



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Sciences

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

Zpracování histologického materiálu metodou  
cytobloku

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: ZDRAVOTNÍ LABORANT

**Autor:** Denisa Krčmáriková

**Vedoucí práce:** MUDr. Jiří Dušek

České Budějovice 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Zpracování histologického materiálu metodou cytobloku 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 \_\_\_\_\_

### **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce MUDr. Jiřímu Duškovi za odborné vedení práce a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zpracovat. Mé poděkování patří také paní Chýškové a celému kolektivu z oddělení patologie v Jindřichově Hradci za jejich ochotu, zapůjčení potřebných materiálů a poskytnutí prostoru pro zpracování praktické části práce. V neposlední řadě děkuji kolektivu laborantek z oddělení gynekologické cytologie v Jindřichově Hradci.

## **Zpracování histologického materiálu metodou cytobloku**

### **Abstrakt**

Zpracování histologického materiálu metodou cytobloku se v laboratořích používá především při vyšetření cytologických materiálů, jako jsou punktáty, aspiráty či kartáčkové stěry. Pro tyto materiály se častěji používá nátěr na sklo, cytoblok má však výhodu v možnosti využití doplňkových metod, například imunohistochemických. Přítomnost tekutiny v coelomových dutinách je fyziologická, slouží zde k lubrikaci, ovšem při jejím nadměrném množství se jedná o projev patologických procesů v těle. Ve správně odebraných vzorcích se nachází buňky, které napomáhají k určení diagnózy pacienta, například k odhalení nádorových buněk. Příčiny vzniku většího objemu tekutiny se však pohybují v počtu desítek, proto je nutná korelace s klinickými údaji pacienta. Tato práce je zaměřena na laboratorní zpracování tekutých vzorků. Cílem metody cytobloku je dosáhnout co nejvyšší výtěžnosti buněčných elementů a zpracování adekvátního preparátu k mikroskopickému vyšetření. Obecná část je zaměřena na poznatky z cytologie, cytologické vzorky pro cytoblokové vyšetření a metody barvení. Praktická část zahrnuje makroskopické a mikroskopické hodnocení materiálu, porovnání dvou možných metod zpracování, pomocí želatiny a celoidinu. Pod praktickou část spadá také odvodnění materiálu, zalití do parafínu, krájení, odparafínování, barvení a montování preparátů. Různé druhy barvení, kterými jsou hematoxylin-eosin, Papanicolaou a May-Grünwald-Giemsa, jsou mikroskopicky zhodnoceny a porovnány. V závěru je práce doplněna zhodnocením buněčného zastoupení, celularity a rozložení buněk ve zpracovaných preparátech a také porovnáním materiálu odebraného s časovým odstupem od stejného pacienta.

### **Klíčová slova**

**Cytoblok; parafín; cytologie; celoidin; želatina; centrifuga**

## **Processing of a histological material by cell block method**

### **Abstract**

The processing of histological material by cell block method is used in laboratories mainly for the examination of cytological materials such as punctates, aspirates or brush swabs. Slide coating is more often used for these materials, but the cell block has the advantage of using additional methods such as immunohistochemical. The presence of fluid in coelom cavities is physiological, used for lubrication, but excessive quantity indicates the presence of pathological processes in the body. Properly collected samples contain lots of cells that help diagnose the patient, for example to detect tumor cells. However, there are dozens of causes for a larger volume of fluid, therefore the correlation with the patient's clinical data is necessary. My work is focused on processing of liquid samples. The aim of the cell block method is to achieve the highest yield of cellular elements, processing an adequate preparation for microscopic examination. The general part is focused on knowledge of cytology, cytological samples for cell block examination and methods of staining. The practical part includes macroscopic and microscopic evaluation of the material, and comparison of the two processing methods, using gelatine and celloidin. The practical part also includes drainage of the material, embedding in paraffin, slicing, dewaxing, staining and assembly of preparations. Different types of staining, such as hematoxylin-eosin, Papanicolaou and May-Grünwald-Giemsa are microscopically evaluated and compared. In conclusion, the work is supplemented by evaluation of cell representation, cellularity and cells distribution in processed preparations, comparing the material taken with a time lag from the same patient.

### **Key words**

**Cell block; paraffin; cytology; celloidin; gelatine; centrifuge**

## Obsah

<b>1</b>	<b>Teoretická část .....</b>	<b>10</b>
1.1	Cytologie obecně.....	10
1.2	Materiály pro cytologické vyšetření.....	10
1.2.1	Tekuté vzorky .....	11
1.2.2	Vzorky odebrané kartáčkem .....	11
1.2.3	Tenkojehlová aspirační biopsie .....	11
1.2.4	Dotyk a otisk.....	12
1.3	Fixace .....	13
1.4	Coelomové dutiny .....	13
1.5	Pleurální výpotek .....	14
1.6	Perikardiální výpotek .....	14
1.7	Peritoneální výpotek.....	14
1.8	Transudát a exsudát.....	15
1.8.1	Transudát .....	15
1.8.2	Exsudát.....	15
1.8.3	Biochemické parametry transudátu a exsudátu.....	16
1.9	Odběr tekutých vzorků.....	16
1.9.1	Hrudní punkce.....	17
1.9.2	Punkce ascitu .....	17
1.10	Cytologická diagnostika .....	18
1.10.1	Zpracování cytologických preparátů .....	18
1.10.2	Cytospin .....	18
1.10.3	Cytoblok.....	19
1.11	Celoidin .....	19
1.12	Želatina .....	20

1.13	Zalévací média.....	21
1.14	Mikrotom.....	21
1.15	Odvodňovací automat.....	22
1.16	Barvení obecně .....	22
1.17	Mikroskop.....	22
1.18	Typy buněk v preparátech .....	23
1.18.1	Mezoteliální buňky .....	23
1.18.2	Erytrocyty .....	24
1.18.3	Histocyty .....	24
1.18.4	Eosinofilní granulocyty.....	24
1.18.5	Neutrofilní granulocyty.....	25
1.18.6	Lymfocyty.....	25
1.18.7	Nádorové buňky.....	25
1.18.8	Bakterie, viry a další .....	27
<b>2</b>	<b>Cíl práce.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>Praktická část.....</b>	<b>29</b>
3.1	Posouzení makroskopického vzhledu materiálu .....	29
3.2	Objem materiálu.....	31
3.3	Příprava celoidinu .....	31
3.3.1	Zpracování pomocí celoidinu .....	31
3.4	Příprava želatiny.....	33
3.4.1	Zpracování pomocí želatiny.....	34
3.5	Zpracování hotového cytobloku.....	35
3.5.1	Odvodnění materiálu.....	35
3.5.2	Zalítí do parafinu .....	36
3.5.3	Krájení na mikrotomu.....	36
3.5.4	Natahování parafínových řezů .....	37

3.6	Odparafinování.....	37
3.7	Barvení .....	38
3.7.1	Hematoxylin-eosin.....	38
3.7.2	Papanicolaou .....	39
3.7.3	May-Grünwald-Giemsa .....	41
3.8	Montování preparátu .....	42
3.8.1	Mikroskopování .....	43
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>44</b>
4.1	Rozložení buněk v preparátu.....	45
4.2	Celularita vzorků .....	45
4.3	Srovnání opakovaných odběrů .....	46
4.3.1	Pacient číslo 1 .....	46
4.3.2	Pacient číslo 2 .....	47
4.3.3	Pacient číslo 3 .....	47
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Seznam literatury.....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Seznam příloh a obrázků .....</b>	<b>56</b>
<b>9</b>	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>57</b>



## Úvod

Tato práce se zabývá zpracováním histologického materiálu pomocí metody zvané cytoblok. Cytoblok se často využívá ke zpracování tekutých vzorků z pohledu cytologického. Metoda je snadná, zpracování je poměrně rychlé a nízkonákladové. Tato práce je zaměřena na dvě možné metody zpracování cytobloku a porovnání tří možných metod barvení. Jeden z typů barvení je na odděleních patologie často rutinně využíván, ovšem není to pravidlem. Další dva typy se řadí mezi barvení speciální. Práce se dále zabývá makroskopickým vzhledem materiálů, mikroskopickým vyšetřením, výskytem buněčných elementů v preparátech.

Na oddělení patologie v jindřichohradecké nemocnici zpracovávají cytoblok poněkud neobvyklým způsobem, za pomoci celoidinu. Výtěžnost této metody je porovnána s metodou cytobloku, která využívá zalití vyšetřovaného materiálu do želatiny. Díky těmto postupům se z tekutých materiálů stanou nativní preparáty vhodné pro mikroskopické vyšetření. Důvodem výběru tématu je aktuálnost diagnostiky především nádorových onemocnění, ale i dalších, která se díky cytologickému vyšetření tekutin mohou odhalit. Výpotky jsou v dnešní době častým problémem interní medicínské praxe a někdy mohou být prvním ukazatelem nádorového onemocnění (Teřl et al., 2004).

# 1 Teoretická část

## 1.1 Cytologie obecně

*Cytologie je nauka o buňce (z řeckého slova „cytos“ – buňka) (Závodská, 2006, s.13). Zrod této disciplíny se datuje až do první poloviny 19. století. Buňky jsou základními stavebními jednotkami živých organismů, jsou schopny pohybu, metabolismu, růstu, rozmnožování. Cytologie, jakožto diagnostická metoda, má dvě složky – morfologickou a funkční. Morfologická část se zabývá studiem velikosti, tvaru a struktury, funkční zkoumá fyziologické a biochemické vlastnosti, jako jsou například množení a stárnutí buněk. Morfologická úzce souvisí s cytopatologií, která se zabývá diagnostickými změnami na úrovni buněk (Bóznér et al., 1986; Glencross et al., 2011; Machová, 2016).*

## 1.2 Materiály pro cytologické vyšetření

Vzorky odebírá lékař, úkolem laboranta je zpracovat z nich preparát vhodný pro mikroskopické vyšetření. Odebraný materiál, který je donesen do laboratoře, musí být správně označen základními údaji, nádoby nesmí být potřísněny biologickým materiálem a musí je doprovázet správně vyplněná žádanka.

Správná žádanka obsahuje základní informace, jako jsou:

- jméno a příjmení pacienta,
- rodné číslo,
- kód zdravotní pojišťovny,
- PSČ bydliště,
- identifikace odesílajícího lékaře včetně razítka a podpisu,
- klinické údaje a kód diagnózy,
- datum odběru.

Většinou se materiál zasílá fixovaný, pokud tomu tak není, musí být do laboratoře doručen ihned po odběru s upozorněním, že je bez fixativa (Chyšková, Cempírková, 2019). V běžném provozu jsou cytologická vyšetření provedena přibližně do 7 dnů (Večerková, 2015; Pumpr, et al. 2016).

### 1.2.1 *Tekuté vzorky*

Velice často se vyšetřují tělní tekutiny, které jsou získány punkcí tělních dutin, jako jsou výpotky perikardiální, pleurální, peritoneální. Dále tekutiny samovolně vyloučené, například sputum či moč. Mezi tyto materiály řadíme také výplachy, příkladem je bronchioalveolární laváž, která se provádí výplachem bronchů přibližně 200 mililitry fyziologického roztoku. Všechny tyto tekutiny obsahují volné buňky, jsou tedy vhodné pro cytologické vyšetření. Materiál musí být odebrán do dostatečně velké nádoby a poté by měl být co nejrychleji zafixován fixativem v poměru 1 : 1. Pro tyto případy se využívá 10% formalín jakožto universální fixační činidlo. Tekuté materiály prvotně míří k centrifugaci (Bóznér et al., 1986; Musil, et al., 2007; Dvořák et al., 2008; Rollins et al., 2017).

### 1.2.2 *Vzorky odebrané kartáčkem*

Tento odběr ve většině případů neklade na pacienty nijak zvláštní nároky, co se týče přípravy před odběrem. Provádí se speciálním kartáčkem (cytobrush), popř. dřevěnou či plastovou špachtlí. I přesto, že je dřevěná špachtle přijatelná, doporučuje se spíše plastová, jelikož dřevěná vlákna mohou zachycovat diagnostický materiál. Nejčastějším příkladem je stěr z děložního čípku či pochvy. Pro adekvátní vzorek je třeba odebrat a na sklo natřít dostatečné množství materiálu, zároveň však vrstva na skle nesmí být příliš silná kvůli průchodu světla při mikroskopickém vyšetření. Po natření na sklo je nutno preparát fixovat, často se používají fixativa ve spreji (Kobilková et al., 1984; Arbyn, et al., 2007; Cibas et al., 2014; Večerková, 2015).

