



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

Histologické vyšetření tlustého střeva

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Studijní program: SPECIALIZACE VE
ZDRAVOTNICTVÍ / ZDRAVOTNÍ LABORANT**

Autor: Karolína Fejková

Vedoucí práce: RNDr. Hana Bláhová

České Budějovice 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*histologické vyšetření tlustého střeva*“ 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

.....

Podpis

Poděkování

V těchto několika řádcích bych ráda poděkovala RNDr. Haně Bláhové, vedoucí laborantce patologicko – anatomického oddělení Nemocnice Jihlava p. o. za odborné rady a vedení při psaní mé bakalářské práce. Dále bych jí také chtěla poděkovat za její ochotu a strávený čas u konzultací a korekcí mé práce, za vstřícnost, pochopení a lidský přístup. Část mého poděkování také patří Mgr. Marcele Waldsbergerové, které vděčím za podporu a rady ohledně psaní bakalářské práce.

Histologické vyšetření tlustého střeva

Abstrakt

Předmětem této bakalářské práce je histologické vyšetření tlustého střeva se zaměřením na laboratorní diagnostiku kolorektálního karcinomu. Kolorektální karcinom je nejen v České Republice, ale i v celém světě aktuálním tématem a to především díky své neustále narůstající incidenci. Laboratorní diagnostika tohoto onemocnění má nejen diagnostický význam, ale díky určení typu a invazivního stádia nádoru má i dopad na následný terapeutický postup u pacienta. Imunohistochemické vyšetření tlustého střeva pak napomáhá k diagnostice Lynchova syndromu, který je dědičným onemocněním s vysokým rizikem vzniku kolorektálního karcinomu.

Z počátku se bakalářská práce zabývá zpracováním odborné rešerše na dané téma, které má nejen seznámit s danou problematikou související s kolorektálním karcinomem, ale má také z počátku uvést do anatomie, histologie a patologie tlustého střeva. Ke konci teoretické části lze najít i obecné seznámení s odběrem tkáně tlustého střeva a jeho zpracováním v histologické laboratoři. Tyto znalosti o histologickém zpracování tkáně tlustého střeva byly následně aplikovány a detailně popsány v metodice bakalářské práce. V této části se lze dozvědět o postupu rutinních barvicích metod jako je hematoxylin – eosin a barvení alciánovou modří. Dále je uvedena i manuálně prováděná imunohistochemická metoda a s ní související reagentie, jako například využití protilátky. Ve výsledcích lze pak nalézt statisticky zpracovaný soubor pacientů s kolorektálním karcinomem v Nemocnici Jihlava p. o. za rok 2018 – 2019. Pomocí těchto dat byl ověřen všeobecně udávaný fakt, že v počtu případů kolorektálního karcinomu převažují muži a také, že nejvíce je zasažena věková skupina od 60. do 70. let. Dále se pak podařilo ověřit, že defekt v MMR proteinech, který souvisí s Lynchovým syndromem nebyl prokázán ani u poloviny vyšetřovaných pacientů.

Klíčová slova

Kolorektální karcinom; hereditární nepolypózní kolorektální karcinom; tlusté střevo; histologie; imunohistochemie; MMR proteiny.

Histological examination of the colon

Abstract

This bachelor's thesis deals with histological examination of the colon, namely the laboratory diagnosis of colorectal cancer. Colorectal cancer is a highly relevant issue today not only in the Czech Republic, not least because of its continually growing incidence worldwide. Laboratory analysis of this disease is not only important from the aspect of diagnosis per se. Determining the type and invasive stage of the disease is also crucial for the therapeutic strategy in a given patient. Immunohistochemistry testing of the colon also aids in the diagnosis of Lynch syndrome, a hereditary disease with a high risk of colorectal cancer.

The first part of the thesis is theoretical and aims to introduce not only the subject of colorectal cancer but also the anatomical, histological and pathological features of the colon. This section also describes the methods used to obtain tissue samples from the colon and to process these in a histopathology laboratory. This information regarding the histopathological processing of colon tissue is then applied and described in detail in the methodology section of the thesis. This describes the process of routine staining methods such as haematoxylin-eosin and Alcian Blue. It also details the manually performed immunohistochemical methods and related reagents, including the use of antibodies. The next section presents a statistical analysis of a sample of patients with colorectal cancer treated at the Jihlava Hospital between 2018 and 2019. These data confirm the generally accepted fact that there is a higher incidence of colorectal cancer in men and that this cancer predominantly affects patients aged between 60 to 70 years. Furthermore, this work shows that defects in the MMR proteins associated with Lynch syndrome are not detected in even one half of the patients tested.

Key words

Colorectal cancer; hereditary nonpolyposis colorectal cancer; colon; histology; immunohistochemistry; MMR proteins.

Obsah

Úvod	8
1. Anatomie tlustého střeva	9
1.1 Úseky tlustého střeva	9
1.2 Histologická stavba stěny tlustého střeva.....	10
1.2.1 Sliznice tlustého střeva.....	10
1.2.2 Podslizniční vrstva	11
1.2.3 Svalová vrstva	11
1.2.4 Adventitia.....	11
2. Patologie tlustého střeva	12
2.1 Střevní záněty.....	12
2.1.1 Idiopatická zánětlivá střevní onemocnění	12
2.2 Megacolon.....	13
2.3 Divertikly	14
2.4 Benigní nádory tlustého střeva.....	14
2.5 Kolorektální karcinom (CRC).....	14
2.5.1 Symptomatologie	15
2.5.2 Epidemiologie CRC	15
2.5.3 Etiologie CRC	17
3. Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom).....	19
3.1 Charakteristika HNPCC	19
3.2 Genetika u HNPCC	19
3.3 Diagnostika HNPCC	20
3.3.1 Imunohistochemie (IHC) a její postavení v diagnostice HNPCC.....	21
4. Odběr biotického materiálu k vyšetření CRC.....	23
4.1 Endoskopická resekce	23
4.2 Kolektomie.....	23
5. Histologické metody užívané v biotické diagnostice	25
5.1 Příprava materiálu pro laboratorní zpracování.....	25
5.2 Zpracování tkáně před samotným barvením	25
5.3 Histologické barvení řezů	26
5.4 Imunohistochemické barvení	26
5.4.1 Imunoglobuliny	27
5.4.2 Antigen.....	27
6. Cíl práce a výzkumné otázky	29
6.1 Cíl práce	29
6.2 Hypotézy	29
7. Metodika práce.....	30
7.1 Materiál a jeho prvotní zpracování před samotným barvením.....	30

7.1.1	Odběr materiálu a jeho fixace	30
7.1.2	Přijmutí tkáně a zhotovení preparátů před samotným barvením.....	30
7.2	Přístroje a pomůcky použité k barvení preparátů.....	31
7.2.1	Barvicí automat	31
7.2.2	Vodní lázeň	32
7.3	Použité reagensie	32
7.3.1	FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Mutl Protein Homolog 1	32
7.3.2	FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Postmeiotic Segregation Increased 2... 33	
7.3.3	FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human MutS Protein Homolog 2	33
7.3.4	FLEX Monoclonal Rabbit Anti-human MutS Protein Homolog 6	33
7.3.5	Promývací a demaskovací pufr	33
7.3.6	EnVision FLEX/HRP a Peroxidase Block RTU	34
7.3.7	DAB chromogen	34
7.4	Barvení.....	34
7.4.1	IHC vyšetření tlustého střeva	35
7.4.2	Barvení hematoxylin – eosin.....	37
7.4.3	Barvení alciánovou modří	38
8.	Výsledky výzkumu	40
8.1	Výsledky barvení	40
8.2	Analyzovaný soubor pacientů s CRC za rok 2018 – 2019.....	43
9.	Diskuze	46
10.	Závěr	48
11.	Seznam literatury	49
12.	Seznam obrázků a tabulek	54
13.	Seznam zkratk	55
14.	Seznam přílohy	56

Úvod

Kolorektální karcinom je v ČR dlouholetý problém a jeho statistiky jsou na předních příčkách ve srovnání s ostatními onkologickými onemocněními. Díky zavedeným screeningovým opatřením a relativně dobré prognóze v časném záchytu tohoto onemocnění, je za poslední roky zaznamenán pokles mortality. Incidence ovšem dále narůstá a s ní lze pozorovat také vzestup prevalence.

Histologické vyšetření tlustého střeva je nedílnou součástí diagnostiky kolorektálního karcinomu a hraje důležitou roli v určení stádia nádoru. Imunohistochemické vyšetření pak napomáhá k screeningu Lynchova syndromu, který je jedním z hlavních geneticky podmíněných onemocnění, která mohou způsobit vznik CRC. Diagnostika Lynchova syndromu je důležitá především v tom, že i po úspěšné léčbě pacienta u něho zůstává nadále celoživotní riziko vzniku nejen dalšího CRC, ale také i vzniku jiného typu nádoru (např. nádor endometria u žen).

K volbě tématu „histologické vyšetření tlustého střeva“ a v něm zaměření se na histologické vyšetření CRC mě směřovala rodinná souvislost s tímto onemocněním. Zároveň mi problematika kolorektálního karcinomu přišla jako poměrně často diskutované a aktuální téma. Proto jsem se rozhodla zvolit dané hypotézy a zkusit tak částečně zmapovat situaci tohoto onemocnění u pacientů s kolorektálním karcinomem v Nemocnici Jihlava p. o. za období roku 2018 - 2019.

1. Anatomie tlustého střeva

Tlusté střevo (*Intestinum crassum*) je konečný úsek trávicí trubice, kde probíhá konečné zpracovávání kašovitého až tekutého obsahu z tenkého střeva. Z tohoto obsahu je postupně v tlustém střevu absorbována voda a elektrolyty a obsah je utvářen ve stolici, jež je pak z konečného úseku tlustého střeva vypuzena análním otvorem. Na rozkladu střevního obsahu v tlustém střevu se podílejí mikroorganismy, jež jsou stálou součástí střevního obsahu, a které způsobují kvasné a hnilobné procesy. Některé bakterie jsou dokonce zdrojem vitamínu K. Celková délka tlustého střeva je přibližně 1,3 – 1,7 m a šířka činí přibližně 4 – 7,5 cm (Čihák, 2013).

1.1 Úseky tlustého střeva

První částí tlustého střeva je slepé střevo (*coecum*) (Dylevský, 2000). Je to vakovitý a nejrozšířenější úsek tlustého střeva, do něhož vede kyčelník, který se nachází v pravé kyčelní jámě. Červovitý přívěsek (*appendix vermiformis*), který odstupuje z mediální stěny slepého střeva, má variabilní délku (2 – 30 cm) i pozici. V jeho stěně nacházíme velké množství lymfatické tkáně (Kachlík, 2018).

Vzestupný tračník (*colon ascendens*) přiléhá k zadní stěně břišní a je pokryt serózou pouze z přední strany. Vzestupný tračník se pod játry zakřivuje doleva (*flexura coli dextra*) a přechází v tračník příčný (Fiala, 2015).

Příčný tračník (*colon transversum*) postupuje příčně břišní dutinou a dále vede vzhůru do levého podžebří k slezině, kde se opětovně stáčí směrem dolů (*flexura coli sinistra*). *Colon transversum* je celistvě kryto serózou. Příčný tračník má také svůj závěs, *mesocolon transversum*, ve kterém procházejí cévy (a. colica media, větve a. mesenterica superior a stejnojmenná žíla). Omenta, zadní list velké předstěry, je upevněna na přední tenii (Fiala, 2015).

Sestupný tračník (*colon descendens*) je opětovně přilehlý k zadní straně břišní a je pokryt serózou pouze z přední strany. V oblasti levé kyčelní jámy pak přechází v esovitou kličku (Fiala, 2015).

Esovitá klička (*colon sigmoideum*) je různě dlouhý a esovitě zakřivený úsek tlustého střeva. *Colon sigmoideum* se nachází v levé kyčelní jámě a může sahát až k pupku. Je to opět volná část, která je celá krytá serózou a uchycena závěsem (*mesosigmoideum*), jehož úpon na zadní stěně vede podobně jako sama esovitá klička. Na rozhraní velké a malé pánve se poté mění esovitá klička v konečník (Čihák 2013; Fiala 2015).

Konečník (*rectum*) je poslední úsek tlustého střeva, dlouhý asi 15 cm a je již bez hauster a tenii (Fiala, 2015). Konečník prochází před křížovou kostí a vede na povrch těla análním otvorem. V pánevní dutině se konečník rozšiřuje v prostornou ampulu (*ampulla recti*)

(Dylevský, 2000). V předozadní rovině se nachází na rektu dvě ohbí, přičemž horní sleduje vyduté linie kosti křížové a dolní, dopředu konvexní, se nachází v oblasti hráze. Následně přechází rektum v řitní kanál (*canalis analis*). Cirkulární svalovina je v této oblasti zesílena a vytváří tak vnitřní svěrač (*m. sphincter ani internus*). Zevně od vnitřního svěrače je cirkulární svalovina tvořená příčně pruhovanou svalovinou a tvoří vůlí ovládaný vnější svěrač (*m. sphincter ani externus*). Anální kanál poté navenek přechází v řiť (*anus*). Anus je kryt kůží a zvenku je vtažen směrem dovnitř a kůže tak vytváří řasy (*crena ani*) (Fiala, 2015).

1.2 Histologická stavba stěny tlustého střeva

Stavba tlustého střeva se shoduje se základním čtyřvrstevným schématem trávicí trubice. Tyto vrstvy trávicí trubice dělíme na sliznici (*tunica mucosa*), podslizniční vrstvu (*tela submucosa*), svalovou vrstvu (*tunica muscularis*) a serosní vrstvu (*tunica serosa*), nebo povrchovou fascii (*tunica adventitia*) (Lüllmann-Rauch, 2012).

Šíře stěny tlustého střeva je kolem 1,7 až 2,2 mm. Třetinu z této šířky zaujímá sliznice, další třetinu submukóza a poslední třetinu muscularis propria (Špičák, 2008).

1.2.1 Sliznice tlustého střeva

V celém úseku tlustého střeva, s výjimkou análního kanálu, má sliznice stejnou stavbu. Rozlišovacím znakem od tenkého střeva je absence klků (Lüllmann-Rauch, 2012). Vyskytují se zde také Lieberkühnovy krypty, které jsou dlouhé a charakteristické přítomností vysokým počtem pohárkových buněk a malým počtem enteroendokrinních buněk (Junqueira, 1997).

Sliznici můžeme dále dělit na tyto vrstvy: epitel (*lamina epithelialis*), vazivovou vrstvu sliznice (*lamina propria mucosae*) a svalovou vrstvu sliznice (*lamina muscularis mucosae*).

Epitel se vyskytuje na samém povrchu sliznice a kryje i povrch Lieberkühnových krypt. Epitelová vrstva je tvořena jednovrstevným cylindrickým epitelem, který je formován vysokými buňkami s krátkými mikrokly (kolonocyty). Podstatnou rolí kolonocytů je absorpce vody. Právě v epitelu je přítomno velké množství pohárkových buněk a jsou zde také rozptýleny endokrinní buňky. Pohárkové buňky tvoří mucin, který chrání epitel a funguje jako bariéra proti bakteriím. Na spodině Lieberkühnových krypt můžeme nalézt kmenové buňky. V dolní polovině krypt probíhá mitosa dceřiných buněk, odkud za současné diferenciaci putují vzhůru k povrchu epitelu. Životaschopnost vyzrálých kolonocytů je nejvýše 6 dní (Lüllmann-Rauch, 2012).

Lamina propria obsahuje lymfoidní buňky a folikuly, ty často sahají až do submukózy (Junqueira, 1997).

Lamina muscularis mucosae je tvořena z příčně a podélně probíhajících snopečků hladké svaloviny (Vacek, 1995).

1.2.2 Podslizniční vrstva

Sliznice spolu s podslizničním vazivem často vytváří cirkulárně uspořádané řasy (*plicae semilunares*), které se od tenkého střeva liší tím, že vznikají přechodně kontrakcí svaloviny (Lüllmann-Rauch, 2012). Podslizniční vrstva je složena z kolagenního vaziva. Oproti vrstvě slizničního vaziva je širší a vedou v ní hrubší pleteně cévní a nervové, které sliznici zásobují. Nalezneme zde rovněž drobné mucinózní žlázky (Vacek, 1995).

1.2.3 Svalová vrstva

V tlustém střevě je svalová vrstva uspořádaná zevnitř do cirkulární svaloviny (*stratum circulare*) a z vnějšku do podélné svaloviny (*stratum longitudinale*). Vrstva cirkulárních vláken je stejnoměrně silná. Vrstvu s podélnými vlákny tvoří tři ztlustělé makroskopicky viditelné pruhy, nazývané taenie (*t. libera*, *t. mesocolica*, *t. omentalis*), mezi kterými je podélná svalová vrstva slabá. Zatím co v appendix vermiformis a v rektu je podélná svalovina jako souvislý stejnoměrný plášť (Lüllmann-Rauch, 2012).

1.2.4 Adventitia

Na povrchu tlustého střeva se vyskytuje buď serosa nebo adventicie. Záleží, o jakou část tlustého střeva jde. Serosní vrstva je tzv. orgánové peritoneum (*peritoneum viscerale*) a pokrývá veškeré orgány břišní dutiny. Na jejím povrchu je jednovrstevný epitel (*mesothelium*), který je podložený tenkou vrstvou vaziva (*lamina propria serosae*). Na řadě míst je vrstva subserosního vaziva (*tela subserosa*), která odděluje serosní vrstvu od svaloviny silnější a umožňuje tak pohyblivost serosy. Adventicie pokrývá a ukotvuje do okolí extraperitoneální úseky (jako část jícnu a konečník) a retroperitoneální úseky trávicí trubice (duodenum a část tlustého střeva) (Lüllmann-Rauch, 2012).

2. Patologie tlustého střeva

2.1 Střevní záněty

Střevní záněty spadají mezi nejčastější střevní onemocnění. Zánět tlustého střeva se nazývá kolitida (*colitis*). Jejich příčiny jsou velmi různorodé. Záněty mohou vyvolat např. bakterie, viry, paraziti, protozoa, alergie či fyzikální a chemické vlivy.

Po histologické stránce se vyskytuje mnoho různých druhů zánětu. V případě, že postihují sliznici, se tyto záněty označují jako katarální. Mezi ně spadá např. akutní serózní, pseudomembranózní, purulentní, ulcerózní a flegmonózní zánět. K obvyklým původcům zánětů patří především salmonely, shigely a stafylokoky (Mačák et al., 2012).

