvácení.

Daleko závažnější jsou zhoubné nádory (karcinomy, vycházející ze sliznice) kůže, které jsou zřejmě nejčastějším typem nádorových onemocnění. Zhoubných nádorů kůže je celá řada, nejčastější a nejdůležitější typy jsou bazocelulární karcinom (bazaliom; basal cell carcinoma; *angl.*), spinocelulární karcinom (spinaliom; squamous cell carcinoma; *angl.*) a melanom, o kterých bude pojednáno podrobněji v samostatných kapitolách. Bazaliom a spinaliom tvoří dohromady asi 95 % kožních nádorů jiných než melanom. Existují ale i další typy kožních nádorů, které jsou buď vzácnější nebo méně významné, o kterých se stručně zmíní tato kapitola (Fait, 2006; Vosmík, 2008; Gordon, 2013; Didona et al, 2018; Fernandes et al, 2018; Lai et al, 2018; Penta et al, 2018). Někteří autoři, např. Hosseini et al, 2017 uvádějí velmi nepříznivý trend výskytu kožních karcinomů – 5 – 7 % roční nárůst.

Vzniku kožních karcinomů velmi často předchází lokalizovaná porucha rohovatění buněk pokožky, tzv. aktinická keratóza (actinic keratosis; *angl.*). Jedná se o prekancerózní stav. Typické příklady postižené tkáně jsou na následujících obrázcích.



Obr. 2 Příklady rozvoje aktinické keratózy (Lai et al, 2018; Gordon, 2013)

Obvykle se manifestuje jako červená skvrna s drsným povrchem, může se olupovat v šupinkách. Laické ohodnocení je velmi obtížné, protože skvrny jsou do určité míry podobné některým dermatitidám. Aktinická keratóza se zpravidla vyskytuje na místech, která jsou během života často vystavována slunci. Postižen bývá zejména obličej, ušní boltce, bezvlasá kůže temene, zadní část krku a další části těla. Prevalence je velmi vysoká a stoupá s věkem. Obvykle se uvádí, že postihuje 40 – 50 % dospělé populace, ve vyšším věku to může být až 80 % populace. Neléčená aktinická keratóza se může po čase, díky molekulárním mutacím (včetně mutace p53) iniciovaných UV zářením, přeměnit ve spinocelulární karcinom. Léčí se obvykle kryoterapií (vymražením) a/nebo aplikací speciálních krémů preskribovaných dermatologem (Vosmík, 2008; Gordon, 2013; Werner et al, 2013; Didona et al, 2018; Lai et al, 2018).

Karcinom z Merkelových buněk (Merkel cell carcinoma *angl.* – MCC) je vysoce agresivní neuroendokrinní kožní nádor, jeho incidence je 0,4 případů na 100 000 obyvatel, pětileté přežití pacientů nepřesahuje 65 %. Nádor vychází z Merkelových buněk lokalizovaných v bazální vrstvě epidermis. Tyto buňky se vyvíjejí z epidermálních kmenových buněk a mají svůj původ v embryonální pokožce. Maligní zvrát Merkelových buněk je podle současných poznatků ve většině případů MCC předcházen integrací DNA sekvencí nedávno objeveného Merkel cell polyomaviru (MCPyV) do buněčného genomu. Uvádí se, že až 80 % případů MCC souvisí s invazí viru MCPyV. Prognóza záleží na fázi onemocnění a lokalizaci. Lokalizovaný tumor do 2cm bez uzlinových metastáz má dobrou prognózu. Nádory velikosti větší než 2cm jsou spojeny s vysokým rizikem generalizace. Ukazuje se, že tento typ karcinomu poměrně dobře reaguje na moderní typy imunoterapie (Šiffnerová, 2015; Kervarrec et al, 2018; Lai et al., 2018; Levican et al, 2018; Palich Fučíková, 2019)

Kaposiho sarkom je vzácné nádorové onemocnění, které kromě kůže postihuje i gastrointestinální a respirační trakt. Vzniká z buněk cévního endothelu při souběhu dvou rizikových faktorů – infekce herpes virem 8 (human herpesvirus-8; HHV-8) a snížené imunitě. Z toho důvodu se vyskytuje hlavně u nemocných s HIV virem (oba viry se přenáší pohlavní cestou), vzácně se ale může objevit i u pacientů po imunosupresi a zcela ojediněle i u Crohnovy choroby. Nádor má vysokou metastatickou aktivitu. Výskyt infekce HHV-8 vykazuje zajímavé geografické a etnické souvislosti. Nejvíce se vyskytuje v subsaharské Africe (více než 50 % dospělé populace), ve Středomoří dosahuje prevalence 20 – 30 %, ve zbytku Evropy, v Asii a USA pod 10 %. Je popsána výrazně vyšší prevalence např. u původního indiánského obyvatelstva jižní

Ameriky nebo u některých etnických skupin v Číně (Uldrick a Whitby, 2011; Günther a Grundhoff, 2017; Windon a Shroff, 2018).

Verukózní karcinom (*Carcinoma verrucosum lat.*; *verrucous carcinoma angl.*) je vzácnou variantou spinocelulárního karcinomu kůže, který se vyznačuje pomalým růstem a bradavičnatým povrchem. Jedná se o asymetricky proliferující útvar do epidermis. Vyskytuje se nejčastěji v dutině ústní, ale i na genitáliích a krku. Převážnou většinu pacientů tvoří muži mezi 50 – 80 rokem věku. Patří mezi invazivní, rychle se rozrůstající karcinomy, ale má velmi malou tendenci k tvorbě metastáz (Fernandes et al, 2018).

2.4. Bazocelulární karcinom

Z buněk pokožky (epitelu) vychází bazocelulární karcinom – BCC (bazaliom; basal cell carcinoma, *angl.*). Tento typ karcinomu je nejčastěji se vyskytující formou nádorových onemocnění.

Didona et al, 2018 uvádějí, že BCC je nejrozšířenějším typem karcinomů kůže – zahrnuje 70 % i více procent nemelanomových kožních karcinomů – Simoes et al. uvádějí 80 – 85 %. Uvádí se, že až 30 % nově diagnostikovaných karcinomů je právě BCC. Tento typ karcinomu téměř netvoří metastázy, uvádí se, že incidence metastáz je 1 : 14 milionům. I z tohoto důvodu je úmrtnost velmi nízká a uvádí se v rozsahu 2 na 1 milion. Největší roli v patogenezi BCC hraje UV záření, i když jednoznačný vztah zde není. Individuální rizikové faktory jsou pohlaví, věk, imunosuprese, některá geneticky podmíněná onemocnění a světlé kožní fenotypy (Simoes et al, 2015; Didona et al, 2018).

Nejčastěji se BCC prezentuje jako malý útvar, který se může pomalu zvětšovat v průběhu měsíců nebo let – obr. 3.



Obr. 3 Příklad bazocelulárního karcinomu (Gordon, 2013)

Projevuje se obvykle nejprve růstem tužšího, bezbarvého nebo barevně, od okolní zdravé tkáně jen nepatrně odlišného útvaru. Povrch bývá obvykle hladký a lesklý s perleťovými hranicemi. Často se stává, že nádor svědí. Ve více rozvinutém útvaru se tvoří centrální vředy, strupy a útvar může krváčet. Tento druh nádoru se většinou objevuje ve vyšším věku (nad 60 let), velmi často v místech, která byla pravidelně vystavována slunci, příčiny jeho vzniku však mohou být různé (kap. 2.6.). Nádor může velmi agresivně růst a způsobit defekty kůže i přilehlých tkání. V určitých případech může invazivní růst proniknout i do chrupavek a kostí, případně i do velkých cév a pacienta svým agresivním místním růstem a porušením životně důležitých okolních struktur i ohrožovat na životě (Fait, 2006; Gordon, 2013; Didona et al, 2018).

Zlatým standardem léčby je chirurgická excize s histologickým vyšetřením, kde je uváděna, např. u obličeje, pětiletá míra recidivy menší než 3%. Pro povrchové BCC jsou k dispozici schválené léky, jako je imiquimod (celková remise 82–90%; modifikuje imunitní odpověď organismu prostřednictvím cytokinů) a lokální 5-fluorouracil (okolo 80%), oba ve formě masti. Využívá se i fotodynamická terapie (71–87%). V některých případech lze použít i jiné ablativní metody (laser, kryochirurgie). Radioterapie je alternativní léčbou pro invazivní, neoperabilní BCC, s 5-letou mírou kontroly nádorů 89–96% (Fait, 2006; Gordon, 2013; Berking et al., 2014; Didona et al, 2018).

2.5. Spinocelulární karcinom

Spinocelulární karcinom – SCC (spinaliom; squamous cell carcinoma, *angl.*) je nádor, který se tvarem i růstem velmi podobá bazaliomu, častější a časnější bývá tvorba vředů, strupů a krvácení.

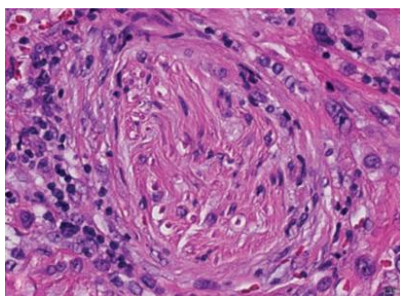
Didona et al, 2018 uvádějí, že SCC je, po bazaliomu, druhým nejrozšířenějším typem - 25 % - nemelanomových kožních karcinomů. Agresivní formy SCC jsou často spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou. SCC vykazuje relativně vysokou metastatickou aktivitu, výskyt metastáz se uvádí v rozsahu 0,1 – 10 % případů. SCC vykazuje rovněž vysokou schopnost rekurence, která závisí na velikosti nádoru, jeho lokalizaci, histologické diferenciaci a dalších faktorech. Hlavním rizikovým faktorem je opět UV záření, dalšími rizikovými faktory jsou např. světlá kůže, ale hlavně infekce lidským papillomavirem (human papillomavirus; HPV; hlavně rizikovými kmeny 16, 18 a 31). Uvádí se rostoucí trend výskytu tohoto karcinomu (Gordon, 2013; Simoes et al, 2015; Didona et al, 2018; Yanagi et al, 2018).

SCC je maligní nádor epidermálních keratinocytů, který prorůstá do dermis. Lokální destrukce tkáně může být rozsáhlá a vysoký může být i rozsah metastáz (hlavně v pokročilých stádiích), které se šíří hlavně lymfatickým oběhem. Klinické projevy zahrnují papuly, plaky nebo uzliny a hladké, hyperkeratotické nebo erozivní léze – obr. 4.



Obr. 4 Příklad spinocelulárního karcinomu (Gordon, 2013)

Významná může být i perineurální invaze (šíření podél periferních nervů) nádoru. Takto vzniklé metastázy se mohou objevit kdekoliv v organismu a prognóza je obvykle špatná. Histologický obraz je na obr. 5 (Cheng a Yan, 2016)

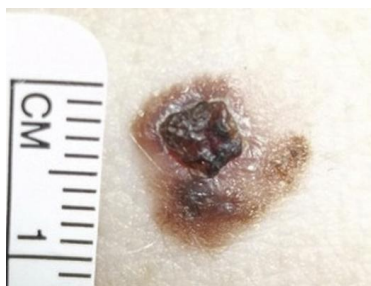


Obr. 5 Perineurální invaze spinocelulárního karcinomu (Cheng a Yan, 2016)

Jednoznačné určení identity SCC je mnohdy možné až po histologickém vyšetření po odstranění. Tento typ nádoru se vyskytuje opět většinou ve vyšším věku, častěji v místech, kde byla kůže pravidelně vystavována slunci nebo jinému typu záření, např. rentgenovému, nebo u lidí, kteří trpí některými jinými kožními chorobami, např. lupénkou (psoriasis). Odstraňuje se podobně jako bazaliom, tedy chirurgicky, rentgenovým ozářením nebo zmrazením. Někdy je však nutné řešit i spádové lymfatické uzliny, případně i další potenciálně postižená místa, např. u perineurální invaze. V některých případech je nutná komplexní onkologická léčba, tedy kromě chirurgického řešení i léčba ozářením a chemoterapií (Fait, 2006; Gordon, 2013; Cheng a Yan, 2016).

2.6. Melanom

Melanom je nádor, který se vyskytuje poměrně vzácněji, ovšem pro svou agresivitu a možnost výskytu v jakémkoliv věku je svým způsobem nejzávažnější – obr. 6. Zatímco incidence se pohybuje v jednotkách % všech kožních nádorů, úmrtnost je okolo 60 – 80 % ze všech nádorů kůže. Hodnota 5-letého přežití je u pacientů s metastazujícím maligním karcinomem pouze okolo 14 % (Fait, 2006; Bandarchi et al., 2013; Gordon, 2013).



Obr. 6 Příklad melanomu (Gordon, 2013)

Zajímavý je trend výskytu melanomu v populaci. Gordon, 2013 mapoval výskyt melanomu v několika zemích v desetiletém intervalu na přelomu tisíciletí. Zatímco ve vyspělých mimoevropských zemích (USA, Austrálie, Kanada) byl trend nárůstu okolo 1 %, v Evropě jsou hodnoty daleko vyšší a pohybují se mezi 3 až 8 %. Uvádí se, že melanom se vyskytuje častěji u osob s citlivou kůží (fototypy I a II), tedy u světlouhlavých a rezavých jedinců, kteří mají obtíže s opálením a u nichž vzniká větší množství pigmentových skvrn na kůži, objevit se však vzácněji může i u snědých osob. Uvedený trend je ale s tímto v rozporu, protože nejvyšší trend byl zjištěn ve Španělsku.