### 1.2.3 *Tenkojehlová aspirační biopsie*

Vybavení pro tento zákrok je malé a lehce přenosné, spadá sem například sterilní gáza, lokální anestetikum, rukavice, mikroskopická sklíčka a další, ovšem nejdůležitější je jehla, jejíž tloušťka se odvíjí dle potřeby odběru. Během biopsie a manipulace se vzorkem je třeba dodržovat standardní bezpečnostní opatření. Zprvu se aplikuje lokální anestezie, poté se připraví a důkladně označí podložní skla, jelikož odebraný materiál musí být co nejdříve připraven k dalšímu zpracování, nesmí dojít k jeho vyschnutí. Pacient je umístěn do vhodné polohy, ta je taková, aby mu byla pohodlná a zároveň byla léze hmatatelná pro lékaře provádějícího odběr. Odběr bývá kontrolován zobrazovacími metodami, jako je např. ultrazvuk. Aspirované buňky se na podložní

sklo natírají podobně jako např. krevní nátěr, tudíž se provede roztěr materiálu hranou druhého podložního sklíčka pod úhlem 45°. Pokud nátěr obsahuje velké částice, může být zpracován také pomocí cytobloku. Tímto způsobem je vyšetřována štítná žláza, prs, slinné žlázy, pankreas a další (Cibas et al., 2014; Večerková, 2015).

#### 1.2.4 *Dotyk a otisk*

Tyto metody nejsou časté, neexistuje o nich zatím ani mnoho literatury, ovšem pomalu se v cytologické praxi rozšiřují. Způsob provedení je relativně jedinečný oproti ostatním cytologiím. Rozdíl v těchto metodách je prostý, dotyk využívá část tkáně z biopsie, která se tažením poválí po povrchu podložního skla, otisk využívá velikou tkáň či orgán, který je čerstvě nařezán a otisknut na podložní sklo. Buněčnost vzorku se na rozdíl od nátěrů či tekutin může lišit, dotyk i otisk je důležité je provést správně, aby nedošlo k poškození vzorků tkáně, což by vedlo ke ztrátě cenných buněk. Výhodou je jednoduchost metody a rychlost získání cytologické diagnózy. Diagnostika však může být náročná, mohou vznikat buněčné artefakty (Pantanowitz, 2018).

### **1.3 Fixace**

Fixace neboli rychlá a zároveň šetrná denaturace bílkoviny buněk a tkání má zabránit samovolnému rozkladu, takzvané autolýze. Autolýza vzniká na základě působení enzymů a vede k buněčným změnám až jejich úplnému rozkladu. Fixace by se měla provádět co nejrychleji po odběru biologického materiálu. Její šetrnost je důležitá zejména pro zachování struktury odebraného materiálu. Fixativum musí do tkáně rychle pronikat, aby došlo ke stejnoměrnému profixování celého materiálu. Fixační prostředek dále nesmí narušovat barvitelnost materiálu. Nejvyužívanějšími fixačními prostředky jsou prostředky chemické. Jedná se nejčastěji o roztoky chemických sloučenin. Fyzikální, jako je například teplo či rychlé vysušení, se v histologických laboratořích využívají jen zřídka.

Nejčastější chemickou fixační tekutinou je formol neboli formalín. Formol je vodný roztok formaldehydu. Výhodou je nízká cena, jeho rychlá a snadná příprava a také možnost uchování v zásobních lahvích z tmavého skla. Tmavé sklo zpomaluje oxidaci a polymeraci. Jedná se o bezbarvou kapalinu, která má dráždivý zápach. Při práci s formolem je nutné používat gumové rukavice, kvůli jeho dráždivosti může způsobovat ekzémy. K fixaci se používá 10% či 20% formol. Další výhodou je, že nemůže dojít k přefixování tkáně, biologický materiál může být ve formolu více než 24 hodin a nedojde k poškození. (Vacek, 1995; Jirkovská, 2006).

### **1.4 Coelomové dutiny**

Coelomové dutiny (pleura, perikard, peritoneum, tunica vaginalis testis) vznikají z intraembryonálního coelomu. Prvotní coelomová dutina je společná, během embryonálního vývoje ji rozděluje septum transversum. V definitivním tvaru představuje uzavřené prostory. Tyto dutiny jsou vystlány mezoteliální výstelkou. Mezotelové buňky produkují tekutinu, která působí kluzkost povrchu, tím snižuje tření, a také chrání dané orgány. Tyto prostory jsou častými propagátory patologických procesů, ať už z okolí, či dokonce zde vzniklých. Tvorba výpotků je ovlivněna propustností kapilár (Čihák, 2002; Cibas et al., 2014; Dušková, 2018).

### **1.5 Pleurální výpotek**

Pleurálním výpotkem nazýváme tekutinu vzniklou v pleurální dutině, tedy mezi plícemi a hrudním košem. Tekutina se hromadí v momentě, kdy tvorba převyšuje resorpci. Hromadění tekutiny v pleurální dutině má různé příčiny, například srdeční selhávání či jaterní cirhózu. Punkci provádíme, když se objem tekutiny zvětšil v důsledku patologických změn (Kobilková et al., 1984; Glencross et al., 2011). Systémové onemocnění často souvisí s transudátem, kdežto pleurální procesy naopak s exsudátem (Češka et al., 2010). Při cytologickém vyšetření je možno identifikovat různé druhy buněk včetně nádorových, které napomáhají diagnostikovat příčinu vzniku výpotku. Odhadem 40 % pacientů s pneumonií má pleurální výpotek (Musil et al., 2007). Velkým problémem při pleurálním výpotku je dušnost, někdy provázená kašlem či bolestí. K diagnostice se používají zobrazovací metody, avšak prvním ukazatelem může být špatné dýchání, přitlumený hrudní poklep či hrudní chvění. Po odběru vzorku následuje laboratorní analýza výpotku (Češka et al., 2010).

### **1.6 Perikardiální výpotek**

Fyziologické množství tekutiny v perikardiálním vaku je zhruba 10–50 mililitrů. Příčinami vzniku abnormálního hromadění tekutiny jsou především kardiovaskulární onemocnění. K diagnostice se používá například echokardiograf, na kterém se výpotek zobrazuje jako prázdný prostor mezi listy perikardu. V případě nahromadění nadměrného množství se provádí perikardiální punkce, která může být v případě srdeční tamponády život zachraňující. Srdeční tamponáda znamená zvýšení tlaku perikardiálního výpotku, který poté omezuje plnění komor, a tedy funkci srdce. Pokud výpotek vzniká pomalu a postupně, může ho být velké množství, a to kvůli elasticitě vaku, ovšem při prudkém průběhu může být život ohrožující i malé množství, jelikož se srdce nestihne adaptovat. Velký výpotek může mít až 1 500 mililitrů. (Češka, 2010; Zemánek, 2015; Bartůněk et al., 2016).

### **1.7 Peritoneální výpotek**

Peritoneální výpotek neboli ascites je označován jako volná tekutina v dutině břišní, které je větší než fyziologické množství, tj. 150 mililitrů. Ascites vyplňuje břišní dutinu, postupně dochází k vyhlazení pupku, jelikož se rozestupují břišní svaly. Typické

jsou strie. Ascites se vyšetřuje sonograficky, mírný není makroskopicky patrný, ovšem při dalších stupních se výrazně zvětšuje břicho. Množství ascitu může být více než 3000 mililitrů. Může docházet k vymizení ascitu a současně se může objevit pleurální výpotek. K tomuto ději dochází kvůli průchodu tekutiny přes bránici do pleurální dutiny, častěji na pravou stranu. Mnohdy nemusí být ascites ani zaznamenán, kvůli pomalé tvorbě a zároveň rychlému proudění do pleury. Ascites je nejčastěji projevem jaterního onemocnění, především cirhózy. U některých onemocnění nebývá urgentním stavem, ovšem u cirhotiků značí velmi špatnou prognózu (Musil, et al., 2007; Táborský, et al., 2017; Zadák, 2017).

## **1.8 Transudát a exsudát**

### **1.8.1 Transudát**

Je povětšinou nezáznětlivý výpotek, tedy chudý na bílkoviny. *Vzniká filtrací krve přes neporušenou stěnu cév při zvýšeném filtračním tlaku* (Navrátil et al., 2008, s.115). Transudát je chudý na počet buněk (méně než 1 000–5 000/ml). Ovšem pestrost v druhovém zastoupení zde nechybí, převažují mezotelie a lymfocyty, v menší míře např. granulocyty, makrofágy apod. Příčinou může být např. plicní embolie, srdeční selhání, jaterní cirhóza a mnoho dalších (Musil et al., 2007). Často je oboustranný, vzhledově podobný séru (slámově žluté) (Teřl et al., 2004; Češka et al., 2010; Cibas et al., 2014).

### **1.8.2 Exsudát**

Exsudát je zánětlivý výpotek bohatý na bílkoviny. Ke vzniku dochází kvůli patologickým procesům poškozujícím cévy (Navrátil et al., 2008). Na rozdíl od transudátu jsou zde buňky zmnoženy. Můžeme zde najít nádorové buňky, mezotelie, záplavu erytrocytů, také neutrofilní granulocyty apod. Vzniká při infekci, malignitě, imunologických onemocněních či jiných zánětlivých procesech (Musil et al., 2007). Velice často je jednostranný, vzhledem bývá různorodý (různě zbarvený, zakalený), séru se však vzdaluje (Teřl et al., 2004; Češka et al., 2010; Cibas et al., 2014).

### 1.8.3 *Biochemické parametry transudátu a exsudátu*

Následující tabulka obsahuje základní testy používané při odlišení transudátu od exsudátu. Tyto testy se provádějí na oddělení klinické biochemie. Dalšími parametry stanovení jsou laktátdehydrogenáza, kreatinkináza a další.

Tabulka 1: Parametry exsudátu a transudátu vyšetřované na oddělení biochemie.

	Transudát	Exsudát
hustota (kg/m <sup>3</sup> )	1003 - 1015	přes 1018
bílkovina	do 3 %	3 - 7 %
fibrinogen	chybí nebo malé množství	středně až mnoho
Rivaltova zkouška	negativní	pozitivní

*Zdroj: Kobilková 1984*

Příkladem stanovení exsudátu a transudátu je Rivaltova zkouška, která se provádí za pomoci kyseliny octové a je založena na denaturaci bílkovin. Do 100 ml destilované vody se přidají dvě kapky koncentrované kyseliny octové. Poté se do roztoku kápně vyšetřovaný materiál. Pokud se jedná o transudát, kapka tekutiny se rozplyne, pokud se ovšem jedná o exsudát, dojde k precipitaci neboli srážení (Doležalová et al., 1995; Hugo et al., 2005).

### 1.9 *Odběr tekutých vzorků*

Způsob odběru materiálu určuje lékař (Chyšková, Cempírková, 2019). Z cytologických materiálů je odběr tekutých vzorků většinou nejkomplicovanější a nejvíce zatěžující pacienta. Výjimkou může být moč, tento odběr pacienta zpravidla nezatěžuje. Odběr ostatních tekutin provádí lékař a často je prováděn ambulantně. Je tedy nutné, aby pacient obdržel informace ohledně zákroku, jelikož je brán jako operativní (Mačák et al., 2004). Při odběru menšího množství tekutin, např. při odběru obsahu cyst, se vzorky zasílají do laboratoře ve zkumavkách. Punktáty se do laboratoře mnohdy zasílají v plastových a mnohem větších lahvích, většinou o objemu 1 litru. U některých pacientů přesahuje množství odebrané tekutiny 5 litrů, tento celek se však nemusí zasílat do laboratoře, i z 1 litru se zpracuje adekvátní vzorek. Na žádance by ovšem mělo být uvedeno množství celkové. Nejen že tohoto materiálu je více, ale také se musí po odběru ředit fixativem, kterým je formol. Formolu se dolévá stejný objem, jako je objem odebrané tekutiny (Večerková, 2015; Cibas et al., 2014).



### 1.9.1 *Hrudní punkce*

Tento lékařský výkon se provádí za účelem odstranění patologického obsahu z pleurální dutiny. Zákrok se musí provádět za aseptických podmínek. Veškeré vybavení potřebné k zákroku musí být sterilní. Před samotným zákrokem lékař prohlédne rentgenový snímek a pomocí doplňujících zobrazovacích metod si označí místo vpichu. Tím je zpravidla 7.–8. mezižebří. Pacient se posadí obkročmo na židli, pažemi se opírá o opěradlo. Místo vpichu se vydesinfikuje. K lokální anestezii dochází pouze výjimečně, při opakovaných punkcích, kdy má pacient ztlustělou pohrudnici, což vede k bolestivosti odběru. Vpich punkční jehly se vede kolmo při hraně horního žebra, aby nedošlo k poranění nervů a cévy v mezižebří. Po vytažení jehly se místo vpichu stlačí, zkontroluje a pevně přelepí. Jako u většiny zákroků, i zde může dojít ke komplikacím. Je zde riziko vzniku pneumothoraxu, proto je nutné, aby byl odběrový systém uzavřený. Při poranění žeburní tepny může dojít k hemothoraxu. Dalšími komplikacemi mohou být zanesení infekce, plicní edém, poranění břišních orgánů. Po zákroku je nutné pacienta sledovat, vždy bývá proveden kontrolní rentgenový snímek (Češka et al., 2010; HospitalTV, 2015).