2.1.1 Idiopatická zánětlivá střevní onemocnění

Mezi tato onemocnění řadíme Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. Jedná se o relativně často se vyskytující chronická onemocnění, která mají ve své etiologii spoustu společného, ale hlavně také stále nejasného. Proto tato onemocnění označujeme jako idiopatická (Mačák et al., 2012).

Ulcerózní kolitida (UC) je tedy chronická idiopatická zánětlivá porucha tlustého střeva, způsobující kontinuální zánět sliznice rozšiřující se od rekta až do proximální části tlustého střeva, s variabilním rozsahem. Pro UC je charakteristický relapsující a remitující průběh. Světově je UC mnohem více rozšířené onemocnění než Crohnova choroba a poměrně často se vyskytuje v industrializovaných zemích. Hlavními rizikovými faktory jsou genetické faktory, životní styl, autoimunita a střevní mikrobiom. Klinicky se UC projevuje chronickým krvavým průjmem s nebo bez hlenu, bolestmi břicha, tenzemi před defekcí, eventuálně horečkami, ztrátou hmotnosti a anémií. U UC je zánět omezen na slizniční vrstvu tlustého střeva, přičemž infiltráty se liší ve složení a hustotě v závislosti na tom, zda je onemocnění aktivní či v remisi. Infiltráty obsahují hlavně lymfocyty, plazmatické buňky a granulocyty. Histologické změny se u UC v 75 % vyznačují dvěma, nebo třemi změnami z následujících čtyř mikroskopických změn: snížená hustota krypt, těžké narušení struktury krypt, nepravidelný povrch sliznice a těžký difúzní transmukosální zánět. Pouze 20% pacientů má narušené krypty během prvních dvou týdnů po nástupu onemocnění. Pokud dojde k narušení krypt, může to pomoci rozlišit UC od akutní kolitidy, která je charakterizovaná normálními kryptami a přítomností akutního zánětu. Mezi histologické rysy, které byly spojeny se zvýšenou mírou recidivy, také patří: poškození epitelu s přítomností neutrofilů, bazální plazmacytóza, přítomnost bazálních lymfoidních agregátů a přítomnost vysokého počtu eozinofilů (Gajendran et al., 2019).

Crohnova choroba je chronické zánětlivé střevní onemocnění neznámé etiologie, spojené se zhoršenou imunitní odpovědí a s obdobími aktivní fáze a remisemi. Vyznačuje se

nerovnoměrnými a transmurálními lézemi, které se mohou vyskytovat v celém gastrointestinálním traktu – od úst po konečník (Ballester Ferré et al., 2018). Crohnova choroba se projevuje granulomatózním zánětem, vyskytujícím se především v terminálním ileu a proximální části tlustého střeva. Mezi nejčastější klinické příznaky patří: chronický průjem, bolesti břicha, ztráta hmotnosti a malabsorpční syndrom (Karges a Dahouk, 2011). Přibližně u 75 % pacientů s Crohnovou chorobou v oblasti tlustého střeva se časem vyvine perianální patologie, včetně kožních znaků, hlubokých vředů, prasklin, píštěl, abscesů a zúžení traktu. Mezi histologické změny patří zvýšený počet lymfocytů a plazmatických buněk napříč bioptickým vzorkem, nepravidelnost krypt a to buď jejich narušením, větvením či zkrácením. Mohou se také nacházet granulomy, které se projevují shlukem epiteloidních histiocytů (monocyty / makrofágové buňky), a transmurální lymfoidní agregáty (Magro et al., 2013).

2.2 Megacolon

Megacolon nastává při zvětšení průměru tlustého střeva nad 6 – 7 cm. Může být již vrozený a to v důsledku vývojové vady, kdy bývá nejčastěji postižena oblast rekta a anu. U 20 % případů bývají defektní i jiné části tlustého střeva. V těchto úsecích se pak utvoří bariéra pro peristaltický pohyb střeva a tedy i pro jeho vyprazdňování. Tyto vzniklé změny jsou nazývány jako Hirsprungova nemoc. Megacolon může nastat i jinými příčinami během života – tzv. získaný megacolon. Takových příčin může být mnoho, např. nádor či tzv. toxický megacolon (Mačák a Mačáková, 2004).

Toxický megacolon je vzácná, ale potenciálně smrtelná komplikace zánětu tlustého střeva. Jeho definice je nestrukturální dilatace tlustého střeva, která může být úplná nebo segmentální a je obvykle spojena se systémovou toxicitou. Jakýkoliv stav vedoucí k zánětu tlustého střeva může potencionálně zapříčinit vznik toxického megacolon. Nejčastěji je spojován se zánětlivým onemocněním střev, tj. ulcerózní kolitida a Crohnova choroba. Do etiologických faktorů spadají i další zánětlivé a infekční stavy jako je bakteriální kolitida či virové a parazitární infekce. Mezi další příčiny mohou patřit i ischemické kolitidy, malignity jako lymfomy tlustého střeva a hemolyticko-uremický syndrom způsobený *Escherichia coli*. Patofyziologické mechanismy vedoucí k toxické dilataci tlustého střeva nejsou stále zcela objasněny. Hlavní charakteristiky toxického megakolonu jsou příznaky systémové toxicity a závažné distenze v tlustém střevě. Je však prokázána souvislost mezi zánětlivými stavy tlustého střeva a sníženou kontraktilitou hladkého svalstva (Autenrieth a Baumgart, 2012).

2.3 Divertikly

Divertikulární onemocnění je velmi běžným onemocněním v západním světě, včetně Evropy, Severní Ameriky a Austrálie. Zatímco méně běžný výskyt tohoto onemocnění je v Africe, na Středním Východě, v Indii a také na Dálném východě včetně Japonska. Je to také nejčastěji nalézaná patologie při kolonoskopii (Mimura, 2002).

Divertikly jsou tvořeny vychlípáním střevní stěny. Mohou být již vrozené či získané (nepravé), tzv. pseudodivertikly. Vrozené divertikly jsou tvořeny vychlípáním všemi vrstvami stěny střeva. Pseudodivertikly jsou mnohem častější a jsou tvořeny pouze sliznicí s občasným výskytem submukózy (Mačák a Mačáková, 2004).

Divertikulární chorobu můžeme klasifikovat do čtyř kategorií, a to buď jako asymptomatickou divertikulózu, divertikulitidu, symptomatickou nekomplikovanou divertikulární chorobu nebo segmentální kolitidu spojenou s divertikulózou. Patogeneze divertikulární choroby je považována za multifaktoriální a není ještě zcela objasněna. Předpokládá se, že patogenezi onemocnění ovlivňují faktory jako motilita a struktura stěny střeva, genetické faktory, příjem vlákniny, hladina vit. D a obezita (Rezapour, 2018).

2.4 Benigní nádory tlustého střeva

Tyto nádory představují spíše rizikové faktory pro vznik maligního nádoru. Podle histologického charakteru je můžeme rozdělit na nádory mezenchymové (leiomyom, lipom, hemangiom), adenomové (polypózní adenom, vilózní adenom, tubulovilózní adenom, papilární adenom, familiární polypóza) a polypy (zánětlivé, hypoplastické, lymfoidní, lipomatózní atd.) (Navrátil et al., 2008).

Převážná část těchto benigních nádorů je po klinické stránce němá. Mohou se však vyskytovat enteroragie a změny charakteru defekcí. Pokud se jedná o výskyt benigních nádorů v rektu, tak ty se mohou projevit jako rektální syndrom (Navrátil et al., 2008).

2.5 Kolorektální karcinom (CRC)

CRC je zhoubný nádor, který se vyvíjí z buněk sliznice tračníku a konečníku. Nejčastěji postihuje rektum (až v 45 % případů), dále colon sigmoideum (25 %), colon caecum (15 %), colon transversum (10 %) a colon descendens (5 %). Kolem 3 % pacientů má synchronní kolorektální nádory a u dalších bývají spolu s karcinomem nalezeny i premaligní polypy. Z histologického hlediska tvoří převážnou část CRC adenokarcinomy a to až v 98 % případů. Charakteristický je progresivní postup z premaligních polypů sliznice střeva až do invazivního stádia karcinomu (Büchler, 2017). Adenokarcinom u CRC bývá ve většině případů nemucinózní (85 %), nebo ve zbylých 15 % mucinózní povahy. Karcinomy mohou po čase prorůst celou

stěnou střeva a dostat se až do okolních orgánů. Poté mohou vygradovat až v lymfogenní a hematogenní metastázy, čímž se šíří oběhem do vzdálených orgánů. Ve většině případů se šíří do jater, ale mohou se šířit i např. do plic a kostí (Vorlíček et al., 2012).

Podle Němečka a Svobody lze rozdělit sporadické CRC dle jejich karcinogeneze na podkladě morfológico-molekulárních souvztažností na tři hlavní typy (© 2020):

- Model, kdy CRC vzniká z konvenčních lézí (tubulární a tubulovilózní adenom).
- Model vznikajícího CRC ze serátních lézí (tradiční serátní adenom a sesilní serátní adenom).
- Model vzniku CRC ze zánětlivých lézí (dysplastické nepolypózní změny).

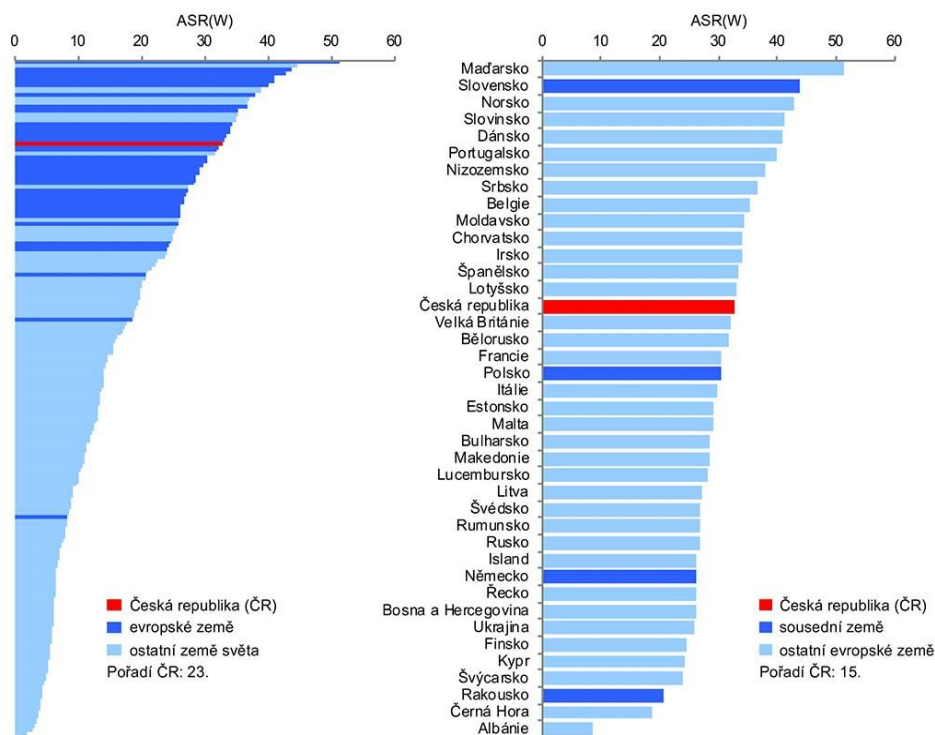
2.5.1 Symptomatologie

V prvních stádiích bývá CRC spíše asymptomatický, bez zevních projevů. V pozdějším stádiu se může začít projevovat lokálními i celkovými příznaky. Nejčastější lokální změna bývá v defekci a charakteru stolice. Ve stolici se také může objevit krev či hlen. Někdy může být přítomná bolest v oblasti břicha nebo konečníku. Bolesti také mohou souviset s odchodem stolice. K celkovým příznakům pak řadíme nevolnost, slabost, ztrátu hmotnosti, nechutenství atd. (Vorlíček et al., 2012). V pozdějších stádiích CRC může dojít k výraznému zúžení lumen střeva, a tedy i ke vzniku střevní obstrukce. Symptomatologie může záležet i na místě výskytu nádoru. Nádory, které se nachází v části proximálně od lienální flexury mohou zapříčinit sideropenickou anémii z chronické ztráty krve. Zatímco nádory colon descendens a sigmoidea se manifestují střídáním obstipace s diareou. Stolice se může také vyznačovat příměsí krve. Výskyt nádoru v oblasti rekta pak může vyvolat tenezmy, hematochezii a nutkání na stolici (Büchler, 2017).

2.5.2 Epidemiologie CRC

Zhoubné nádory kolorekta se řadí mezi nejčastější onkologické diagnózy ve vyspělých státech a jeho incidence stále narůstá. Česká Republika (ČR) se zařazuje na první místa v mezinárodním žebříčku. Podle dat GLOBOCAN se řadí ČR na 15. místo mezi evropské země v incidenci CRC. V celosvětovém měřítku se pak ČR řadí na 23. Místo (obr. 1.). (Ferlay et al., 2018). Co se týče pohlaví, je na tom mužská populace v ČR hůře než populace ženská. Muži se řadí na 14. pořadí v Evropě a 19. pořadí ve světě. Ženy jsou na tom o něco lépe, protože zaujímají 19. pořadí v Evropě a 28. – 29. pořadí ve světě (Ferlay et al., 2018).

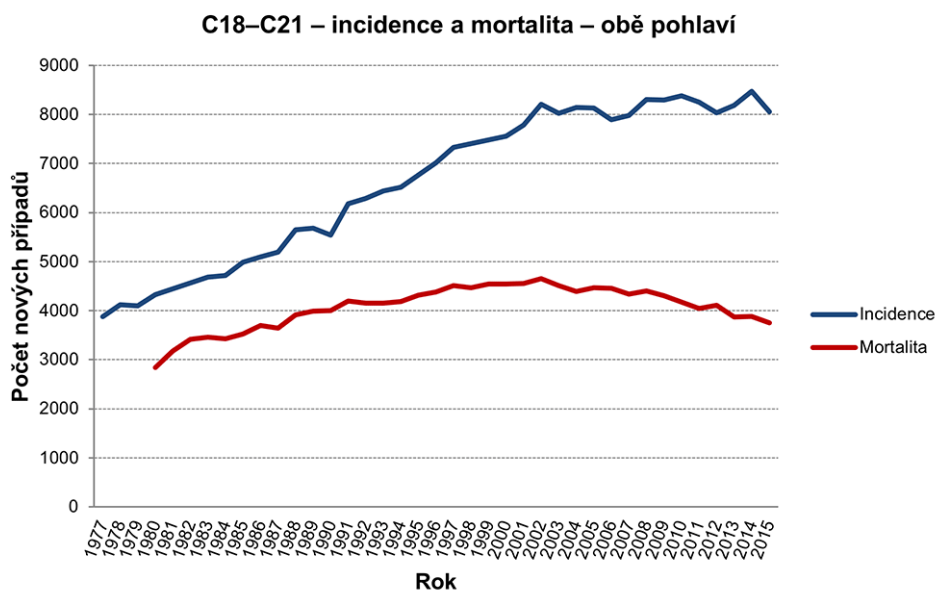
Incidence zhoubných nádorů tlustého střeva a konečníku (C18–C21) u obou pohlaví v mezinárodním srovnání.
 ASR(W) – počet nově diagnostikovaných nádorů na 100 000 osob věkově standardizovaný na světový věkový standard.



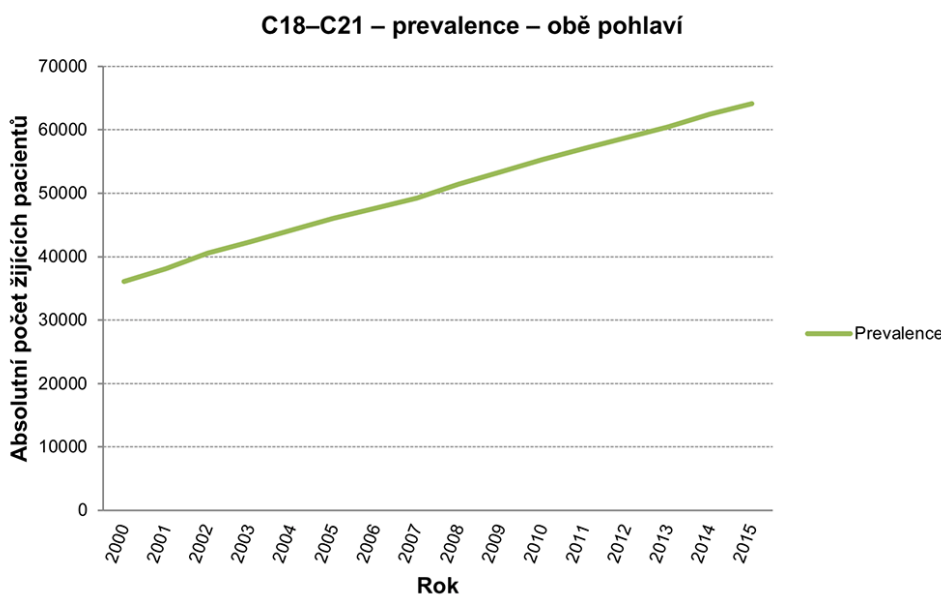
Zdroj: Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <https://gco.iarc.fr/today>, accessed on 4 October 2018.

Obrázek 1: Incidence CRC u obou pohlaví v mezinárodním srovnání (zdroj: Ferlay et al., 2018)

Incidence CRC pro rok 2018 ve světě byla odhadnuta na 1 849 518 nově diagnostikovaných případů a z toho je odhadované množství úmrtí v 880 792 případech. V Evropě pak pro rok 2018 činí odhad na 499 667 vzniklých nádorů a z toho 242 483 úmrtí (Ferlay et al., 2018). Populační zátěž je rovněž vysoká i přímo v ČR. V ČR je diagnostikováno 8000 případů za rok a z toho takřka 4000 úmrtí (obr. 2.). Za poslední roky můžeme vidět epidemiologické zlepšení situace, a to především stabilizaci a pokles mortality. Ovšem incidence je rostoucí a tedy vzrůstá i prevalence – počet žijících osob, které prodělaly CRC. Od roku 2005 do roku 2015 vzrostla prevalence téměř o 40 % (obr. 3). Včasný záchyt CRC v méně pokročilém stádiu výrazně zlepšuje prognózu. V ČR je však stále vysoký podíl nových pacientů s diagnostikou CRC v pozdějším stádiu. Věk pacientů v ČR s CRC je kolem 60 – 79 let, ale až 19 % pacientů je mladších 60 let (Gregor et al., 2018).