Maligní melanom je odvozen od dermálních melanocytů a může se objevit v jakékoli tkáni, která obsahuje tyto buňky. Vznik maligního melanomu je indukován prostřednictvím více mechanismů, včetně potlačení imunitního systému kůže, zvýšeného dělení melanocytových buněk, produkce volných radikálů a poškození DNA melanocytů (Gordon, 2013).

Jedním z hlavních faktorů, které přispívají ke vzniku tohoto nádoru, je expozice UV záření, zejména při vystavení slunečnímu záření. Velký význam má počet situací, kdy došlo ke spálení kůže, přičemž nádor může vzniknout i mnoho let po posledním opálení nebo spálení. Udává se, že poměrně zásadní význam má expozice slunci do věku 9 let. Nádor může vzniknout na čisté kůži, ale i v dříve přítomném znaménku, a

projevuje se nejprve pouze růstem a barevnými změnami, později pak svědění a krvácením (Fait, 2006).

Rozpoznání časných stadií melanomu je někdy poměrně obtížné, jako pomůcka k určení existuje tzv. ABCD pravidlo, které může pomoci rozlišit podezřelá znaménka:

A: asymetrie (Assymetry): znaménko má nepravidelný tvar, každá polovina je jiná;

B: ohraničení (Border): znaménko nemá hladký okraj, okraje jsou nepravidelné, zubaté;

C: barevná nepravidelnost (Colour variation): znaménko není jednolitě barvy, obvykle jsou přítomny různé odstíny černé, hnědé, růžové;

D: průměr (Diameter): znaménko je obvykle větší než 6 mm v průměru, nebo se rychle mění velikost.

Léčba i prognóza melanomu značně závisí na časnosti zjištění. V počátečních fázích, kdy nádor nemetastázuje, se volí jednoduché chirurgické řešení, nutná je excize i části zdravé tkáně okolo karcinomu. V pozdějších stadiích, kdy již je riziko metastáz, se odstraňuje i nejbližší spádová mízní uzlina (tzv. sentinelová uzlina) a v případě jejího postižení je nutné odstranění všech uzlin ve spádové oblasti. V pokročilejších stadiích již léčba kromě chirurgického odstranění zahrnuje i chemoterapii a radioterapii. Při pokročilých nádorech je již léčba poměrně komplikovaná a mnohdy i málo účinná (Fait, 2006; Bandarchi et al., 2013; Gordon, 2013).

Melanom má řadu histologických typů, které zahrnují epitheliální, mezenchymové, hematologické i neurální tumory. K jejich spolehlivé diagnostice je nutno využít imunohistologické (imunohistochemické) metody. Zlatým standardem imunohistochemických markerů se ukazuje protilátka S-100, která je nejcitlivějším markerem pro melanocytické léze. Protilátky HMB-45, MART-1/Melan-A, tyrosinase a MITF vykazují relativně vysokou specifitu, ale nejsou tak citlivé jako S-100 (Ohsie et al, 2008).

2.7. Rizikové faktory kancerogeneze

Na vzniku a rozvoji kožních karcinomů se podílí řada faktorů. Hlavními neovlivnitelnými faktory jsou genetická zátěž a věk, u některých typů nádorů zřejmě i pohlaví. Tuto zátěž samozřejmě ovlivnit nelze, ale platí, že predisponovaní jedinci by měli, pokud možno absolutně, eliminovat ovlivnitelné faktory, zejména expozici slunečnímu (UV) záření.

2.7.1. Neovlivnitelné rizikové faktory kancerogeneze

Velmi významným rizikovým faktorem je věk. To platí zejména pro bazocelulární a spinoelulární karcinom, kde se maligní nádor objevuje téměř výhradně až ve vyšším věku – uvádí se většinou nad 60 let. Podobně to platí i pro prekancerózní aktinickou keratózu. Toto ale již neplatí u melanomu, který se může vyskytnout u všech věkových kategorií (Fait, 2006; Simoes et al, 2015; Didona et al, 2018).

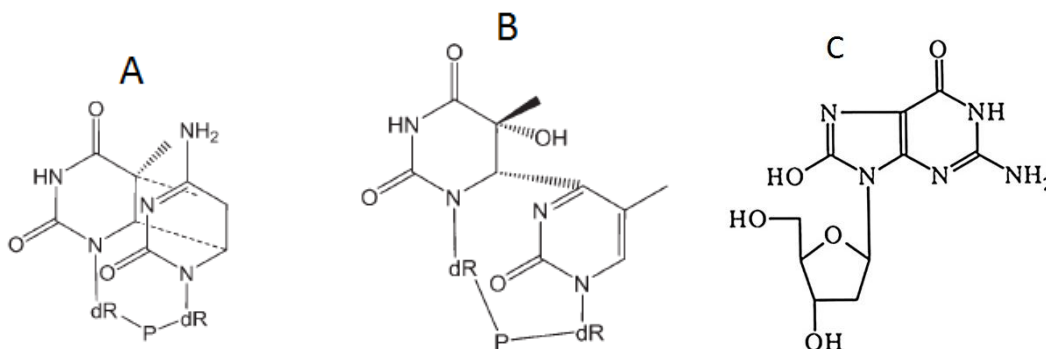
Zásadní pozici mezi neovlivnitelnými faktory mají genetické vlivy a poruchy na molekulární úrovni. Významným rizikovým faktorem jsou světlé kožní fenotypy, obvykle se označují termínem Fitzpatrick skin. Velmi významným rizikovým faktorem je i rodinná anamnéza. Poruchy na molekulární úrovni souvisejí zejména se vznikem a rozvojem melanomu. Vznik maligního melanomu je indukován prostřednictvím více mechanismů, mezi které patří i zvýšené dělení melanocytových buněk, produkce volných radikálů a poškození DNA melanocytů (Gordon, 2013; Simoes et al, 2015; Didona et al, 2018).

Velmi významným rizikovým faktorem jsou poruchy imunitních funkcí a cílená imunosuprese. V obou případech je potlačen i imunitní systém kůže. Asi nejzávažnější je to u melanomů a zejména u Kaposiho sarkomu, kde výskyt u HIV pozitivních jedinců je mnohonásobně vyšší proti zdravé populaci. Jedním z méně známých faktorů, které mohou negativně ovlivnit imunitní systém kůže je i UV záření (Uldrick a Whitby, 2011; Gordon, 2013; Günther a Grundhoff, 2017; Didona et al, 2018; Hart a Norval, 2018).

2.7.2. Ovlivnitelné faktory

Největší roli v patogenezi kožních karcinomů hraje UV záření, i když jednoznačný vztah zde není. Poškození DNA indukované UV zářením hraje klíčovou roli v iniciační fázi většiny kožních karcinomů. Pokud poškozené buňky zůstanou neopravené nebo nejsou odstraněny apoptózou, aktivuje se tvorba proto-onkogenu a/nebo dochází k inaktivaci genů suprese nádorů. Chemická povaha a rozsah poškození DNA silně závisí na vlnové délce dopadajících fotonů. Nejenergičtější část slunečního spektra na povrchu Země (UVB, vlnová délka $\lambda = 280\text{--}320$ nm) vede k tvorbě mutagenních cyklobutanpyrimidinových dimerů (CPD) a thyminových dimerních (6–4) fotoproduktů (64PP). Méně energetické, ale 20krát intenzivnější UVA záření (vlnová délka $\lambda = 320\text{--}400$ nm) také indukuje tvorbu CPD (ale v daleko menší míře) spolu s celou řadou oxidativně generovaných lézí, jako jsou například zlomy jednoho řetězce DNA a oxidované báze.

Nejčastěji se vyskytující oxidovanou bází je 8-oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoGua). Struktury uvedených sloučenin jsou znázorněny na obr. 7.



Obr. 7 Struktury mutagenních produktů fotooxidace: A = CPD; B = 64PP; C = 8-oxoGua; dR = deoxyribosa; P = fosfát (Marrot a Meunier, 2008; Cadet a Douki, 2018)

Dostupné údaje o vzniku fotoproduktů DNA v buňkách a na kůži ukazují, že vystavení slunečnímu záření většinou indukuje tvorbu pyrimidinových dimerů, s nižším množstvím 8-oxoGua a zlomů řetězců. Kromě toho může UV záření v kůži indukovat tvorbu volných radikálů, včetně vysoce patogenního singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$) a hydroxylového ($\cdot\text{OH}$) radikálu (Marrot a Meunier, 2008; Gordon, 2013; Simoes et al, 2015; Cadet a Douki, 2018; Didona et al, 2018).

V poslední době se ukazuje, že tvorbu kožních karcinomů mohou velmi výrazně stimulovat některé virové infekce. U spinocelulárního karcinomu je v současné době infekce lidským papillomavirem (human papillomavirus; HPV; hlavně rizikovými kmeny 16, 18 a 31) považována za hlavní rizikový faktor. Infekce zasahuje hlavně anogenitální oblast a je považována za velmi závažný problém (Gordon, 2013; Simoes et al, 2015; Bacaj a Burch, 2018; Didona et al, 2018; Yanagi et al, 2018).

Maligní zvrát Merkelových buněk je podle současných poznatků ve většině případů předcházen integrací DNA sekvencí nedávno objeveného Merkel cell polyomaviru (MCPyV) do buněčného genomu. Uvádí se, že až 80 % případů MCC souvisí s invazí viru MCPyV (Šiffnerová, 2015; Kervarrec et al, 2018; Levican et al, 2018).

Kaposiho sarkom vzniká z buněk cévního endotelu při souběhu dvou rizikových faktorů – infekce herpes virem 8 (human herpesvirus-8; HHV-8) a snížené imunitě. Z toho důvodu se vyskytuje hlavně u nemocných s HIV virem (oba viry se přenášejí pohlavní cestou), vzácně se ale může objevit i u pacientů po imunosupresi a zcela ojediněle i u Crohnovy choroby (Uldrick a Whitby, 2011; Günther a Grundhoff, 2017; Windon a Shroff, 2018).

Problematika vlivu toxických chemikálií na vznik a rozvoj kožních karcinomů se v poslední době prakticky výhradně soustřeďuje na vliv expozice arsenu. Problém vysokých koncentrací arsenu v životním prostředí je v Evropě prakticky neznámý. Vyskytuje se ale v řadě asijských zemí (nejznámější je v tomto ohledu asi Čína a Bangladéš), kde se problém soustřeďuje zejména na užitkovou a pitnou vodu. Závlaha zemědělských produktů kontaminovanou užitkovou vodou může potom vést k masivní kontaminaci zemědělských plodin, např. rýže. Vzhledem k obavám z obsahu arsenu v rýži zavedla Evropská komise na popud Evropského úřadu pro bezpečnost potravin EFSA od roku 2016 limity pro maximální obsah. V syrové loupané rýži je povoleno 0,2 mg/kg, v předpařené rýži 0,25 mg/kg, v rýžových chlebičkách a podobných výrobcích 0,3 mg/kg a v rýži pro malé děti 0,1 mg/kg (Nařízení 2015/1006, 2015).

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) klasifikuje arsen jako lidský karcinogen skupiny 1 - prokázaný velmi závažný karcinogen. Epidemiologické studie prokázaly silnou souvislost mezi expozicí anorganického arsenu a zvýšeným výskytem rakoviny včetně rakoviny močového měchýře, jater, plic, prostaty a kůže. Molekulární mechanismy karcinogeneze nejsou zcela známy, předpokládá se mechanismus genotoxicity, změny buněčné proliferace, oxidačního stresu, změn epigenomu, poruch signálních transdukčních drah, cytotoxicity a regenerační proliferace (Bjorklund et al., 2018; Didona et al., 2018; Roy et al., 2018; Zhou a Xi, 2018).

2.8. Přírodní sloučeniny s antikancerogenním účinkem

Karcinomy kůže jsou život ohrožující onemocnění a jejich výskyt a riziko vzniku se během posledních desetiletí zvyšuje na celém světě. Většina karcinomů kůže si vyvinula částečnou nebo úplnou rezistenci proti chemoterapii a radioterapii. Fytochemikálie extrahované z léčivých rostlin a potravin vykazují často vysokou biologickou aktivitu. Mnoho studií *in vitro* a *in vivo*, které se zabývají těmito bioaktivními sloučeninami, dokazuje potenciální antioxidační, antiproliferační, fotoprotektivní, pro-apoptické, protizánětlivé a antiangiogenní účinky, které jsou významné v boji proti rakovině kůže. Tyto fytochemikálie rovněž mohou regulovat několik dalších molekulárních procesů, jako je angiogeneze, metastázy a buněčný cyklus likvidaci buněk kožních karcinomů. Jako nejvýznamnější bioaktivní látky s inhibičním účinkem vůči kožním karcinomům se jeví skupina fenolových sloučenin (včetně vitamínu E). Určitý efekt je přisuzován i určitým karotenoidům a některým

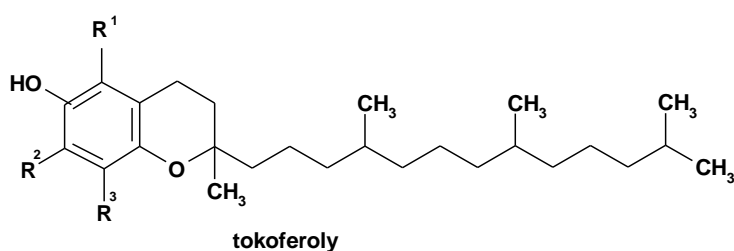
dalším sloučeninám (Francis, 2006; Simoes et al, 2015; Penta et al, 2017; Didona et al, 2018; Iqbal et al, 2019).

