

**ČESKÉ VYSOKÉ  
UČENÍ TECHNICKÉ  
V PRAZE**

**FAKULTA  
BIOMEDICÍNSKÉHO  
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ  
PRÁCE**

**2018**

**VERONIKA  
HOFMANNOVÁ**



**ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE**

---

**Fakulta biomedicínského inženýrství  
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

**Histologická stavba zdravé plíce v porovnání s patologickým obrazem  
adenokarcinomu**

**Histological structure of a healthy lung compared to the pathological  
image of the adenocarcinoma**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví  
Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Richard Becke

**Veronika Hofmannová**

---

**Kladno 2018**

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2017/2018

## Z a d á n í   b a k a l á ř s k é   p r á c e

Student: **Veronika Hofmannová**  
Obor: Zdravotní laborant  
Téma: **Histologická stavba zdravé plic v porovnání s patologickým obrazem adenokarcinomu**  
Téma anglicky: Histological Structure of a Healthy Lung Compared to the Pathological Image of the Adenocarcinoma

### Z á s a d y   p r o   v y p r a c o v á n í :

Předmětem bakalářské práce bude studium histologické stavby zdravé plic v porovnání s patologickými plicemi s rozvinutým adenokarcinomem. Aktuálnost tématu dokazuje to, že kuřáků v České republice přibývá a kromě jiných následků z kouření je u dlouholetých kuřáků diagnostikovaný adenokarcinom příčinou úmrtí.

Teoretická část práce bude zaměřena na anatomický a histologický popis stavby plic s jejími bronchy, bronchioly, plicními lalůčky a alveoly, blíže pak bude popsána funkce plic a přenos plynů přes hemo-respirační bariéru a buňky vystylající alveoly. Další téma, o které bude teoretická část pojednávat, bude klasifikace karcinomů plic, se zaměřením na adenokarcinom, jeho příčiny vzniku a klinické příznaky.

V teoretické části se studentka také zaměří na možnosti cytologické diagnostiky nádoru plic díky průkazu konkrétních nádorových buněk a zmíní se o možnostech další diagnostiky.

Praktická část bude věnována přípravě preparátů metodami hematoxylin eosin, AZAN, Orcein a prokázání konkrétních nádorových buněk díky metodám imunohistochemie a cytologie. Preparáty budou fotograficky zdokumentovány a popsány.

### Seznam odborné literatury:

- [1] LULLMAN- RAUCH, Renate, Histologie, Praha: Grada, 2011, ISBN 978-80-247-3729-4
- [2] ČIHÁK, Radomír, Anatomie 2, ed. 3., Grada, 2013, ISBN 978-80-247-4788-0
- [3] POVÝŠIL, Ctibor a et al., Speciální patologie, ed. 2., Galén, 2007, ISBN 978-80-726-2494-2

Zadání platné do: 13.09.2019

Vedoucí: MUDr. Richard Becke

Konzultant: MUDr. Petra Galgonková

.....  
vedoucí katedry / pracoviště

.....  
děkan

V Kladně dne 25.10.2017

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem „Histologická stavba zdravé plíce v porovnání s patologickým obrazem adenokarcinomu“ vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 18.05.2018

.....  
Veronika Hofmannová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce MUDr. Richardu Beckemu za jeho návrh tématu, trpělivost, čas věnovaný této práci a za jeho odborné rady. Za předání svých dlouholetých zkušeností, získání údajů pro zpracování zejména patologické části práce a za ochotu a vstřícnost během celé práce patří velký dík MUDr. Lindě Čapkové, PhD. Svými odbornými radami a zkušenostmi danými dlouholetou praxí a odbornou pomocí při vypracování praktické části mi byly dále oporou RNDr. Marcela Mrhalová, PhD., spolu s laborantkami z oddělení imunohistochemie Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol, Praha. Za cenné a konstruktivní připomínky patří poděkování konzultantce mé práce MUDr. Petře Galgonkové. Velké poděkování patří také paní laborantce Elišce Boučkové, bez jejíž pomoci bych nemohla zrealizovat velkou část praktické části, a za poskytnutí materiálů z oblasti histologické techniky.