### 1.9.2 *Punkce ascitu*

Punkci ascitu můžeme také nazvat punkcí peritoneální dutiny či paracentézou. Ascites je přítomnost volné tekutiny v dutině břišní. Pacient by se měl dojit před zákrokem vymočit, je lepší, aby byl močový měchýř vyprázdněn. Vyšetřovaného si posadíme do polosedu, aby se tekutina dostala do spodní části dutiny břišní. Punkce ascitu se provádí na spojnici mezi levou spina iliaca anterior superior a pupkem, v místě zvaném také Monroův bod. Tento bod se nachází v levém podbřišku. Vpravo se punkce neprovádí z důvodu rizika poranění slepého střeva a také u pacientů s jaterní cirhózou, kteří mají játra zvětšená, tudíž hrozí jejich poranění. Punkce ascitu se od hrudní punkce výrazně neliší, nehrozí zde riziko nasávání vzduchu do tělní dutiny, proto nemusí být odsávací systém uzavřený. Místo vpichu se vydesinfikuje a provede se lokální anestezie. Zavede se punkční jehla s hadičkou vedoucí do sběrné nádoby. Pacient by měl být po zákroku sledován. Samozřejmě, i zde může dojít ke komplikacím, jako je např. krvácení, zanesení infekce do peritoneální dutiny či hypotenze po vypuštění ascitu (Češka et al., 2010; Roche Česká Republika, 2019).

## **1.10 Cytologická diagnostika**

Tato diagnostická metoda se zabývá interpretací buněk, které jsou například odlupovány z epitelálních povrchů či získány z různých tkání. Je rychlá, levná a málo zatěžuje pacienta. Může být prováděna mnoha metodami, ale v základě ji můžeme rozdělit na 4 části. První část zahrnuje odběr buněk, druhá postup zpracování, třetí mikroskopické vyšetření a čtvrtá stanovení diagnózy. V dnešní době hraje velkou roli v onkologii. Rozdílem mezi cytologií a histologií je, že cytologie nemá k dispozici celistvou tkáň. Jde zde o početnost a morfologii buněk. Jednoduše řečeno, cytologie je nauka o buňkách, histologie je nauka o tkáních. Příkladem může být diagnostika nádoru. Pro histologii je důležitý nádor jako struktura, jeho fyziologicko-strukturní charakter, kdežto u cytologie je důležitá izolovaná nádorová buňka. Výhodou cytologie je, že k diagnostice stačí minimální množství vzorku. I přes to, že shoda cytologického a histologického vyšetření je vysoká, má histologie výhodu díky identifikaci celé struktury. Histologie, a mnohdy i cytologie, má možnost využít pomocné metody k upřesnění diagnózy, kupříkladu imunohistochemická barvení. (Kobilková et al., 1984; Musil, et al., 2007; Dvořák, et al., 2008; Glencross et al., 2011; Mathew et al., 2017).

### **1.10.1 Zpracování cytologických preparátů**

Cytologická vyšetření se mohou rozdělit na základě odlišnosti materiálů a především způsobu odběru. Do skupiny exfoliativní cytologie spadají odběry epitelálních buněk, nejčastěji v podobě stěrů, například děložního čípku. Druhou skupinou jsou punkční cytologie, kdy se pomocí jehly odebere potřebný materiál. Do této skupiny spadá vyšetření plicní tkáně, prsu, ale i obsahu cyst. Metodika se však výrazně neliší. Z odebraných vzorků se zhotovují mikroskopické preparáty. Nejčastěji se provádí nátěr materiálu na podložní sklo, tuto činnost ve většině případů vykonává lékař. Některé materiály jsou zasílány do laboratoře, kde je laborant vizuálně zhodnotí, popíše zbarvení, hustotu, objem změří odměrným válcem, zhodnotí také množství případného sedimentu (Dvořák et al., 2008; Chyšková, Cempírková, 2019).

### **1.10.2 Cytospin**

Při zpracování tekutých vzorků je prvním krokem centrifugace. Významnou metodou je cytospin. Pro vznik cytospinového preparátu se používá speciální centrifuga, takzvaná cytocentrifuga nebo sklíčková odstředivka, která má modifikovaný

rotor, jenž pojme mikroskopická sklíčka i vzorky tekutiny. Odebraná tekutina je nalita do speciální kyvety, pod níž se nachází podložní sklo. Odstředivá síla odděluje buňky a sedimentuje je jako rovnoměrnou vrstvu na podložním skle (Dvořák et al., 2008; Glencross et al., 2011).

### 1.10.3 *Cytoblok*

Technika cytobloku může být využívána pro zpracování sputa a jiných tekutých materiálů, které nelze spolehlivě natřít na podložní sklo. Metod zpracování cytobloku existuje mnoho, neexistuje žádný tzv. zlatý standard. Většina laboratoří má modifikovanou vlastní techniku, která záleží na dosažitelnosti komerčně dostupných souprav či objemu vzorků. Následující body obsahují 4 příklady zpracování tekutých materiálů metodou cytobloku.

- Přecezení či vybrání kousků tkáně z tekutiny.
- Vysrážení tekutiny vhodným činidlem, přecezení.
- Centrifugace ve zkumavce, která má stěny pokryté celoidinem.
- Cytospinový cytoblok, kdy jsou buňky zachytávány v gelu.

Rozdíl mezi zpracováním tekutých materiálů cytospinem a cytoblokem spočívá v tom, že cytoblok využívá zalití do parafínu. Suspenze z buněk je vkládána do histologických kazet, zalita do parafínu a nakrájena na mikrotomu, tedy zpracována jako histologický materiál a hodnocena na základě histologických řezů. Tato technika přináší cytologickým vzorkům strukturální morfologii. Cytoblok má výhodu v možnosti archivace materiálu pro budoucí použití a dále v aplikaci doplňkových postupů, jako jsou například imunocytochemické či molekulárně genetické metody, jelikož je možné preparáty vytvořit duplicitně. (Dvořák et al., 2008; Cibas et al., 2014; Krogerus et al., 2018; Ondič, 2018; Chyšková, Cempírková, 2019).

## 1.11 *Celoidin*

Celoidin se v chemii řadí mezi nitrocelulózy. Za surového, pevného stavu připomíná nastříhanou vatou. Řadí se mezi hořlaviny, je také velice výbušný, a proto se s ním nesmí manipulovat u otevřeného ohně. V jindřichohradecké nemocnici na oddělení patologie ho využívají ke zpracování cytobloku, jiné histologické laboratoře ho ale používají například k zalévání tkání. Nejčastějším zalévacím médiem je stále parafín, ovšem pro orgány či tuhé tkáně, jako jsou například chrupavky a šlachy,

se využívá právě ve vodě nerozpustné médium zvané celoidin. Nejčastějším zalévacím médiem je parafin, avšak tuhé či objemné tkáně se po zalití do parafínu špatně krájí, tudíž se využívá zalití do celoidinu. I přes to, že zalití do celoidinu je pro tkáň šetrné, nevyužívá se především kvůli zdlouhavosti. Zalévání do celoidinu totiž zahrnuje 5 etap. První je odvodnění tkání, ovšem tato etapa je stejná jako u zalití do parafínu. Druhá etapa zahrnuje prosycení vzorků rozpouštědlem po dobu 6–8 hodin. Třetí etapou je prosycení vzorků celoidinem, kdy vzorek prochází roztoky celoidinu o stoupajících koncentracích. Čtvrtá etapa zahrnuje vlastní zalití do 10% celoidinu a pátá, závěrečná etapa, tvrzení celoidinových bločků po dobu minimálně 24 hodin. Teprve po tomto procesu putují bločky ke krájení na mikrotomu (Vacek, 1995; Bancroft et al., 1996).

### ***1.12 Želatina***

Za surového stavu je želatina sypká směs béžové barvy. Řadí se mezi měkká zalévací média, je rozpustná ve vodě. Využívá se při zalévání řídkých tkání. Tyto tkáně se poté zpevní. Pokud tkáň chceme uchovat delší dobu, zalití do želatiny je také vhodné. Výhodou je, že želatina vytěsňuje z tkáně vodu, která se nachází mezi buňkami. Některé laboratoře toto zalévací médium používají, postup zahrnuje 5 etap. Prvním krokem zpracování tkáňových bločků pro jejich fixaci formolem je prosycení 10% roztokem želatiny při 37 °C po dobu 4–6 hodin. Druhá fáze zahrnuje prosycení 20% roztokem želatiny při stejné teplotě a po stejnou dobu. Třetí fáze je zalití bločku 20% roztokem želatiny do kovové krabičky, želatina se poté nechá tuhnout. Čtvrtou fází je tvrzení bločků ve 20% formolu po dobu 24 hodin. Poslední, pátou fází je praní želatinových bločků ve vodě a následné krájení na mikrotomu (Vacek, 1995).

### ***1.13 Zalévací média***

Zalévací média musejí perfektně prostoupit vzorkem a ztuhnout tak, aby bylo možné krájet řezy pro mikroskopické vyšetření. Nejčastěji jsou dělena na zalévací média rozpustná a nerozpustná ve vodě. Mezi média rozpustná ve vodě patří například želatina či vodou rozpustné vosky. Mezi média nerozpustná ve vodě patří například parafín a celoidin. V histologických laboratořích je nejčastěji využívaným zalévacím médiem právě parafín. Je to směs nasycených alifatických uhlovodíků, v rozehrátém stavu je to bezbarvá tekutina, po ztuhnutí připomíná bílý vosk. Parafín je bez chuti i zápachu. Jeho velkou výhodou je nízká cena. Manipulace s ním je snadná, lze jednoduše recyklovat, tedy opakovaně použít. Má širokou škálu teplot tání (Bancroft et al., 1996; Jirkovská, 2006).

### ***1.14 Mikrotom***

Mikrotom je přístroj využívaný především v histologických laboratořích a slouží ke zhotovování řezů tkání. Řezy tkání jsou využívány pro mikroskopické vyšetření, kdy je potřeba mít buňky v co nejtenčí vrstvě, aby byly mikroskopicky vyšetřitelné a nepřekrývaly se v silné vrstvě. Proto je tloušťka řezů v mikrometrech, přesné nastavení mikrometrů se odvíjí dle materiálu. Krájí se pomocí ocelových nůžů či speciálních žiletek, záleží na druhu mikrotomu. Mikrotomy mají mikrometrické šrouby, které zajišťují posun ostří k preparátu. Nejběžněji využívaným mikrotomem je mikrotom sáňkový, u nějž se pohybuje nůž či žiletka. Dalším typem je mikrotom rotační, u kterého se nepohybuje ostří, ale svorka se zabločkovaným preparátem. Třetím častým typem je kryostat, na němž se krájí zmrazené preparáty při akutních vyšetřeních (Jirkovská, 2006; Lichnovský et al., 2007).

### ***1.15 Odvodňovací automat***

Odvodňovací automat neboli autotechnikon, je přístroj využívaný v histologických laboratořích v rutinním provoz. Pracuje automaticky dle předem nastaveného programu a zastává mnoho funkcí, jako je fixace, promývání tkáně a další. Autotechnikon se skládá z programového časového kotouče či novějšího mikropočítače, které slouží k nastavení času a také k elektrickému pohonu nádobek. Dalšími částmi jsou nádobky na tekutiny, deska s jamkami na nádobky, hlavice posunovacího mechanismu sloužící k pohybu, elektromotor, košíček na pouzdra a další (Vacek, 1995).

### ***1.16 Barvení obecně***

Z velké většiny jsou cytologické preparáty na podložním skle bezbarvé, což velice znesnadňuje mikroskopii. V neobarveném preparátu nerozeznáme jednotlivé složky kvůli jejich podobné lomivosti světla, proto se využívají barviva, která pohlcují světlo určitých vlnových délek. Barvení slouží nejen ke zviditelnění, ale také ke snadnějšímu rozlišení tkáňových složek. Každé barvení má celou řadu modifikací, důvodem používání více typů barvení je, že optimalizují viditelnost různých struktur, a informace o vzorcích se tím zvyšují. V dnešní době se vyrábí převážně chemicky. Pro přehlednost barvicích metod je důležité, aby se jádra obarvila rozdílným způsobem než cytoplazma buněk. V histologii se používají zásaditá a kyselá barviva. Nejedná se o kyseliny a zásady, ale molekuly barviva obsahují kyselé či zásadité radikály. Kyselá barví cytoplazmu, kdežto zásaditá jádra buněk. V cytologii je tedy důležité, aby barvení zvýraznilo jaderný chromatin a struktury v cytoplasmě (Bóznér et al., 1986; Jirkovská, 2006; Dušková, 2018).

### ***1.17 Mikroskop***

K mikroskopii se využívá zařízení zvané mikroskop, které slouží k pozorování mikroskopických předmětů, ty se poté stávají viditelnými pro lidské oko. V mém případě se jednalo o světelný mikroskop. Světelný mikroskop se skládá ze tří částí, těmi jsou část mechanická, osvětlovací a optická.

Mechanická část je tvořena stativem neboli kovovým stojanem, který sestává z těžké podkovy nesoucí stolec a nosič. Na nosiči je připevněný okulárový tubus. Tubus nese revolverový měnič objektivů. Stolec tvoří deska, která má uprostřed otvor

a na povrchu dvě kovové vzpruhy, které slouží k uchycení mikroskopického preparátu. Do mechanické části dále řadíme ovládací šrouby, jako je makrometrický a mikrometrický šroub, které slouží k zaostření obrazu.