2.8.1 Fenolové sloučeniny s antikancerogenním efektem

Z fenolových sloučenin se největší inhibiční efekt obvykle přisuzuje vitaminu E a katechinům zeleného čaje.

Vitamin E

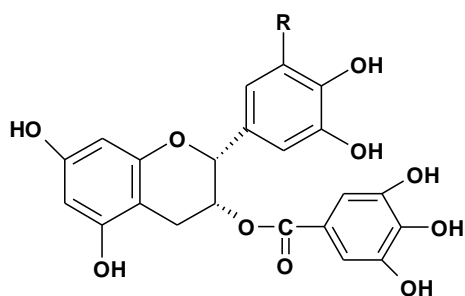
Aktivitu vitaminu E vykazuje osm lipofilních strukturně podobných derivátů chroman-6-olu. Větší praktický význam v potravinách vykazují 4 tokoferoly (α -, β -, γ -, δ -), které se běžně vyskytují v rostlinných olejích a olejných semenech.



Tokoferoly vykazují velmi silné antioxidační a fotoprotektivní účinky, některé studie jim přisuzují i určitý antiproliferativní efekt. Údaje o efektu tokotrienolů jsou poněkud kontroverzní. Řada autorů přisuzuje tokotrienolům v organismu ještě významnější efekt než je efekt tokoferolů. Uvádí se, že mohou ovlivnit různé biologické systémy, které určují rozsah proliferace nádorových buněk, jejich invazivitu a schopnost metastáze, jako jsou např. NF- κ B, STAT3, Akt/mTOR aj. Kromě toho zřejmě dokáží senzibilizovat nádorové buňky vůči některým chemoterapeutikům (Francis et al, 2006; Velíšek a Hajšlová, 2009; Sailo et al, 2018).

Katechiny zeleného čaje

Do této skupiny se řadí bezbarvé katechiny, epikatechiny, gallokatechiny a epigallokatechiny a jejich estery s gallovou kyselinou. Nejvyšší biologickou aktivitu vykazují epikatechin-gallát (ECG) a epigallokatechin-gallát (EGCG).

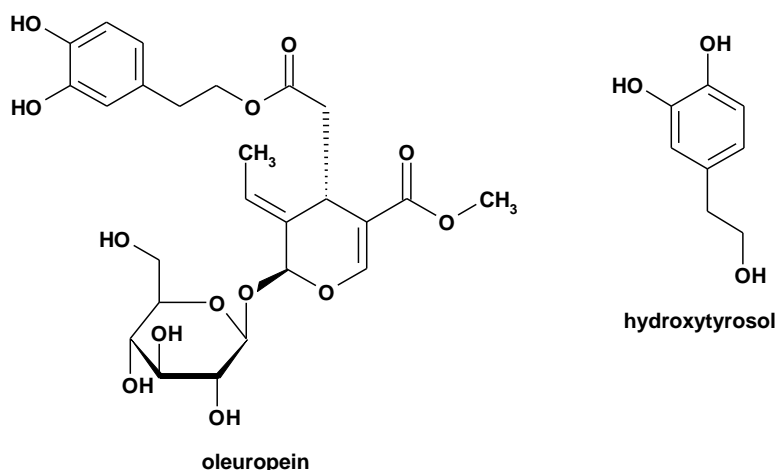


R = H (-)-epikatechin-gallát (ECG)
R = OH (-)-epigallokatechin-gallát (EGCG)

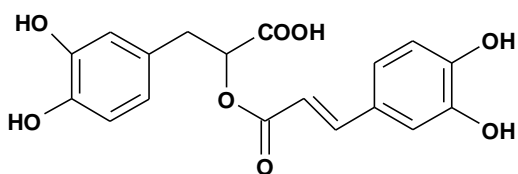
Tyto sloučeniny vykazují extrémně silný antioxidační efekt a přisuzuje se jim rovněž významný fotoprotektivní a antiangiogenní efekt. Prokazatelně inhibují metastázu buněk melanomu a vykazují synergistický efekt s dalšími antikancerogenními sloučeninami, např. některými karotenoidy (Kuroda a Hara, 1999; Francis et al, 2006; Velíšek a Hajšlová, 2009; Fujiki et al, 2018; Iqbal et al, 2019).

Další fenoly

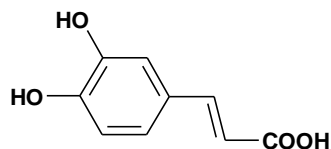
Jako potenciálně velmi zajímavé se jeví dvě bioaktivní sloučeniny přítomné v olivách (*Olea europaea*) – pryskyřice oleuropein a její metabolit hydroxytyrosol. Oleuropein je, díky své lipofilitě, přítomen i v olivovém oleji, kde se podílí na jeho vysoké oxidační stabilitě. Oba fenoly jsou významnými antioxidanty, inhibitory buněčné proliferace, mají antiangiogenní efekt a mohou efektivně brzdit invazivní růst karcinomu a migraci odštěpených buněk karcinomu do jiných tkání. Jsou efektivními inhibitory enzymu cyklooxygenasy-2, která syntetizuje prozánětlivé prostaglandiny z arachidonové kyseliny a tím snižují rozsah poškození DNA zánětem (Imran et al, 2018).



Významný antioxidační a antiproliferativní efekt se přisuzuje i některým fenolovým kyselinám a jejich esterům. Patří sem zejména kávová a rosmarinová kyselina. Kávová kyselina se v přírodě vyskytuje hlavně ve formě esterů (depsidů) s dalšími látkami – příkladem může být chlorogenová, rosmarinová, kaftarová, cichorová kyselina a další. Rosmarinová kyselina se vyskytuje ve významnějším množství v některých bylinách, např. rozmarýnu, majoránce nebo šalvěji (Pokorný a Pánek, 2012; Gonzales-Vallinas et al, 2015).

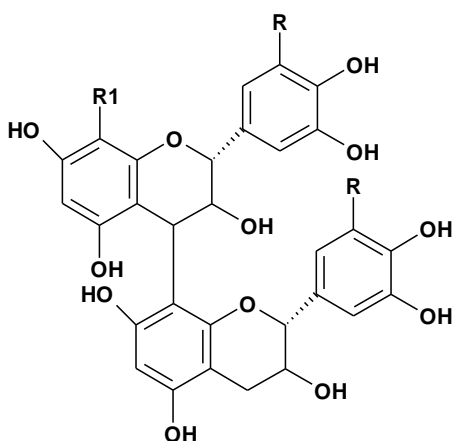


rosmarinová kyselina



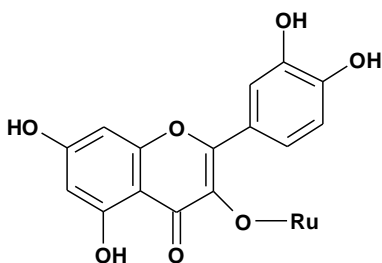
kávová kyselina

Velmi silný antioxidační, ale také určitý protizánětlivý efekt vykazují sloučeniny ze skupiny proanthokyanidinů (někdy nazývané pycnogenoly); příklad jednoho typu sloučenin je uveden na následujícím obrázku. Tyto sloučeniny jsou velmi aktivními zhášeci reaktivních kyslíkatých sloučenin, zejména volných radikálů, které mohou poškozovat strukturu DNA (Francis et al, 2006; Velišek a Hajšlová, 2009; Yang et al, 2018).

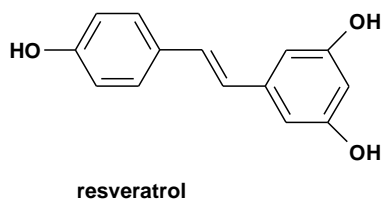


Prokyanidiny C4 - C8 oligomery
 R = H nebo OH
 R1 = H dimer
 R1 = 3-hydroxyflavan oligomer

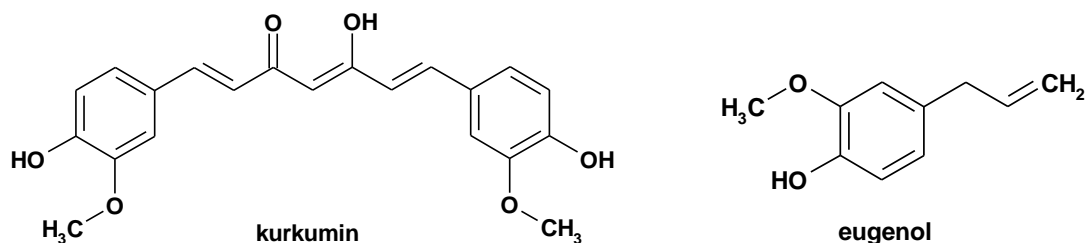
Významný antioxidační a antiproliferativní efekt vykazují i některé flavonoidy, zejména látky ze skupiny flavonolů – kvercetin (a jeho glykosid rutin – viz obrázek), taxifolin, myricetin, kemferol a další a flavonů, hlavně apigenin (Francis et al, 2006; Velišek a Hajšlová, 2009; Iqbal et al, 2019).



Významným fenolem se zdá být rovněž resveratrol, kterému je přisuzován určitý antioxidační, antiangiogenní a antiproliferativní efekt. Kromě toho dokáže velmi účinně indukovat apoptózu buněk a autofagii a snižovat rozsah metastáz (Francis et al, 2006; Velišek a Hajšlová, 2009; Aziz a Aziz, 2018).



Velmi sledovanou sloučeninou je kurkumin, který je hlavní barevnou, ale i chuťovou a aromatickou složkou oddenku rostliny kurkumovník dlouhý (*Curcuma longa*). U nás je známý hlavně jako složka směsi koření zvaného kari. Má výrazné antiproliferativní a antioxidační účinky a je významným regulátorem procesu apoptozy. Uvádí se rovněž, že suplementace kurkuminu je účinnou doplňkovou léčbou kožních nádorů souvisejících s expozicí arsenem (Mantzorou et al, 2018; Iqbal et al, 2019).

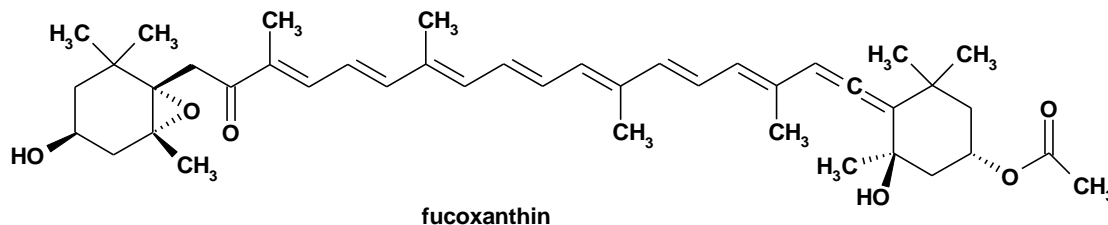


Antiproliferativní a pro-apoptotický efekt byl pozorován i u jednoduchého fenolu eugenolu (vyskytuje se např. v hřebíčku, *Syzygium aromaticum*) (Iqbal, 2019).

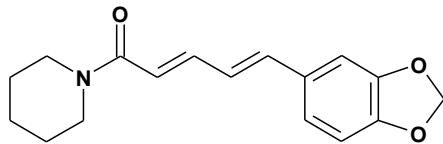
2.8.2 Další bioaktivní látky

Ze skupiny karotenoidů jsou středem zájmu zejména uhlovodíky β -karoten a lykopen, které vykazují významný antioxidační a fotoprotektivní efekt (Francis et al, 2006; Velišek a Hajšlová, 2009).

Předmětem velkého zájmu je v současné době kyslíkatý karotenoid fucoxanthin, kterému jsou přisuzovány významné antiproliferativní, antimetastatické a proapoptotické účinky (Iqbal et al, 2019).

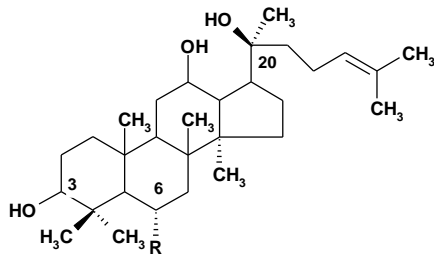


Ještě větší zájem výzkumu pak vyvolává alkaloid piperin, který je hlavní chuťovou a aromatickou složkou pepře černého (*Piper nigrum*). Je prokázáným inhibátorem proliferace buněk a regulátorem apoptozy (Iqbal et al, 2019).