## **Abstrakt**

Bakalářská práce „Histologická stavba zdravé plicé v porovnání s patologickým obrazem adenokarcinomu“ se v první části zabývá anatomickým popisem stavby plic, jakožto součásti dýchacího systému a dále histologickou stavbou dýchacího systému – obecným principem stavby stěny dýchacích cest, buňkami epitelu dýchacích cest a popisem mukociliárního čistícího mechanismu. Druhá část práce se zaměřuje na problematiku plicních karcinomů, v první řadě na obecný princip kancerogeneze, epidemiologii plicních karcinomů a jejich klasifikaci se zaměřením na adenokarcinom. Jsou zmíněny jeho příčiny vzniku, klinické příznaky a histologický, či cytologický obraz nádoru s jeho imunohistochemickým profilem. Část práce je také věnována algoritmu využívanému při diagnostice tohoto typu nádoru.

Praktická část kopíruje vyšetřovací algoritmus. Popsána je jak příprava histologického a cytologického preparátu pomocí základních i speciálních histochemických barvicích metod: Hematoxylin-eosin, AZAN, Orcein, Alcianová modř, ale i metody imunohistochemické a cytologické, sloužící k upřesnění diferenciální diagnostiky výše popsaného onemocnění.

## **Klíčová slova**

Plice, nádor, adenokarcinom, imunohistochemie, cytodiagnostika.

## **Abstract**

Bachelor thesis "Histological structure of a healthy lung compared to the pathological image of an adenocarcinoma" deals with the anatomical description of the lung as a part of the respiratory system, histological structure of the respiratory system –general principle of airways wall structure, cell types of the airway epithelium, and description of the mucociliary clearance mechanism. The second part of the thesis focuses on the problems of pulmonary carcinomas, primary the general principle of carcinogenesis, epidemiology of lung carcinomas and their classification, especially adenocarcinoma. There are mentioned causes clinical signs and histological, cytological and immunohistochemical picture of the tumor. Part of the thesis is also devoted to the strategic algorithm used in the diagnosis of this type of tumor.

The practical part copies the investigation algorithm. The histological and cytological samples are described using basic and special staining methods, such as Hematoxylin-eosin, AZAN, Orcein, Alcian blue, as well as immunohistochemical and cytological methods used in differential diagnostics of above listed tumor type.

## **Keywords**

Lung, tumor, adenocarcinoma, immunohistochemistry, cytodiagnosics.

## Obsah

1	Úvod .....	11
2	Současný stav.....	13
2.1	Plíce jako součást dýchacího systému.....	13
2.2	Dýchací systém z pohledu histologie .....	18
2.2.1	Obecný princip stavby stěny dýchacích cest.....	18
2.2.2	Buňky epitelu dýchacích cest .....	20
2.2.3	Mukociliární čistící mechanismus.....	21
2.2.4	Stavba stěny jednotlivých částí bronchiálního stromu.....	22
2.3	Problematika plicních karcinomů .....	28
2.3.1	Kancerogeneze, základní rozdělení nádorů obecně a jejich vlastnosti .....	28
2.3.2	Příčiny vzniku karcinomu plic, jeho prevence a klinické příznaky .	29
2.3.3	Epidemiologie plicního karcinomu .....	33
2.3.4	Klasifikace plicních karcinomů .....	36
2.4	Strategické postupy pro cílenou diagnostiku adenokarcinomu plic	39
2.4.1	Makroskopické formy a morfologická diagnostika adenokarcinomu plic .....	39
2.4.2	Cytopatologie adenokarcinomů.....	41
2.4.3	Vyšetřovací algoritmus pro stanovení optimálního léčebného postupu u nemocných s adenokarcinomem plic .....	42
3	Cíl práce .....	48
4	Metodika .....	49