Osvětlovací část zahrnuje světelný zdroj a kondenzor. Světelným zdrojem bývá v dnešní době nejčastěji nízkovoltová žárovka zasazená do stativu mikroskopu. U starších mikroskopů naleznete místo žárovky zrcátko, zde by zdrojem světla bylo světlo sluneční. Kondenzor se nachází pod stolkem mikroskopu, sbírá paprsky světla ze zdroje, shromažďuje je do světelného kužele, a tím prosvětluje preparát.

Část optickou tvoří objektivy a okuláry. Zvětšení prosvětleného obrazu a promítnutí jej okuláru zajišťuje objektiv. Okulár poté obraz dále zvětší a promítá ho pozorujícímu. Zvětšení mikroskopu je násobkem použitého objektivu a okuláru (Vacek, 1995; Junqueira et al., 2002).

### ***1.18 Typy buněk v preparátech***

Nejobtížnější součástí cytodiagnostiky nejsou postupy zpracování materiálu, ale určení diagnózy z preparátu obsahujícího zachycené buňky. Lékař hodnotí, zda jsou buňky v preparátech fyziologického, nebo patologického původu, jejich množství, poměr. Výpotky obsahují různé typy buněk v různém zastoupení, nejčastější jsou však krevní buňky jako například lymfocyty. Jelikož při odběru těchto materiálů občas dochází ke krvácení, častými kontaminanty jsou červené a bílé krvinky. (Dvořák et al., 2008; Cibas et al., 2014).

#### ***1.18.1 Mezoteliální buňky***

Mezotelie nejsou krevní buňky, ale buňky výstelky dutin, jako jsou dutiny pleurální či peritoneální, které se při odběru dostaly do tekutého materiálu. Mezotel je epitel pokrývající povrch těchto dutin. Tyto buňky mají v preparátech různou četnost, většinou se jedná o izolované buňky nebo příležitostně malé shluky. Shluky vznikají díky schopnosti některých aktivních buněk, které se v tekutině zvládnou množit, k tomu dochází například při probíhajícím zánětu. Jednotlivé buňky jsou malé a kulaté, s bazofilní cytoplazmou. Jádro je kulaté či oválné, veliké a může jich být v buňce více, není neobvyklé spatřit tyto buňky v mitóze. Více mezoteliálních buněk bývá odděleno úzkým prostorem. Méně častá je přítomnost jedné či více cytoplazmatických vakuol. Výskyt velkých shluků o 12 a více buňkách je velice neobvyklý, ovšem tento jev

či atypické zvětšení mezotelií může znamenat malignitu. Mezotelie bývají častou příčinou falešně pozitivních nálezů malignity na základě jejich široké variability fyziologického obrazu. Degenerativně změněné buňky, které se mění na základě dalších vývojových řad, mohou mít cytoplazmatickou či jadernou změnu nebo cytoplazmu zcela ztratit, a jádra se mohou zdát suspektní z malignity. Proto je důležité hledět na jejich kulatost, oválnost, přesné obrysy. Degeneraci buněk může způsobit například dlouhodobé stání odebrané tekutiny při pokojové teplotě (Kobilková et al., 1984; Ross, et al., 2011; Fátorová, 2011; Cibas et al., 2014).

### 1.18.2 *Erythrocyty*

Červené krvinky jsou bezjaderné buňky, které tvarem připomínají bikonkávní disk. Jejich průměr je asi 7,5  $\mu\text{m}$ . Vyvíjejí se v kostní dřeni, odkud putují do krve a zde žijí zhruba 110–120 dní. Obsahují červené krevní barvivo zvané hemoglobin, díky němuž přenášejí kyslík v cévách. Nemohou se aktivně pohybovat, mohou se však deformovat, což jim umožní průchod např. úzkou kapilárou. Pokud dojde ke zduření erytrocytů vlivem změny osmotického tlaku, hemoglobin unikne do okolí, a způsobí tím hemolýzu některých výpotků. Při mikroskopii lze tedy pozorovat oranžové, splývavé pozadí (Kobilková et al., 1984; Trojan, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012).

### 1.18.3 *Histocyty*

Histocyty jsou bílé krvinky schopné pohlcovat a následně prezentovat cizorodý materiál lymfocytům. Některé výpotky bývají na histocyty bohaté. Histocyty mají excentricky uložené jádro, které je menší než u mezoteliálních buněk. Jádro bývá kulaté, oválné či ledvinovitého tvaru, časté jsou buňky vícejaderné. Cytoplazma obsahuje granula a také vakuoly. Mitóza není vzácná. Dalším rozdílem mezi mezoteliemi a histocyty je, že přilehlé histocyty nejsou odděleny úzkým prostorem. Pokud je výpotek hojný na histocyty, při zpracování pomocí cytobloku může docházet k tvorbě shluků, které jsou jednoduše zaměnitelné s malignitou. Proto se využívají imunohistochemické metody pro odlišení mezotelií, histocytů a metastatických karcinomů (Kobilková et al., 1984; Hugo et al., 2005; Cibas et al., 2014).

### 1.18.4 *Eosinofilní granulocyty*

Eosinofily se řadí mezi bílé krvinky, do skupiny granulocytů, tedy buněk obsahujících v cytoplazmě granula. Po obarvení eosinem je pro tyto buňky typická



cihlová barva granul. Jádro je rozděleno většinou na 2 segmenty. Jejich funkcí je obrana před parazity a vyskytují se také u alergií. Výpotek je považován za eosinofilní, pokud eosinofily představují více než 10 % přítomných jaderných buněk. Nejběžnější příčinou jsou pneumothorax a hemothorax, kdy do pleurálního prostoru pronikne vzduch či krev, proto jsou častější eosinofilní výpotky pleurální než perikardiální. Mezi méně časté příčiny eosinofilního výpotku patří rezistence na léky či parazitární infekce, ovšem u většiny případů zůstává původ nejasný (Trojan, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012).

#### 1.18.5 *Neutrofilní granulocyty*

Neutrofilny jsou nejpočetnější bílé krvinky a také nejčastější granulocyty. Měří 10–12  $\mu\text{m}$ , jsou tedy zjevně větší než erythrocyty. Jsou také nazývány polymorfonukleární leukocyty, a to kvůli laločnatému jádru, které se vlivem stáří buňky člení na segmenty. Název neutrofilny nesou kvůli nedostatku charakteristického cytoplazmatického barvení. Neutrofilní granulocyty jsou pohyblivé buňky a jejich hlavní funkcí je fagocytóza. Zvýšený výskyt především mladých forem nalézáme při zánětech a akutních infekcích (Trojan et al., 2003; Ross, et al., 2011).

#### 1.18.6 *Lymfocyty*

Tyto buňky mají jedno kulaté, nesegmentované jádro, které mívá tmavší okraj. Dále mají převážně úzký lem bledé bazofilní cytoplazmy bez granul. Lymfocyty se v krvi vyskytují pouze zhruba hodinu, a to jen jejich malá část, většinou část nalezneme v lymfatických orgánech a lymfě. Jejich hlavní funkcí je imunitní obrana organismu. Ve zpracovaných výpotcích jsou viditelné převážně malé lymfocyty, tedy s úzkým lem cytoplazmy. Tento nálezn je relativně běžný, ale nespecifický. Navzdory nepřítomnosti maligních buněk bývá malignita častou příčinou lymfocytárních výpotků. Není neobvyklé, že počáteční pleurální tekutiny u pacientů s pleurálním mezoteliomem obsahují pouze lymfocyty (Kobilková et al., 1984; Trojan, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012; Cibas and Ducatman, 2014).

#### 1.18.7 *Nádorové buňky*

Některé nádory mají větší tendenci šířit se do pleury, perikardu či peritonea, a proto tyto buňky můžeme v preparátech nalézt. Mezi nejčastější nádory, které se do těchto dutin dostávají, patří například nádory vaječníků, plic, prsu a prostaty. Dobrým způsobem, jak identifikovat maligní buňky ve výpotku, je nejprve lokalizovat některé

benigní mezoteliální buňky. Důležité je rozlišit například reaktivní mezotelie od buněk nádorových, což někdy bývá obtížné, a proto je možné využít imunohistochemické metody.

Mezi obecné znaky nádorových buněk při mikroskopii patří:

- různý tvar a velikost buněk;
- nestejně velká a tvarově různá jádra;
- početnější a výraznější jadérka;
- vakuolizace jader i cytoplazmy, vakuoly mohou vyplnit celou buňku a porušit její membránu, tím pádem se dostávají do okolí;
- hyperchromazie (větší barvitelnost);
- holá jádra bez cytoplazmy;
- nepravidelné mitózy.

Obecných znaků často musí platit více najednou, ale nevyskytují se většinou všechny. Hodnocení nádorových buněk musí provádět zkušený lékař. Nádorové buňky nemusí být nutně větší než buňky mezoteliální, některé mají přibližně stejnou velikost, odlišují se hyperchromázií nebo přítomností jadérek. Výjimkou z tohoto pravidla však mohou být mezoteliomy, u nichž není patrné rozlišení mezi benigními a neoplastickými mezoteliálními buňkami. Výpotky s četnými velkými shluky lze označit jako maligní, je třeba ovšem dbát na možnost shlukování kvůli centrifugaci (Kobilková et al., 1984; Musil, et al., 2007; Cibas and Ducatman, 2014).

#### 1.18.8 *Bakterie, viry a další*

Bakterie obvykle způsobí akutní pleuritidy, perikarditidy a peritonitidy. Pro přítomnost bakterií v tekutině může svědčit krémově žlutá barva a především silný zápach. Mikroskopické preparáty bývají velice buněčné a skládají se téměř výhradně z polymorfonukleárních leukocytů neboli neutrofilů. Bakterie jsou v preparátu prokazovány často speciálními barvenými. K přesnému určení bakterie se výpotky posílají na mikrobiologické vyšetření. Příkladem bakterií jsou pyogenní bakterie, tedy streptokoky, stafylokoky, dále například *Mycobacterium tuberculosis*.

Viry se vyskytují velmi vzácně, ve formě cytoplazmatických inkluzí. Mezi nejčastěji zachycené zástupce patří herpesviry a cytomegaloviry. Ve výpotcích vzácně můžeme zachytit i plísňe, nejčastěji *Candida species*, *Cryptococcus neoformans* či *Aspergillus niger*. Velice neobvyklým případem mohou být nestrávené potraviny v pleurální tekutině, k tomuto nálezu dochází při ruptuře jícnu (Cibas and Ducatman, 2014; Rozsypal, 2015).

## 2 Cíl práce

Cílem této práce je porovnání dvou možných způsobů zpracování tekutých materiálů, jako jsou dutinové výpotky, metodou cytobloku. Tyto materiály se využívají k cytologické diagnostice nejrůznějších onemocnění, napomáhají určit klinickou diagnózu a mohou být také ukazatelem onemocnění nádorových.

Všech 32 tekutých materiálů, přijatých na oddělení patologie v Jindřichově Hradci, jsem rozdělila na poloviny. Každou polovinu jsem zpracovala odlišnou cytoblokovou metodou, a to za pomoci celoidinu a želatiny. Porovnávala jsem výhody a nevýhody obou metod zpracování.

Dalším cílem je porovnání tří různých metod barvení. Veškerý zpracovaný materiál jsem pomocí mikrotomu nakrájela na tři podložní skla, první sklo jsem nabarvila barvením hematoxylin-eosin, druhé barvivem Papanicolaou a třetí May-Grünwald-Giemsou. Zde jsem porovnávala mikroskopický vzhled a také výhody či nevýhody barvení.

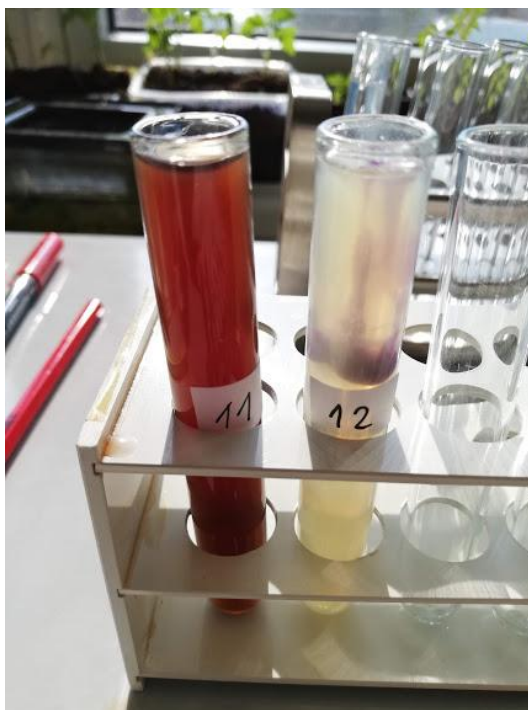
Na závěr jsem mikroskopicky zhodnotila buňky ve všech preparátech, jejich celularitu, rozložení v preparátu a srovnala jsem preparáty od stejného pacienta, kterému byly tekuté materiály odebrány s časovým odstupem.