Obrázek 2: incidence a mortalita u obou pohlaví (zdroj: Gregor et al., 2018)



Obrázek 3: prevalence u obou pohlaví (zdroj: Gregor et al., 2018)

2.5.3 Etiologie CRC

Jelikož dochází k značnému rozdílu v incidenci CRC v rozdílných oblastech světa, lze předpokládat, že značný význam na vznik CRC mají vnější vlivy a to především nutriční faktory. Mezi nutriční faktory ovlivňující vznik CRC se řadí především nadbytek tuku a masa ve stravě, kdy se prokarcinogenní účinek navyšuje s vysokým obsahem omega-6 polynenasycených mastných kyselin (Lukáš et al., 2005). Do skupiny vnějších vlivů dále spadá i nedostatek vlákniny, nadměrná produkce žlučových kyselin do tračníku, kouření a deficit vápníku ve stravě (Navritál et al., 2008). Je popisována i souvislost vzniku CRC u osob s vyšší konzumací červeného masa. U kouření dochází ke zvýšenému výskytu invazivních karcinomů

v tlustém střevě a adenomů skoro dvojnásobně. Stále je vláknina považována za preventivní faktor, který ovšem novodobé studie přímo neprokázaly. Užívání kyseliny acetylsalicylové ve vyšších dávkách riziko CRC snižuje až o 30 % a úmrtnost o 40 %. Na snížení rizika se podílí i užívání orálních kontraceptiv, a to díky přímému účinku estrogeneru na sliznici střeva a poklesu koncentrace žluči ve střevě. Při vyšší fyzické aktivitě dochází ke snížení rizika dokonce až o 40 – 50 % (Drdová et al., 2010).

Výrazně častější výskyt karcinomu tlustého střeva nastává u pacientů s dlouhotrvajícími idiopatickými zánětlivými střevními onemocněními, a to nejčastěji po asi 20 letech trvání onemocnění. U těchto onemocnění dochází ke změnám na sliznici střeva v důsledku dlouhého a častého výskytu zánětů. Díky těmto změnám může časem nastat i nádorové onemocnění (Drdová et al., 2010).

Většina CRC je sporadického původu, ale je odhadováno, že 20 – 30 % je dědičného původu, přičemž jen u 5 – 10 % je znám genetický syndrom (Plevová et al., 2019). Do této skupiny spadá syndrom familiární adenomatózní polypózy (FAP) a Lynchův syndrom (familiární nepolypózní karcinom tlustého střeva). U FAP se zprvu objevují mnohonásobné adenomatózní polypy, lokalizované v tlustém střevě, které mají sklon se přetvářet v karcinomy (Vorlíček et al., 2012). O Lynchově syndromu více v kapitole 3.

U kolorektální karcinogeneze jsou hlavními patogenetickými příčinami chromozomální instability a mikrosatelitní instability. Každý z těchto mechanismů má odlišný fenotypový obraz lišící se v lokalizaci primárního nádoru, stupněm diferenciaci nádoru, pohlavím a věkem pacientů (Němeček a Svoboda, © 2020).

3. Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC, Lynchův syndrom)

3.1 Charakteristika HNPCC

Ze souboru všech nově vzniklých kolorektálních karcinomů jsou 3 % připisována Lynchovu syndromu (Win et al., 2017). Zatímco u sporadických CRC dochází ke vzniku ve starším věku (kolem 69 let), u CRC spojených s HNPCC dochází již ve věku mladším (45 – 60 let) (Møller et al., 2017). U HNPCC je značné celoživotní riziko vzniku kolorektálního karcinomu. U mužů je toto riziko kolem 28 – 75 %, zatímco u žen se udává 24 – 52% riziko vzniku CRC. Ačkoliv v názvu stojí nepolypózní, i u tohoto syndromu se může vyskytnout menší množství polypů tlustého střeva, které ovšem nepřekračuje počet 100 polypů. Jedinci s diagnózou HNPCC, u kterých se vyskytl kolorektální karcinom, mohou mít až 16% riziko, že při sledování po dobu 10 let onemocní dalším nádorem tlustého střeva. U žen s HNPCC je navíc 27 – 71% riziko, že onemocní karcinomem endometria a zhruba 3 – 13% riziko, že onemocní karcinomem vaječníků. HNPCC bývá také spojován se zvýšeným rizikem karcinomu urotraktu (riziko 1 – 12 %), tenkého střeva (4 – 7 %), hepatobiliárního systému (2 %), žaludku (2 – 13 %) a nádoru mozku (1 – 4 %). U HNPCC mohou být nádorová onemocnění mnohočetná (Vasen et al., 2007).

Do histologických znaků nádorů spojených s HNPCC spadá špatná diferenciaci, mucinózní rysy, Crohn-like lymfocytární infiltrace, lymfoidní shluky v okrajích nádoru, buňky vzhledem pečetního prstenu nebo medulární diferenciaci. Histologické znaky svádí k názoru, že nádor je vysoce rizikového charakteru, avšak CRC spojené s HNPCC mají ve srovnání s nádory sporadickými nižší sklon k metastatickému šíření do lymfatických uzlin a ke vzdáleným metastázám (Plevová, 2019). Vývoj z adenomu do karcinomu je u HNPCC rychlejší, neboť tyto nádory se mohou vyvinout již během 5 letého intervalu i dříve. U sporadických nádorů je interval kolem 10 let a více (Wells a Wise, 2017).

3.2 Genetika u HNPCC

Jedná se o autozomálně dominantní dědičný syndrom s vysokým rizikem vzniku kolorektálního karcinomu (CRC). Syndrom ve většině případů vzniká v důsledku patogenní mutace genů (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), které jsou odpovědné za reparaci chyb DNA (deoxyribonukleové kyseliny) vzniklých na úrovni replikace, a to již v zárodečné buňce. Jedná se o tzv. mismatch repair genes (MMR geny). Tento defekt vede k vysokému stupni nestability mikrosatelitů (krátkých tandemových repetitiv) v molekule DNA (Plevová et al., 2009; Mačák et al., 2012). MMR geny tedy udržují stabilitu genomu a potlačují vznik nádoru opravou chyb

replikace DNA a zajišťují apoptickou odpověď na poškození DNA (Scherer et al., 2005). U zdravých osob jsou jednotlivé mikrosatelity ve všech buňkách stejné (příčemž mezi jedinci se liší). Pokud však MMR geny neplní správně svoji funkci, může nastat situace, kdy se délka jednotlivých mikrosatelitů u jednoho jedince může lišit a nastává tedy tzv. nestabilita mikrosatelitů (Dušek et al., 2016).

Kromě patogenních mutací byly také prokázány rodiny, v nichž Lynchův syndrom vznikl na podkladě hypermetylace promotoru (tzv. konstituční epimutace) genů MutL protein homolog 1 (MLH1) nebo Muts homolog 2 (MSH2) (Pinto et al., 2018). U konstituční epimutace dochází ke konstitučnímu transkripčnímu útlumu genů pomocí epigenetických mechanismů a sekvence genu tak není přímo změněna. Ke konstituční epimutaci MSH2 dochází sekundárně, a to příčinou zárodečné delece genu EPCAM (epithelial cell adhesion molecule) v poloze cis a jedná se také o autozomálně dominantní dědičnost. Vznik konstituční epimutace u MLH1 je závislý na vzniku tohoto genu a můžeme ji tak rozdělit na primární a sekundární. Primární konstituční epimutace MLH1 vzniká spontánně a je reverzibilní mezi generacemi. Zatím co sekundární konstituční epimutace je děděna klasickou autozomálně dominantní cestou v důsledku výskytu sekvenční genetické změny v poloze cis. Primární konstituční metylace MLH1 je zjištěna u 10 % pacientů se ztrátou exprese proteinu MLH1 a může tak být důsledkem až 3 % případů HNPCC (Plevová, 2019).

MLH1 využívají fyziologicky fungující proliferující buňky k reparaci bodových mutací, které mohou vzniknout při replikaci DNA. MLH1 spolu s MutL protein homolog 2 (PMS2), který slouží k opravě chybně spárovaných bází, tvoří heterodimerický komplex MLH1 – PMS2. Tento komplex se váže na chybně spárovanou sekvenci DNA za pomoci heterodimerického komplexu MutS MMR. Komplex MutS MMR se skládá z heterodimeru tvořeného MSH2 – MSH6 (Muts homolog 6), který se již bezprostředně naváže k místu vadně spárované báze. Opravné funkce poté podnítlí komplex MLH1 – MSH2. Tyto opravné funkce pokračují proti směru řetězce DNA, a to včetně likvidace chybně spárované sekvence řetězce. Poté dojde k následnému opravení prostřednictvím navázání polymeráz, nukleáz a dalších proteinů (Dako North America, 2009).

3.3 Diagnostika HNPCC

U HNPCC je bohužel absence tzv. premorbidního fenotypu, tedy změn, které by umožnily diagnostikovat syndrom, dříve než se u pacienta vyvine maligní tumor. Diagnóza Lynchova syndromu se tedy může stanovit prakticky až při zjištění již vzniklého maligního tumoru, nebo při genetickém vyšetření v rámci rodinné anamnézy (Dušek et al., 2016).

Indikace k vyšetření HNPCC vychází ze stanovených kritérií, a to především z revidovaných kritérií z Bethesdy (tzv. Bethesda guidelines, BG), která ale nejsou dostatečně

senzitivní, jelikož je odhadováno cca 25 % pacientů s HNPCC, u kterých tento syndrom nebyl za využití systému BG odhalen. Vyšší senzitivity se dá docílit za použití novodobých metod v patologii, byť s rizikem snížení specifity. Tato diagnostika zahrnuje přímý a nepřímý průkaz nestability mikrosatelitů. Nepřímý průkaz nestability mikrosatelitů zahrnuje rozpoznávání morfologických znaků asociovaných s nestabilitou mikrosatelitů pomocí histologického vyšetření vzorků tkáně CRC a také využití imunohistochemického vyšetření (Dušek et al., 2016).

Nestabilita mikrosatelitů však neznačí stav, při kterém bezprostředně vzniká nádor. Při jeho stanovení jde především o semikvantitativní posudek genetického defektu DNA způsobený tímto zmíněným mechanismem. Stanovení stupně nestability mikrosatelitů se zakládá na stanovení nestability mezinárodně kodifikovaných markerů. U vzorku (především tedy nádoru) se podle počtu postižených markerů určují tři stavy, a to buď jako tkáň se stabilními mikrosatelity (MSS), s nízkým stupněm nestability mikrosatelitů (MSI-L) či s vysokým stupněm nestability mikrosatelitů (MSI-H) (Dušek et al., 2016). Na příklad jako vysoce nestabilní klasifikujeme tkáň v případě, že nám z pěti testovaných mikrosatelitních markerů vyjde u dvou či více vysoká hodnota nestability mikrosatelitů (Shia, 2008).

Na rozdíl od nádorů způsobené HNPCC jsou u sporadických nádorů CRC mikrosatelity ve většině případů stabilní (Wells a Wise, 2017). Ale zhruba u 15 % sporadických nádorů se vyskytuje vysoký stupeň nestability mikrosatelitů (MSI-H), což je patrně důsledkem epigenetických transformací povahy hypermetylace místa promotoru u genu MLH1. U těchto nádorů se obvykle vyskytují somatické mutace v BRAF genu. Tím se tyto nádory odlišují od nádorů vzniklých na základě germinálních mutací genů pro Lynchův syndrom, u kterých se běžně mutace v genu BRAF nevyskytují (Plevová, 2019). Proto k vyloučení těchto sporadických nádorů by měla být zahrnuta analýza metylace promotoru MLH1 a vyšetření genu BRAF (Dušek et al., 2016).

3.3.1 Imunohistochemie (IHC) a její postavení v diagnostice HNPCC

Všeobecně se IHC považuje za spolehlivou metodu v testování mutací, které mají za následek zkrácení nebo degradaci proteinu. Mělo by se ovšem brát na vědomí, že výsledek IHC může být považován za „genetické informace“ a mělo by se tak zajistit obeznámení a souhlas pacienta (Shia, 2008).

IHC vyšetření u HNPCC využívá monoklonální protilátky proti všem čtyřem již výše zmíněným MMR proteinům a může tedy prokázat ztrátu exprese proteinu a upozornit tak na kauzální gen (Vasen et al., 2007). Ve valné většině případů mutací genu MSH2 dochází ke zkrácení proteinu, tudíž se dá předpokládat, že většina CRC zapříčiněná touto mutací bude metodou IHC v důsledku chybějící exprese MSH2 proteinu odhalena. Avšak mutace v genu MLH1 jsou u více než třetiny případů zapříčiněny v důsledku missense mutace, které sice vedou

k mutantním neaktivním proteinům, ale jsou antigeně neporušené. Následkem těchto mutací může být falešně negativní výsledek IHC barvení. Tyto abnormality v genech MMR, které nejsou pokryty panelem IHC protilátek, může detekovat stanovení nestability mikrosatelitů. Naopak IHC vyšetření může detekovat případy, které mohou být vynechány testováním nestability mikrosatelitů (Shia, 2008). Proto se v současné době tyto dvě metody považují za komplementární, jelikož jejich kombinací lze dosáhnout vyšší senzitivity než při samostatném používání metod (Dušek et al., 2016). Při použití všech čtyř protilátek je citlivost IHC vyšetření kolem 92 %, oproti tomu testování nestability mikrosatelitů pomocí PCR se udává kolem 93 % (Shia, 2008).

IHC vyšetření se upřednostňuje jako první screeningová metoda v určení diagnózy HNPCC a provádí se u všech CRC. Důvody pro preferenci této metody podle Duška et al. jsou následující (2016):

- IHC vyšetření má co se týče mutací genu MSH6 vyšší záchyt, která při vyšetření pomocí PCR metodou stanovení nestability mikrosatelitů může uniknout. Tento falešně negativní výsledek u PCR metody je z toho důvodu, že MSH2 je schopen tvořit heterodimerní komplex s MSH3 a tudíž nemusí nutně docházet ke stavu MSI-H.
- Na rozdíl od stanovení nestability mikrosatelitů umožňuje IHC vyšetření exprese MMR proteinů určit postižený gen pro molekulárně genetické vyšetření. Tudíž dochází i k značnému snížení nákladů při následující detekci zárodečné mutace.
- Není nutná kontrolní nenádorová tkáň.
- Dokáže odhalit i případy, kdy nastává BMMR-D (biallelic mismatch repair deficiency), u kterého často nedochází k nestabilitě mikrosatelitů.

4. Odběr bioptického materiálu k vyšetření CRC

Cílem standardního odběru pro bioptickou diagnostiku je odběr tkáně s předpokládanou patologickou změnou pomocí různých chirurgických metod. Bioptický odběr je často veden jako součást terapeutické operace s ohledem na nález, který chirurg zaznamená během operativního výkonu. Po zvážení chirurg provede parciální resekci orgánů či odejmutí orgánu celého. Materiál odebraný během operace je pak zaslán na patologické oddělení v nativní nebo fixované formě. K bioptickému vyšetření tlustého střeva jsou zasílány především parciální resekáty (hlavně u nádorů a Crohnovy choroby), celé tlusté střevo, koloskopické mikroexcize a jednotlivé polypózní útvary (Dvořák et al., 2008).

Fixace tlustého střeva se provádí nejčastěji formolem. Rozstříhnuté tlusté střevo se fixuje rozvinuté na korkových deskách a polohu střeva v nádobě lze zajistit smotky gázy. Nádoba musí obsahovat dostatečné množství fixační tekutiny (Dvořák et al., 2008).

Bioptické vyšetření nádorů poskytuje informace především o růstové aktivitě nádorů, o tom zda jsou infiltrované i okolní uzliny a také o patomorfologických změnách (počet mitóz, míra exprese proliferčních markerů, přítomnost či nepřítomnost hormonálních receptorů atd.). Patolog také může uvádět diagnostickou rozvahu v případě nejednoznačného výsledku biopsie (Dvořák et al., 2008).

4.1 Endoskopická resekce

Endoskopická resekce (ER) je častou diagnostickou a léčebnou metodou. Jedná se o zákrok, při kterém dochází k odejmutí sliznice i submukózy až v rozsahu úrovně muscularis propria. ER poskytuje možnost odběru reprezentativních vzorků ke konečnému histopatologickému zhodnocení. Tato metoda se využívá především k odstranění dysplastických lézí či časných karcinomů, a to v rozsahu celého gastrointestinálního traktu. Výhodou je menší invazivita této metody oproti operačním rizikům (Špičák, 2008).

Jelikož sliznice vzniká z entodermy a svalová vrstva z mezodermy, je možné tyto vrstvy bez komplikací oddělit (např. mezi vrstvy aplikovat tekutinu pomocí injektoru). Lze tedy sliznici i submukózu resekovat a zároveň tak ponechat svalovou i zevní vrstvu neporušenou (Špičák, 2008).

4.2 Kolektomie

Kolektomie je chirurgický zákrok, při kterém dochází k vynětí celé části tlustého střeva. Název kolektomie je odvozen z latinského slova *ectomia*, které v překladu znamená vynětí, a také latinského značení části tlustého střeva. Ne vždy je chirurg nucen odebrat celou část tlustého střeva. V tomto případě se pak zákrok značí podle odebrané části, např.

sigmoidektomie (vynětí esovitě kličky), hemikolektomie (vynětí poloviny tlustého střeva), appendektomie (vynětí slepého střeva), resekce rekta. U zákroků, kdy dochází i k odejmutí rekta se musí přistoupit k tzv. kolostomii, což znamená vytvoření umělého vývodu (Linkos, © 2020).

U pacientů s karcinomem tlustého střeva v souvislosti s HNPCC je subtotální kolektomie (kdy dochází k odstranění celé části tlustého střeva s ponecháním rekta) často základní operační výkon. Na konečník se poté připojí tenké střevo, takže není nutný vývod. Jako další možnost se nabízí segmentální odstranění zasaženého úseku tlustého střeva, u které ovšem hrozí riziko opětovného vzniku karcinomu ve zbylé části tračníku (Fiala, 2019). Většinou se lze setkat také s pravostrannou či levostrannou hemikolektomií, resekcí transversa a resekcí sigmoidea. Nedílnou součástí chirurgické léčby karcinomu tlustého střeva je také lymfadenektomie regionálních mízních uzlin. Minimální požadovaný počet mízních uzlin zasílaných k histologickému vyšetření je 12 uzlin (Bednařík, 2008).