4.1	Cytodiagnostika.....	50
4.1.1	Příprava a zpracování vzorků pro cytologické vyšetření .....	50
4.2	Přehled histologické techniky pro zpracování bioptického materiálu .....	56
4.2.1	Fáze mimo laboratoř: odběr, fixace a transport .....	56
4.2.2	Fáze v laboratoři: zalévání do parafínu, krájení, barvení a montování .....	57
4.3	Plicní adenokarcinom – přehled použitých barvicích metod .....	61
4.3.1	Základní barvicí metoda Hematoxylin - eosin.....	61
4.3.2	Průkaz kolagenních vláken metodou AZAN.....	65
4.3.3	Průkaz elastických vláken metodou Orcein unna Tanzer.....	66
4.3.4	Průkaz kyselých mukopolysacharidů metodou Alciánové modře ..	68
4.4	Imunohistochemie .....	69
4.4.1	Vlastní imunohistochemický průkaz provedený z parafínových bloků.....	72
5	Výsledky.....	76
5.1	Cytologický průkaz .....	77
5.2	Barvicí metoda hematoxylin-eosin.....	78
5.3	Barvicí metoda AZAN .....	81
5.4	Barvicí metoda Orcein unna Tanzer .....	82
5.5	Barvicí metoda Alciánová modř.....	84
5.6	Imunohistochemický průkaz.....	85
6	Diskuze .....	88
7	Závěr.....	94

8	Seznam použitých zkratk.....	95
9	Seznam použité literatury.....	97
10	Seznam použitých obrázků .....	103

# 1 ÚVOD

V České republice i v jiných oblastech světa neustále roste počet pacientů s diagnostikovaným nádorovým onemocněním. Ač je v dnešní době medicína v oblasti zobrazovacích metod, klinických či laboratorních vyšetření na vysoké úrovni, některé typy nádorových onemocnění nelze i přesto diagnostikovat včas např. pomocí screeningového vyšetření.

Pacientů, kterým bývá diagnostikován plicní nádor v časném stádiu, je velmi málo. Klinicky se totiž začne projevovat až v pozdějších stádiích, kdy ložiska bývají rozšířená a tudíž se nádor stává inoperabilní. Prognóza pacientů s karcinomem plic již proto není příznivá. Podle údajů z roku 2009 incidence nádorů plic roste – jedná se o třetí nejčastější typ zhoubného nádoru v České republice. Příčiny karcinomu plic jsou různé. I když se jedná o jednu z nejčastějších příčin, karcinom vzniká nejen u aktivních kuřáků. Příčin, vedoucích k jeho vzniku je celá řada. Žijeme totiž v prostředí plném výfukových plynů a zplodin, z izolací domů hrozí uvolňování azbestu, který se spolu s radonem a ionizujícím zářením podílí na vzniku rakoviny plic.

Plíce patří mezi terminální, to ale neznamená, že méně důležitou část dýchacího ústrojí, do které proniká vzduch dýchacími cestami. Vzduch proniká přes průdušnici do systému průdušek, které rovnoměrně rozdělí vzduch do pravé a levé plíce. Tím je zajištěno rovnoměrné rozložení vzduchu a erytrocyty tak bez problémů mohou přes hemo-respirační bariéru přijmout kyslík, který je naprosto nezbytný pro život, a transportovat ho po celém našem těle. Vzduch, který dýcháme, je plný nečistot. Proto jsou dýchací cesty od nosní dutiny až po průdušky vystlány víceřadým cylindrickým epitelem s řasinkami s vmezeřenými pohárkovými buňkami. Veškeré nečistoty a hlen řasinky posouvají směrem k hrtanu. Zplodiny, které vznikají při dlouhodobém kouření cigaret, poškozují řasinky a jejich aktivní pohyb je omezen, a tím je poškozena i jejich ochranná funkce.