## 3 Praktická část

### 3.1 *Posouzení makroskopického vzhledu materiálu*

Makroskopický vzhled výpotků je v diagnostice velice prospěšný. Pokud se pacientovi odebírá více vzorků tekutin, může se makroskopický vzhled viditelně měnit, což napovídá o stavu pacienta. Z původně čirého výpotku se může stát hemoragický nebo naopak (Kobilková et al., 1984). Tekuté materiály získané nejčastěji punkcí coelomových dutin nabývají barvy od průsvitné, lehce nažloutlé až po neprůsvitné, hnědé tekutiny. Dle makroskopického vzhledu dělíme tekutiny na serózní, hnisavé, chylózní a hemoragické. Serózní se podobají séru, jsou čiré, žlutavé barvy. Hnisavé jsou zakalené, mnohdy zbarvením až do zelena a mohou se od serózních lišit také zápachem. Chylózní jsou mléčně zakalené vlivem přítomnosti tuků. Krvavé jsou nejvíce odlišné od ostatních, jsou totiž sytě červeně či hnědě zbarvené. Může docházet i k jejich kombinaci, v mnoha případech se nedá přesně určit, o který typ se jedná, příkladem může být krvavý výpotek se zákalem, může být s velikou pravděpodobností kombinace s hnisavým. Jak již bylo řečeno v předchozích kapitolách, ne každý výpotek musí znamenat malignitu. Hemoragické výpotky bývají traumatického a nádorového původu, není to však podmínkou, proto je makroskopický vzhled pouze orientační a nelze od něj odvíjet diagnózu pacienta (Teřl et al., 2004). Většinová část buněk, které jsou pro vyšetření nejdůležitější, se usazuje na dně nádoby, což lze pozorovat pouhým okem.

Ze 32 vyšetřovaných vzorků byly nejčastější výpotky žluté barvy, bez zákalu, kterých bylo 15, druhými nejčastějšími byly hnědě zbarvené, také bez zákalu, s počtem 8. Další 4 tekuté vzorky byly zbarvením hnědé se zákalem a 5 jich bylo zbarveno žlutě, také se zákalem.



Obrázek 1: Makroskopický rozdíl mezi krvavým neboli hemoragickým (vlevo) a hnisavým tekutým materiálem (vpravo). Zkumavka vpravo obsahuje přidanou kapku hematoxylinu, který se váže na shluk buněk.

*Zdroj: vlastní výzkum*

### **3.2 Objem materiálu**

K makroskopickému vyšetření materiálu patří také zjišťování objemu lékařem zaslané tekutiny. Množství punktátu zaslané do laboratoře většinou nebývá množstvím celkově odebraným, pacientům se mnohdy odebere až několik litrů tekutiny a pro tvorbu adekvátního preparátu není potřebný celkově odebraný objem. Část odebrané tekutiny se často také zasílá do jiných laboratoří, jako je třeba klinická biochemie či mikrobiologie. Celkové množství odebrané pacientovi bývá uvedeno na žádance.

Všechny vyšetřované tekutiny byly již naředěny fixativem. Objem tekutin jsem měřila pomocí 2000mililitrového odměrného válce, který jsem musela po každém použití pečlivě umýt, aby nedošlo k nežádoucí kontaminaci jiným výpotkem. Nejčastěji se vyskytovaly vzorky o objemu kolem 500 mililitrů, největší objem měl vzorek s 1060 mililitry a nejmenší s 50 mililitry. Nejméně objemný materiál byl velice viskózní, proto i toto množství bylo dostačující k tvorbě adekvátního preparátu. Až po změření celkového objemu jsem vzorek rozdělila na poloviny, jedna polovina byla určena pro zpracování pomocí celoidinu, druhá pro želatinovou metodu.

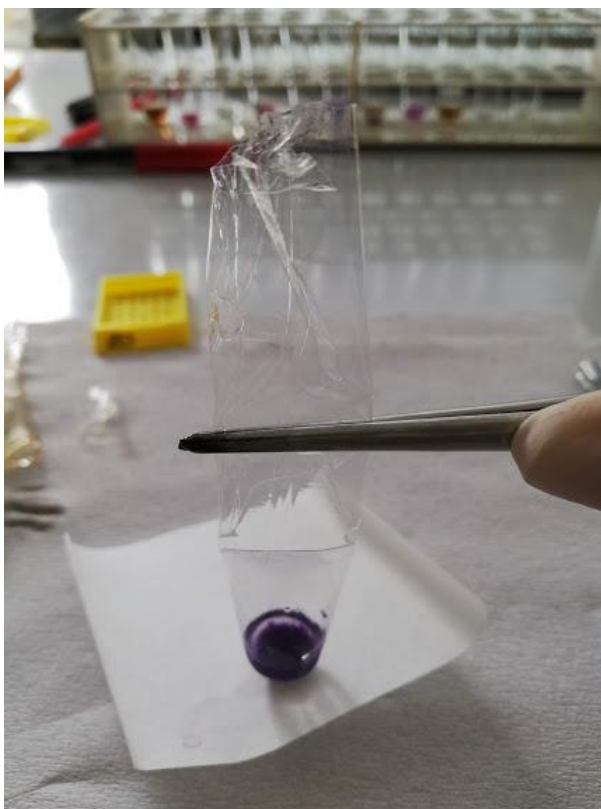
### **3.3 Příprava celoidinu**

Do nádoby s úzkým hrdlem jsem přidala 10 gramů celoidinu Geig a zalila 50 mililitry absolutního alkoholu (96%). Celoidin jsem pomocí skleněné tyčinky zatlačila do alkoholu a nechala bobtnat 24 hodin. Po 24 hodinách jsem přidala 50 mililitrů éteru. Pro uchování v lednici je důležitá nádoba se zabroušenou zátkou a úzkým hrdlem, která poskytne minimální vypařovací prostor. Může se stát, že celoidin po určité době zhoustne, pro navrácení konzistence stačí naředit jej alkoholéterem, což je absolutní alkohol a éter v poměru 1 : 1 (Chyšková, Cempírková, 2019).

#### **3.3.1 Zpracování pomocí celoidinu**

Zkumavku o objemu 10 mililitrů jsem naplnila již připraveným celoidinem, který jsem následně opět vylila zpět do zásobní lahve a zkumavku otočenou dnem vzhůru jsem nechala lehce okapat nad papírovými utěrkami položenými na pracovní desce. Okapání je důležité pro vznik celistvé a tenké vrstvy na vnitřní stěně zkumavky. Poté jsem do ní nalila 70% alkohol, který jsem zde nechala po dobu 1 minuty. Tento krok slouží k zacelení vrstvy celoidinu, která se udržela na vnitřním povrchu zkumavky.

Po vylití alkoholu musela celoidinová vrstva ve zkumavce zůstat nepoškozená, nezvrásněná, průsvitná. Pokud by došlo k poškození této vrstvy, hrozí protržení či necelistvost celoidinového „pytlíčku“. Pokud by došlo k protržení, musel by se celý proces opakovat a došlo by ke ztrátě biologického materiálu. Takto připravenou zkumavku jsem naplnila vyšetřovaným vzorkem o objemu 9 mililitrů a přidala 2 kapky Mayerova hematoxylinu pro barevné zvýraznění buněk, tedy snazší makroskopickou orientaci. U hnědých neboli hemoragických vzorků není Mayerův hematoxylin potřeba, buněčná suspenze je makroskopicky viditelná. Zkumavky jsem centrifugovala při 3000 otáčkách po dobu 10 minut. Po slití supernatantu jsem pomocí pinzety opatrně odlepila vzniklý „pytlíček“ z celoidinu a vytáhla ho ze zkumavky. Přebytečnou část pytlíčku jsem zastříhla nůžkami a užitečnou část s buněčným sedimentem jsem zabalila do papíru vhodného pro vložení do histologické kazety (Chyšková, Cempírková, 2019).



Obrázek 2: Celoidinový pytlíček vyjmutý ze zkumavky, obsahující cytologický materiál obarvený Mayerovým hematoxylinem.

*Zdroj: vlastní výzkum*



### **3.4 Příprava želatiny**

Metoda zpracování cytobloku pomocí želatiny se na oddělení patologie v Jindřichově Hradci nevyužívá, jelikož laboratoř nemá zpracované postupy pro tvorbu želatiny jakožto adekvátního zalévacího média, proto jsem nejprve musela správné ředění želatiny s destilovanou vodou zkoušet. Připravila jsem si 4 kádinky a do každé nalila 100 mililitrů destilované vody. Do první kádinky jsem nasypala 3,5 gramu želatiny, do druhé 4,5 gramu, do třetí 5,5 gramu a do čtvrté 6,5 gramu. Pomocí skleněné tyčinky jsem roztoky zamíchala a poté zahřívala na vařiči, dokud tekutiny nebyly čiré. Horké roztoky jsem nechala chladnout a pozorovala tuhnutí.

Roztok se 3,5 gramy želatiny tuhnul velmi dlouho, ani po 15 minutách, nebyl dostatečně tuhý. Roztok s 5,5 a 6,5 gramy tuhnul zase poměrně rychle, proto jsou tyto gramáže pro praxi nevhodné. Neadekvátnějším ředěním bylo 100 mililitrů destilované vody se 4,5 gramy želatiny.

Nově vytvořenou želatinu potřebnou k zalévání jsem zprvu opět rozmíchala tyčinkou, zahrála na vařiči do čirosti a poté jsem ji nechala chladnout při pokojové teplotě, ovšem ne tak dlouho, aby ztuhla. Želatina se nemůže používat horká, aby nedošlo k poškození buněčného materiálu.

### 3.4.1 *Zpracování pomocí želatiny*

Pro zalití do želatiny jsem využívala nižší zkumavky s menším objemem, z vysokých zkumavek by totiž nebylo možné následně vyjmout potřebný materiál. Do zkumavky o objemu 8 mililitrů jsem nalila vyšetřovaný materiál. Pro snazší makroskopickou orientaci jsem do nekrvavých výpotků přidala 2 kapky Mayerova hematoxylinu a zkumavku vložila do centrifugy, kde se materiál stáčel při 3000 otáčkách po dobu 10 minut. Ze zkumavky jsem poté slila supernatant a k buněčnému sedimentu přidala 1–2 mililitry předem připravené, chladné, ale stále tekuté želatiny. Objem nalité želatiny záležel na množství sedimentu, který byl mnohdy rozdílný. Pokud ho bylo málo, stačil 1 mililitr želatiny. Dále jsem pomocí sterilní injekční jehly roztok ve zkumavce rozmíchala a následně opět centrifugovala, tentokrát však při 3000 otáček jen 2 minuty. Zkumavku jsem vyjmula z centrifugy a nechala ji vychladnout a ztuhnout v lednici po dobu 10–15 minut. Po ztuhnutí jsem materiál ve zkumavce obkroužila injekční jehlou za současného vstřikování 10% formolu, to způsobilo uvolnění vzorku, který jsem následně vložila na papír vhodný pro zabalení do histologické kazety.



Obrázek 3: Cytologický materiál zalitý v želatině, vyjmutý ze zkumavky.

*Zdroj: vlastní výzkum*

### **3.5 Zpracování hotového cytobloku**

Tato část zpracování je pro obě zvolené metody, tedy za pomoci celoidinu a želatiny, stejná. Vzorek obsahující buněčný sediment, položený na vhodném papíru, jsem pomocí sterilní pinzety zabalila do malého balíčku tak, aby nedošlo k jeho vylití. Balíček se následně vešel do histologické kazety, kterou jsem poté uzavřela kovovým víčkem, správně označila fixem a ponořila do nádoby obsahující formol, který materiál fixuje do doby dalšího zpracování.

#### **3.5.1 Odvodnění materiálu**

Histologické kazety jsem vyjmula z formalínu a vložila je v kovovém košíčku do odvodňovacího tkáňového automatu neboli autotechnikonu. Autotechnikon slouží k vymytí fixativa, odvodnění, projasnění a prosycení zpracovávaného materiálu. Tento přístroj pracuje automaticky, stačí pouze nastavit vhodný program. K odvodnění dochází na základě průchodu vzorků přes řadu alkoholů ve stoupající koncentraci, voda ve vzorku je tedy nahrazena alkoholem.

Projasnění vzorku znamená proces, při kterém se ze vzorku odstraňuje alkohol z procesu odvodnění. Alkohol není mísitelný se zalévacími médii nerozpustnými ve vodě, proto je nutné ho nahradit látkou, která se s médiem mísí. Touto látkou je například xylen.

V závěrečné fázi tohoto procesu dochází k prosycení tekutým parafinem, který je obsažen ve více lázních (Jirkovská, 2006; Chyšková, Cempírková, 2019).

### 3.5.2 *Zalítí do parafínu*

Odvodněné, projasněné a prosycené vzorky jsem zalila do parafínu. Parafin je nejběžnější zalévací médium, nejen díky své nízké ceně. Tento proces jsem prováděla na parafinové zalévací lince, která obsahuje vyhřívanou nádrž, do níž jsem nasypala tuhý parafin, ten se vlivem vysoké teploty přeměnil na tekutý. Vzorek vyjmutý z autotechnikonu jsem vložila do vyhřáté části zalévací linky, pokud bych tak neučinila, tkáň by ztuhla následkem předchozího prosycení parafinem v tkáňovém procesoru. Poté jsem zpracovávaný vzorek vyjmula z histologické kazety, pomocí sterilní pinzety jsem rozbalila balíček z papíru a veškerý biologický materiál jsem přemístila do kovové zalévací formičky o vhodné velikosti. Kovovou formičku jsem přikryla plastovou částí histologické kazety a zalila parafinem, který je v zalévacím automatu udržován ve vyšší teplotě, aby byl tekutý. Po zalítí jsem parafin nechala ztuhnout na chlazené ploténce, která proces tuhnutí velice urychlila. Po ztuhnutí jsem parafinový bloček vyjmula z kovové formičky (Jirkovská, 2006; Chyšková, Cempírková, 2019).