5. Histologické metody užívané v bioptické diagnostice

Nejčastějším postupem v histologii je parafínová metoda zpracování materiálu na tkáňové řezy určené pro pozorování ve světelném mikroskopu. Z tkání a orgánů, které dorazí do histologické laboratoře je důležité vytvořit tenké řezy, které se přenesou na podložní sklíčko a pomocí barvicích technik se zvýrazní jejich vnitřní struktury. Za ideálních podmínek, by měly být v preparátech zachovány strukturní vlastnosti tkáně, shodné s vlastnostmi tkáně v živém organismu (Mescher, 2018).

5.1 Příprava materiálu pro laboratorní zpracování

Důležitým krokem pro uchování strukturních vlastností tkáně a zabránění její autolýze je fixace. K tomuto kroku nejčastěji slouží fixační činidla, která mají za úkol rychlou denaturaci bílkovin a zachování jejich struktur tkáně. Je podstatné, aby se fixační činidlo dostalo do celé části vzorku a byly tak uchovány mikrostruktury veškerých buněk (Mescher, 2018).

Zatím není znám dokonalý fixační prostředek, který by zcela zachoval struktury tkáně beze změny. Při fixaci dochází k vysrážení buněčných bílkovin, vzniku artefaktů, následné smrštění tkáně a tudíž dochází i k určitému zkreslení tkáňové struktury. Je tedy důležité dbát na kvalitu fixačního činidla, aby docházelo k co nejmenšímu zkreslení. Fixace také nesmí ovlivnit následné barvení tkáně. Pro světelnou mikroskopii je nejrozšířenějším fixačním činidlem roztok formaldehydu (Vacek, 1995a).

5.2 Zpracování tkáně před samotným barvením

Před zalitím vzorku do parafínu je zapotřebí vzorek odvodnit a dále prosytit intermédiem. Pro odvodnění se používá vzestupná řada alkoholů (kdy postupné navyšování koncentrace alkoholů zabrání přílišnému smrštění tkáně). Alkohol se společně se zalévacím médiem nemísí, a proto je důležité vzorek zprvu prosytit intermédiem. Většinou se využívá organických činidel, jako je xylen, benzen a toluen. Poté se vzorek prosytí přímo zalévacím médiem a následně se přistoupí k samotnému zalití. Pro zalívání musí být parafín v tekutém stavu, a proto se zalití provádí při 56 – 58 °C. Tkáň, která je zalitá do parafínu není možno využít k průkazu lipidů (Čížková, 2018).

Zalitá tkáň se nechá ztuhnout a po ztuhnutí lze přistoupit k samotnému krájení preparátů. Pomocí mikrotomu se zpočátku tzv. trimováním seřízne tkáň až na celý její průřez. Poté lze zhotovit z tkáňového bločku pomocí mikrotomu tenké řezy. Pro světelnou mikroskopii se parafínové řezy krájí o tloušťce 3 – 10 µm. Řezy se dále napínají na podložní sklíčko a následně barví (Mascher, 2018).

5.3 Histologické barvení řezů

Aby se dala většina buněk a mezibuněčné hmoty pod mikroskopem pozorovat, musí se přistoupit k jejich barvení. Buněčné struktury mají totiž velmi podobný index lomu, a tudíž jsou v mikroskopu téměř nerozeznatelné. Barvicí metody využívané v histologické technice tkáň nejen zvýrazní pro její vizualizaci v mikroskopii, ale jsou také schopny barevně jednotlivé složky tkáně odlišit. Jednotlivé složky buněk a tkání mají totiž různou afinitu k odlišným barvivům (Čížková, 2018; Mascher, 2018).

Barviva můžeme dělit podle různých hledisek. Nejběžněji se setkáváme s rozdělením barviv na zásaditá a kyselá, jelikož barviva ve tkáních vytvářejí elektrostatické vazby s elektricky nabitými skupinami makromolekul. Mezi kyselá barviva řadíme např. eosin, nebo kyselý fuchsin (Mascher, 2018). Podle složek, které barviva barví, se zásaditá barviva často nazývají jádrová a naopak kyselá barviva jako cytoplazmatická. Existují i barviva neutrální, která jsou směsí barviv kyselých a zásaditých. Neutrální barviva tak barví struktury bazofilní i acidofilní. Podle zdroje se pak barviva dělí na syntetická a přírodní. Převážná většina barviv, která jsou využívána v histologické technice, jsou syntetického původu. Přírodní barviva, jak již název napovídá, jsou získávána z rostlin či živočichů. Mezi přírodní barviva můžeme řadit např. hematoxylin, nebo karmín (Čížková, 2018).

Výše popsaná barviva fungují převážně na chemických interakcích. V histologii můžeme najít barvicí metody, které jsou založeny i na interakcích fyzikálních. U těchto interakcí se barvivo buď v barvené složce rozpouští, nebo se na tkáňových strukturách absorbuje či dochází k precipitaci. Fyzikálních interakcí se využívá především v barvení tuků, kdy jsou využívána barviva rozpustná v tucích, ale nikoliv v alkoholech či vodě (Čížková, 2018).

5.4 Imunohistochemické barvení

Jak už sám název vypovídá, imunohistochemii můžeme vnímat jako využití imunologických metod a jejich následného aplikování při studiu buněk a tkání. Často se můžeme setkat i s označením imunocytochemie. Využívá se především hlavního principu imunologických metod, kterým je afinita antigenu a specifické protilátky, kdy dochází k jejich vzájemné vazbě (Lukáš, 1997).

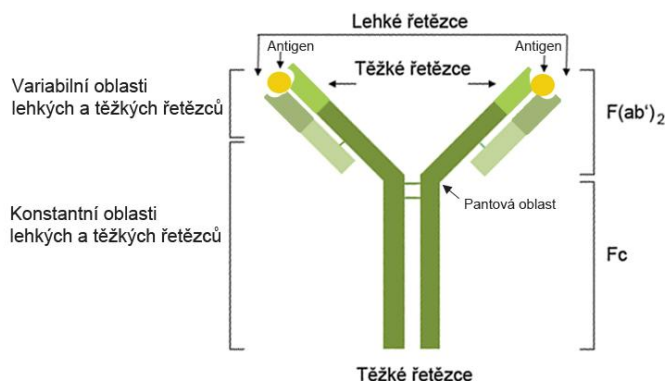
V imunohistochemii prokazujeme antigen (především tedy jeho samotné antigenní determinanty) v tkáních a buňkách pomocí konkrétních protilátek. Specifické protilátky, které jsou namířeny proti hledanému antigenu, se nanáší přímo na tkáňové řezy. Je-li antigenní determinant v tkáňovém řezu přítomna, specifická protilátka se na ni naváže. Imunohistochemie se dá provádět jak na úrovni světelné mikroskopie, tak i na úrovni mikroskopie elektronové (Lukáš, 1997). Využívanou protilátku lze „označit“ pomocí konjugace

s fluorescenční sloučeninou či cytochemicky prokazatelným enzymem nebo látkou, kterou lze prokázat v elektronovém mikroskopu (např.: feritin, nebo koloidní zlato) (Vacek, 1995a).

5.4.1 *Imunoglobuliny*

Imunoglobulin a jeho základní stavba je tvořen párem lehkých řetězců (L) a párem těžkých řetězců (H). Tyto řetězce jsou formovány do písmene Y. Na konci imunoglobulinové molekuly se nachází část se značně variabilním řazením aminokyselinových zbytků. Tento úsek molekuly se nazývá aminotermální část. Na druhém konci imunoglobulinové molekuly se nachází část, která je poměrně konstantní. Místo pro navázání antigenního epitopu lze nalézt na variabilní části imunoglobulinové molekuly. Tato část imunoglobulinu se označuje zkratkou Fab (Fučíková, 1997). Schéma stavby protilátky můžeme vidět na obrázku 4.

Podle rozdílností v oblasti konstantní části imunoglobulinové molekuly lze imunoglobuliny rozdělit do jednotlivých imunoglobulinových tříd (izotopů). Těchto imunoglobulinových tříd rozlišujeme pět – IgG, IgM, IgA, IgD a IgE (Fučíková, 1997).



Obrázek 4: Schéma protilátky (zdroj: Labguide, © 2019)

5.4.2 *Antigen*

Všeobecně se jako antigen bere kterákoliv struktura, která je schopná podnítit imunitní odpověď. Nejběžněji se lze setkat s antigeny převážně bílkovinné povahy, ale v jejich složení se může objevit jakákoliv chemická struktura. Antigeny mohou pocházet buď z vnějšího prostředí nebo mohou být organismu vlastní (Fučíková, 1997).

V tkáních a buňkách jsou obsaženy endogenní antigeny, které jsou jejich přirozenou součástí. Mezi endogenní antigeny můžeme zařadit např. antigeny cytoskeletální, jaderné, membránové nebo také produkty onkogenů apod.. V tkáních můžeme také nalézt antigeny exogenní, které jsou do buňky transportovány infekcí či fagocytózou. Nejběžněji jsou to antigeny virového a bakteriálního původu (Dvořák et al., 2008).

V případě, že je antigenní determinanta, proti které je namířená specifická protilátka v tkáni přítomna, tak se na ní daná protilátka svým Fab fragmentem naváže. Takto vzniklý komplex (tzv. imunokomplex) lze znázornit již výše popsanými způsoby (Dvořák et al., 2008).

6. Cíl práce a výzkumné otázky

6.1 Cíl práce

Na základě tématu bakalářské práce byly stanoveny cíle, které jsou představeny v následujících bodech:

- Sepsání odborné rešerše na dané téma.
- Osvojení si histologických a imunohistochemických metod barvení tlustého střeva.
- Kvantitativní zpracování výsledků z vyšetřovaných vzorků CRC za období 2018 – 2019 na patologicko – anatomickém oddělení Nemocnice Jihlava p. o..

6.2 Hypotézy

Pro tuto práci byly stanoveny následující tři hypotézy:

1. Počet vyšetřovaných vzorků CRC bude závislý na pohlaví a bude dominovat u pohlaví mužského.
2. Počet vyšetřovaných vzorků bude závislý nejen na pohlaví, ale také na stáří pacientů a to především u pacientů ve věkové skupině 60 – 70. let.
3. Defekt v MMR proteinech bude prokázán u méně než poloviny všech vzorků.

7. Metodika práce

Veškeré metody a uvedené postupy v této kapitole byly prováděny v histologických laboratořích na patologicko – anatomickém oddělení v Nemocnici Jihlava p. o. za dodržování všech bezpečnostních zásad kladených na práci v histologické laboratoři, o kterých jsem byla řádně poučena.

V první části kapitoly se zaměřuji na materiál a jeho zpracování před samotným barvením zhotoveného preparátu. Dále budou představeny přístroje a reagentie, které byly při této práci použity. V barvení jsme se zaměřili na imunohistochemické stanovení exprese proteinů čtyř hlavních genů, za účelem screeningového vyšetření LS. V této práci se také věnuji i základnímu barvení hematoxylin – eosin a barvení na prokázání kyselých mukopolysacharidů (barvení alciánovou modří). Výsledky z analyzovaného souboru za rok 2018 – 2019 byly zpracovány metodou kvantitativního výzkumu. Veškeré grafy a tabulky z tohoto statisticky zpracovaného souboru jsou dále uvedeny v kapitole 8.2..

7.1 Materiál a jeho prvotní zpracování před samotným barvením

7.1.1 Odběr materiálu a jeho fixace

K provádění práce bylo využito bioptických vzorků tkáně. U všech vzorků se jednalo o resekáty tlustého střeva, které byly odebrány operativně při částečné nebo úplné kolektomii. Jako fixační činidlo bylo u odebraných tkání využito 10% formaldehydu.

7.1.2 Přijmutí tkáně a zhotovení preparátů před samotným barvením

Materiál do histologické laboratoře přichází v řádně označené nádobce a se správně vyplněným průvodním listem. Průvodní list musí obsahovat informace jako jméno a příjmení pacienta, jeho rodné číslo, klinická diagnóza, požadavek na vyšetření, datum odběru materiálu, druh fixační tekutiny a v neposlední řadě odesílatele. Laborant má povinnost takto uvedené údaje na žádance zkontrolovat, zda souhlasí s informacemi uvedenými na nádobce s materiálem.

Poté může patolog tkáň přikrojit a vybrat reprezentativní vzorky. Laborantka v této fázi příslušnému patologovi asistuje. Patolog dále vzorky vloží do kazet, na kterých jsou předem předtištěné informace jako číslo biopsie, pořadové číslo a rok. Kazety se vzorky poté laborantka vloží do odvodňovacího automatu přes noc a na druhý den ráno je tkáň připravena k zalití do bločku. V odvodňovacím automatu se materiál odvodní, zároveň prosytí látkou, která rozpouští parafin (např. Xylenem) a následně prosytí parafinem.

K samotnému zalití tkáně do bločku se využívá zalévací linka, kdy laborantka tkáň vloží do kovové formičky a zorientuje ji dle potřeby. Dále na kovovou formičku přiloží kazetu a vyplní ji parafínem. Takto zalitý bloček se nechá ztuhnout na chladicí desce.

Zalitě tkáně se poté krájí pomocí mikrotomů na tenké řezy o tloušťce 1 – 5 μm . Řezy se dále vloží na hladinu vody v Petriho misce, kde se napnou a poté opatrně přenesou na podložní sklíčko. Preparát se vloží do termostatu a nechá se uschnout.

7.2 Přístroje a pomůcky použité k barvení preparátů

K histologickému a imunohistochemickému vyšetření tlustého střeva byly použity laboratorní přístroje, které se rutinně využívají v provozu histologické laboratoře na patologicko - anatomickém oddělení v Nemocnici Jihlava. Samotné imunohistochemické barvení bylo realizováno manuálně. Zatímco k rutinnímu barvení hematoxylin – eosin a k barvení alciánovou modří bylo využito barvicího automatu.

7.2.1 Barvicí automat

Jak bylo již výše zmíněno, barvicí automat byl použit pouze na barvení hematoxylin – eosin a barvení alciánovou modří. K těmto barvením bylo využito přístroje značky LEICA, a to konkrétně model ST5020 (obr. č. 5). K lince náleží i montovací automat LEICA CV5030.

LEICA ST5020 je barvicí automat, který je navržen pro barvení histologických a cytologických preparátů. Tento barvicí automat zvládá zpracovat i 12 košů současně a umožňuje i současný provoz více barvicích programů najednou. Celý barvicí proces se zároveň zaznamenává na display a umožňuje tak orientaci v celém postupu barvení. Na jednotlivých barvicích koších můžeme zaznamenat různé barevné klipy, podle kterých si přístroj sám určí, jaký barvicí proces má zvolit. Kapacita jednoho barvicího koše je 30 skel. Reagenční nádoby mají objem až 450 ml. V sušící komoře se udržuje teplota kolem 40-70 °C. LEICA ST5020 je vybaven i integrovanou ochranou před výpary z reagensů (Leica Biosystems, 2017).



Obrázek 5: Barvicí automat (zdroj: vlastní)

7.2.2 Vodní lázeň

Při imunohistochemickém barvení bylo využito vodní lázně značky JULABA, která slouží k demaskování antigenních epitopů v tkáni.

Bylo zjištěno, že v důsledku fixace může docházet k vyvázání, maskování a v některých případech dokonce k zablokování antigenních determinant, které jsou přítomny v nativní tkáni. Díky této skutečnosti tak může dojít ke značnému zkrácení imunohistochemického vyšetření. Aby bylo dosaženo demaskování či případné revitalizaci takto zablokovaných epitopů, lze využít digesce proteolytickými enzymy nebo zahřátí tkáňových řezů v pufru ve vodní lázni (Dvořák et al., 2008).

7.3 Použité reagensie

K laboratornímu vyšetření byly použity reagensie jako monoklonální protilátky proti čtyřem MMR proteinům, pufrů, alkoholů a barviva. Protilátky byly použity od firmy DAKO.

7.3.1 FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Mutl Protein Homolog 1

Jedná se o protilátku určenou k používání v imunohistochemické diagnostice. Je to monoklonální myší protilátka, která je do laboratoře dodávána v kapalné podobě, a to jako supernatant buněčných kultur. Obsahuje totiž fetální bovinní sérum. Protilátka je izotopem IgG1, kappa a jedná se o klon ES05. Takto doručená protilátka je typu RTU (Ready-To-Use). Protilátku tedy nebylo zapotřebí před použitím naředit.

Jako imunogen slouží rekombinantní protein, který odpovídá části aminokyseliny 210 lidské molekuly MLH1. Imunoglobulin je tedy vhodný k diagnostice exprese MMR proteinů genu MLH1 (Dako North America, 2009).

7.3.2 FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Postmeiotic Segregation Increased 2

V tomto případě se jedná o monoklonální králičí protilátku, a to opět typu RTU. Do laboratoře je dodávána v kapalné podobě v pufru, který obsahuje stabilizující protein a 0,015 mol/l azidu sodného. Protilátka je izotopem IgG a jedná se o klon EP51.

Jako imunogen zde hraje roli syntetický peptid, který odpovídá reziduum v lidském proteinu PMS2. Imunoglobulin je tedy vhodný k diagnostice exprese MMR proteinů genu PMS2 (Dako North America, 2009c).

7.3.3 FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human MutS Protein Homolog 2

Jedná se opět o myší protilátku k okamžitému použití (RTU) a je určena pro využití v imunohistochemii. Touto protilátkou lze detekovat MutS protein homolog 2 nejen v normální, ale i neoplastické tkáni. Protilátka se dodává v kapalné formě, a to v podobě pufru, který obsahuje stabilizující protein a 0,015 mol/l azidu sodného. Protilátky jsou izotypu IgG1, kappa a jedná se o klon FE11.

Jako imunogen slouží rekombinantní protein, který obsahuje aminokyseliny karboxyl-terminál 330 z hMSH2. Imunoglobulin je tedy vhodný k diagnostice exprese MMR proteinů genu MSH2 (Dako North America, 2009a).

7.3.4 FLEX Monoclonal Rabbit Anti-human MutS Protein Homolog 6

Tato protilátka je také předem určena k využití v imunohistochemii a je králičího původu. Jedná se o klon EP49 a izotop protilátky IgG. Protilátka detekuje MSH6 jak v normální, tak i neoplastické tkáni. Je dodávána opět jako protilátka RTU a nemusí se tedy dále ředit. Protilátka se dodává v kapalné formě v podobě pufru, v kterém lze mimo jiné nalézt stabilizující protein a 0,015 mol/l azidu sodného.