Cílem této práce je podat informace o morfologické a fyziologické stránce plic. V teoretické části se zaměřuji na anatomický a histologický popis stavby plic, a také přenos plynů přes hemo-respirační bariéru. V další části se zabývám diagnostikou jednoho z nejčastějších typů nádorů plic – adenokarcinomu. Jak již bylo zmíněno, včasný záchyt nádoru se stává nezbytným pro zlepšení pacientovy prognózy. Proto se i já pokusím přiblížit v této práci jednotlivé články v diagnostickém řetězci rozpoznání právě tohoto typu plicního nádoru - adenokarcinomu, jejichž zachovaný postup lékařům pomáhá nejen k určení typu nádoru plic, ale i v následné léčbě. Co se týká laboratorní stránky diagnostiky, právě u adenokarcinomů se díky pokročilé diagnostice tohoto typu nádoru uplatňuje spektrum metod, které bych chtěla prostřednictvím své práce demonstrovat.

## 2 SOUČASNÝ STAV

### 2.1 Plíce jako součást dýchacího systému

Plíce jsou párovým orgánem, které připomínají tvar komolého kužele, zajišťující při dýchání výměnu plynů mezi vzduchem a krví a jsou vlastním orgánem dýchání. Dýchací systém lze rozlišit podle funkce jednotlivých oddílů dýchacího systému na dýchací cesty a dýchací odstavce plic. Dýchací cesty, jejichž hlavní úlohou je především převádět plyny mezi nosní dutinou a plícemi dělíme na horní a dolní dýchací cesty.

Horní cesty dýchací zahrnují *cavitas nasi* (nosní dutinu) a na ni navazující *pars nasalis pharyngis* (nosohltan) [1].

Dolní cesty dýchací se zakládají již v embryonálním vývoji a vznikají jako laryngotracheální výchlípka, nezávisle na horních cestách dýchacích. Řadíme do této skupiny *larynx* (hrtan) – zřepdu připojený k *pars laryngea pharyngis* (hrtanová část hltanu), *tracheu* (průdušnici) – nepárová trubice navazující na hrtan a *bronchi* (průdušky) – párové trubice, které vedou z trachey do plic [2].

Vlastními dýchacími odstavci plic jsou *bronchioli* (průdušinky), *ductuli alveolares* (alveolární chodbičky) a *alveoli* (plicní sklípky). Tento dýchací oddíl hraje velmi důležitou úlohu. Odehrává se zde totiž přenos dýchacích plynů mezi krví a vzduchem, zkracuje se zde dráha kyslíku a oxidu uhličitého mezi plicními sklípky a krví. Vylučovací funkci plic, což se týká zejména těkavých látek, vody a dalších látek, zajišťuje obrovský povrch krevních kapilár (asi 140 m<sup>2</sup>) [1].

#### 2.1.1 Anatomie dolních cest dýchacích

*Larynx* (hrtan) patří mezi nepárové trubicovité orgány, navazující vpředu na *pars laryngea pharyngis* a dolním úsekem trvale přechází do průdušnice. Je uložen na přední straně krku, je zavěšen pomocí vazivové membrány k jazylce a dorzálně

se spojuje s hltanem. Orientaci nám také pomáhají ulehčit laloky štítné žlázy, které se upínají na boční stěny a velké krční tepny. Stěna laryngu je tvořena chrupavkami párovými (hlasivková chrupavka) i nepárovými (štítná, hrtanová chrupavka). Larynx plní také řadu důležitých funkcí, jako je tvorba hlasu, dýchání a účast při polykání. Vchod do hrtanu kryje *epiglottis* (příklopka hrtanová) [1].

*Trachea* (průdušnice) je asi 12cm dlouhá trubice, která se navazuje díky prstencovité chrupavce na hrtan. Počátkem trachey se považuje tělo obratle C<sub>6</sub> a končí jako *bifurcatio tracheae* - rozvětvení, ve výši obratlů Th4 – Th5, ve dva primární bronchy – *bronchus dexter et sinister*. Pevnost stěny trachey zajišťují prstence hyalinní chrupavky spojené vazivem [2].