### 3.5.3 *Krájení na mikrotomu*

Abychom vzorky mohli pozorovat pod mikroskopem, je třeba je nakrájet na tenké plátky o tloušťce 5–7  $\mu\text{m}$  (Mačák et al., 2004). K řezání materiálu jsem použila sáňkový mikrotom. Bloček z parafínu jsem upevnila do svorky a pomocí žiletky připevněné na mikrotomu jsem krájela řezy. Nejprve je třeba skrojit parafinový bloček, aby se v řezu zachytil adekvátní biologický materiál. Tloušťku řezů jsem si v průběhu krájení upravovala mikrometrickým šroubem, dokud nevzniknul adekvátní řez. Pro vhodnější mikroskopický preparát je lepší série řezů, tedy dva či tři na jedno podložní sklo, dle velikosti řezaného vzorku (Jirkovská, 2006).

### 3.5.4 *Natahování parafinových řezů*

Natahování parafinových řezů se provádí na podložní skla vhodná pro mikroskopování. Nejprve jsem na čisté podložní sklo natřela velmi tenkou vrstvičku kamencové želatiny, která zde slouží jako takzvané adhezivní médium. Na sklo jsem tedy kápala malou kapku této želatiny, prstem ji rozetřela po celé ploše podložního skla a vrstvičku jsem nechala dostatečnou dobu zaschnout. Takto připravené podložní sklo jsem si řádně označila obyčejnou tužkou.

Po ukrojení adekvátního řezu na mikrotomu jsem řez přemístila do předem připravené vodní lázně předehřáté na 45 °C. Účinkem teplé vody se řez napnul. K úpravě nedostatečného napnutí, nerovností a výběru vhodných řezů jsem používala pátradla. Ve vodní lázni jsem jednou rukou přidržovala téměř ponořené podložní sklo a druhou rukou jsem řez nasunula na sklo, také za pomoci pátradla. Toto sklo jsem na závěr položila na vyhřátou ploténku, aby došlo k zaschnutí (Jirkovská, 2006; Chyšková, Cempírková, 2019).

### 3.6 *Odparafinování*

Před každým barvením se vzorky zalité do parafínu musejí odparafinovat, tedy parafínu zbavit. Bez důkladného odparafinování by nedošlo ke správnému nabarvení preparátu, jelikož parafin je ve vodě nerozpustný. Tento proces jsem prováděla v barvicím automatu, v němž automaticky k odparafinování dochází před samotným barvením HE. Postup je uveden v tabulce.

Tabulka 2: Postup automatického odparafinování

Sušení	20 min.
Xylen	8 min.
Xylen	7 min.
96% alkohol	2 min.
90% alkohol	1 min.
88% alkohol	1 min.
80% alkohol	1 min.
70% alkohol	1 min.
Voda	30 min

*Zdroj: SOPV-PAO-001 Zpracování bioptického materiálu*

### 3.7 Barvení

#### 3.7.1 Hematoxylin-eosin

Tato metoda využívá kombinaci bazického hematoxylinu a kyselého eosinu. Hematoxylin je jedno z mála přírodních barviv a slouží k obarvení jader. Od hematoxylinu jakožto jaderného barvení se požaduje, aby nejen dobře barvil jádro, ale nepřebarvoval jej kvůli jaderným strukturám, dále aby neměnil ostatní cytoplazmatická barviva. Eosin naopak barví cytoplazmu. Cytoplazmatická barvení nesmí měnit barvu jader, které jsou obarvená jaderným barvivem, kvůli zániku viditelnosti jaderných struktur. Dále také musí rozlišit, které buňky jsou eosinofilní či basofilní. Eosinofilní se barví červeně a basofilní modře až modrozeleně (Kobilková et al., 1984; Jirkovská, 2006; Dvořák, et al., 2008; Chyšková, Cempírková, 2019).

Barvení HE je na oddělení patologie rutinně využíváno a pro hojnost preparátů v Jindřichově Hradci využívají barvicí automat. Postup barvení je uveden v tabulce.

Tabulka 3: Postup automatického barvení hematoxylin-eosin.

Sušení	20 min.
Xylen	8 min.
Xylen	7 min.
96% alkohol	2 min.
90% alkohol	1 min.
88% alkohol	1 min.
80% alkohol	1 min.
70% alkohol	1 min.
Hematoxylin-Weigert	10 min.
Voda	2 min.
Kyselý alkohol	7 sec.
Voda	10 min.
Eosin	1 min.
Oplachovací alkohol	1 min.
Oplachovací alkohol	1 min.
Aceton-xylen	1 min.
Aceton-xylen	2 min.
Karbol-xylen	2 min.
Xylen	2 min.
Xylen	1 min.

Zdroj: SOPV-PAO-001 Zpracování bioptického materiálu

### 3.7.2 *Papanicolaou*

PAP barvení se používá k diferenciaci buněk při gynekologických nátěrech, sputa, moči či tekutých materiálech. Jedná se o barvení polychromatické. K obarvení jader slouží hematoxylin, polychrom EA 50 k obarvení cytoplazmy. Další důležitou složkou barviva je Oranž G, která slouží k obarvení keratinu. Při barvení PAP se jádra obarvila do modrofialové, cytoplazma většiny buněk do odstínu červenorůžové (Bóznér et al., 1986; Arbyn, et al., 2007; Branca, et al., 2000; Dvořák, et al., 2008).

Toto barvení jsem prováděla v jindřichohradecké gynekologicko-cytologické laboratoři GYN-CYT, nikoliv na oddělení patologie. Zde ho využívají rutinně, pro obarvení gynekologických nátěrů a pro jejich hojnost využívají barvicí automat Shandon Varistain Gemini. V automatickém přístroji preparát postupoval dle následující tabulky.

Tabulka 4: Postup automatického barvení Papanicolaou.

Kyselina octová 3%	20 sec.
Alkohol – ether 1 : 1	2 min.
Alkohol 70%	20 sec.
Destilovaná voda	20 sec.
Hematoxylin (Harrisův)	3 min.
Tekoucí voda	1 min.
Amoniak 20%	1 min.
Tekoucí voda	4 min.
Alkohol 96%	30 sec.
Alkohol 96%	30 sec.
Alkohol 96%	30 sec.
Oranž G	3 min.
Alkohol 96%	30 sec.
Alkohol 96%	30 sec.
Alkohol 96%	30 sec.
Polychrom EA 50	3 min.
Alkohol 96%	30 sec.
Alkohol 96%	30 sec.
Alkohol 96%	30 sec.
Xylen – aceton 1 : 1	30 sec.
Xylen – aceton 1 : 1	30 sec.
Xylen	30 sec.
Xylen	30 sec.
Xylen	20 sec.

*Zdroj: SOPV 01-GYN-CYT s.r.o.*



V případě poruchy přístroje či při dlouhodobém výpadku proudu lze barvit manuálně dle následující tabulky.

Tabulka 5: Postup manuálního barvení Papanicolaou

Kyselina octová 3%	10× protáhnout
Alkohol – ether 1 : 1	10× protáhnout
Alkohol 70%	10× protáhnout
Destilovaná voda	10× protáhnout
Hematoxylin (Harrisův)	3 min.
Tekoucí voda	1 min.
Amoniak 20%	1 min.
Tekoucí voda	3 min.
Alkohol 96%	10× protáhnout
Alkohol 96%	10× protáhnout
Alkohol 96%	10× protáhnout
Oranž G	3 min.
Alkohol 96%	10× protáhnout
Alkohol 96%	10× protáhnout
Alkohol 96%	10× protáhnout
Polychrom EA 50	3 min.
Alkohol 96%	10× protáhnout
Alkohol 96%	10× protáhnout
Alkohol 96%	10× protáhnout
Xylen – aceton 1 : 1	10× protáhnout
Xylen – aceton 1 : 1	10× protáhnout
Xylen	10× protáhnout
Xylen	10× protáhnout
Xylen	10× protáhnout

*Zdroj: SOPV 01-GYN-CYT s.r.o.*

### 3.7.3 *May-Grünwald-Giemsa*

Toto monochromatické barvení představuje kombinaci barviv May-Grünwald a Giemsa (Dvořák, et al., 2008). Výsledkem barvení jsou eosinofilní složky dorůžova, basofilní v různých odstínech modré. Roztoky May-Grünwald a Giemsa Romanovski si na oddělení patologie v Jindřichově Hradci objednávají již hotové v nádobách o objemu 1 litr. Barvení jsem prováděla v odvětrávaném laboratorním boxu. Nejdříve jsem si připravila 11 kyvet na mikroskla. Do první kyvety jsem nalila 100 mililitrů koncentrovaného May-Grünwalda, do druhé ředěný May-Grünwald v poměru 1 : 1

s destilovanou vodou (50 mililitrů MG : 50 mililitrů destilovaná voda). Do třetí kyvety jsem si naředila Giemsu s destilovanou vodou v poměru 1 : 20 (4 mililitry Giemsa : 80 mililitrů destilovaná voda). Dále jsem pokračovala v plnění zbylých kyvet dle tabulky a vše si řádně popsala. Skla jsem vyskládala do první kyvety a manuálně přendávala v závislosti na uvedených časech (Chyšková, Cempírková, 2019).

Tabulka 6: Postup manuálního barvení May-Grünwald-Giemsa.

May - Grünwald (koncentrovaný)	5 min.
May - Grünwald (ředěný)	1 min.
Giemsa (ředěný)	20 min.
70% alkohol	10 sec.
96% alkohol	10 sec.
96% alkohol	10 sec.
96% alkohol	30 sec.
Aceton	30 sec.
Xylen	1 min.
Xylen	1 min.
Xylen	2 min.

*Zdroj: SOPV-PAO-001 Zpracování bioptického materiálu*

### 3.8 Montování preparátu

Výraz montování se v histologii využívá pro závěrečnou fázi vzniku trvalého preparátu, která zahrnuje přikrytí podložního skla sklem krycím. Aby na sobě skla držela, používá se vhodné montovací médium. Tato média by měla mít stejný index lomu jako sklo, aby nedocházelo k nežádoucím efektům při mikroskopickém vyšetření. Při výběru vhodného média je třeba dbát také na jeho pH, pokud je kyselé, může ovlivnit použité barvivo, a tím změnit jeho barevný tón. V jindřichohradecké nemocnici na oddělení patologie využívají Pertex. Montovací médium Pertex obsahuje xylen (30–65%) a methybenzen (0–20%). Díky tomuto složení se řadí mezi hořlavé kapaliny s hořlavými parami, dráždí kůži, při dlouhodobém vdechování může dojít ke vzniku respiračních poruch. Proto je nutné při manipulaci s Pertexem pracovat v ochranných rukavicích, pod digestoří. Toto montovací médium není mísitelné s vodou, ředí se tedy xylenem. Stejně jako u všech chemikálií uchovávaných v laboratoři, i tato musí mít svůj bezpečnostní list. Alternativou Pertexu je kanadský balzám, ovšem ten se kvůli své ceně tolik nevyužívá, je značně dražší. V gynekologicko-cytologické laboratoři, kde jsem barvila PAP, využívají montovací médium Bio mount. Montování může být ruční

či za použití montovacího automatu. Po barvení HE a PAP jsem využívala montovací automat, který celý proces zajistí sám, ovšem po obarvení v MGG jsem využívala ruční montování. Na obarvený preparát jsem kápala dostatečně velkou kapku montovacího média, přikryla ho krycím sklem a v případě vzniklých bublin, které by mohly negativně ovlivnit mikroskopování, jsem je lehkým tlakem prsty vytlačila ven. Takto připravené preparáty jsou vhodné k mikroskopii (Jirkovská, 2006; Chyšková, Cempírková, 2019).

### 3.8.1 *Mikroskopování*

Potřebný mikroskopický preparát jsem umístila do držáku skel tak, aby nedošlo k nežádoucímu pohybu po stolku mikroskopu. Vypínačem na mikroskopu jsem zapnula zdroj světla a na revolverovém měniči jsem nastavila objektiv s nejmenším zvětšením. Pomocí šroubu pro křížový posun jsem posunula preparát po stolku do středu zorného pole. Dále jsem makrometrickým šroubem zaostřovala, dokud jsem nezahlédla buňky v preparátu. Při tomto kroku je důležité dbát zvýšené opatrnosti, jelikož zde hrozí proražení sklíčka objektivem. Po nalezení obrazu preparátu jsem ostrost zlepšila mikrometrickým šroubem. Preparát jsem prohlížela celý, tedy jsem dále využívala i šroub pro křížový posun. Dle potřeby jsem měnila objektivy, neboli upravovala zvětšení. Poslední, imerzní objektiv, který slouží k největšímu zvětšení, jsem k tomuto pozorování nevyužívala.