Jako imunogen pro tuto protilátku slouží syntetický peptid odpovídající reziduum poblíž N-konce v lidském proteinu MSH6. Imunoglobulin může být tedy využit k diagnostice exprese MMR proteinů genu MSH6 (Dako North America, 2009b).

7.3.5 Promývací a demaskovací pufr

Promývací pufr má hodnotu pH 7,6 – 7,8. Před použitím je nutné ho zředit v poměru 1:20 (100 ml pufru + 1900 ml destilované vody).

Demaskovací pufr má hodnotu pH 9. Před použitím se ředí v poměru 1:50 (5 ml pufru + 45 ml destilované vody). Demaskovací pufr se vlivá do kyvety, která se vkládá do výše zmiňované vodní lázně.

7.3.6 *EnVision FLEX/HRP a Peroxidase Block RTU*

EnVison HRP je určen k používání s primárními protilátkami myšího i králíčího původu. Činidla jsou určené ke kvalitativní identifikaci antigenu pomocí světelné mikroskopie. Systém EnVision HRP je založen na polymeru, který je značen křenovou peroxidázou (HRP). Polymer je konjugovaný se sekundárními protilátkami. Primární protilátky dobře reagují s takto značeným polymerem (Dako North America, 2015).

K potlačení endogenní peroxidázové aktivity se docílí pětiminutovou inkubací vzorku s činidlem Peroxidase Block, který endogenní peroxidázu blokuje. V činidlu Peroxidase Block je obsaženo 0,03% peroxid vodíku obsahující azid sodný (Dako North America, 2015).

7.3.7 *DAB chromogen*

DAB (3,3'-diaminobenzidin) slouží k zviditelnění reakce u IHC barvení. Pokud se v tkáni nachází daný antigen, dojde k vazbě primární a sekundární protilátky. Po této reakci se nanese DAB chromogen a dojde k chemické reakci se značeným polymerem na sekundární protilátce. Tato chemická reakce zapříčiní vznik hnědé barvy produktu, který můžeme následně zaznamenat pod světelným mikroskopem. DAB je klasifikován jako potencionální karcinogen, proto je u jeho aplikace důležité dodržovat bezpečnostní zásady práce (Dako North America, 2015).

7.4 Barvení

Za pomoci výše uvedených přístrojů, pomůcek a reagentů bylo provedeno manuální imunohistochemické barvení tlustého střeva, spolu s barvením hematoxylin – eosin a alciánovou modří v barvicím automatu. Barvení bylo realizováno v souladu se schválenými rutinními manuálními protokoly v dané histologické laboratoři. K barvení bylo využito vzorků tlustého střeva za období roku 2018 – 2019.

Při samotném barvení je důležité především dodržovat jednotlivé časy barvení a nijak jednotlivé kroky neuspěchat. Podstatné je také kontrolovat kvalitu barvení pomocí kontrolních řezů a reagentie pravidelně měnit. U barvicích automatů je značnou výhodou, že jsou jednotlivé časy promývání, odkapávání a barvení neustále stejné a lze tak jednoduše dosáhnout standardizace postupu barvení.

7.4.1 IHC vyšetření tlustého střeva

Tímto vyšetřením detekujeme v buňkách vzorku tlustého střeva přítomnost či absenci DNA MMR proteinů. Využíváme k tomu již výše zmíněné protilátky, které jsou barevně označeny. Tyto protilátky se specificky naváží na předem daný MMR protein. Protilátky jsou namířeny proti MLH1, PMS2, MSH6 a MSH2. Po obarvení lze preparát odečítat pod světelným mikroskopem. Přítomnost proteinů ovlivňuje i to, zda je defekt v hlavním nebo ve vedlejším genu. Pokud se defekt vyskytne v hlavních genech (MLH1 či MSH2), bude nepřítomnost exprese MMR proteinů jak u hlavních genů, tak i u genů vedlejších (PMS2 či MSH6). Tento jev je zapříčiněn tím, že vedlejší protein je již nepotřebný. Pro úsporu aminokyselin totiž buňka veškeré nepotřebné proteiny degraduje ubiquitinovou cestou. Ovšem pokud není přítomen protein vedlejší, hlavní stále zůstává (Hadravský et al., 2017).

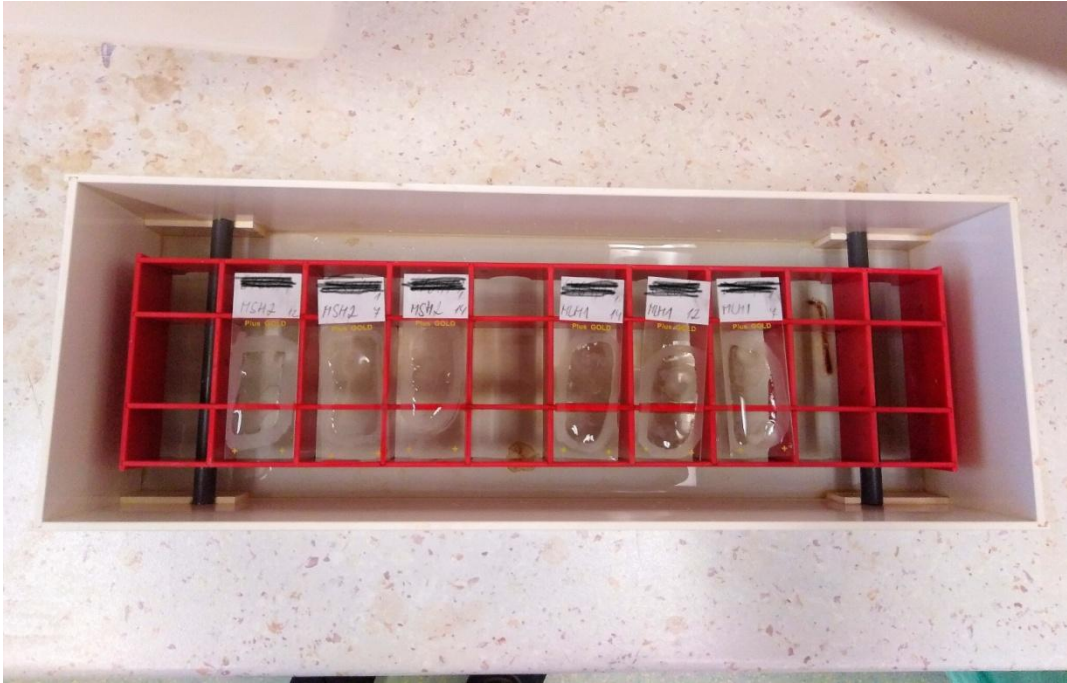
V případě, že výsledek barvení vyjde pozitivně pro LS, je pacient kontaktován a odkázán na molekulárně genetické vyšetření, které dědičné onemocnění dále potvrdí (Hadravský et al., 2017).

Manuální postup IHC barvení:

1. V první fázi barvení jsem si zředila pufr 3v1 v poměru 1:50 (5 ml pufru + 245 ml destilované vody).
2. Kyvetu s pufrem jsem vložila do vodní lázně. Vodní lázeň jsem následně nahřála na teplotu 97 °C. Teplotu jsem v průběhu zahřívání kontrolovala teploměrem. Po dostatečném zahřátí vodní lázně jsem do kyvety vložila odparafinované preparáty v tzv. kontejnerech a nechala je inkubovat 30 minut. Poté jsem kontejnery s preparáty vyjmula a ponechala je chladnout 20 minut při 25 °C.
Jako další možnost lze také vkládat i řezy neodparafinované, ale v tomto případě se mění doba inkubování preparátu ve vodní lázni na 40 minut. Teplota lázně a čas chladnutí se nemění. Neodparafinované řezy jsou schopné se v pufru odparafinovat a zároveň demaskovat antigen.
3. Po zchladnutí jsem preparáty vložila do promývacího pufru na 2 minuty.
4. Pomocí parafinového pera (liquid blocker) jsem okolo preparátů aplikovala tenkou vrstvu parafínu, který napomůže udržení reagentů na preparátu a reagentie se tak nerozlije po celém sklíčku.
5. Pomocí automatické pipety jsem aplikovala 100 µm peroxidázové blok RTU na 5 minut a vložila jsem je do vlhké komůrky.
6. Preparáty jsem opláchla promývacím pufrem.
7. Pomocí automatické pipety jsem aplikovala na preparáty primární protilátku RTU 30 minut.
8. Preparáty jsem opět propláchla pufrem.

9. Poté jsem na preparáty aplikovala pomocí automatické pipety Linker a ponechala ve vlhké komůrce 15 minut.
10. Preparáty jsem opět opláchla promývacím pufrem.
11. Po opláchnutí přišla na řadu aplikace EnVision FLEX/HRP, které jsem nanesla pomocí automatické pipety a nechala ve vlhké komůrce 30 minut.
12. Preparáty opláchneme promývacím pufrem.
13. Po opláchnutí jsem ještě preparáty vložila do kádinky s promývacím pufrem na 5 minut.
14. Po vyjmutí preparátů z kádinky jsem pomocí automatické pipety nanesla na preparáty DAB chromogen a ponechala ho působit ve vlhké komůrce v časovém rozmezí 10 minut.
15. Preparáty jsem opláchla promývacím pufrem.
16. Po opláchnutí jsem preparáty vložila do kádinky obsahující Gillův hematoxylin a ponechala jsem je v něm po dobu 2 minut.
17. Poté jsem přistoupila ke kroku, který je nazýván jako tzv. modrání jader, kdy jsem nechala preparáty v kádince s vodou z vodovodu po dobu 2 minut.
18. Na závěr barvení jsem preparáty odvodnila a projasnila v lázních s 96% alkoholem, acetonem, aceton-xylenem a samotným xylenem. Po projití preparátu těmito lázněmi došlo k jejich odvodnění a projasnění.
19. V poslední fázi barvení jsem preparát zamontovala montovacím médiem, konkrétně solakrylem BMX, na který jsem následně přiložila krycí sklíčko. Před samotným zamontováním preparátu se musí dbát na to, aby preparát nezačal osychat. Také je důležité krycí sklíčko pokládat opatrně, aby se zamezilo vzniku vzduchových bublin.

Ve výsledném barvení bychom měli vidět prokazované antigeny hnědě a jádra buněk modře. Při jednotlivých krocích jsem postupovala obezřetně a tak, aby reagentie vždy pokryly celou plochu tkáně na preparátu. V případě vkládání preparátů do kádinek s reagentiemi jsem kontrolovala, zda hladina reagentií je dostatečná a dosahuje na všechny části preparátu.



Obrázek 6: Preparáty ve vlhké komůrce (zdroj: vlastní)

7.4.2 Barvení hematoxylin – eosin

Jedná se o základní barvicí techniku, využívanou v histologických laboratořích. Hematoxylin se řadí mezi bazická barviva a v tkáních zbarví jádra do modra. Eosin je oproti hematoxylinu barvivo kyselé a v tkáních barví cytoplazmu červeně. Nejběžněji se k rutinnímu barvení využívá hematoxylin Mayerův (Dvořák et al., 2008).

Toto barvení jsme využily u každého vzorku tlustého střeva. Sloužilo nám k základnímu znázornění jednotlivých struktur v tkáni tlustého střeva. K barvení jsme využily hematoxylin Weigertův.

Nejprve jsem na košík připnula červený klip, podle kterého barvicí automat rozpozná, jakou barvicí metodu má zahájit. V tomto případě červený klip značí metodu hematoxylin – eosin. Do košíku jsem poté vložila jednotlivé preparáty otočené s tkání směrem k barevnému klipu. Takto připravený košík jsem pak vložila do vstupní stanice. Barvicí automat si poté již sám načte barvicí metodu ihned po vložení košíku. Následně se na displayi zobrazí metoda, kterou automat zvolil. Poté barvicí automat preparáty obarví a následně na navazující montovací lince i zamontuje. Po tomto procesu jsem připravené preparáty vyjmula a připravila do jednotlivých desek pro odečítání preparátů a stanovení diagnózy odborným patologem.

Barvicí protokol, podle kterého postupuje barvicí automat LEICA ST5020 k barvení preparátů technikou hematoxylin – eosin:

- | | |
|----------------------------------|-------------|
| 1. Sušení | 10 minut |
| 2. Xylen | |
| 3. Xylen | |
| 4. Alkohol 96% | |
| 5. Alkohol 96% | |
| 6. Alkohol 80% | |
| 7. Alkohol 70% | |
| 8. Hematoxylin Weigertův | 5 -10 minut |
| 9. Alkohol 70% (oplach) | |
| 10. Oplach vodou | |
| 11. Kyselý alkohol 3% | 10 sekund |
| 12. Oplach vodou | |
| 13. Uhličitan lithný | 30 sekund |
| 14. Oplach vodou (modrání jader) | |
| 15. Eosin | 3-5 minut |
| 16. Oplach vodou | |
| 17. Alkohol 96% | |
| 18. Aceton | |
| 19. Aceton-xylen | |
| 20. Xylen | |

Výsledek barvení: jádra buněk – modře. Erythrocyty – oranžovočerveně. Cytoplasma a ostatní tkáň – červená až růžová.

7.4.3 Barvení alciánovou modří

Pohárkové buňky ve stěně tlustého střeva obsahují kyselé mukopolysacharidy, tzv. GAG. Tyto GAG lze barvit alciánovou modří při pH 2,5. Barvení alciánovou modří je užitečné při odhalování tzv. myxoidních nádorů (myxoidní lipom, myxoidní liposarkom, myxoidní fibrom, lipoblastom, myxoidní maligní fibrózní histiocytom) (Dvořák et al., 2008).

Preparáty jsem vložila do barvicího automatu stejným způsobem, které jsou již popsány v kapitole 7.4.2.. Jediný rozdíl, který jsem u tohoto barvení učinila byl ten, že jsem místo červeného klipu na košík připnula klip modrý, který značí metodu barvení alciánovou modří.

Barvicí protokol, podle kterého postupuje barvicí automat při barvení alciánovou modří:

1. 1. Sušení 10 minut
2. Xylen
3. Xylen
4. Alkohol 96%
5. Alkohol 96%
6. Alkohol 80%
7. Alkohol 70%
8. Destilovaná voda
9. Alciánová modř 30 minut
10. Opláchnutí vodou
11. Jádrová červeň 5 minut
12. Opláchnutí vodou
13. Alkohol 96%
14. Aceton
15. Aceton-xylen
16. Xylen

Výsledek barvení: hlen – modrozeleně. Jádra buněk – červeně.

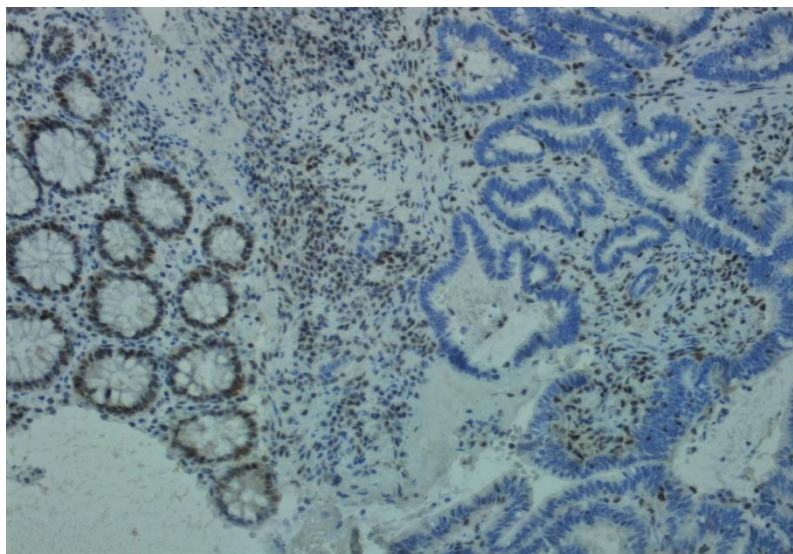
8. Výsledky výzkumu

Všechny níže uvedené tabulky a grafy jsou zpracované z výsledků, které mi byly poskytnuty v Nemocnici Jihlava p. o. na patologicko-anatomickém oddělení. Již ze zvolené metodiky lze odvodit, že veškerým vyšetřovaným materiálem byly vzorky tkáně tlustého střeva od pacientů ze zmíněné nemocnice za rok 2018 – 2019. Vyšetřovaný soubor za tuto roční období činil dohromady 121 vzorků s CRC.

Dále v této kapitole lze najít krom statisticky zpracovaných dat i výsledné mikrofotografie všech tří barvicích metod u pacienta s CRC. Samotné mikroskopování a následné určení diagnózy provádí patolog. Proto uvádím pouze fotografie výsledného barvení spolu s komentáři, kde můžeme názorně vidět defekt v expresi MMR proteinů, tkáň bez defektu v MMR proteinech a rutinní barvení hematoxylin – eosin a alcianovou modří. Všech šest uvedených mikrofotografií pochází od jednoho pacienta s karcinomem tlustého střeva.

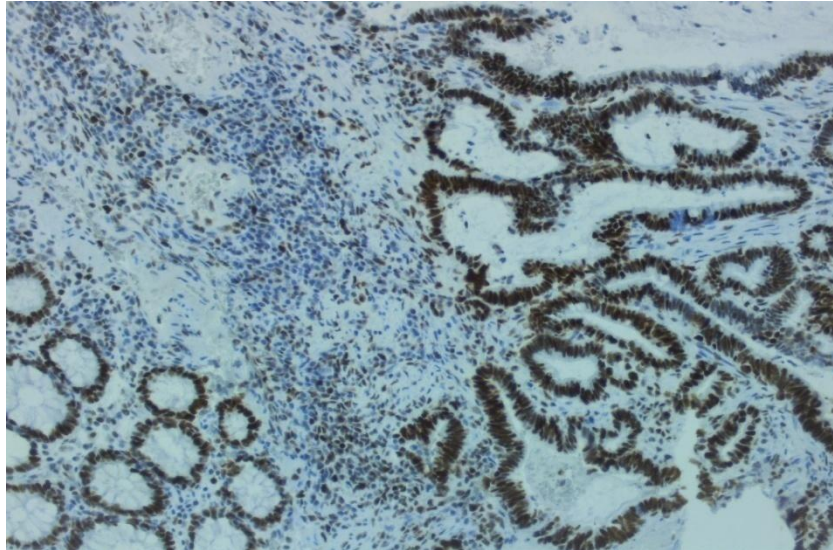
8.1 Výsledky barvení

Na obrázku 7 můžeme vidět imunohistochemické barvení exprese proteinu MLH1 u karcinomu tlustého střeva. V pravé části obrázku lze nalézt část karcinomu tlustého střeva s negativním barvením jader. Jedná se tak o defekt exprese proteinu MLH1. V levé části je poté přítomna normální sliznice tlustého střeva již s pozitivním barvením jader. Tato část slouží k pozitivní vnitřní kontrole. Na obrázku lze zpozorovat i pozitivní barvení stromatu, které také slouží jako pozitivní kontrola.