*Bronchi* (průdušky) – jde o označení pro celkový rozvětvený systém trubic, který vzniká rozvětvením průdušnice, vedoucích vzduch až do dýchacích odstavců plic. Celý komplex těchto trubic dává dohromady bronchiální strom s konstantními větvemi (*arbor bronchialis*), jehož dalšími větvemi jsou:

- dva hlavní bronchy (*bronchus principalis dexter et sinister*), odstupujících z bifurcatio tracheae;
- *bronchi lobares* (lalokové bronchy) – vstupují do plicních laloků a jsou větvemi hlavních bronchů;
- *bronchi segmentales* (segmentové bronchy) – jsou dalšími větvemi lalokových bronchů, vstupujících do plicních segmentů;
- střední, malé a nejmenší bronchy, následují
- *bronchioli* (průsvit menší než 1mm), posledními větvemi jsou
- *bronchioli terminales* (asi 0,4mm) vstupující do plicních lalůček
- *bronchioli respiratorii*;
- *ductuli alveolares*, které po asi pěti větveních končí v
- *sacculi alveolares*, které se vyklenují v
- *alveoli pulmonis* [2]; [3].

Pouze *bronchus principalis dexter et sinister* jsou uloženy v mediastinu. Směrem od *bronchi lobares* jsou větve uloženy již v plicích [2].

### 2.1.2 Stavba plic

Plíce jsou houbovité, měkké a porézní párové orgány uloženy v dutině hrudní (viz Obr. 1). Jejich velikost se odvíjí od velikosti hrudníku, výška se pohybuje okolo 25 – 30 cm. Zakulacený vrchol (*apex*) plic vyčnívá 4 – 5 cm nad klíční kost, základna naléhá na vyklenutí bránice. Pravá plíce je větší než plíce levá. Jejich barva se mění s přibývajícím věkem – u novorozenců je nejprve růžová, poté začnou mít plíce šedavý nádech a postupem let se na povrchu plic objevuje makroskopické šedočerné mramorování způsobené vdechováním prachových částic [2].

Co se týká dalších vlastností plicní tkáně, za zmínku stojí i jejich hmotnost a hustota. Obě plíce jsou obecně těžší u mužů než u žen. Průměrná hmotnost u mužů je 780 g, u žen 640 g. Poměr hmotností pravé a levé plíce je asi 11:10 až 8:7. Hustota plicní tkáně se pohybuje mezi 0,34 – 0,75 a proto kousky této tkáně na vodě plavou. Výjimku tvoří mrtvě narození novorozenci, případně plicní tkáň postižená patologickým procesem, kdy hustota tkáně je větší než hustota vody a proto ve vodě klesá [2].

Plíce zcela vyplňují prostory pleurálních dutin. Pleura je lesklá, průhledná blána, která je tvořena jednou vrstvou plochých buněk s malým množstvím vaziva. Zatímco *pleura visceralis* (poplicnice) je tenčí a kryje povrch obou plic, *pleura parietalis* (pohrudnice) tvoří nejnvnitřnější hladkou výstelku obou pleurálních dutin. Mezi pohrudnicí a poplicnicí je prostor, vyplněn serózní tekutinou produkovanou buňkami pleury, která zamezuje tření při pohybu plic [2].

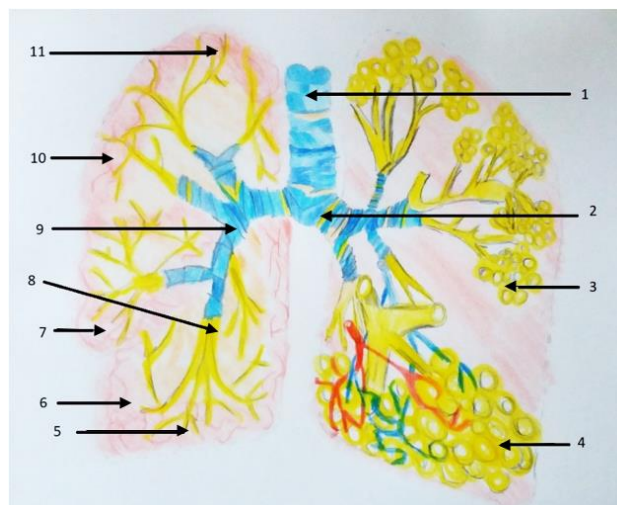
Makroskopicky rozlišujeme na pravé plíci 3 laloky: *lobus superior* (horní lalok), *lobus medius* (střední lalok) a *lobus inferior* (dolní lalok) a na levé plíci 2 laloky: *lobus*