## 4 Výsledky

Na oddělení patologie v Nemocnici Jindřichův Hradec jsem zpracovala 32 tekutých materiálů. Do těchto materiálů spadaly pouze výpotky, punktáty. Tyto biologické materiály jsem zpracovala metodou cytobloku za pomoci celoidinu a za pomoci želatiny. Každý vybraný tekutý materiál jsem rozdělila na polovinu, vzniklo tedy 64 parafínových bločků, 32 bločků zpracovaných celoidinovou a 32 zpracovaných želatinovou metodou. Z každého bločku jsem nakrájela řezy na 3 podložní skla. První sklo s řezy putovalo k obarvení hematoxylin-eosinem, druhé sklo do barviva Papanicolaou a třetí jsem barvila barvením zvaným May-Grünwald-Giemsa. Vzniklo tedy 192 trvalých mikroskopických preparátů. Kvůli vzniklé chybě, která nastala při zpracování a je objasněná v diskuzi, jsem pracovala pouze se 168 preparáty.

Věk pacientů, kterým byly odebrány vyšetřované tekutiny, se pohyboval nejčastěji v rozmezí 60–80 let, vyskytla se pouze jedna výjimka, a to pacient ve věku 34 let. Častější pohlaví bylo mužské, ovšem tento aspekt zřejmě nehraje ve tvorbě výpotků roli, záleží zde na onemocnění. Kvůli malému množství hodnocených vzorků jsem se těmito statistikami více nezabývala, tato informace je pouze pro doplnění.



Obrázek 4: Graf zobrazující poměr mužů a žen z celkového počtu vyšetřovaných tekutin

*Zdroj: vlastní výzkum*

#### **4.1 Rozložení buněk v preparátu**

Při mikroskopickém hodnocení rozložení buněk jsem pozorovala všechny zpracované trvalé preparáty. Při tomto pozorování jsem se zabývala buněčným rozložením v celém preparátu. Hodnotila jsem průměrnou vzdálenost mezi buňkami a stanovila stupnici od 1 do 3. Stupeň 1 značí buňky velice vzdálené, stupeň 3 buňky nahuštěné u sebe. Preparáty, které byly nehodnotitelné, tedy v případě, kdy se na podložním skle materiál vůbec nevyskytoval, jsem hodnotila číslem 0.

Do průměrného rozložení jsem započítávala i číslo 0. Celkem 96 preparátů zpracovaných celoidinovou metodou mělo průměrné rozložení 1,95. Rozložení preparátů obarvených HE bylo 1,91; v případě preparátů MGG 1,84 a u PAP 2,09.

72 preparátů zpracovaných metodou za pomoci želatiny mělo průměrné rozložení 1,68; z toho preparáty obarvené HE 1,50; MGG 2 a PAP 1,78. Průměrné rozložení MGG není objektivní, jelikož jsem hodnotila pouze 8 preparátů, proto je průměr oproti ostatním vyšší.

#### **4.2 Celularita vzorků**

Celularita neboli buněčnost prokazovala počet buněk v zorném poli. Zorné pole jsem zvolila takové, aby mělo nejvíce nahuštěných buněk. Pro toto hodnocení jsem stejně jako u rozložení zvolila stupnici od 1 do 3 s tím, že 3 znamenala nejvyšší stupeň celularity. Špatně zpracovaným preparátům, tedy nehodnotitelným, bez buněčného materiálu, jsem přidělila číslo 0.

Stejně jako u hustoty jsem číslo 0 započítávala do průměrných hodnot. Preparáty zpracované metodou celoidinovou v počtu 96 měly průměrnou celularitu 2,31. Buněčnost preparátů barvených HE byla 2,19; MGG 2,38 a PAP 2,40.

Preparáty zpracované želatinovým cytoblokem měly průměrnou celularitu 1,88. Těchto preparátů je 72. Preparáty barvené HE měly průměr 1,69; MGG 2,13 a PAP 2. Hodnota průměru preparátů barvených MGG není objektivní, jelikož byl průměr počítán pouze z 8 preparátů.

### **4.3 Srovnání opakovaných odběrů**

Cílem bylo porovnání makroskopického vzhledu, porovnání objemu, mikroskopického vzhledu, které zahrnovalo zhodnocení rozložení buněk v preparátech a celularity dvou vzorků od stejného pacienta, odebraných s časovým odstupem. Porovnání jsem prováděla u tří pacientů, u každého jsem doplnila klinickou diagnózu, která byla vyhodnocena odborným lékařem.

#### **4.3.1 Pacient číslo 1**

Vzorky od tohoto pacienta byly odebrány v rozmezí 7 dní. Jednalo se o tekutiny z pravé pohrudniční dutiny. Makroskopicky byly totožné, jednalo se o žlutou tekutinu bez zákalu. Rozdílný byl objem, první materiál měl objem 200 mililitrů, druhý 590 mililitrů. Mikroskopický nález byl také velice obdobný, v obou vzorcích byly nalezeny mezotelie, malé lymfocyty, erytrocyty, neutrofilní granulocyty. Celularita i rozložení buněk však byly u druhého vzorku o řád vyšší.

Před dvěma lety byl pacientovi diagnostikován tumor pravé plíce. Po dvou letech se objevilo velké množství pravostranného pleurálního výpotku, až do výše 4. mezižebří. Později byl pacientovi diagnostikován oboustranný pleurální výpotek, ovšem pravostranný byl masivní. V tomto případě nebylo klinicky možné vyloučit ani podíl srdečního selhání. Při mikroskopickém vyšetření potvrzen tumor pravé plíce. Dále diagnostikována hilová lymfadenopatie, hypertenze, hyperthyreosa.

#### 4.3.2 *Pacient číslo 2*

Odběr materiálů se prováděl v rozmezí 74 dní. Tekutiny z pohrudniční dutiny byly makroskopicky lehce odlišné, obě byly bez zákalu, ovšem první byla zbarvena žlutě, druhá nesla odstín světle hnědé, tedy patrně větší příměs krve. Objem první byl 1060 mililitrů, druhé 950 mililitrů. V mikroskopických preparátech byly patrné erytrocyty, mezotelie, ojedinělé i v trsech. V prvním vzorku se nacházelo více malých lymfocytů, neutrofilů, proto celularita i rozložení buněk byly o jednotku vyšší.

Pacient byl opakovaně hospitalizován na interním oddělení. Z chronických onemocnění byl u pacienta diagnostikován DM II. typu a arteriální hypertenze. K vyloučení nádorového onemocnění plic bylo provedeno CT vyšetření, na kterém byla zjištěna fibróza jater. Následné endoskopické vyšetření horního gastrointestinálního traktu prokázalo jícnové varixy, které souvisejí s diagnózou jaterní fibrózy. Jelikož mikroskopicky vyšetřený pravostranný výpotek byl serózní, byl případ hodnocen jako výpotek při jaterní fibróze.

#### 4.3.3 *Pacient číslo 3*

Tekutiny z pravé pohrudniční dutiny byly odebrány v rozmezí 66 dní. Z makroskopického pohledu byly velice odlišné, první, o objemu 1000 mililitrů, byla tmavě hnědá, zakalená, druhá, o objemu 800 mililitrů, žlutá, pouze s lehkým zákalem. Při mikroskopii obou preparátů nalezeny malé lymfocyty, erytrocyty, mezotelie, samostatně i v trsech. Celularita a rozložení buněk se výrazně nelišily.

Pacient byl přijat kvůli hemoptýze a byl mu diagnostikován pravostranný hrudní výpotek. Při mikroskopickém vyšetření byla objevena dysplazie epitelových buněk z bronchiální biopsie, dle tohoto nálezu nebylo možné vyloučit přítomnost infiltrujícího maligního tumoru. O měsíc později se pravostranný výpotek opět zvětšoval, levá strana bez výpotku. Výpotek působil tlakové změny na plicní parenchym pravého dolního laloku. Za tři měsíce pacient zemřel na srdeční selhání.

## 5 Diskuze

Hromadění nadměrného množství výpotku v lidském těle může být komplikací u mnoha onemocnění. Mikroskopické zhodnocení buněk lékařem přispívá k diagnóze, mohou se odhalit také buňky nádorové. Z těchto preparátů nelze bez pomoci doplňkových, například imunohistochemických metod, stanovit konkrétní druh a původ nádoru, ovšem upozorní na jeho přítomnost v těle a dle klinické diagnózy se nádory dohledají. Úkolem laborantů je zpracování těchto tekutin tak, aby byly mikroskopické preparáty co nejjednodušší, čím více buněk budou preparáty obsahovat, tím bude diagnostika lékařem přesnější.

Při praktickém zpracování vzorků došlo k chybám, a to kvůli lidskému faktoru. První komplikace nastala při barvení metodou PAP. Skla zpracovaná na oddělení patologie, jsem nesla do gynekologicko-cytologické laboratoře, kde mají pro tuto metodu barvení barvicí automat. Vzorky jsem správně umístila do automatu, vyčkala do konce procesu barvení. Při pohledu pouhým okem bylo vidět, že se preparáty neobarvily. Důvodem této komplikace bylo neodparafínování vzorků. Proto jsem musela zpracovat preparáty nové, odparafínovat je a vložit do barvicího automatu. Poté se preparáty obarvily.

Druhou komplikací byl nedostatečný systém v nabarvených preparátech. I přes relativně malé množství vzorků se stalo, že vzorky číslo 1–24, zalité do želatiny, neprošly barvením PAP, ale jsou duplicitně nabarveny MGG. Těchto 24 preparátů z celkového počtu 192 tedy chybí.

V Jindřichově Hradci na oddělení patologie cytoblok zpracovávají pomocí celoidinu. Tato netradiční metoda je pro cytoblok velmi vhodná, zpracování je jednoduché, poměrně rychlé a velice snadno reprodukovatelné. Důležitá je správná příprava celoidinového „pytlíčku“, který se poté vytáhne ze zkumavky s veškerým biologickým materiálem, nedochází tedy ke ztrátám buněk. Výhodou celoidinu je možnost uchování v lednici pro jeho další použití. Malá nevýhoda se jeví při mikroskopickém vyšetření, kde bývá patrná tenká vrstvička celoidinu.

Celoidinovou metodu jsem porovnávala s metodou želatinovou, která se jeví pro cytoblok méně vhodná. Želatina byla zvolena na základě podobnosti s agarem, který se pro zpracování cytobloku v histologických laboratořích hojně využívá, ovšem pro jeho vysokou cenu jsem zvolila právě želatinu. Zpracování je oproti celoidinové metodě o něco zdlouhavější a také složitější. Velikou nevýhodou této



metody je ztráta buněčného materiálu. K této komplikaci dochází při vyjímání materiálu zalitého želatinou ze zkumavky. I přes pečlivé obkroužení injekční jehlou a za současného vstřikovávání formolu dochází k přichycení části buněk ke zkumavce. Další nevýhodou oproti celoidinu je nemožnost uchování želatiny například do druhého dne, želatina po určité době ztuhne a nedá se opět naředit. Proto se vždy musí odhadnout potřebné množství při ředění želatiny, aby nedocházelo k velkému plýtvání. V mikroskopických preparátech želatina zůstává v poměrně velkém množství.

Mikroskopické preparáty byly často velice buněčné, vyskytovaly se zde všechny možné typy buněk, nádorové buňky jsem zachytila u pěti pacientů. Při mikroskopii byla zřetelná nevýhoda želatinové metody, želatina totiž mnohdy překrývala buňky v preparátech, které poté nebyly dobře viditelné. To téměř u poloviny želatinových preparátů znemožnilo objektivní hodnocení rozložení buněk a celularity, mohlo by to tedy ovlivnit i lékařskou diagnózu. Tenká vrstva celoidinu viditelná v preparátech se nejevila jako velký problém, neměla zásadní vliv na hodnocení.

Na 12 z celkového počtu 168 mikroskopických skel se biologický materiál vůbec nevyskytoval, nebylo tedy možné je mikroskopicky hodnotit. Ke ztrátám materiálu může dojít například při barvení, kdy se řez ze skla odlepí a odplaví. Nejčastěji biologický materiál chyběl u barvení HE zpracovaným želatinovým cytoblokem. Materiál však chyběl i u PAP a MGG, a dokonce i u celoidinových cytobloků, proto tyto ztráty nelze spolehlivě obhájit.

Z mikroskopického hlediska se nejadekvátnějším barvením jevílo barvení HE. Toto barvení je velice přehledné, buňky jsou od sebe většinou rozeznatelné. Některé preparáty mi přišly výraznější, tedy o něco lepší, méně výrazné preparáty se hůře hodnotí kvůli horšímu rozpoznání typů buněk. Důvodem kolísavé výraznosti barvení bývá čerstvost namíchaných barviv v barvicím automatu. Při tomto barvení nebyla natolik viditelná želatina vyskytující se v preparátech. Celoidinové preparáty byly naprosto v pořádku, vrstvička celoidinu obarvená HE je světle růžová, tedy ještě méně viditelná v porovnání s želatinou, a proto nemá výrazný vliv na hodnocení.