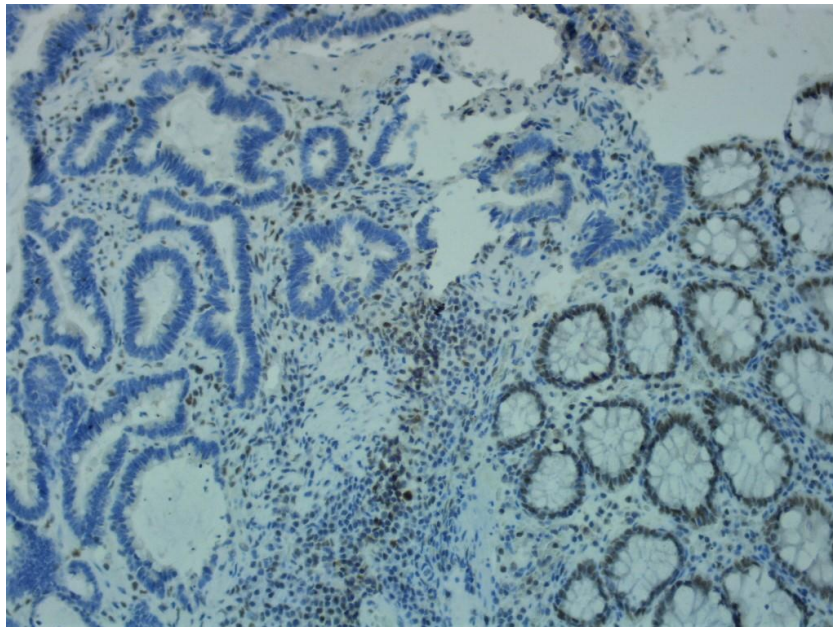
Obrázek 7: IHC vyšetření MLH1, 200x zvětšení (Zdroj: vlastní)

Na obrázku 8 lze v pravé části vidět karcinom s pozitivním barvením jader v imunohistochemickém barvení exprese proteinu MSH6. Defekt exprese tohoto proteinu je tedy nepřítomen. V levé dolní části obrázku lze poté shledat normální sliznici tlustého střeva.



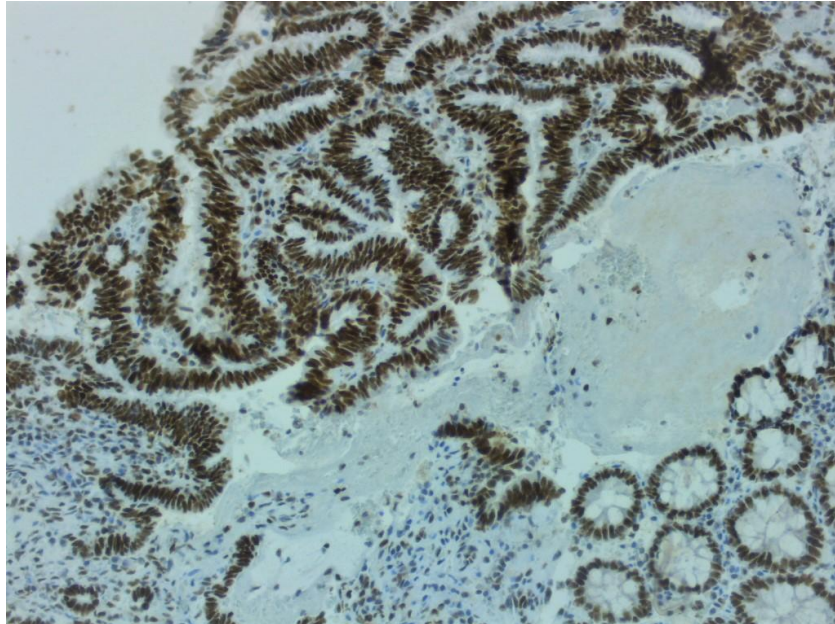
Obrázek 8: IHC vyšetření MSH6, zvětšení 200x (Zdroj: vlastní)

Obrázek 9 znázorňuje imunohistochemické vyšetření exprese proteinu PMS2. V levé části lze sledovat karcinom s negativním barvením, tudíž se jedná o defekt v tomto proteinu. V pravé části pak lze opět najít normální sliznici tlustého střeva, sloužící jako pozitivní vnitřní kontrola správnosti barvení.



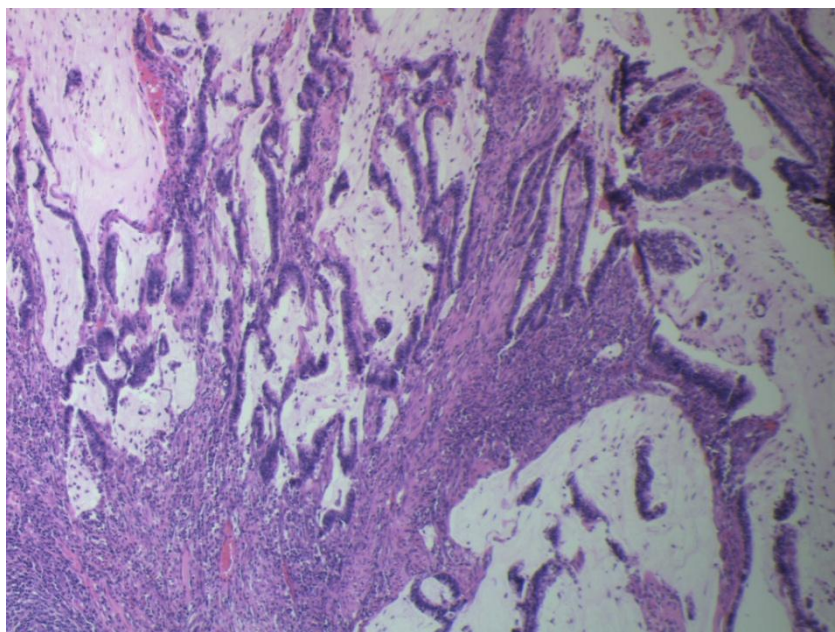
Obrázek 9: IHC vyšetření PMS2, zvětšení 200x (Zdroj: vlastní)

Obrázek 10 je posledním imunohistochemickým vyšetřením exprese proteinu MSH2. V levé části obrázku je patrný karcinom s pozitivním barvením jader, defekt tedy není přítomen. V pravé části obrázku je poté normální sliznice tlustého střeva, sloužící jako pozitivní kontrola.

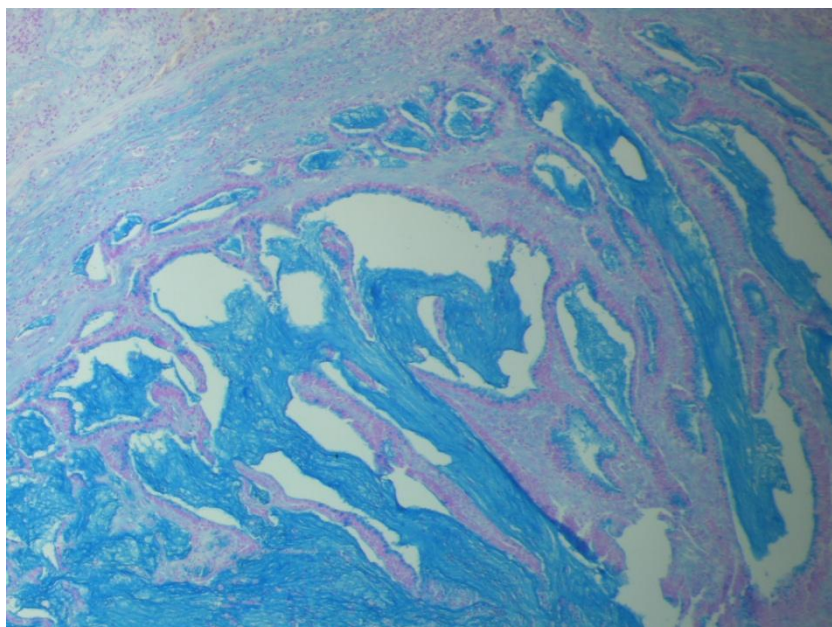


Obrázek 10: IHC vyšetření MSH2, zvětšení 200x (Zdroj: vlastní)

Na následujícím obrázku 11 můžeme vidět karcinom barvený metodou hematoxylin-eosin. Na obrázku 12 pak můžeme vidět barvení alciánovou modří. V tumoru lze shledat hojný extracelulární hlen i zánětlivý infiltrát. Jedná se o znaky, které lze často nalézt u nádorů s vysokým stupněm mikrosatelitové instability (MSI-H).



Obrázek 11: barvení hematoxylin - eosin, zvětšení 100x (Zdroj: vlastní)



Obrázek 12: Barvení alcianovou modří, zvětšení 100x (Zdroj: vlastní)

8.2 Analyzovaný soubor pacientů s CRC za rok 2018 – 2019

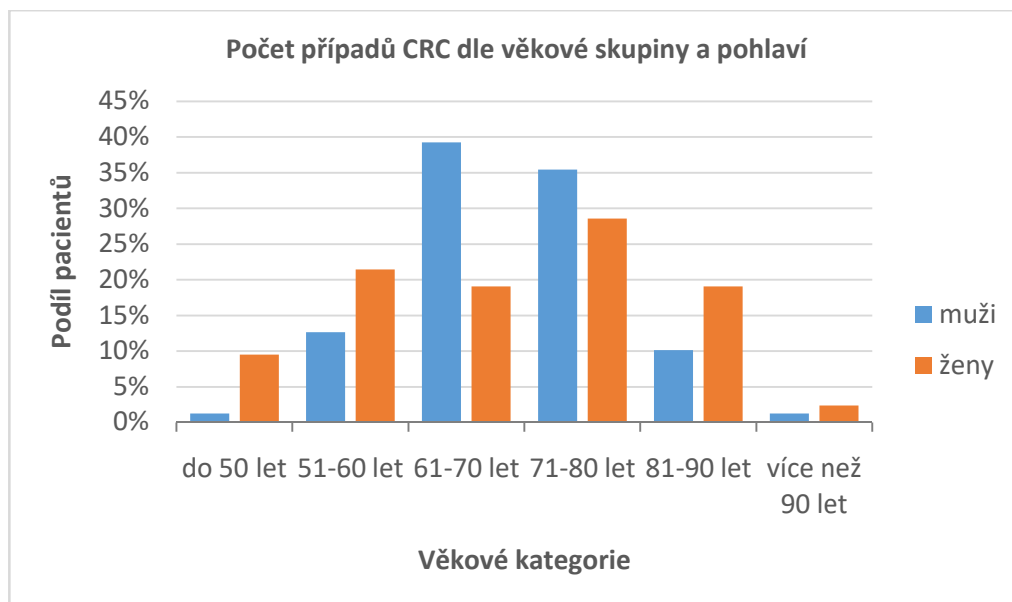
V následující tabulce 1 lze vidět všech 121 vzorků přehledně rozdělených dle pohlaví a věku. Již z těchto dat se dá odvodit, že v počtu uvedených případů CRC dominují muži.

Tabulka 1: počet vzorků CRC v rozdělení dle pohlaví a věku

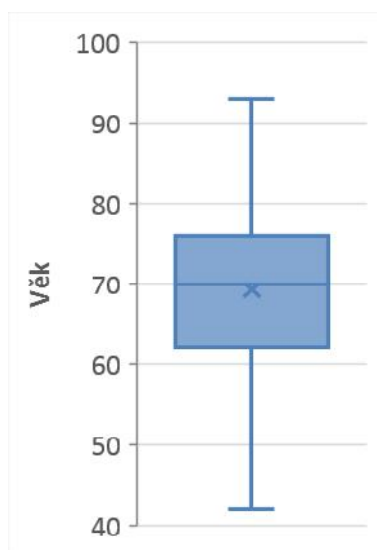
Věková kategorie	Pohlaví		Celkem	Pohlaví	
	muži	Ženy		muži	Ženy
do 50 let	1	4	5	1,3%	9,5%
51-60 let	10	9	19	12,7%	21,4%
61-70 let	31	8	39	39,2%	19,0%
71-80 let	28	12	40	35,4%	28,6%
81-90 let	8	8	16	10,1%	19,0%
více než 90 let	1	1	2	1,3%	2,4%
Celkem	79	42	121	100,0%	100,0%

(zdroj: vlastní)

Na obrázku č. 13 je graf vytvořený z dat v tabulce č. 1, znázorňující počet onemocnění žen a mužů dle věkových kategorií. Jelikož je zastoupení mužů a žen značně odlišné, byly pro prezentaci výsledků v grafu zvoleny relativní četnosti. Nejvíce případů CRC u mužů se vyskytlo ve věkové kategorii 61 – 70 let, kdy jejich počet dosáhl skoro 40 %. U žen se nejvíce případů CRC objevilo ve věkové kategorii 71 – 80 let, kdy jejich počet v tomto sahal téměř k 30 %. Nejméně případů CRC u žen pak bylo ve věkové kategorii nad 90 let, kdy podíl pacientů nedosáhl ani 5 %. U mužů se nejmenší hodnoty případů CRC vyskytly srovnatelně ve dvou věkových kategoriích, a to ve věkové kategorii do 50 let a poté ve věkové kategorii nad 90 let, kdy podíl pacientů také nedosáhl ani 5%.



Obrázek 13: Počet případů CRC dle věkové skupiny za rok 2018 - 2019 (zdroj: vlastní).



Obrázek 14: krabicový graf (zdroj: vlastní)

Na obrázku 14 pak můžeme vidět krabicový graf, který nám slouží k přehlednému posouzení souboru dat věku pacientů.

Nabízí se nám zde otázka, zda je věk žen a mužů srovnatelný. Dle t testu kdy $p = 85,6\%$, můžeme říct, že průměrný věk se neliší podle pohlaví pacientů.

Z tabulky č. 2 můžeme vidět, že konfidenční interval podílu mužů neobsahuje hodnotu 50 % a můžeme tedy tvrdit, že je podíl mužů nadpoloviční. U podílu vzorků s defektem v MMR proteinech můžeme naopak tvrdit, že jejich podíl ani zdaleka nedosahuje poloviny. U věku pacientů se nám konfidenční interval částečně překrývá s hypotetickým rozmezím 60 – 70 let. Lze tedy tvrdit, že se onemocnění vyskytuje přibližně v navrhovaném rozmezí, avšak spíše na jeho horní hranici.

Tabulka 2: test statistické významnosti

Proměnná	Hodnota	Stř. chyba	95% konfidenční interval	
			horní	Dolní
Podíl mužů	65,3%	4,3%	73,8%	56,8%
Podíl vzorků s defektem	9,9%	3,1%	16,0%	3,8%
Průměrný věk (roky)	69,2	1,0	71,2	67,3

(zdroj: statistik JCU)

Kritéria pro imunohistochemické vyšetření skrze screening Lynchova syndromu splnilo 91 vzorků ze 121. Jak můžeme vidět dle kategoriálních dat v tabulce č. 3, defekt v MMR proteinech byl prokázán pouze u 9 vzorků, z toho 5 vzorků byly muži a 4 vzorky ženy.

Tabulka 3: Rozdělení vzorků dle defektu v MMR proteinech

Defekt MMR proteinů	Pohlaví		Celkem
	Muži	Ženy	
ano	5	4	9
ne	50	32	82
Celkem	55	36	91

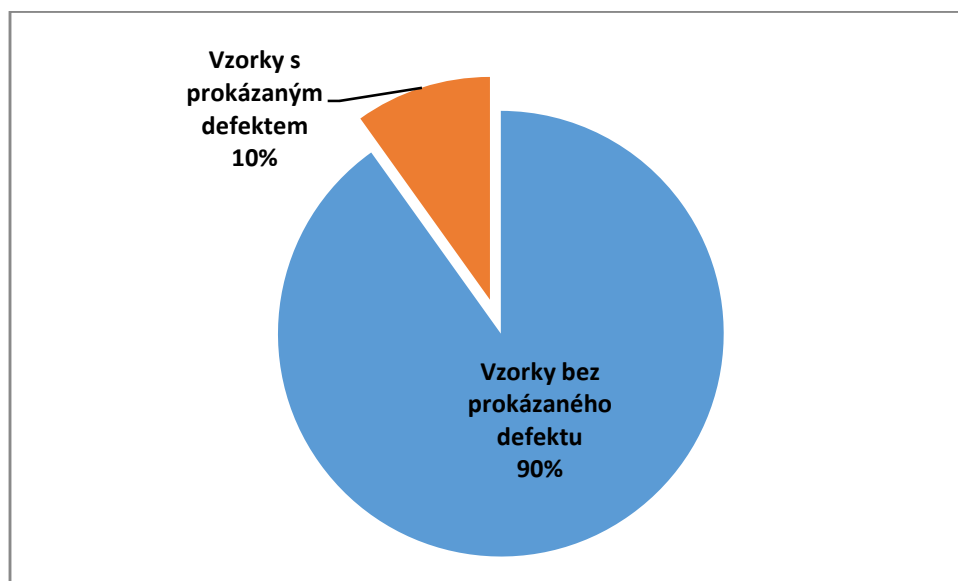
(zdroj: vlastní)

Je výskyt defektu v MMR proteinech závislý na pohlaví?

Chí kvadrát test $p = 75,2\%$

Výskyt defektu v MMR proteinech není závislý na pohlaví, jelikož je u mužů i žen stejný.

Přehledné znázornění poměru počtu vzorků bez defektu a s defektem v MMR proteinech můžeme vidět na obrázku č. 6, kdy vidíme, že z celkového počtu vyšetřovaných vzorků byl defekt prokázán jen v 10 % případů CRC.



Obrázek 15: poměr vzorků s defektem a bez defektu v MMR proteinech

(Zdroj: vlastní)

9. Diskuze

Téma kolorektálního karcinomu v ČR je velmi aktuální a má jak praktický, tak i sociální význam, jelikož incidence CRC a s ní spojená úmrtnost v naší zemi nás zařazuje na první příčky v incidenci tohoto onemocnění v celosvětovém měřítku (Penka a Kala, 2008).