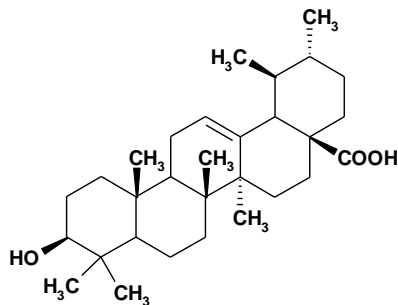
piperin

Potenciálně zajímavými sloučeninami jsou i triterpenové saponiny ginsenosidy, které jsou hlavními aktivními látkami ženšenu. Je u nich prokázán určitý antiangiogenní a antiproliferativní efekt (Francis et al, 2006; Velíšek a Hajšlová, 2009)



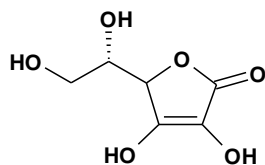
R = H Protopanaxadiol
R = OH Protopanaxatriol

Velký význam je přisuzován i ursolové kyselině, další sloučenině ze skupiny triterpenových saponinů (podobné struktury jako výše uvedené ginsenosidy). Významnější množství obsahují některé byliny, např. tymián, bazalka, rozmarýn aj., ale velmi důležitým zdrojem jsou i jablka, kde se tato látka vyskytuje v dužnině těsně pod slupkou. Jsou prokázány významné protizánětlivé, antioxidační a antiproliferativní účinky (Velíšek a Hajšlová, 2009; Gonzales-Vallinas et al, 2015; Iqbal et al, 2019)



ursolová kyselina

Významnou roli v patogenezi kožního karcinomu zřejmě hraje i askorbová kyselina (vitamin C). Jde o velmi silný hydrofilní antioxidant, který při suplementaci vysokými dávkami je schopen snižovat viabilitu a invazivitu buněk maligního melanomu a indukovat apoptózu (Velíšek a Hajšlová, 2009; Wang et al, 2018).



askorbová kyselina

3. Cíle práce a hypotézy

Cíle práce

Hlavní cíle práce je možno specifikovat do následujících bodů:

1. Charakterizovat běžněji se vyskytující kožní nádory z hlediska jejich incidence a patogenity, morfologie, invazivity a metastatické aktivity.
2. Mapovat a posoudit parametry, které stimulují nebo inhibují vznik a rozvoj kožních nádorů.
3. Popsat možnosti a konkrétní realizaci histologického vyšetření kožních karcinomů v oddělení patologie Nemocnice Tábor a.s.
4. Zpracovat vybrané případy kožních excizí a pomocí několika diagnostických metod připravit preparáty vhodné pro spolehlivé stanovení diagnózy.
5. Prokázat, že při dodržení zásad Správné laboratorní praxe a dodržení Standardních operačních postupů lze připravit diagnostické preparáty standardní kvality, které umožní stanovit diagnózu s nejvyšší mírou spolehlivosti.
6. Mapovat počty a typy maligních kožních karcinomů diagnostikovaných v Nemocnici Tábor a.s. v pětiletých intervalech 2007 – 2017.

Hypotézy

1. Příprava preparátů pro histologické a imunohistologické vyšetření je velmi náročná na obsluhu, laboratorní techniku i čistotu vybraných ingrediencí. Práce chce prokázat, že při dodržení zásad Správné laboratorní praxe a dodržení Standardních operačních postupů lze připravit diagnostické preparáty standardní kvality, které umožní stanovit diagnózu s nejvyšší mírou spolehlivosti.
2. Literatura často uvádí, že celkový počet kožních nádorů a počet jednotlivých hlavních typů (bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom, melanom) v posledních letech výrazně narůstá. Lze předpokládat, že podobný nárůst případů kožního karcinomu bude i ve zdravotnickém zařízení Nemocnice Tábor a.s.

4. Metodika

4.1. Chemikálie

Ethanolum benzino denaturatum - ethanol denaturovaný, 1%lékařského benzínu, 96% v/v alkohol, ředí se na 80,70, 60% v/v

Montovací médium Pertex: Složení: xylen, akrylová pryskyřice založená na polymerech metakrylátů. Montovací médium pro světelnou mikroskopii, pro užití po aplikaci xyleny, v případě potřeby může být ředěn xylenem.

Xylen, Aceton, Isopropanol – čistota PURE (chemikálie vhodná pro obecné laboratorní práce)

Histoalkohol 99 (směs absolutních alkoholů 99,7- 99,9%)

4.2. Histologické vyšetření tkáně

Příprava biologického preparátu pro histologické vyšetření tkáně zahrnuje 3 základní kroky:

1. Odběr, předpříprava a transport odebraného preparátu
2. Zpracování preparátu v laboratoři
3. Vyhodnocení hotového preparátu

4.2.1. Odběr, předpříprava a transport odebraného preparátu

Po odebrání kožní excize lékařem je vzorek ihned vložen do fixační tekutiny (10% formol /formaldehyd/), aby došlo k rychlému vysrážení bílkovin protoplazmy buněk a zabránilo se samovolnému rozkladu (autolýze) tkáně.

Následně je vzorek v roztoku formaldehydu bez další úpravy transportován do laboratoře – transport zajišťují obvykle sanitáři nemocnice nebo oddělení patologie, případně řidiči nemocnice, výjimečně mohou transport realizovat i další osoby, např. externí lékaři.

4.2.2. Zpracování vzorku v laboratoři

Harmonogram práce je v histologické laboratoři rozdělen na 3 pracovní úseky (I - III), ve kterých se laborantky pravidelně střídají. Pro účely této bakalářské práce byl harmonogram pozměněn tak, že všechny tři úseky zabezpečila jedna laborantka – autorka bakalářské práce.

Úsek I – příjem vzorku

Tento úsek zahrnuje dvě samostatné dílčí operace – samotný příjem a označení vzorku a přikrajování vzorku.

Příjem a označování vzorku

1. Laborantka na příjmu kontroluje shodu označení vzorku na nádobce s údaji na průvodním listu
2. Kontroluje všechny požadované údaje na průvodním listu k zásilce histologického materiálu.
3. Očísluje materiál a průvodní list pořadovým číslem, připraví a označí pořadovým číslem nádobku na přikojené vzorky.
4. Označí průvodku kódy pro vykazování platby zdravotní pojišťovny (ZP) a označí průvodku datem přijetí a svou parafou, případně značkou lékaře, který bude materiál přikrajovat a odečítat.

Používané kódy u kožních excizí pro vykazování ZP:

87125 - jednoduchý vzorek, bez popisu

87127 - jednoduchý vzorek s popisem

87129 - vícečetný vzorek

87215 - zhotovení dalšího bloku

87217 - prokrajování bloků

87223 - speciální barvení jednoduché

87231 - imunohistologické preparáty

87225 - speciální barvení (stříbření-masson)

Přikrajování vzorku

Patolog, za asistence laborantky provádí makropopis vyšetřovaného materiálu, popřípadě pro zpřesnění topografie značí vzorky eosinem (viz barvení vzorků), určuje množství odebraných bloků a druhy barvení.

Laborantka kontroluje počty přikrojených vzorků v transportní skleněné nádobce a zapisuje jejich počet a požadavky na barvení na průvodku.

Úsek II – Zpracování vzorku v laboratoři

Laborantka přijímá od příjmové laborantky nádobky s přikrojenými vzorky, kontroluje shodu mezi počtem vzorků v nádobce a údaji na průvodním listě, v případě, pokud se materiál zpracovává celý, provádí se kontrola údajů i na originální transportní skleněné nádobce. Vzorky se ukládají společně s číslem do plastových nebo kovových

kazet. Všechny kazety se vzorky se vkládají do závěsného koše robotického zařízení – autotechnikonu - Tkáňového procesoru TP 1020 Automatic Tissue Processor (Leica Biosystems, Germany) – viz obr. 8



Obr. 8 Orientační obrázek autotechnikonu

Promytí, odvodnění a prosycení vzorků parafinem

Promytí, odvodnění a prosycení vzorků parafinem probíhá v autotechnikonu podle nastaveného programu do druhého dne v řadě lázní. V první lázni je promývací destilovaná voda, v dalších lázních rozpouštědla o klesající polaritě, ve kterých dochází k postupné dehydrataci vzorku. Tato dehydratace musí být velmi pomalá, protože jinak by došlo k nevratnému mechanickému poškození zkoumané tkáně. Nejprve se vzorek zbavuje většiny vody v řadě roztoků ethanolu ve vodě o vzestupné koncentraci - 60%, 70%, 80% a 2x 96%, reziduální voda se odstraňuje nejprve v lázni s acetonem, následně v lázni se směsí aceton-xylen a 2x v lázni s xylenem. Dehydratovaný vzorek se následně prosycuje parafinem ve dvou lázních při teplotě 54°C. Tento postup umožňuje archivovat vzorky po velmi dlouhou dobu.

Zalévání do bloků

V 6,00 hodin ráno laborantka vyjme závěsný košík s uloženými a parafinem prosycenými vzorky tkání, vzorky vyjme z kazet a za asistence dalších dvou laborantek na zalévací parafinové lince Leica EG 1150 H (Leica Biosystems, Germany) vytvoří parafinové bloky – viz obr. 9. Při zalévání kožní excize do parafinu laborantka dbá na to, aby excize byla správně zalita a po krájení byly zachovány všechny vrstvy kůže. Všechny parafinové bloky se nechají zchladit a poté se skládají na plotny. Při skládání bločků na plotny se kontroluje a zapisuje jejich počet na seznam, který slouží jako podklad pro přípravu podložních skel.



Obr. 9 Zalévací parafinová linka

Krájení

U krájení jsou třeba dvě laborantky. Jedna krájí z parafinových bloků na sáňkovém mikrotomu Leica SM2000 R Sliding microtome (Leica Biosystems, Germany) histologické preparáty, druhá je pomocí háčku natahuje z teplé lázně destilované vody na podložní sklo, nechá oschnout, přesuší filtračním papírem a skládá do stojánků. Ty se následně vkládají do barvicího automatu. Sáňkový mikrotom je vyobrazen na obr. 10.



Obr. 10 Sáňkový mikrotom

Úsek III - Barvení

Princip

Základním principem je nabarvení vzorku tkáně tak, aby se zobrazily určité charakteristické struktury, které jsou možné sledovat pod mikroskopem. Z těchto charakteristických struktur lze následně identifikovat typ karcinomu a rozsah léze.

K barvení se používají pouze validované metody. Verifikace používaných postupů probíhá při zavedení postupu v laboratoři a dále pravidelně 1x ročně.

Každý preparát je nabarven v barvicím automatu TST 44.200C (Medite GmbH, Germany) základní metodou Hematoxylin – eosin; výběr dalšího speciálního barvení určuje patolog. Využívá se několik typů speciálního barvení: Hematoxylin-van Gison, Weigert, Alviánová modř-PAS(ALP), PAS, Giemsa-Romanovski, Hematoxylin-alciánová modř (HEAL). Ostatní speciální barvicí metody barví laborantka ručně. Po nabarvení jsou preparáty zamontovány v montovacím automatu ACS 720 (Medite GmbH, Germany). Laborantka na tomto úseku jednou týdně vymění chemikálie a doplní barvicí roztoky v barvicím automatu. Vše se zapisuje do provozního deníku automatu. Barvicí a montovací automat jsou zobrazeny na obr. 11.



Obr. 11 Barvicí a montovací automat

Seznam používaných barvení

Podmínky a postup barvení jsou specifikovány ve Standardním operačním postupu (NT_OSM_PAT_100, 2018)

Pro barvení kožních excizi se používají barvicí metody uvedené v tabulce 1. V tabulce je rovněž uvedena specifikace tkání, reagujících na příslušnou barvicí metodu.

Tabulka 1 Používané typy barvení pro kožní excize

Typ barvení	Specifická tkáň
Hematoxylin-eosin	základní přehledné barvení
Goldnerův-trichrom	kolagenní vlákna
Eosin-elastika	elastická vlákna
Hematoxylin-van Gieson	barvení kolagenu
Masson	impregnační metoda - melanin
Weigert	barvení elastických vláken

Pro další diagnostické účely se používají barvicí metody uvedené v tabulce 2

Tabulka 2 Používané typy barvení pro ostatní diagnostiku

Typ barvení	Specifická tkáň
Hematoxylin-eosin	základní přehledné barvení
Alcianová modř -PAS	průkaz mukopolysacharidů
Hematoxylin-alcianová modř	hlen ve žlázkách kyretáže
Gömory	impregnace retikulárních vláken
Gram	průkaz bakterií
Grockot	průkaz plísní
Kongo červeně	barvení amyloidu
Kossa	průkaz vápníku
Luxolová modř	myelinové pochvy
Ziehl-Neelsen	průkaz mykobakterií
Modrý trichrom	kolagenní vazivo
NOOR	průkaz senilních drůz
PAS	průkaz polysacharidů
PERLS	průkaz železa
Šarlach	barvení tuků
Zelený trichrom	barvení kolagenu

Barvicí metoda Hematoxylin-eosin (HE)

Hematoxylin je bazické přirozené barvivo, je extraktem z dřeva pocházejícího z krevenuš obecné (*Haematoxylum campechianum*). Hematoxylin barví až oxidovaný na hematein a teprve pak tvoří s různými kationty barevné laky. Hematoxylin je specifické barvivo pro jednu tkáňovou složku - jádro, které barví modře až modrofialově. Eosin je kyselé fluorescentní červené barvivo vzniklé působením bromu na fluorescein; eosin barví cytoplazmu růžově.

Příprava roztoku Mayerův Hematoxylin

1g Hematoxylin (Merck) + 50g síran hlinitodraselný + 0,2g jodičnan sodný + 1g kyselina citronová + 50g chloralhydrát (2,2,2-trichlorethan-1,1-diol); 1000 ml destilovaná voda

Postup přípravy: Síran hlinitodraselný se rozpustí za tepla (80°C) v menším množství destilované vody, do horkého roztoku se přidá postupně hematoxylin. Teprve po rozpuštění těchto látek se přidávají postupně další chemikálie. Roztok zraje 7 dní v termostatu při 58 °C.