Výhodou barvení MGG je jeho výraznost, ovšem vadila mi jeho nepřehlednost, vše bylo zbarveno do odstínů modré, proto byla orientace v preparátech těžká a přehlednost vyskytujících se buněk byla nízká. Různé typy buněk na první pohled vypadají stejně, až při velmi podrobném zkoumání jsem typy dokázala relativně odlišit. Ne všechny jsem však dokázala s přesností 100 % označit. Želatina se také obarvila do modra, proto byly tyto preparáty velmi nepřehledné. Vrstvička celoidinu byla v tomto barvení

výraznější, ovšem nenarušila pozorování tak jako želatina. Celkově mi toto barvení přišlo nejméně vhodné.

Barvení PAP bylo přehledné, typy buněk od sebe byly relativně jednoduše odlišitelné. Toto barvení je značně sytější než například pozorované barvení HE, proto zde byl větší problém se želatinou, která se obarvila do velmi syté růžové až fialové a velice výrazně překrývala buněčný obsah. I zde byla celoidinová vrstva výraznější, ale stejně jako u MGG nenarušovala pozorování tak jako želatina.

## 6 Závěr

Tuto studii v rámci bakalářské práce jsme vybrali na základě důležitosti zpracování punktátů metodou cytobloku, kvůli jejich diagnostickému přínosu nejen v onkologii. Cílem bylo porovnání laboratorního zpracování cytobloku metodou za pomoci želatiny a metodou za pomoci celoidinu. Pomocí obou metod jsem zpracovala 32 tekutých materiálů. Metoda zpracování celoidinem je jednoduchá, reprodukovatelná. Želatinová metoda je o trochu pracnější, také reprodukovatelná, ovšem dochází zde ke ztrátám biologického materiálu a hodnocení je limitované častějším překrytím vyšetřovaného materiálu zbytky želatiny, pro cytoblokovou metodu je tedy méně vhodná.

Druhé porovnání zahrnovalo výhody a nevýhody barvení. Porovnávala jsem barvení HE, MGG a PAP. Nejadekvátnějším barvením pro zpracování cytobloku a jeho následné mikroskopické hodnocení bylo barvení HE.

Má práce přispěla hodnotícím lékařům a laborantům z nemocnice v Jindřichově Hradci. Hodnotící lékaři už delší dobu uvažovali o změně metody laboratorního zpracování cytobloku, především kvůli viditelné vrstvičce celoidinu v mikroskopických preparátech, a přemýšleli také nad želatinovou metodou, ovšem ta se dle mé práce jeví jako méně vhodná, protože želatina mnohem více ovlivňuje mikroskopické vyšetření. Laborantům jsem poskytla vysvětlení o náročnosti a nevýhodách želatinové metody v porovnání s metodou celoidinovou. Laboranti z oddělení patologie jsou s celoidinovou metodou spokojeni a využívají ji už několik let.

Díky této práci jsem se naučila nejen zpracovávat cytoblok, ale také pracovat se základními histologickými metodami, jako je práce s autotechnikonem, zalití materiálu do parafínu na zalévací lince, krájení řezů na mikrotomu, odparafínování, barvení a montování mikroskopických preparátů. Tyto činnosti se hojně využívají ke zpracování jakéhokoliv bioptického materiálu v histologických laboratořích.

## 7 Seznam literatury

1. ARBYN, M., HERBERT, A., a kol., 2007. *European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening: recommendations for collecting samples for conventional and liquid-based cytology\**. *Cytopathology* [online]. **18**(3), 133-139 [cit. 2020-02-13]. DOI: 10.1111/j.1365-2303.2007.00464.x. ISSN 09565507. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2303.2007.00464.x>
2. BANCROFT D. J., STEVENS A., 1996. *Theory and Practice of Histological Techniques*. New York: Pearson Professional Limited. ISBN 0-443-04760-X.
3. BARTŮNĚK, P., JURÁSKOVÁ, D., HECZKOVÁ, J., 2016. *Vybrané kapitoly z intenzivní péče*. Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-4343-1.
4. BRANCA, M., COLEMAN, D. V., a kol., 2000. *Quality assurance and continuous quality improvement in laboratories which undertake cervical cytology*. Roma. PHARM IT Srl. Dostupné z: <https://www.eurocytology.eu/sites/default/files/resources/Quality%20Assurance%20In%20Laboratories%20Which%20Undertake%20Cervical%20Cytology.pdf>
5. BÓZNER, A., a kol., 1986. *Cytológia: Učebnica pre prírodovedecké fakulty*. Martin: Osveta. ISBN 70-059-86.
6. CIBAS, S., E., DUCATMAN, S., B., 2014. *Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates*. Philadelphia: Saunders. ISBN 978-1-4557-4462-6.
7. ČEŠKA, R., a kol., 2010. *Interna*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-423-0.
8. ČIHÁK, R., 2002. *Anatomie 2: Druhé, upravené a doplněné vydání*. Praha: Grada publishing, a.s. ISBN 80-247-0143-X.
9. DOLEŽALOVÁ, V., a kol., 1995. *Principy biochemických vyšetřovacích metod. II. část*. Brno: IDVPZ. ISBN 80-7013-206-X.
10. DUŠKOVÁ, J., 2018. *Cytologie výpotků v coelomových dutinách. Česko – Slovenská patologie a soudní lékařství*. Praha: Nakladatelství Olympia, a.s. č. 4. ISSN 1210-7875.
11. DVOŘÁK, K., DVOŘÁKOVÁ, Z., FEIT, J., LUKÁŠ, Z., ŠMARDOVÁ, J. 2008. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod* [online]. [2020-13-02]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLKHM0422c/um/Zaklady\\_histopatologicky\\_ch\\_vysetrovacich\\_metod.pdf?lang=en](https://is.muni.cz/el/med/jaro2016/BLKHM0422c/um/Zaklady_histopatologicky_ch_vysetrovacich_metod.pdf?lang=en)

12. FÁTOROVÁ, I., 2011. *Encyklopedie laboratorní medicíny pro klinickou praxi: Mezotelie* [online]. [2020-16-02]. Dostupné z: <http://www.demo4.smitka.eu/encyklopedie/A/FIAED.htm>
13. GLENCROSS, H., AHMED, N., WANG, Q., SMITH, CH., 2011. *Biomedical science practice*. New York: Oxford University Press. ISBN 978-0-19-953329-9.
14. HospitalTV, 2015. *Hrudní punkce – nábodnutí pohrudniční dutiny a odčerpání výpotku*. Youtube video [2020-12-02]. Dostupné z <https://www.youtube.com/watch?v=ZoYdNQRHLM>
15. HUGO, J., VOKURKA, M., a kol., 2005. *Velký lékařský slovník 5. vydání*. Praha: Maxdorf, s.r.o. ISBN 80-7345-058-5.
16. CHYŠKOVÁ, P., CEMPÍRKOVÁ, D., 2019. *SOPV-PAO-001: Zpracování bioptického materiálu*. Oddělení patologie. Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.
17. CHYŠKOVÁ, P., CEMPÍRKOVÁ, D., 2019. *SOPV-PAO-010: Zpracování cytologického materiálu metodou cytobloku*. Oddělení patologie. Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.
18. JIRKOVSKÁ, M., 2006. *Histologická technika pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. Praha 5: Galén. ISBN 80-7262-263-3.
19. JUNQUEIRA C. L., CARNEIRO J., KELLEY O. R., 2002. *Základy histologie*. Praha: H&H a.s. ISBN 80-85787-37-7.
20. KOBILKOVÁ, J., SIRACKÝ, J., a kol., 1984. *Cytodiagnostika v gynekologii*. Praha: Avicenum. ISBN 80-201-0001-6.
21. KROGERUS, L., KHOLOVÁ, I., 2018. Cell Block in Cytological Diagnostics: Review of Preparatory Techniques. *Acta Cytologica*. Roč. 62, č. 4. DOI: 10.1159/000489769.
22. LICHNOVSKÝ, V., a kol., 2007. *Přehled histologie člověka v obrazech*. Olomouc: Universita Palackého v Olomouci. ISBN 978-80-244-2277-0.
23. LÜLLMANN-RAUCH, R., 2012. *Histologie*. Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-3729-4.
24. MAČÁK, J., MAČÁKOVÁ, J., 2004. *Patologie*. Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN 80-247-0785-3.
25. MACHOVÁ, J., 2016. *Biologie člověka pro učitele*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3357-2.

26. MATHEW P., E., NAIR, V., 2017. *Role of cell block in cytopathologic evaluation of image-guided fine needle aspiration cytology* [online]. [2020-05-02]. Dostupné z: <http://www.jcytol.org/article.asp?issn=0970-9371;year=2017;volume=34;issue=3;spage=133;epage=138;aulast=Mathew>
27. MESCHER, L. A., 2018. *Junqueirovy základy histologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-324-1.
28. MUSIL, J., PETŘÍK, F., TREFNÝ, M., a kol., 2007. *Pneumonologie*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-0993-5.
29. NAVRÁTIL, L., a kol., 2008. *Vnitřní lékařství pro nelékařské zdravotnické obory*. Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN 978-80-247-2319-8.
30. ONDIČ, O., 2018. *Negynekologická cytologie – návod na přežití. Česko – slovenská patologie*. Praha: Olympia, a.s. Roč. 54, č. 4. ISSN 1210-7875.
31. PANTANOWITZ, L., XING, J., MONACO, E., S., 2018. *Atlas of touch preparation cytopathology*. New York City: Springer Publishing Company. ISBN 9781620700686.
32. PECKA, M., BLÁHA, M., 2010. *Praktická hematologie: Laboratorní metody*. Český Těšín: Infiniti art. ISBN 978-80-903871-9-5.
33. PUMPR, P., POKORNÁ, H., 2016. *SOPV 01. GYN – CYT s.r.o. Nemocnice Jindřichův Hradec, a.s.*
34. Roche Česká Republika, 2019. *Punkce ascitu|Výšetřovací metody|Mojemedicina.cz*. Youtube video [2020-13-02]. Dostupné z <https://www.youtube.com/watch?v=H5dG1hujJrc>
35. ROLLINS, D., S., RUSSEL, K., D., 2017. *Cytopathology in Focus: Cell blocks: Getting the most from the least invasive method* [online]. [2020-19-02]. Dostupné z: <http://www.captodayonline.com/cytopathology-cell-blocks-getting-least-invasive-method/>
36. ROSS, M., H., PAWLINA, W., 2011. *Histology: a text and atlas*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-1-45110-150-8.
37. ROZSYPAL, H., 2015. *Základy infekčního lékařství*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-2932-2.
38. TÁBORSKÝ, M., ZADRAŽIL, J., ŠČUDLA, V., 2017. *Interní propedeutika*. Praha: Mladá fronta. ISBN 978-80-204-4645-9.

39. TEŘL, M., PEŠEK, M., TAUCHMAN, A., 2005. Pleurální výpotek v lékařské praxi. *Vnitřní lékařství*. Praha: Medica Publishing and Consulting, s.r.o. Roč. 51, č. 4. ISSN 0042-773X.  
Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/vnitri-lekarstvi/2005-4/pleuralni-vypotek-v-interni-praxi-38047/download?hl=cs>
40. TROJAN, S., a kol., 2003. *Lékařská fyziologie*. Praha: Grada Publishing, a.s. ISBN 80-247-0512-5.
41. VACEK Z., 1995. *Histologie a histologická technika – II.část*. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7013-202-7.
42. VEČERKOVÁ, I., 2015. *Laboratorní příručka: Cytologická laboratoř Brno* [online]. [2020-16-02]. Dostupné z: <http://www.damier.cz/soubory/laboratorni-prirucka.pdf>
43. ZADÁK, Z., 2017. *Intenzivní medicína na principech vnitřního lékařství*. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0282-2.
44. ZÁVODSKÁ, R., 2006. *Biologie buněk: základy cytologie, bakteriologie, virologie*. Praha: Scientia. ISBN 80-86960-15-3.
45. ZEMÁNEK, D., 2015. Perikarditidy. *Kardiologická revue – Interní medicína*. Praha: Ambit Media, a. s. Č. 4. ISSN 2336-2898. Dostupné z: <https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2015-4/perikarditidy-56860>

## 8 Seznam příloh a obrázků

Tabulka 1: Parametry exsudátu a transudátu vyšetřované na oddělení biochemie.....	16
Tabulka 2: Postup automatického odparafinování.....	37
Tabulka 3: Postup automatického barvení hematoxylin-eosin. ....	38
Tabulka 4: Postup automatického barvení Papanicolaou. ....	40
Tabulka 5: Postup manuálního barvení Papanicolaou .....	41
Tabulka 6: Postup manuálního barvení May-Grünwald-Giemsa. ....	42
Obrázek 1: Makroskopický rozdíl mezi krvavým neboli hemoragickým (vlevo) a hnisavým tekutým materiálem (vpravo). Zkumavka vpravo obsahuje přidanou kapku hematoxylinu, který se váže na shluk buněk.	30
Obrázek 2: Celoidinový pytlíček vyjmutý ze zkumavky, obsahující cytologický materiál obarvený Mayerovým hematoxylinem.	32
Obrázek 3: Cytologický materiál zalitý v želatině, vyjmutý ze zkumavky.	35
Obrázek 4: Graf zobrazující poměr mužů a žen z celkového počtu vyšetřovaných tekutin	44



## **9 Seznam zkratek**

HE – hematoxylin-eosin

MG – May-Grünwald

MGG – May-Grünwald-Giemsa

PAP – Papanicolaou