Tato bakalářská práce se zabývá zpracováním 121 vzorků kolorektálního karcinomu, které byly vyšetřovány za období roku 2018 – 2019. Vzorky byly vyšetřeny pomocí běžných histologických metod jako je barvení preparátů pomocí barvicí metody hematoxylin – eosin a metody barvení alciánovou modří. 91 vzorků z celkových 121 splnilo kritéria pro speciální imunohistochemické vyšetření, kdy se v tkáni detekovala přítomnost čtyř hlavních MMR proteinů – MLH1, PMS2, MSH2 a MSH6. Z celkového počtu vzorků jsme se poté snažily zjistit, zda výskyt kolorektálního karcinomu u pacientů v Nemocnici Jihlava p. o. je závislý na věku a pohlaví pacientů, a také u jak velkého počtu vzorků bude prokázán defekt v expresi MMR proteinů.

Hlavním cílem této bakalářské práce bylo kvantitativní zpracování výsledků z dat získaných v Nemocnici Jihlava p. o., které se následně budu v této kapitole snažit porovnat s ostatními studiemi a zdroji. Ze získaných dat a následných výpočtů se nám podařilo ověřit všechny tři zvolené hypotézy. Podíl mužských vzorků z celkového počtu se ukázal jako nadpoloviční. Většina případů CRC se vyskytovala přibližně v navrhovaném hypotetickém rozmezí 60 – 70 let, ale držela se spíše na jeho horní hranici. Ovšem průměrný věk pacientů nebyl závislý na jejich pohlaví. Podíl vzorků s prokázaným defektem v MMR proteinech nedosahoval ani třetiny všech vzorků a nebyl závislý ani na pohlaví pacientů, jelikož byl u mužů i žen stejný.

Analyzovaný soubor jsem se rozhodla porovnat s daty z portálu SVOD (systém pro vizualizaci onkologických dat), který byl vytvořen kolektivem autorů Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, a také Masarykovým onkologickým ústavem v Brně. Webový portál svod pracuje převážně s daty poskytnutými Národním onkologickým registrem (NOR), který je dále řízen Ústavem zdravotnických informací a statistiky ČR. SVOD poskytuje srovnání dat od roku 1977 do roku 2017. Z grafů uvedených na tomto portálu lze zaznamenat, že ve srovnání vývoje hrubé incidence dle pohlaví dominují hlavně muži, a to především od roku 1997, kdy se rozdíl mezi počtem případů a pohlavím výrazně zvyšuje. Co se týče věkové struktury pacientů, tak od 50 roku začíná křivka strmě stoupat a vrcholí na hranici 75 let, což se přibližně podobá i datům v této práci. Na portálu Svod lze data rozdělit i dle krajů. Jelikož jsem svůj výzkum, prováděla v Nemocnici Jihlava p. o., zvolila jsem si pro porovnání i výsledky z kraje Vysočina. U těchto grafů, co se týče incidence dle pohlaví a věku, můžeme vidět podobnou situaci jako u dat z celé ČR. V incidenci opět dominují muži, avšak co se týče věku,

lze pozorovat mírný rozdíl. Jak u mužů, tak i žen věková křivka vrcholí kolem 84 roka života. Použité grafy k srovnání výsledků lze najít v příloze této práce (příloha 1 – 5) (Dušek, 2007).

Pro celosvětové srovnání jsem zvolila databázi Global Cancer Observatory (GCO), která funguje jako interaktivní webová platforma představující globální statistiky co se týče onkologických onemocnění. Tuto platformu zajišťuje International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Nedávné statistiky z této platformy naznačují, že výskyt CRC v ČR je nad celosvětovým průměrem, a to především u českých mužů. Míra výskytu CRC u mužů se řadí na 19. místo ve světě a 14. místo v Evropě, zatímco ženy se zařazují na 28. – 29. místo celosvětově a 18 – 19 místo v Evropě (Ferlay, 2018). Co se týče věku, tak GCO uvádí největší incidenci CRC ve věkové skupině od 60 – 74 let, což zhruba odpovídá i našemu hypotetickému rozmezí. Incidence CRC silně narůstá od 50 roka života (GLOBCAN, 2018).

Když ještě zůstaneme u světového srovnání, tak např. Keum a Giovannucci uvádí ve své studii z roku 2019, že se počet případů CRC rapidně zvyšuje od věkové kategorie 50 let. Také se zmiňuje, že po 50 letech věku lze pozorovat i značný rozdíl mezi souvislostí nárůstu incidence a pohlaví, kdy je počet případů vyšší u mužů a dochází až k 1,4 násobnému rozdílu v incidenci mezi muži a ženami (Keum a Giovannucci, 2019).

Co se týče hypotézy č. 3, tak bohužel srovnání počtu případů CRC v souvislosti s Lynchovým syndromem není na portálu SVOD a GCO zaznamenán. Ovšem Ma et al. ve své práci uvádí, že 2 – 5 % případů CRC souvisí s dědičným onemocněním a to včetně Lynchova syndromu, který se uvádí jako nejběžnější genetická predispozice CRC a podílí se na 2 – 4 % případů tohoto onemocnění (Ma et al., 2018). Toto odpovídá uvedenému tvrzení již v teoretické části od Win et al., kteří uvádí, že z nově vzniklých případů CRC jsou 3 % připisována Lynchovu syndromu (Win et al., 2017). Na druhé straně Plevová ve své práci „Nové poznatky o geneticky podmíněných nádorech tlustého střeva a polypózách gastrointestinálního traktu“ hovoří o odhadu téměř 20 – 30 % případů CRC v souvislosti s familiárním podkladem, přičemž 5 – 10 % souvisí se známým genetickým syndromem. Ovšem co se týče CRC zapříčiněných v důsledku Lynchova syndromu, uvádí shodné 2 – 3 % jako v předchozích zmíněných pracích (Plevová, 2019). V této bakalářské práci uvádím, že defekt v MMR proteinech, který zapříčiňuje Lynchův syndrom, byl zjištěn u 10 % imunohistochemicky vyšetřovaných vzorků, což se liší od procent ve výše zmíněných pracích. Tato odchylka mohla vzniknout i na podkladě toho, že použitá IHC metoda je pouze screeningovým vyšetřením tohoto genetického onemocnění a pacienti, u kterých byl defekt nalezen, jsou dále odkázáni na molekulárně genetická vyšetření, která tento defekt následně potvrdí. Jistě by bylo také vhodné při dalším výzkumu analyzovat větší soubor pacientů, jelikož IHC metodou bylo vyšetřeno 91 vzorků a při tak malém procentu pozitivních pacientů může nastat určité zkreslení hodnot.

10. Závěr

Tématem bakalářské práce je histologické vyšetření tlustého střeva. Pro práci byly definovány tři cíle a v návaznosti na ně byly stanoveny tři hypotézy, které jsme statisticky ověřovali.

Prvním cílem této bakalářské práce bylo zhotovení odborné rešerše. Tento cíl jsem splnila v teoretické části bakalářské práce, kdy jsem ze začátku představila anatomii, histologii a patologii tlustého střeva. V teoretické části jsou i obecné informace o odběru a histologických metodách zpracování tkáně tlustého střeva a jeho barvení.

Tyto teoretické znalosti jsem následně využila v praktické části, ve které bylo mým dalším cílem si tyto histologické a imunohistochemické metody prakticky osvojit. Prakticky osvojené metody jsem následně blíže představila v metodice a s nimi i spojené přístroje a reagentie, které byly k daným metodám využity. Metody jsou rutinně využívány v provozu nemocničních laboratoří, což usnadnilo přístup a dostupnost těchto metod.

Třetím a posledním cílem práce bylo ze souboru vyšetřených vzorků za rok 2018 - 2019 na pracovišti patologicko-anatomickém oddělení v Nemocnici Jihlava p. o. výsledky kvantitativně zpracovat a porovnat. Pro práci byly zvoleny celkem tři hypotézy, které se následně podařilo ověřit. Ve své práci jsem zjistila, že výskyt CRC ovlivňuje jak pohlaví pacienta, tak i jeho věk. Také jsem zjistila, že defekt v MMR proteinech se vyskytoval zhruba jen v 10 % případů, z celkového počtu imunohistochemicky vyšetřovaných vzorků. V této práci byly tedy splněny všechny cíle a zároveň potvrzeny stanovené hypotézy.

Karcinom tlustého střeva je závažné onemocnění, které trápí již řadu let nejen Českou republiku, ale stává se již celosvětovým problémem. Jelikož je prognóza v časném záchytu onemocnění velmi příznivá, je na místě pokládat prevenci a screeningová vyšetření za velmi důležitou a přínosnou roli v naší společnosti. Po rozvinutí tohoto onemocnění do vyšších stádií nastupují často metastázy, které zasahují nejčastěji játra a další orgány, což následnou prognózu značně nepříznivě ovlivňuje.

Ačkoliv se z bakalářské práce může zdát, že případy CRC vzniklé na podkladě Lynchova syndromu se pohybují v malých procentech, je i tak důležité tyto pacienty aktivně vyhledávat. Prováděnými IHC screeningovými vyšetřeními lze nejen značně napomoci rodinné anamnéze, ale také včasnému záchytu dalších vzniklých nádorů v souvislosti s Lynchovým syndromem.

11. Seznam literatury

1. AUTENRIETH, D. M., BAUMGART, D. C., 2012. Toxic megacolon[online]. *Inflammatory Bowel Diseases*. 18(3), 584-591 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1002/ibd.21847. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ibdjournal/article/18/3/584-591/4608027>
2. BALLESTER FERRÉ, M. P., BOSCA-WATTS, M. M., MÍNGUEZ PÉREZ, M., 2018. Enfermedad de Crohn [online]. *Medicina Clínica*. 151(1), 26-33 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1016/j.medcli.2017.10.036. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025775317308448>
3. BEDNAŘÍK O., 2008. Diagnostika a léčba nádorů tlustého střeva a konečníku. *Interní medicína pro praxi*. 10(4), 172 – 178s. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2008/04/06.pdf>
4. BÜCHLER, T., 2017. *Speciální onkologie*. Praha: Maxdorf. 274 s. ISBN 9788073455392.
5. ČIHÁK, R., 2013. *Anatomie 2.. 3. vydání*. Praha: Grada. 512 s. ISBN 9788024747880.
6. ČÍŽKOVÁ, K., 2018. *Základy histochemických metod*. Univerzita Palackého v Olomouci (lékařská fakulta). 50 s. ISBN 9788024453163.
7. Dako North America, 2009. *FLEX Monoclonal Mouse Anti – Human MutL Protein Homolog 1.1 – 3* s. DOI: 307806CZ_002 Dostupné z: www.dako.cz.
8. Dako North America, 2009a. *FLEX Monoclonal Mouse Anti – Human MutS protein Homolog 2*. 1-4 s. DOI: P01931CZ_002_IR085/2015.09 p Dostupné z: www.dako.com.
9. Dako North America, 2009b. *FLEX Monoclonal Mouse Anti – Human MutS protein Homolog 6*. 1-4 s. DOI: P01933CZ_002_IR086/2015.09 p. Dostupné z: www.dako.com.
10. Dako North America, 2009c. *FLEX Monoclonal Rabbit Anti-Human Postmeiotic Segregation Increased 2*. 1-4 s. DOI: P01935CZ_002_IR087/2015.09 p Dostupné z: www.dako.com.
11. Dako North America, 2015. *Dako EnVisio+ Systém-HRP (DAB)*. 1-7 s. DOI: P04045CZ_01_K4006_K4007/2015.07 Dostupné z: www.dako.com.
12. DRDOVÁ, M., DVOŘÁKOVÁ, V., JELÍNKOVÁ, N., 2010. Kolorektální karcinom - epidemiologie a genetika. ISSN 2570-8791. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/kolorektalni-karcinom-epidemiologie-a-genetika/>.

13. DUŠEK, L., MUŽÍK, J., KUBÁSEK, M., KOPTÍKOVÁ, J., ŽALOUDEK, J., VYZULA, R., 2007. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Masarykova univerzita. [cit. 2020-07-10]. ISSN 1802 – 8861. Dostupné z: <http://www.svod.cz>.
14. DUŠEK, M., HADRAVSKÝ, L., ČERNÁ, K., et al., 2016. Lynch Syndrome – the Pathologist’s Diagnosis [online]. *Klinická onkologie*. 29(3), 180-186. [cit. 2020-02-27]. DOI: 10.14735/amko2016180. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/klinicka-onkologie-journal/search-for-articles/skupina/a/zobrazit/ids/4976/>
15. DVOŘÁK, K., DVOŘÁKOVÁ, Z., FEIT, J., LUKÁŠ, Z., ŠMARDOVÁ, J., 2008. *Základy histopatologických metod* [online]. Brno: Masarykova Univerzita [cit. 2020-04-03]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLHM0422c/um/Zaklady_histopatologickych_vysetrovacich_metod.pdf
16. DYLEVSKÝ, I., 2000. *Somatologie*. 2. vydání. Olomouc: Epava. 480 s. ISBN 8086297055.
17. FERLAY, J., ERVIK, M., LAM, F., COLOMBET, M., MERY, L., PŮNĚR, M., ZNAOR, A., SOERJOMATARAM, I., BRAY, F., 2018. *Global Cancer Observatory: Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [cit. 2020-02-15]. Dostupné z <https://gco.iarc.fr/today>.
18. FIALA, L., 2019. *Chirurgické výkony v prevenci nádorů* [online]. Masarykův onkologický ústav [cit. 2020-06-03]. Dostupné z: <https://www.mou.cz/chirurgicke-vykony-v-prevevci-nadoru/t2055>.
19. FIALA, P., VALENTA, J., EBERLOVÁ, L., 2015. *Stručná anatomie člověka*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Karolinum. 244 s. ISBN 9788024626932.
20. Fučíková, T., 1997. *Klinická imunologie v praxi*. 2. vydání. Praha: Galén. 343 s. ISBN 8085824574.
21. GAJENDRAN, M., LOGANATHAN, P., JIMENEZ, G., P. CATINELLA, A. P., NG, N., UMAPATHY, Ch., ZIADE, N., HASHASH, J. G., 2019. A comprehensive review and update on ulcerative colitis [online]. *Disease-a-Month*. 65(12) [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1016/j.disamonth.2019.02.004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0011502919300318>
22. GLOBCAN, 2018. *Graph production: Global Cancer Observatory*. International Agency for Research on Cancer. Dostupné z: <http://gco.iarc.fr/>.
23. GREGOR, J., KREJČÍ, D., MUŽÍK, J., ŠNAJDROVÁ, L., 2018. *Epidemiologie kolorektálního karcinomu v České Republice* [online]. Masarykova univerzita, Brno. [cit. 2020-02-22]. ISSN 1804-0888. Dostupný z: <http://www.kolorektum.cz>.

24. HADRAVSKÝ, L., DAUM O., MICHAL, M., © 2017. *Lynchův syndrom* [online]. Bioptická laboratoř s.r.o. [cit. 2020-04-24]. Dostupné z: <http://www.lynch.cz/diagnostika.php>
25. JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J., KELLEY, R. O., 1997. *Základy histologie*. Jinočany: H & H. 502 s. ISBN 8085787377.
26. KACHLÍK, D., 2018. *Anatomie pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Karolinum. 154 s. ISBN 9788024640587.
27. KARGES, W. J. P., DAHOUK, S., 2011. *Vnitřní lékařství: stručné repetitorium*. Praha: Grada. 112 s. ISBN 9788024731087.
28. KEUM, N., GIOVANNUCCI, E., 2019. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 16(12), 713-732. DOI: 10.1038/s41575-019-0189-8.
29. LABGUIDE, © 2019. *Imunoglobulin* [online]. [cit. 2020-07-14]. Dostupné z: <https://labguide.cz/protilatky/imunoglobulin/>.
30. LEICA BIOSYSTEMS, 2017. *Instructions for Use Leica ST5020 Multistainer* [online]. [cit. 2020-01-10]. Dostupné z: <http://www.LeicaBiosystems.com>.
31. Linkos © 2020. *Operace tlustého střeva*. Česká onkologická společnost, České lékařské společnosti J. E. Purkyně. ISSN 2570-8791. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/slovnicek/kolektomie/>.
32. LUKÁŠ, K., a kol., 2005. *Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry*. Praha: Grada. 288 s. ISBN 8024712830.
33. LUKÁŠ, Z., 1997. *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice*. Brno: Masarykova univerzita. 147s. ISBN 80-210-0620-x.
34. LÜLLMANN-RAUCH, R., 2012. *Histologie*. 3. vydání. Praha: Grada. 576 s. ISBN 9788024737294.
35. MA, H., LODEWIJK, A., A., BROSENS, G., J., A., OFFERHAUS, F., M., GIARDIELLO, WENDY W., J., LENG, D., MONTGOMERY, E., A., 2018. Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology*. 50(1), 49-59. DOI: 10.1016/j.pathol.2017.09.004.
36. MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J., 2004. *Patologie*. Praha: Grada. 347 s. ISBN 8024707853.
37. MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J., DVOŘÁČKOVÁ, J., 2012. *Patologie*. 2. Vydání. Praha: Grada. 376 s. ISBN 9788024735306.
38. MAGRO, F., LANGNER, C., DRIESSEN, A., et al., 2013. European consensus on the histopathology of inflammatory bowel disease [online]. *Journal of Crohn's and Colitis*. 7(10), 827-851 [cit. 2020-02-12]. DOI: 10.1016/j.crohns.2013.06.001.