Příprava roztoku Eosin

5g Eosin žlutavý ve vodě rozpustný + 5g dichroman draselný + 100ml 96% alkohol + 100ml nasycený roztok kyseliny pikrové + 800ml destilovaná voda

Vzorky musí být nejprve zbaveny parafinu a teprve poté dále zpracovávány. Postup a časový harmonogram jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 Pracovní postup a časový snímek barvení preparátů metodou Hematoxylin-eosin (HE)

Krok č.	Operace	Doba (min)	Krok č.	Operace	Doba (min)
1	Sušení preparátů 56 °C	20	4	Barvení Eosin	2
2	Odparafinování			Proplach H ₂ O - diferenciacce	1
	Xylen 1	10	5	Odvodnění	
	Xylen 2	10		Proplach 96% ethanol 1	1
	96 % ethanol 1	2		Proplach 96% ethanol 2	1
	96 % ethanol 2	2		Proplach Histoalkohol	1
	80 % ethanol	2	6	Projasnění	
	70 % ethanol	2		Xylen	2
	Proplach H ₂ O	1		Xylen	2
3	Barvení Hematoxylin Mayer	10	7	Montování preparátu – medium Pertex	
	Proplach H ₂ O - diferenciacce	10			

Výsledek barvení:

Jádra buněk a bazofilní struktury modrá

Ostatní části preparátu odstínově červené

Barvicí metoda Hematoxylin - van Gieson (HvG)

K barvení se využívá barvivo hematoxylin (viz výše) a tzv. van Giesonovo barvivo – pikrofuchsin, který obsahuje pikrovou kyselinu a kyselý fuchsin. Roztok pikrofuchsinu, připravený k použití dle van Giesona, se používá pro barvení kolagenní pojivové tkáně, svalové tkáně a zrohovatěného epitelu. Může být také použit k barvení fibril glia a cytoplazmy. Fuchsin a kyselina pikrová, dvě složky roztoku, barví různé tkáňové struktury současně a selektivně. Kolagenní vlákna se objeví se zářivou červenou barvou, svalová tkáň a glia fibrily budou obarveny žlutě a amyloid, hyalin, koloid, stejně jako hlen bude obarven postupně červeně až žlutě. Doporučuje se barvení Weigertovým hematoxylinem, aby se vytvořilo stabilní a trvalé barvení jader (Merck, 2019).

Příprava roztoku pikrofuchsinu

-zásobní roztok: 1g kyselého fuchsinu + 100ml nasycený roztok kyselina pikrová

- pracovní roztok: 10ml zásobní roztok + 90ml nasycený roztok kyselina pikrová

Pracovní postup je téměř identický s metodou hematoxylin – eosin, pouze v bodu 4 je místo eosinu použit pikrofuchsin, doba barvení je 1 minuta; odvodnění (bod 5) se provádí po dobu 2 minut.

Výsledek barvení:

Jádra buněk	modrá
Svalovina	žlutá
Kolagenní vazivo	červené

Barvicí metoda Goldnerův trichrom

Metoda slouží zejména k identifikaci pojivové tkáně. Velmi dobře zobrazuje i svalovou tkáň, nervové buňky i jádra buněk. Připravují se dva typy směsných barvicích preparátů – G5 a Ponceau + Fuchsin.

Směs G5

5ml 5% vodný roztok barviva světlá zeleň žlutavá

3,5ml 5% vodný roztok barviva oranž G

0,5% kyselina fosfowolframová doplnit do 100 ml

Roztok se uchovává ve tmě při pokojové teplotě.

Směs Ponceau + kyselý fuchsin

Ponceau S.....0,20 g

Kys. fuchsin.....0,10 g

Kyselina octová 2,5%.....200 ml

Roztoky obou barviv se připravují při teplotě 70 - 80 °C za stálého míchání po dobu 30 minut.

Postup a časový harmonogram barvení jsou uvedeny v tabulce 4. Kroky 1, 2, 5, 6, 7 jsou shodné se základní metodou Hematoxylin-eosin (HE), proto jsou znázorněny bez detailů.

Tabulka 4 Pracovní postup a časový snímek barvení preparátů metodou Goldnerův trichrom

Krok č.	Operace	Doba (min)	Krok č.	Operace	Doba (min)
1	Sušení preparátů 56 °C	20	4c	Barvení Směs G5	2
2	Odparafinování	29		Diferenciace 96 % ethanolom	
3	Barvení Hematoxylin Mayer	10		Oplach destilovaná H ₂ O	
	Proplach H ₂ O - diferenciace	10	5	Odvodnění	3
4a	Barvení Ponceau + kyselý fuchsin	5	6	Projasnění	4
	Oplach destilovaná H ₂ O		7	Montování preparátu – medium Pertex	
4b	Kyselina fosfomolybdenová	3			
	Oplach destilovaná H ₂ O				

Výsledek barvení:

Jádra	modročerně
Vazivo	zeleně
Svalovina	oranžově červeně
Hlen	růžově
Nervové buňky	šedofialově

Barvicí metoda Weigert – rezorcín - fuchsin

Metoda zahrnuje 3 fáze barvení preparátu. Nejprve se barví tzv. Weigertovým roztokem, což je barvivo tvořené bázičným fuchsinem a resorcinol-železitým lakem. Barvivo barví elastická vlákna původně do modročerného zbarvení (webpath, 2019). Jádra se následně barví hematoxylinem (viz metoda HE). Třetí fází je barvení pikrofuchsinem (viz metoda HvG).

Postup a časový harmonogram barvení jsou uvedeny v tabulce 5. Kroky sušení preparátů, odparafinování, odvodnění, projasnění a montování jsou shodné se základní metodou Hematoxylin-eosin (HE), proto jsou znázorněny bez detailů.

Tabulka 5 Pracovní postup a časový snímek barvení preparátů metodou Weigert – rezorcín - fuchsin

Krok č.	Operace	Doba (min)	Krok č.	Operace	Doba (min)

1	Sušení preparátů 56 °C	20	4	Barvení Hematoxylin Mayer	10
2	Odparafinování	29		Proplach H ₂ O - diferenciacce	10
3	Barvení - Weigert roztok	25	5	Barvení - pikrofuchsin	1
	Proplach H ₂ O	1	6	Odvodnění	3
	Diferenciacce		7	Projasnění	4
	70 % ethanol	10 s	8	Montování preparátu – medium Pertex	
	Kyselý alkohol	5 s			
	70 % ethanol	5 s			
	Proplach H ₂ O	1			

Výsledek barvení:

Jádra	modročerně
Kolagen	červeně
Svalovina	žlutě
Elastická vlákna	fialově-červená

Barvicí metoda Masson

Preparát se nejprve impregnuje dusičnanem diaminostříbrným $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{NO}_3$ (připraven reakcí dusičnanu stříbrného s amoniakem) a po odstranění nadbytečných Ag^+ iontů thiosíranem sodným se barví jádrovou červení. Jádrová červeně - Nuclear fast red (C.I. 60760) je suché barvivo pro mikroskopii. Obvykle se používá pro barvení v histochemických reakcích, např. v barvení berlínské modři pro detekci železa nebo stříbrného pokovování vláken reticulínu, jakož i jaderného barvení alciánovou modří.

Impregnační roztok - Masson Fontána

K roztoku dusičnanu stříbrnému o koncentraci 5% m/v se přidává po kapkách amoniak, až se zprvu vznikuvší sraženina rozpustí. Hotový roztok nesmí zapáchat po amoniaku – v takovém případě se dokapává dusičnan stříbrný až do vzniku opalescence.

Příprava roztoku Jádrová červeně

0,5g jádrová červeně + 100ml Síran hlinitý 5% roztok; 5 minut povařit, po zchladnutí 2x zfiltrovat přes filtrační papír

Postup a časový harmonogram barvení jsou uvedeny v tabulce 6. Kroky sušení preparátů, odparafinování, odvodnění, projasnění a montování jsou shodné se základní metodou Hematoxylin-eosin (HE), proto jsou znázorněny bez detailů.

Tabulka 6 Pracovní postup a časový snímek barvení preparátů metodou Masson

Krok č.	Operace	Doba (min)	Krok č.	Operace	Doba (min)
1	Sušení preparátů 56 °C	20	5	Thiosíran sodný (5% m/V roztok)	5
2	Odparafinování	29		Oplach destilovanou vodou	
3	Impregnace dusičnanem diaminostříbrným (ve tmě)	4 hod	6	Barvení – jádrová červeně	5 - 10
	Promytí destilovanou vodou		7	Odvodnění	3
4	Stabilizace chloridem zlatitým (1% m/V roztok)	5	8	Projasnění	4
	Oplach destilovanou vodou		9	Montování preparátu – medium Pertex	

Výsledek barvení:

Argentafilní granula černá
 Jádra červeně

Barvicí metoda Eosin-Elastika (EEL)

Metoda zahrnuje 3 fáze barvení preparátu. Nejprve se barví tzv. Weigertovým roztokem (viz výše). Jádra se následně barví hematoxylinem a eosinem (viz metoda HE).

Postup a časový harmonogram barvení jsou uvedeny v tabulce 7. Kroky sušení preparátů, odparafinování, odvodnění, projasnění a montování jsou shodné se základní metodou Hematoxylin-eosin (HE), proto jsou znázorněny bez detailů.

Tabulka 7 Pracovní postup a časový snímek barvení preparátů metodou Eosin-Elastika

Krok č.	Operace	Doba (min)	Krok č.	Operace	Doba (min)
1	Sušení preparátů 56 °C		4	Barvení Hematoxylin Mayer	10

2	Odparafinování			Proplach H ₂ O - diferenciacce	10
3	Barvení - Weigert roztok	20	5	Barvení - eosin	2
	Proplach H ₂ O	1		Proplach H ₂ O	1
	Diferenciacce		6	Odvodnění	
	70 % ethanol	10 s	7	Projasnění	
	Kyselý alkohol	5 s	8	Montování preparátu – medium Pertex	
	70 % ethanol	5 s			
	Proplach H ₂ O	1			

Výsledek barvení:

Jádra buněk modročerná
Svalovina žlutě
Elastická vlákna fialově-červená

Úsek III - Skládání do desek

Zhotovené preparáty skládají laborantky do desek, provádějí zpětnou kontrolu počtu preparátů, vykázaných kódů pro zdravotní pojišťovny. Pověřená laborantka provádí interní kontrolu kvality preparátů (10% z celkového počtu).

Laborantky označí svou parafou na histologické žádance na kterém úseku pracovaly s histologickým materiálem.

Úsek III - Zadávání průvodek do NIS

V odpoledních hodinách laborantka zapisuje postupně podle pořadových bioptických čísel nové průvodní listy do nemocničního informačního systému. Jeho součástí je také Bioptická kniha, kam se kromě údajů o pacientovi, zapisuje počet bločků, preparátů a druhy barvení. Po vytištění Bioptické knihy se provede zpětná kontrola správnosti zapsaných údajů a listy se archivují.

4.2.3. *Vyhodnocení hotového preparátu*

Vyšetření odebraného tkáňového vzorku vede k bioptické diagnóze. Diagnózu formuluje kvalifikovaný patolog. Bioptická diagnóza poskytne klinikovi významné informace pro terapii. Nález patologa se vztahuje především ke změnám v místě excize, má proto své limity. Pokud bioptická diagnóza rozpozná nádor a jeho vlastnosti, kombinací makroskopického a mikroskopického vyšetření umožňuje většinou rozpoznat rozsah nádorového infiltrátu a zjistit, zda nádor byl vyjmut až do zdravé tkáně. Mikroskopické vyšetření provádějí lékaři zpravidla v odpoledních hodinách.

4.3. Imunohistologické vyšetření antigenů

O imunohistologické vyšetření pro upřesnění diagnózy žádá patolog po vyšetření vzorků základní barvicí metodou (kap. 4.2.). Imunohistologické vyšetření provádí laborantka specialista na samostatném úseku laboratoře.

Princip metody

Principem je reakce antigenu a specifické protilátky a jejich vzájemná vazba. Tuto vazbu s navázanou protilátkou je možno znázornit detekčním činidlem.

Reagencie

- PBS pufr pH 7,4 (Phosphate Buffer Saline; složení (m/V): 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na₂HPO₄, 0,024% KH₂PO₄),
- citrátový pufr pH 6,
- EDTA-Pufr pH 9,
- detekční systém SuperVision1 HPR,
- DAB dvousložkový kit (3,3'-diaminobenzidin, peroxidasa),
- hematoxylin.

Primární protilátky

Vyšetření kožních excizi se provádí s protilátkami Melanosome-HMB-45 a S100. Další používané protilátky: Aktin, desmin, vimentin, CD3, CD30, CD20, CD45, Cytokeratin HMW, Cytokeratin A1/A3, Cytokeratin 20, Cytokeratin 7, KI-67, HP

Protilátka HMB45

Tato protilátka je užitečná pro identifikaci melanocytů s tvorbou nezralých melanosomů v normální kůži, nervu a tkáni melanomu. Pozitivní výsledky napomáhají klasifikaci melanomů a melanocytických lézí a také napomáhají při rozlišení metastatických melanomů od jiných špatně diferencovaných nádorů nejasného původu.

Protilátka S100

Tato protilátka značí buňky produkující S 100 protein. Též je vhodná k identifikaci S100 pozitivních neoplazmat, jako je například maligní melanom.

Postup zpracování preparátu

Postup a časový harmonogram imunohistologického zpracování preparátů jsou uvedeny v tabulce 8. Kroky odparafinování a převedení do destilované vody, odvodnění

a montování jsou shodné se základní metodou Hematoxylin-eosin (HE), proto jsou znázorněny bez detailů.

Tabulka 8 Pracovní postup a časový snímek zpracování imunohistologického preparátu

Krok č.	Operace	Doba (min)	Krok č.	Operace	Doba (min)
1	Odparafinování		6	Super Vision1-HPR	20
2	Odmaskování epitopů *	15		Oplach puřrem PBS	3
3	Chlazení při pokojové teplotě	30	7	DAB dvousložkový kit (1 ml puřru+2 kapky DAB chromogen)	15
4 **	Blokování (inhibice) endogenní peroxidázy 3 % H ₂ O ₂	10		Oplach pod tekoucí vodou	
	Oplach puřrem PBS	3	8	Dobarvení jader hematoxylinem	10
5	Aplikace primární protilátky	30		Oplach v tekoucí H ₂ O	10
	Oplach puřrem PBS	3	9	Odvodnění	
			10	Montování preparátu – medium Pertex	

* Odmaskování epitopů se provádí ve vodní lázni. Podle typu protilátky se volí puřr pH 9 nebo pH 6. Sklíčka se inkubují v kyvetě s puřrem při teplotě 96 – 98 °C

** Kroky 4 – 8 se provádějí ve vlhké komoře

Výsledek barvení:

Jádra modrá

Pozitivní reakce tmavě hnědé až černé zbarvení

Vyhodnocení hotového preparátu

Diagnózu formuluje kvalifikovaný patolog. Detekcí tkáňového původu nádoru lze rozpoznat, zda se jedná o lymfatickou, epiteliální nebo mezenchymální neoplazii. Dalším krokem je hledání bliřších znaků jednotlivých tkání, z nichž by nádor mohl vycházet. Těmito znaky jsou orgánové či tkáňové specifické diferenační antigeny. Širší spektrum výběru protilátek poskytují pracoviště univerzitního typu, která v nutných případech slouží jako konziliární pracoviště.

Řízení jakosti

- O každém vyšetření se provádí zápis do sešitu Seznam vyšetření imunohistochemie. Záznam obsahuje tyto údaje: číslo vyšetřovaného vzorku, typ použité protilátky, číslo kontrolního vzorku, datum, jméno laborantky.
- Seznam nových činidel je sešit, kde jsou uvedeny všechny nové protilátky a sety. Jsou evidována tato data: číslo šarže (LOT kód), doba expirace, datum otevření nového činidla, datum verifikace.
- Protilátky a detekční set se používají validované od firmy DCS
- Verifikace se provádí pravidelně při zakoupení nového činidla nebo podle verifikačního plánu 1x ročně.
- Použití starých fixačních roztoků, prošlých činidel a použití nadměrně vysoké teploty během zalévání do parafínu mají negativní vliv na kvalitu a vypovídací schopnost výsledků.
- Nesprávná fixace, zmrazení, rozmrazení, promývání, vyschnutí řezů mohou být příčinou vzniku artefaktů nebo falešně negativních výsledků.
- Je nutné pravidelné provedení kontrolních vyšetření za použití kontrolních vzorků.
- Pokud nelze předpokládat přítomnost prokazované tkáně ve vzorku, je třeba použít kontrolního preparátu. O výběru kontrolního preparátu rozhoduje lékař.
- Typy tkání pro pozitivní kontroly uvádí tabulka 9

Tabulka 9 Typy tkání používaných pro pozitivní imunohistologickou kontrolu

Primární protilátka	Tkáň pro pozitivní kontrolu
Aktin	střevo
Desmin	kůže
Vimentin	kůže
CD3	uzlina
CD30	uzlina s lymfogranulomem
CD20	uzlina
CD45	uzlina
Melanosome-HMB-45	melanom
CytokeratinHMW	prostata
Cytokeratin 7	mandle

Cytokeratin 20	apendix
Cytokeratin A1/A3	kůže
S100	nervová tkáň
Ki 67	mandle

Dokumentace, zpracování a vydávání výsledků

- Zapisování výsledků do Nemocničního informačního systému (NIS) - v dopoledních hodinách dalšího dne dopisuje referentka diagnózy.
- Po jejich zapsání vytiskne výsledky na zadní stranu průvodních listů.
- Patolog, který diagnózu vyhotovil, provádí kontrolu textu a následně podepisuje výsledky.
- Pokud je diagnostikován zhoubný nádor, kopie výsledků se posílají také do Centra klinické onkologie v Č. Budějovicích a na onkologii v NT.
- Originál průvodky, kde jsou také údaje o postupech zpracování vzorku v laboratoři se na oddělení archivuje.
- Autorizace výsledku v NIS probíhá spuštěním programu "Denní chod "; tím se také výsledky přenesou elektronicky na příslušná oddělení.
- V textové podobě je odesílání výsledků zajišťováno podatelnou nemocnice,

Archivace dat

- Výsledky jsou na oddělení uchovávány ve spisovně podle platného skartačního řádu NT_RAD_06.
- Parafínové bločky jsou uchovávány na oddělení minimálně 10 let v úložišti bloků, zde je možno kdykoliv dohledat požadovaný blok na dodatečné laboratorní vyšetření.
- Preparáty jsou archivovány na oddělení 5 let v archivních skříních.
- Po uplynutí archivační doby jsou bloky a preparáty likvidovány v souladu s NT_SM_07 Provozní řád a nakládání s odpadem.

Obrazová dokumentace aktuálně používaných přístrojů a zařízení bioptické laboratoře oddělení patologie Nemocnice Tábor a.s. je zobrazena v příloze 1.

5. Výsledky a diskuse

5.1 Kožní nádory

Nemocnice Tábor a.s. má již řadu let zavedenu diagnostiku nádorových onemocnění, včetně diagnostiky různých typů karcinomů kůže. Cílem práce je zobrazení a diskuse některých typických diagnostických preparátů kožních excízi a statistické zhodnocení výskytu vybraných nádorů kůže v pětiletých intervalech mezi lety 2007 a 2017.

Tato práce se zabývá výskytem maligních melanomů, maligních bazocelulárních karcinomů různého typu a spinocelulárních karcinomů. Vedle toho jsou ještě pro úplnost zahrnuty i tzv. karcinomy *in situ* (*carcinoma in situ*), což znamená karcinom lokalizovaný v místě svého vzniku bez prorůstání do dalších tkání. U těchto karcinomů je prognóza výrazně lepší.

V tabulce 10 je pro orientaci uveden počet bioptických preparátů, které laboratoř Nemocnice Tábor a.s. zpracovávala ve výše uvedených letech.

Tabulka 10 Celkový počet biopsií Nemocnice Tábor a.s.

Rok	Počet biopsií	Nárůst v %
2007	8223	100
2012	8325	101
2017	8992	109

Z tabulky je vidět velmi mírný nárůst celkového počtu zpracovávaných vzorků. Tento údaj ale není relevantní pro posouzení trendu výskytu nádorových onemocnění.

Pro klasifikaci kožních nádorů se běžně využívá Mezinárodní klasifikace nemocí pro onkologii (MKN-O). Klasifikace se vyjadřuje šestimístním kódem s lomítkem (poslední číslo kódu je nepovinné). První čtyřčíslí označuje morfologický typ karcinomu, přičemž karcinomy jsou seřazeny podle typů. Např. 809X až 811X označuje skupinu bazocelulárních nádorů, 872X-879X je skupina névů a melanomů atd. První číslice za lomítkem pak označuje biologické chování nádoru, které znázorňuje tabulka 11. Druhá číslice za lomítkem (volitelná) označuje diferenciaci nádoru.

Tabulka 11 Typy nádorů podle biologického impaktu

Číselné označení	Typ nádoru
0	Benigní tumor
1	Nejisté chování, není jisté, zda jde o nádor benigní nebo maligní
2	Tumor <i>in situ</i> , neinvazivní
3	Maligní tumor, primární
6	Maligní tumor, metastatický
9	Maligní tumor, nelze určit původ

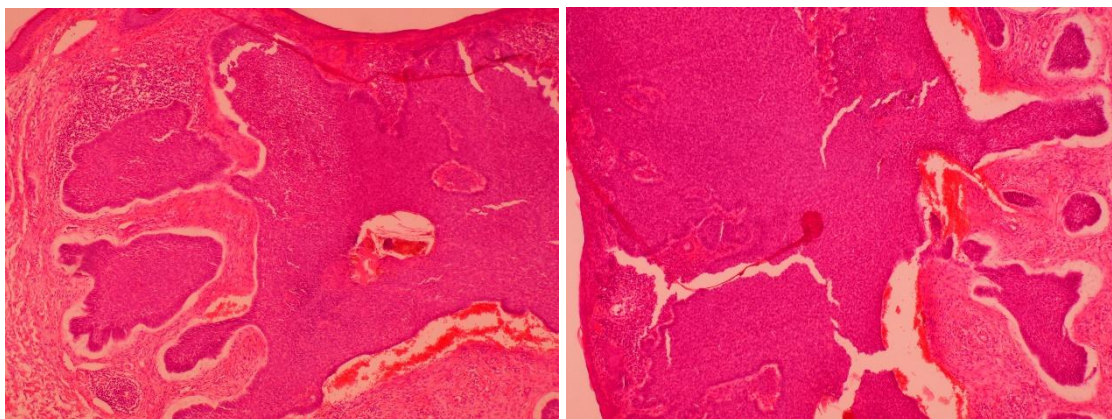
V práci byly sledovány následující typy kožních karcinomů – viz tabulka 12

Tabulka 12 Klasifikace dle MKN-O kožních nádorů diagnostikovaných na patologii Nemocnice Tábor a.s.

Kód	Typ nádoru
8070/3	Spinaliom, syn. karcinom dlaždicový
8090/3	Karcinom bazocelulární, syn. bazaliom
8091/3	Karcinom bazocelulární, multicentrický
8093/3	Karcinom bazocelulární, fibroepiteliální
8095/3	Karcinom metatypický
8720/3	Melanom maligní, syn. melanoblastom maligní

5.2. Diagnostické preparáty kožních nádorů

Některé typy kožních nádorů ve formě diagnostických preparátů jsou formou mikrofotografií znázorněny na následujících obrázcích.



Obr. 12 Mikrofotografie diagnostikovaného bazocelulárního karcinomu

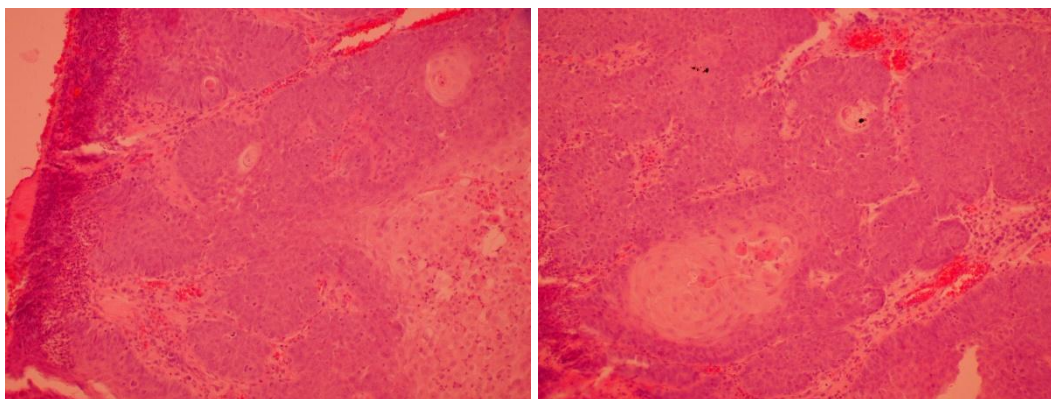
Barvení: Hematoxylin – Eosin (HE)

Výsledek barvení:

Jádra buněk a bazofilní struktury modrá

Ostatní části preparátu odstínově červené

Odstíny červené barvy a tvary kontur umožňují identifikaci bazocelulárního karcinomu.



Obr.13 Mikrofotografie diagnostikovaného spinocelulárního karcinomu

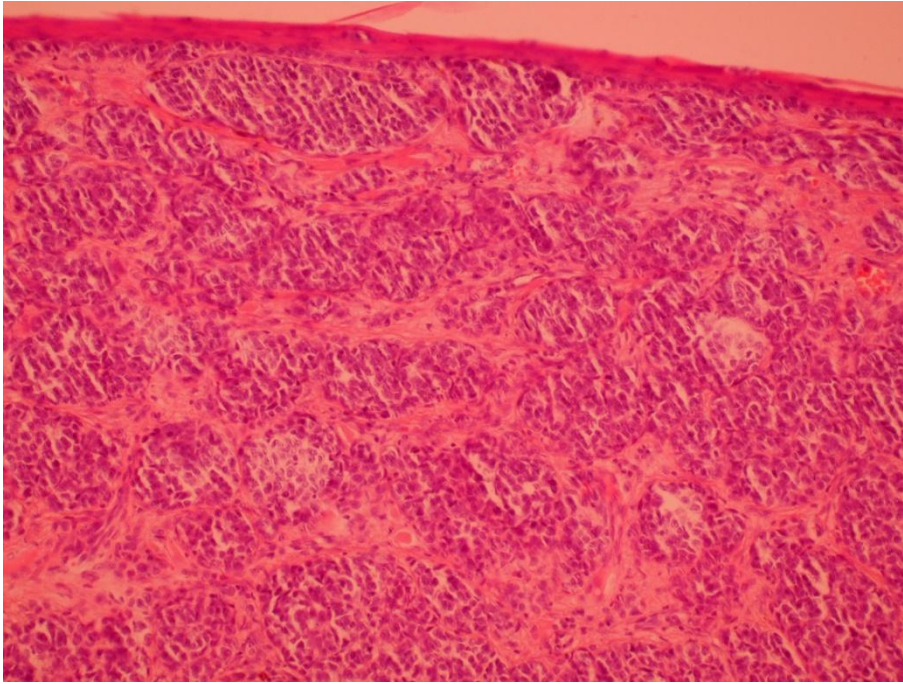
Barvení: Hematoxylin – Eosin (HE)

Výsledek barvení:

Jádra buněk a bazofilní struktury modrá

Ostatní části preparátu odstínově červené

Odstíny červené barvy a tvary kontur umožňují identifikaci spinocelulárního karcinomu.