- Dostupné z: <https://academic.oup.com/ecco-jcc/article-lookup/doi/10.1016/j.crohns.2013.06.001>
39. MESCHER, A., L., 2018. *Junqueirovy základy histologie*. Praha: Galén. 558 s. ISBN 978-80-7492-324-1
40. MIMURA, T., EMANUEL, A., KAMM, M. A., 2002. Pathophysiology of diverticular disease [online]. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 16(4), 563-576. [cit. 2020-01-06]. DOI: 10.1053/bega.2002.0298. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691802902982>.
41. MØLLER, P., SEPPÄLÄ, T., BERNSTEIN, I., et al., 2017. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database [online]. *Gut*. 66(3), 464-472. [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1136/gutjnl-2015-309675. Dostupné z: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2015-309675>
42. NAVRÁTIL, L., a kol., 2008. *Vnitřní lékařství: pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada. 424 s. ISBN 9788024723198.
43. NĚMEČEK, R., SVOBODA M., © 2020. *Není kolorektální karcinom jako kolorektální karcinom* [online]. ČOS ČLS JEP [cit. 2020-02-25]. ISSN 2570-8791. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy-po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/neni-kolorektalni-karcinom-jako-kolorektalni-karcinom/>
44. PENKA, I., KALA, Z., 2008. Chirurgická léčba kolorektálního karcinomu [online]. *Onkologie*. 2(1), 12 – 16. Dostupné z: www.onkologiecs.cz.
45. PINTO, D., PINTO, C., GUERRA, J., et al., 2018. Contribution of MLH1 constitutional methylation for Lynch syndrome diagnosis in patients with tumor MLH1 downregulation [online]. *Cancer Medicine*. 7(2), 433-444. [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1002/cam4.1285. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cam4.1285>
46. Plevová P., Novotný J., Šachalová M., Křepelová A., Foretová, L., 2009. Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom. *Klinická Onkologie*. 22(1), 12-15. ISSN: 1802-5307
47. PLEVOVÁ, P., 2019. An Update on Inherited Colon Cancer and Gastrointestinal Polyposis [online]. *Klinická Onkologie*. 32(2), 97-108. [cit. 2020-02-24]. DOI: 10.14735/amko2019S97. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/english-summary/klinicka-onkologie-journal/2019-08-18-supplementum-2-en/nove-poznatky-o-geneticky-podminenych-nadorech-tlusteho-streva-a-polypozach-gast-1/>

48. REZAPOUR, M., ALI, S., STOLLMAN, N., 2018. Diverticular Disease: An Update on Pathogenesis and Management [online]. *Gut and Liver*. 12(2), 125-132. [cit. 2020-01-05]. DOI: 10.5009/gnl16552. Dostupné z: <http://www.gutnliver.org/journal/view.html?doi=10.5009/gnl16552>
49. SHIA, J., 2008. Immunohistochemistry versus Microsatellite Instability Testing For Screening Colorectal Cancer Patients at Risk For Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome [online]. *The Journal of Molecular Diagnostics*.10(4), 293-300. [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.2353/jmoldx.2008.080031. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525157810601638>
50. SCHERER, S. J., AVDIEVICH, E., EDELMANN, W., 2005. Functional consequences of DNA mismatch repair missense mutations in murine models and their impact on cancer predisposition [online]. *Biochemical Society Transactions*. 33(4), 689-693. [cit. 2020-02-21]. DOI: 10.1042/BST0330689. Dostupné z: <https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article/33/4/689/65053/Functional-consequences-of-DNA-mismatch-repair>
51. ŠPIČÁK, J., 2008. *Novinky v gastroenterologii a hepatologii*. Praha: Grada 421 s. ISBN 978-80-247-1783-8.
52. VACEK, Z., 1995. *Histologie a histologická technika I. část*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. 332 s. ISBN 8070132019.
53. VACEK, Z., 1995a. *Histologie a histologická technika II. část*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. 185 s. ISBN 8070132019.
54. VASEN, H. F. A., MOSLEIN, G., ALONSO, A., et al., 2007. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer) [online]. *Journal of Medical Genetics*.44(6), 353-362. [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1136/jmg.2007.048991. Dostupné z: <http://jmg.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jmg.2007.048991>
55. VORLÍČEK, J., ABRAHÁMOVÁ J., VORLÍČKOVÁ H., 2012. *Klinická onkologie pro sestry*. 2. Vydání. Praha: Grada. 448 s. ISBN 9788024737423.
56. WELLS, K., WISE P. E., 2017. Hereditary Colorectal Cancer Syndromes [online]. *Surgical Clinics of North America*.97(3), 605-625. [cit. 2020-02-25]. DOI: 10.1016/j.suc.2017.01.009. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039610917300099>
57. WIN, A. K., JENKINS, M. A., DOWTY, G. J., et al., 2017. Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer [online]. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*.26(3), 404-412. [cit. 2020-02-20]. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-16-0693. Dostupné z: <http://cebp.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1055-9965.EPI-16-0693>

12. Seznam obrázků a tabulek

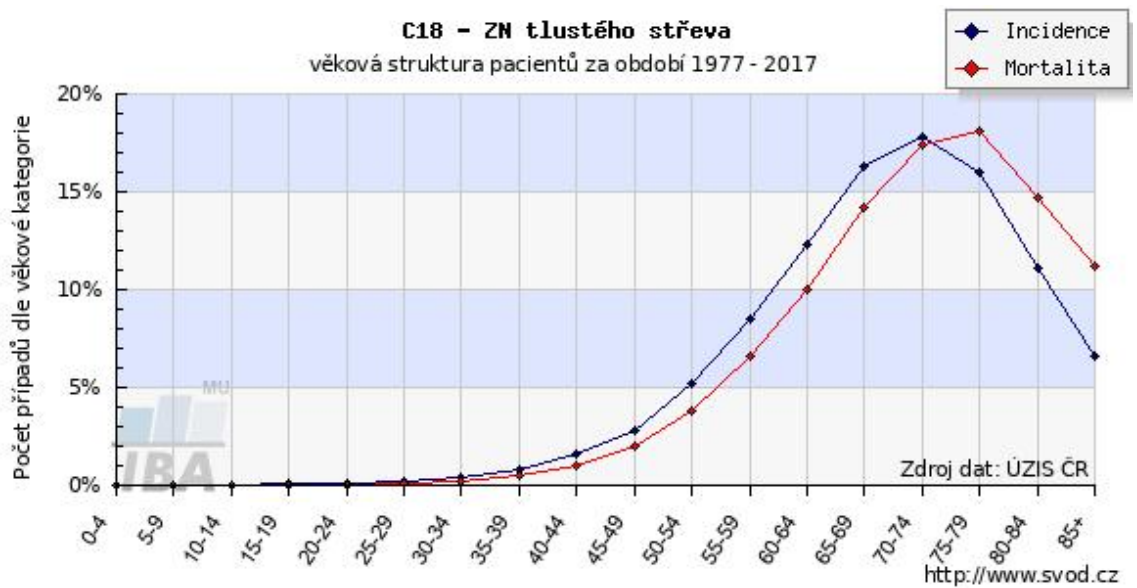
Obrázek 1: Incidence CRC u obou pohlaví v mezinárodním srovnání (zdroj: Ferlay et al., 2018)	16
Obrázek 2: incidence a mortalita u obou pohlaví (zdroj: Gregor et al., 2018)	17
Obrázek 3: prevalence u obou pohlaví (zdroj: Gregor et al., 2018)	17
Obrázek 4: Schéma protilátky (zdroj: Labguide, © 2019)	27
Obrázek 5: Barvicí automat (zdroj: vlastní)	32
Obrázek 6: Preparáty ve vlhké komůrce (zdroj: vlastní)	37
Obrázek 7: IHC vyšetření MLH1, 200x zvětšení (Zdroj: vlastní)	40
Obrázek 8: IHC vyšetření MSH6, zvětšení 200x (Zdroj: vlastní)	41
Obrázek 9: IHC vyšetření PMS2, zvětšení 200x (Zdroj: vlastní)	41
Obrázek 10: IHC vyšetření MSH2, zvětšení 200x (Zdroj: vlastní)	42
Obrázek 11: barvení hematoxylin - eosin, zvětšení 100x (Zdroj: vlastní)	42
Obrázek 12: Barvení alcianovou modří, zvětšení 100x (Zdroj: vlastní)	43
Obrázek 13: Počet případů CRC dle věkové skupiny za rok 2018 - 2019 (zdroj: vlastní)	44
Obrázek 14: krabicový graf (zdroj: vlastní)	44
Obrázek 15: poměr vzorků s defektem a bez defektu v MMR proteinech (Zdroj: vlastní)	45
Obrázek 16: Věková struktura pacientů za období 1977 - 2017 (zdroj: Dušek et al., 2007)	56
Obrázek 17: Časový vývoj hrubé incidence (zdroj: Dušek et al., 2007)	56
Obrázek 18: Věková struktura populace pacientů kraj Vysočina (zdroj: Dušek et al., 2007)	57
Obrázek 19: Věková struktura populace pacientů kraj Vysočina - muži (zdroj: Dušek et al., 2007)	57
Obrázek 20: Věková struktura populace pacientů kraj Vysočina - ženy (zdroj: Dušek et al., 2007)	58
Tabulka 1: počet vzorků CRC v rozdělení dle pohlaví a věku	43
Tabulka 2: test statistické významnosti	45
Tabulka 3: Rozdělení vzorků dle defektu v MMR proteinech	45

13. Seznam zkratek

BG – Bethesda kritéria
BMMR-D – biallelic mismatch repair deficiency
BRAF – protoonkogen B - raf
CRC – kolorektální karcinom
DAB – 3,3'-diaminobenzidin
DNA – deoxyribonukleová kyselina
EPCAM – epithelial cell adhesion molecule
ER – endoskopická resekce
GAG – kyselé mukopolysacharidy
GCO – Global Cancer Observatory
HNPCC – Hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
HRP – křenuv peroxidáza
IHC – imunohistochemické
LS – Lynchův syndrom
MLH1 – MutL protein homolog 1
MMR – mismatch-repair
MSH2 – MutS protein homolog 2
MSH6 – MutS protein homolog 2
MSI-H – vysoký stupeň nestability mikrosatelitů
MSI-L – nízký stupeň nestability mikrosatelitů
MSS – stabilní mikrosatelity
NOR – národní onkologický registr
PCR – polymerázová řetězová reakce
PMS2 – Postmeiotic segregation increased 2
RTU – k okamžitému použití (ready to use)
SVOD – systém pro vizualizaci onkologických dat
UC – ulcerózní kolitida

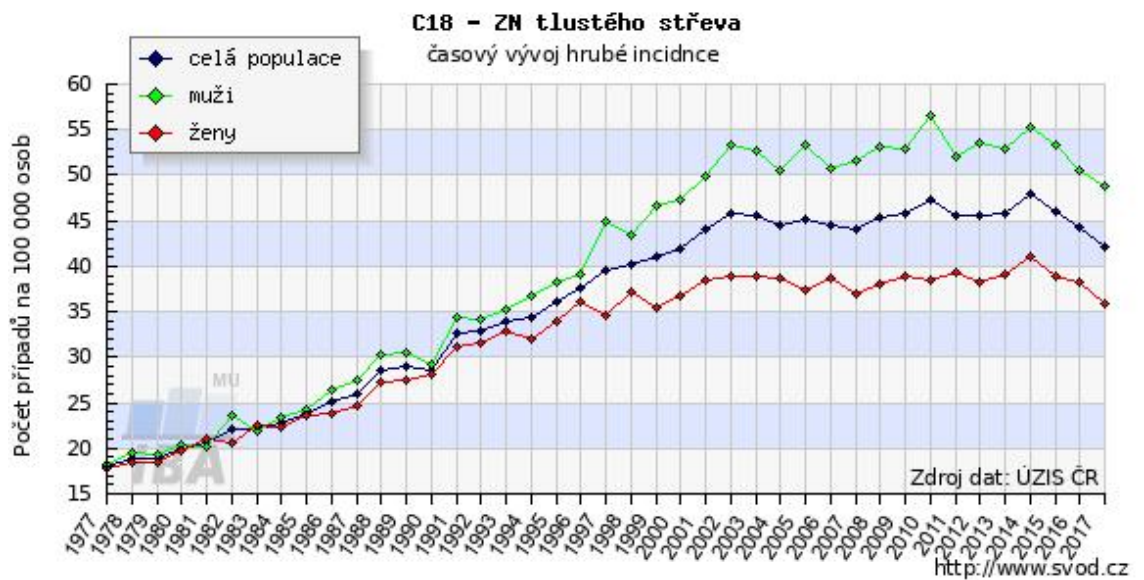
14. Seznam přílohy

Příloha 1



Obrázek 16: Věková struktura pacientů za období 1977 - 2017 (zdroj: Dušek et al., 2007)

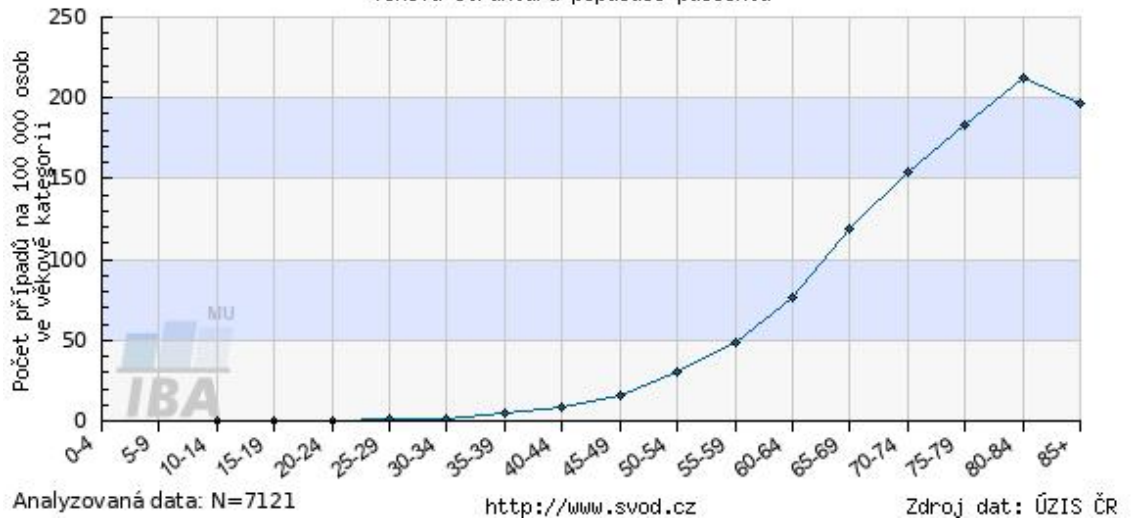
Příloha 2



Obrázek 17: Časový vývoj hrubé incidence (zdroj: Dušek et al., 2007)

C18 - ZN tlustého střeva - Incidence, kraj Vysočina

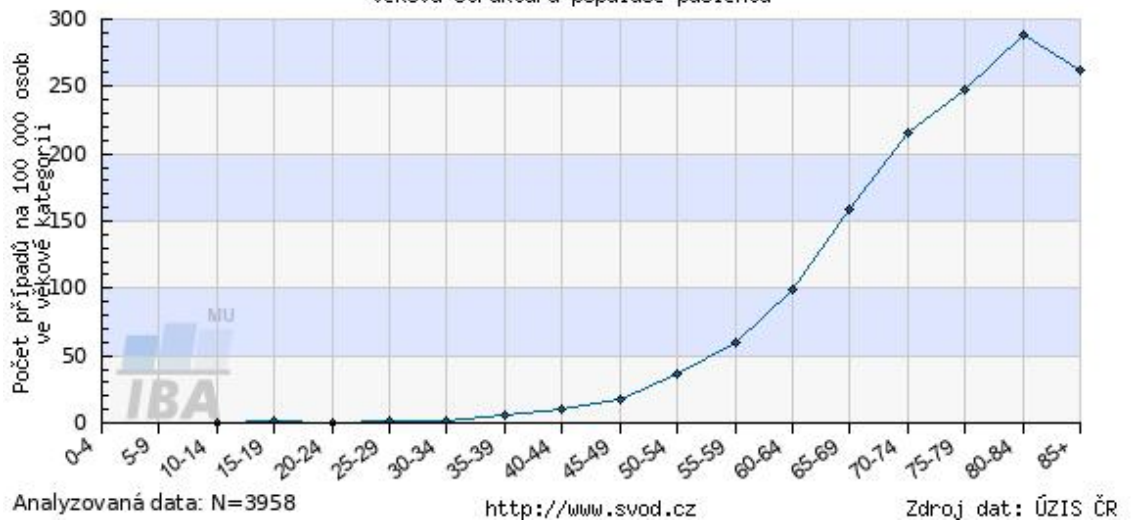
věková struktura populace pacientů



Obrázek 18: Věková struktura populace pacientů kraj Vysočina (zdroj: Dušek et al., 2007)

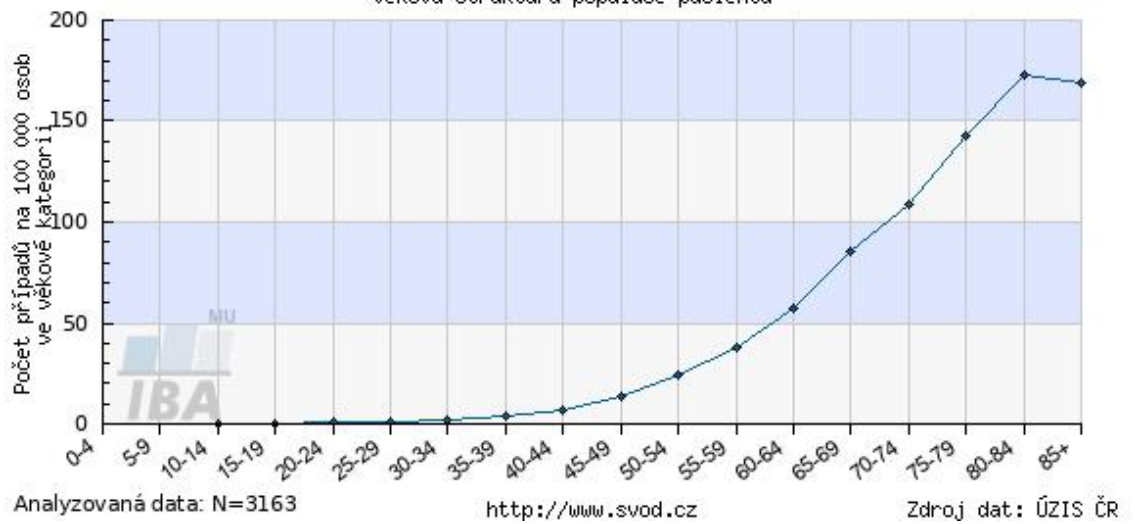
C18 - ZN tlustého střeva - Incidence, kraj Vysočina, muži

věková struktura populace pacientů



Obrázek 19: Věková struktura populace pacientů kraj Vysočina - muži (zdroj: Dušek et al., 2007)

C18 - ZN tlustého střeva - Incidence, kraj Vysočina, ženy
 věková struktura populace pacientů



Obrázek 20: Věková struktura populace pacientů kraj Vysočina - ženy
 (zdroj: Dušek et al., 2007)