Obr. 14 Mikrofotografie diagnostikovaného melanomu

Barvení: Hematoxylin – Eosin (HE)

Výsledek barvení:

Jádra buněk a bazofilní struktury modrá

Ostatní části preparátu odstínově červené

Odstíny červené barvy a tvary kontur umožňují alespoň předběžnou identifikaci melanomu. Pro verifikaci diagnózy je nutno využít preparát s jiným typem barvení a imunohistologické preparáty.



Obr. 15 Mikrofotografie diagnostikovaného melanomu

Barvení: Masson

Výsledek barvení:

Argentafilní granula černá

Jádra červená

Tmavě hnědé až černé zbarvení argentafileních granulí a tvary kontur umožňují alespoň předběžnou identifikaci melanomu. Pro verifikaci diagnózy je nutno využít imunohistologické preparáty.

5.3. Kožní nádory v Nemocnici Tábor a.s.

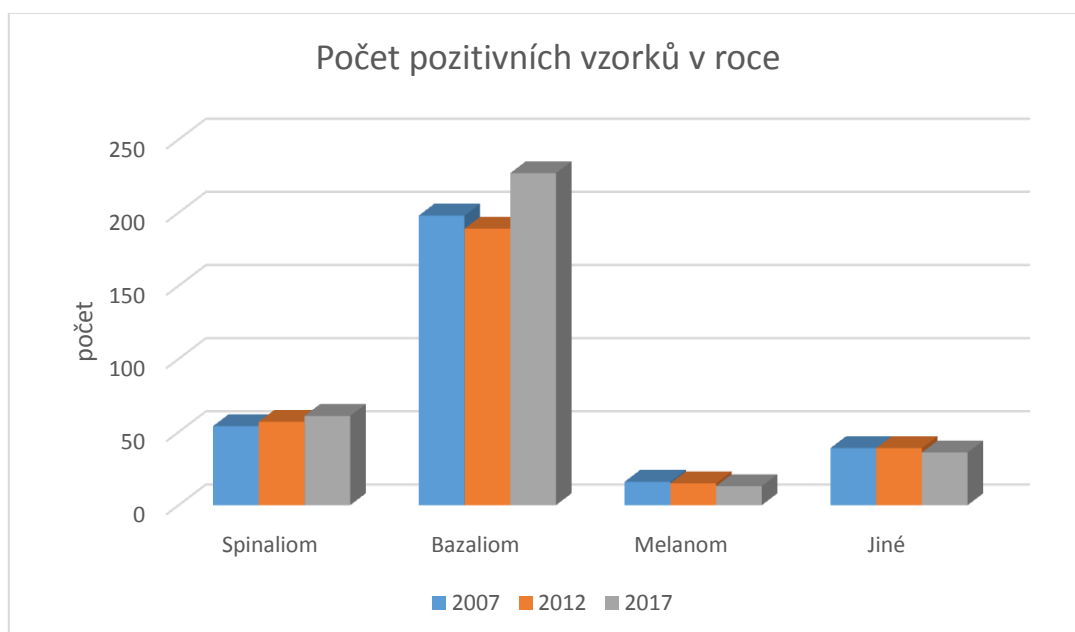
Následující tabulka mapuje počty vzorků různých typů maligních nádorů diagnostikovaných na patologii Nemocnice Tábor a.s. v letech 2007 až 2017.

Tabulka 13 Maligní nádory diagnostikované na patologii Nemocnice Tábor a.s.

Kód	Zjednodušené označení	Počet pozitivních vzorků v roce		
		2007	2012	2017
8070/3	Spinaliom	54	57	61
8090/3	Bazaliom - Karcinom bazocelulární	149	125	147
8091/3	Bazaliom - Karcinom bazocelulární, fibroepiteliální	34	46	50
8093/3	Karcinom bazocelulární, fibroepiteliální	2	10	20
8095/3	Bazaliom - Karcinom metatypický	13	8	10
	Bazaliom celkem	198	189	227
8720/3	Melanom	16	15	13
	Jiné	39	39	36
	Maligní nádory celkem	307	300	337

Poznámka: Položka Jiné zahrnuje různé další karcinomy kůže, např. verukózní karcinom, Kaposiho sarkom, karcinom Merkelových buněk aj.

Následující graf dokumentuje trend výskytu karcinomů dle hodnot uvedených v předchozí tabulce.



Obr. 18 Maligní nádory diagnostikované na patologii Nemocnice Tábor a.s.

Literatura (např. Didona et al, 2018; Lai et al, 2018; Hosseini et al, 2017) poměrně často uvádí, že počet kožních nádorů v posledních letech roste, hlavně v souvislosti s expozicí slunečnímu záření. Uvedené údaje vedly k vytvoření hypotézy, že by i v Nemocnici Tábor a.s. měl být vyšší počet diagnostikovaných maligních nádorů.

K ověření této hypotézy byly využity údaje uvedené v tabulce 14. Bylo nutno prokázat, že mezi soubory z jednotlivých let existuje statisticky významný rozdíl na hladině $p = 0,05$ (95 % hladina pravděpodobnosti). Pro tento účel byl využit jednoduchý statistický t-test, který umožňuje porovnat soubory s nehomogenními parametry. Výsledky statistického hodnocení uvádí následující tabulka.

Tabulka 14 Dvouvýběrový párový t-test na střední hodnotu ($p = 0,05$)

Rok	2007 - 2012	2012 - 2017	2007 - 2017
Pearsonův koeficient korelace	0,9962	0,9983	0,9956
t stat	0,83151	-2,27496	-1,97294
t krit	1,894458	1,89458	1,89458
Statisticky významný rozdíl	ne	ano	ano

Z výsledků uvedených v tabulce 14 je vidět, že mezi soubory v intervalu let 2007 a 2012 není statisticky významný rozdíl a případný nárůst počtu diagnostikovaných kožních nádorů nelze potvrdit. Naopak, statisticky významný rozdíl je mezi počty diagnostikovaných kožních nádorů v pětiletém intervalu 2012 až 2017 a i v desetiletém intervalu 2007 – 2017. To znamená, že výše uvedená hypotéza byla potvrzena jen částečně.

Prokázaný nárůst počtu diagnostikovaných kožních nádorů je jevem samozřejmě velmi nepříznivým. Pozitivní ale je, že prakticky veškerý nárůst je dán nárůstem počtu nejméně závažných bazocelulárních karcinomů, zatímco počet závažnějších spinocelulárních karcinomů, melanomů a jiných kožních nádorů v uvedeném časovém rozmezí stagnoval.

Je nutno zdůraznit, že uvedená statistika má velmi omezenou platnost. Platí pouze pro Nemocnici Tábor a.s., nejde zevšeobecnit ani pro jihočeský kraj a již vůbec ne pro celou ČR. Pro takové zevšeobecnění nejsou k dispozici dostatečná data. Navíc by bylo

vhodné doplnit uvedená data ještě demografickými daty (spádovost nemocnice, počet obyvatel a jejich průměrný věk v regionu spádové nemocnice), která ale nejsou k dispozici.

Pro doplnění jsou uvedeny ještě počty diagnostikovaných karcinomů *in situ* – tabulka 15

Tabulka 15 Nádory *in situ* diagnostikované na patologii Nemocnice Tábor a.s

Název	Počet pozitivních vzorků v roce		
	2007	2012	2017
Melanom <i>in situ</i>	5	7	5
Ostatní karcinomy <i>in situ</i>	14	4	27

6. Závěr

Cíle práce, specifikované v zadání bakalářské práce a v kapitole 3, byly splněny.

- ✓ V teoretické části práce jsou charakterizovány nejvíce se vyskytující maligní kožní nádory (melanom, spinocelulární karcinom a bazocelulární karcinom), krátce jsou zmíněny i méně časté typy maligních nádorů a prekancerosy. Je mapována jejich incidence, patogenita, morfologie, schopnost invazivního růstu i potenciální metastatická aktivita. Mapovány jsou ovlivnitelné a neovlivnitelné rizikové faktory vzniku a rozvoje maligních nádorů kůže. V této části je zpracován i přehled přírodních sloučenin, které vykazují určitou inhibiční aktivitu vůči maligním kožním karcinomům.
- ✓ V metodické části je popsána technika, možnosti a konkrétní realizace histologického a imunohistologického vyšetření kožních karcinomů v oddělení patologie Nemocnice Tábor a.s.
- ✓ Byly zpracovány vybrané případy kožních excizí a pomocí několika diagnostických metod připraveny preparáty vhodné pro spolehlivé stanovení diagnózy. V jedné excizi byl standardním barvením hematoxylin – eosin diagnostikován bazocelulární karcinom, stejné barvení pomohlo k diagnostice spinocelulárního karcinomu u druhé excize. Pro diagnostiku melanomu byly použity dva typy histologického barvení a oba používané typy imunohistologického zobrazení. Všechna zobrazení jsou dokumentována pomocí mikrofotografií.
- ✓ Na příkladu výše uvedených zobrazení bylo prokázáno, že při dodržení zásad Správné laboratorní praxe a dodržení Standardních operačních postupů lze připravit diagnostické preparáty standardní kvality, které umožní stanovit diagnózu s nejvyšší mírou spolehlivosti. Tím byla potvrzena první hypotéza.
- ✓ Z údajů v registru byly mapovány počty a typy maligních kožních karcinomů diagnostikovaných v Nemocnici Tábor a.s. v pětiletých intervalech 2007 – 2017. Pro klasifikaci kožních nádorů byla využita Mezinárodní klasifikace nemocí pro onkologii (MKN-O).
- ✓ Získané údaje byly podrobeny statistickému hodnocení pomocí t-testu na hladině pravděpodobnosti 95 %. Statistická analýza prokázala statisticky významný nárůst počtu diagnostikovaných kožních nádorů mezi lety 2012 a 2017, zatímco rozdíl

mezi lety 2007 a 2012 nebyl statisticky významný. Z toho vyplývá, že druhá hypotéza byla potvrzena jen částečně.

7. Literatura

- AZIZ S.W., AZIZ M.H., 2018. Protective molecular mechanisms of resveratrol in UVR-induced Skin carcinogenesis. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 34 (1), 35 – 41; DOI: 10.1111/phpp.12336
- BACAJ P., BURCH D., 2018. Human Papillomavirus Infection of the Skin. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 142 (6), 700 – 705; DOI: 10.5858/arpa.2017-0572-RA
- BANDARCHI B., JABBARI C.A., VEDADI A., NAVAB R., 2013. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *Journal of Clinical Pathology* 66 (8), 644-648; DOI: 10.1136/jclinpath-2013-201471
- BERKING C., HAUSCHILD A., KOLBL O., MAST G., GUTZMER R., 2014. Basal Cell Carcinoma—Treatments for the Commonest Skin Cancer. *Deutsches Arzteblatt International* 111 (22), 389 – 395; DOI: 10.3238/arztebl.2014.0389
- BJORKLUND G., AASETH J., CHIRUMBOLO S., URBINA M.A., UDDIN R., 2018. Effects of arsenic toxicity beyond epigenetic modifications. *Environmental Geochemistry and Health* 40 (3), 955-965; DOI: 10.1007/s10653-017-9967-9
- CADET J., DOUKI T., 2018. Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochemical & Photobiological Sciences* 17 (12), 1816-1841; DOI: 10.1039/c7pp00395a
- DIDONA D., PAOLINO G., BOTTONI U., CANTISANI C., 2018. Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. *Biomedicines* 6 (1), Article No. 6; doi:10.3390/biomedicines6010006
- FAIT V., 2006. Nádory kůže. Státní zdravotní ústav, Praha, 2006
- FERNANDES A.R., SANTOS A.C., SANCHEZ-LOPEZ E., KOVAČEVIĆ A.B., ESPINA M., CALPENA A.C., VEIGA F.J., GARCIA M.L., SOUTO E.B., 2018. Neoplastic Multifocal Skin Lesions: Biology, Etiology, and Targeted Therapies for Nonmelanoma Skin Cancers. *Skin Pharmacology and Physiology* 31(2), 59–73; DOI: 10.1159/000479529
- FRANCIS S.O., MAHLBERG M.J., JOHNSON K.R., MING M.E., DELLAVALLE R.P., 2006. Melanoma chemoprevention. *Journal of the American Academy of Dermatology* 55 (5), 849-861; DOI: 10.1016/j.jaad.2006.04.014

- FUJIKI H., WATANABE T., SUEOKA E., RAWANGKAN A., SUGANUMA M., 2018. Cancer Prevention with Green Tea and Its Principal Constituent, EGCG: from Early Investigations to Current Focus on Human Cancer Stem Cells. *Molecules and Cells* 41 (2), 73 – 82; DOI: 10.14348/molcells.2018.2227
- GONZÁLEZ-VALLINAS M., REGLERO G., RAMÍREZ DE MOLINA A., 2015. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract as a Potential Complementary Agent in Anticancer Therapy. *Nutrition and Cancer*, 67 (8), 1223-1231; DOI: 10.1080/01635581.2015.1082110
- GORDON R., 2013. Skin Cancer: An overview of epidemiology and risk factors. *Seminars in Oncology Nursing*, 29 (3), 160-169; doi:10.1016/j.soncn.2013.06.002
- GÜNTHER T., GRUNDHOFF A., 2017. Epigenetic manipulation of host chromatin by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus: a tumor-promoting factor? *Current Opinion in Virology* 26, 104–111; DOI: 10.1016/j.coviro.2017.07.018
- HART P.H., NORVAL M., 2018. Ultraviolet radiation-induced immunosuppression and its relevance for skin carcinogenesis. *Photochemical & Photobiological Sciences* 17 (12), 1872-1884; DOI: 10.1039/c7pp00312a
- HOSSEINI M., KASRAIAN Z., REZVANI H.R., 2017. Energy metabolism in skin cancers: A therapeutic perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* 1858 (8), 712–722; DOI: 10.1016/j.bbabi.2017.01.013
- CHENG J., YAN S.F., 2016. Prognostic variables in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: a review. *Journal of Cutaneous Pathology* 43 (11), 994 – 1004; DOI: 10.1111/cup.12766
- IMRAN M., NADEEM M., GILANI S.A., KHAN S., SAJID M.W., AMIR R.M., 2018. Antitumor Perspectives of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol: Recent Updates. *Journal of Food Sciences* 83 (7), 1781-1791; DOI: 10.1111/1750-3841.14198
- IQBAL J., ABBASI B.A., AHMAD R., BATOOL R., MAHMOOD T., ALI B., KHALIL A.T., KANWAL S., SHAH S.A., ALAM M.M., BASHIR S., BADSHAH H., MUNIR A., 2019. Potential phytochemicals in the fight against skin cancer: Current landscape and future perspectives. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 109, 1381–1393; DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.107
- KARLSON P., GEROK W., GROSS W., 1987. Pathobiochemie. Academia, Praha
- KERVERREC T., SAMIMI M., GABORIAUD P., GHEIT T., BEBY-DEFAUX A., HOUBEN R., SCHRAMA D., FROMONT G., TOMMASINO M., LE CORRE Y.,

- HAINAUT-WIERZBICKA E., AUBIN F., BENS G., MAILLARD H., FURUDOI A., MICHENET P., TOUZÉ A., GUYÉTANT S., 2018. Detection of the Merkel cell polyomavirus in the neuroendocrine component of combined Merkel cell carcinoma. *Virchows Archiv* 472 (5), 825–837, 2018; DOI: 10.1007/s00428-018-2342-0
- KURODA Y., HARA Y., 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Research* 436 (1), 69–97; DOI: 10.1016/S1383-5742(98)00019-2
- LAI V., CRANWELL W., SINCLAIR R., 2018. Epidemiology of skin cancer in the mature patient. *Clinics in Dermatology* 36 (2), 167–176; DOI: 10.1016/j.clindermatol.2017.10.008
- LEVICAN J., ACEVEDO M., LEÓN O., GAGGERO A., AGUAYO F., 2018. Role of BK human polyomavirus in cancer. *Infectious Agents and Cancer* 13, Article Number 12; DOI: 10.1186/s13027-018-0182-9
- MANTZOROU M., PAVLIDOU E., VASIOS G., TSAGALIOTI E., GIAGINIS C., 2018. Effects of curcumin consumption on human chronic diseases: A narrative review of the most recent clinical data. *Phytotherapy Research* 32 (6), 957–975; DOI: 10.1002/ptr.6037
- MAREŠ J., 2015. Fyziologie a patofyziologie buňky. In: Fyziologie a patologická fyziologie pro klinickou praxi, Rokyta R., Ed. Grada Publishing, Praha, 2015; ISBN 978-80-247-4867-2
- MARROT L., MEUNIER J.-R., 2008. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *Journal of the American Academy of Dermatology* 58 (5), S139–S148; DOI: 10.1016/j.jaad.2007.12.007
- MERCK, 2019. Pikrofuchsin, roztok dle van Giesona.
http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/product/Picrofuchsin-solution-acc.-to-van-Gieson,MDA_CHEM-100199 (staženo 7.4.2019)
- NAŘÍZENÍ 2015/1006, 2015. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2015/1006 ze dne 25. června 2015, kterým se mění nařízení (ES) č. 1881/2006, pokud jde o maximální limity anorganického arsenu v potravinách. EU, Brusel, 25.6.2015; <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32015R1006>
- NT_OSM_PAT_100, 2018. Histologické vyšetření tkání a diagnostika, SOPV 01. Nemocnice Tábor, a.s.

- OHSIE S.J., SARANTOPOULOS G.P., COCHRAN A.J., BINDER S.W., 2008. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology* 35 (5), 433-444; DOI: 10.1111/j.1600-0560.2007.00891.x
- PALICH FUČÍKOVÁ J., 2019. Imunoterapie: přítomnost a budoucnost. Přednáška pro Učenou společnost ČR, Akademie věd ČR, Praha, 19.2.2019
- PENTA D., SOMASHEKAR B.S., MEERAN S.M., 2018. Epigenetics of skin cancer: Interventions by selected bioactive phytochemicals. *Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine* 34 (1), 42–49; DOI: 10.1111/phpp.12353
- POKORNÝ J., PÁNEK J., 2012. The effect of natural antioxidants in herbs and spices on food shelf-life. In: Handbook of Herbs and Spices, 2nd Edition, Vol. 2, K.V.Peter, Ed., Woodhead Publishing, Cambridge, UK; ISBN 978-0-85709-040-9
- ROY J.S., CHATTERJEE D., DAS N., GIRI A.K., 2018. Substantial Evidences Indicate That Inorganic Arsenic Is a Genotoxic Carcinogen: a Review. *Toxicological Research* 34 (4), 311-324; DOI: 10.5487/TR.2018.34.4.311
- SAILO B.L., BANIK K., PADMAVATHI G., JAVADI M., BORDOLOI D., KUNNUMAKKARA A.B., 2018. Tocotrienols: The promising analogues of vitamin E for cancer therapeutics. *Pharmacological Research* 130, 259–272; DOI: 10.1016/j.phrs.2018.02.017
- SILBERNAGL S., LANG F., 2012. Atlas patofyziologie. Grada Publishing, Praha; ISBN 978-80-247-3555-9
- SIMOES M.C.F., SOUSA J.J.S., PAIS A.A.C.C., 2015. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Letters* 357 (1), 8–42; DOI: 10.1016/j.canlet.2014.11.001
- ŠIFFNEROVÁ H., 2015. Kožní karcinom z Merkelových buněk. XXII. Jihočeské onkologické dny, České Budějovice, 15.-17.10.2015 (dostupné <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/kozni-karcinom-z-merkelovych-bunek/>)
- ULDRICK T.S., WHITBY D., 2011. Update on KSHV epidemiology, Kaposi Sarcoma pathogenesis, and treatment of Kaposi Sarcoma. *Cancer Letters* 305 (2), 150–162; DOI: 10.1016/j.canlet.2011.02.006
- VOSMÍK F., 2008. Kožní nádory. In: Dermatovenerologie, Štork J., Ed. Galén, Karolinum, Praha; ISBN 978-80-246-1360-4

- WANG K.Q., JIANG H., LI W.S., QIANG M.Y., DONG T.X., LI H.B., 2018. Role of Vitamin C in Skin Diseases. *Frontiers in Physiology* 9, Article Number: 819, 2018; DOI: 10.3389/fphys.2018.00819
- WEBPATH, 2019. Elastic Tissue Fibers – Weigert’s Resorcin – Fuchsin. <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/WEIGERTS.PDF> (staženo 08.4.2019)
- WERNER R.N., SAMMAIN A., ERDMANN R., HARTMANN V., STOCKFLETH E., NAST A., 2013. The natural history of actinic keratosis: a systematic review. *British Journal of Dermatology* 169 (3), 502–518, 2013; DOI: 10.1111/bjd.12420
- WINDON A.L., SHROFF S.G., 2018. Iatrogenic Kaposi's Sarcoma in an HIV-Negative Young Male With Crohn's Disease and IgA Nephropathy: A Case Report and Brief Review of the Literature. *International Journal of Surgical Pathology* 26 (3), 276-282, 2018; DOI: 10.1177/1066896917736610
- WWW.LINKOS, 2019. <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/maligni-melanom-spinaliom-bazaliom-c43-44-d03/maligni-melanom-a-ostatni-nadory-kuze/#anatomie>. Staženo 05.4.2019
- WWW.LINKOS2, 2019. <https://www.linkos.cz/slovnicek/imiquimod-ucinna-latka/>. Staženo 09.4.2019
- YANAGI T., KITAMURA S., HATA H., 2018. Novel Therapeutic Targets in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology* 8, Article 79; doi: 10.3389/fonc.2018.00079
- YANG L.Y., XIAN D.H., XIONG X., LAI R., SONG J., ZHONG J.Q., 2018. Proanthocyanidins against Oxidative Stress: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *BioMed Research International* 2018, Article ID 8584136; DOI: 10.1155/2018/8584136
- ZHOU Q., XI S.H., 2018. A review on arsenic carcinogenesis: Epidemiology, metabolism, genotoxicity and epigenetic changes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 99, 78-88; DOI: 10.1016/j.yrtph.2018.09.010

8. Seznam příloh

Příloha 1

Obrazová dokumentace aktuálně používané přístrojové techniky a příslušenství
v bioptické laboratoři oddělení patologie Nemocnice Tábor a.s.

Příloha 1

Obrazová dokumentace aktuálně používané přístrojové techniky a příslušenství v bioptické laboratoři oddělení patologie Nemocnice Tábor a.s.



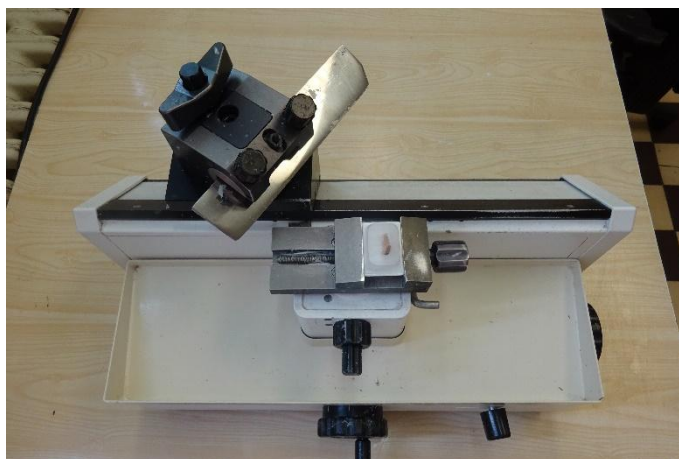
Obr. 19 Kazety pro přikrájené vzorky vkládané do autotechnikonu



Obr. 20 Tkáňový procesor („autotechnikon“) TP 1020 Automatic Tissue Processor (Leica Biosystems, Germany)



Obr. 21 Zalévací parafinová linka Leica EG 1150 H (Leica Biosystems, Germany) a formy na zalévání vzorků



Obr. 22 Sáčkový mikrotom Leica SM2000 R Sliding microtome (Leica Biosystems, Germany)



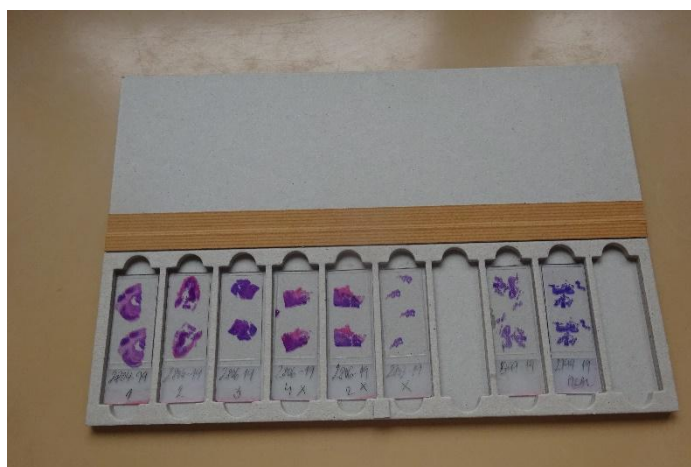
Obr. 23 Košík do barvicího automatu



Obr. 24 Barvicí a montovací automat TST 44.200C / ACS 720 (Medite GmbH, Germany)



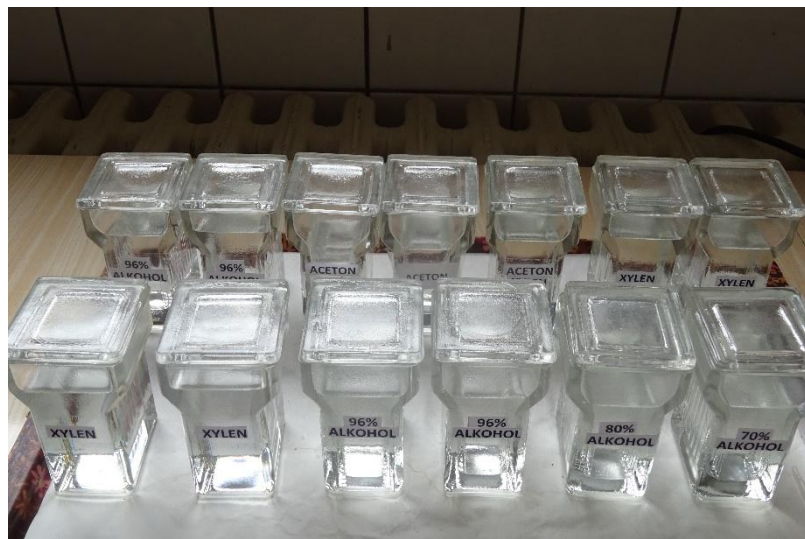
Obr. 25 Příklady preparátů po barvení HE



Obr. 26 Desky pro transport hotových preparátů



Obr. 27 Lázeň pro odmaskování epitopů při imunohistologii



Obr. 28 Sada lázně pro manuální odvodnění preparátu při imunohistologii