*superior* (horní lalok) a *lobus inferior* (dolní lalok). Mezi jednotlivými laloky nacházíme *fissurae interlobares* (mezilalokové rýhy), které nejen, že pokrývají povrch plic, ale zasahují až k plicnímu hilu. Plicní hilus je vysoký asi 6 cm, široký 3-4 cm a plní funkci místa, kde do plíce vstupuje primární bronchus, plicní žíly a tepna, mízní žíly a nervy [1]; [2].

Jednotlivé laloky jsou složeny z deseti menších úseků, plicních segmentů, jak v pravé, tak v levé plíci (viz Obr. 2). Laloky se tímto způsobem rozdělují díky vazivovým přepážkám, vycházejících z poplicnice. Segmenty jsou jednak základními, funkčními jednotkami plic, také se ventilují jedním terciálním bronchem a zásobují se jednou větví plicní tepny. Žíly probíhají pouze mezi segmenty [1].

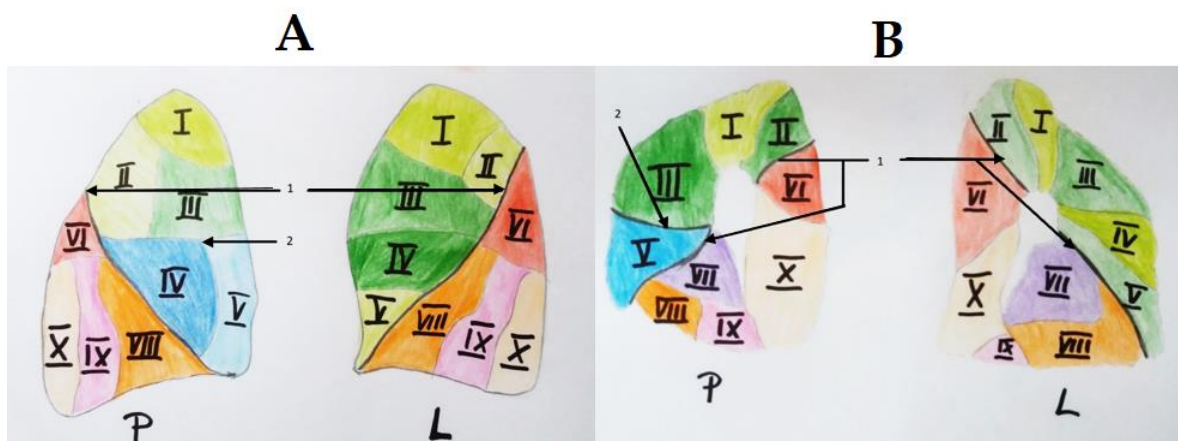
Plicní segmenty se dále člení na plicní lalůčky s typickým pyramidovým tvarem. Základna lalůčku je na povrchu plíce, hrot směřuje k jejímu hilu. Úsek dýchacích cest, sestávajícího z *bronchiolus terminalis*, se označuje jako *acinus pulmonis*. Skládá se z *bronchioli respiratorii*, *ductuli alveolares* a dalších alveolů. Soubor několika acinů vytvoří *lobulus pulmonis*. Jednotlivé lalůčky jsou neúplně ohraničeny díky vazivovým septům [2]; [3].





Obr. 1 - Stavba plic (vlastní zdroj).

1 – Trachea, 2, 9 – bronchi (průdušky), 3 – alveoli pulmonis (plicní sklípky), 4 – detail plicního sklípku s plicními vlásečnicemi, 5 – basis pulmonis (plicní báze), 6 – lobus inferior (dolní lalok), 7 – lobus medius (střední lalok), 8 – bronchioli (průdušinky), 10 – lobus superior (horní lalok), 11 – apex pulmonis (plicní vrcholek).



Obr. 2 - Průběh plicních segmentů a mezilalokových rýh u pravé a levé plíce (vlastní zdroj).

A - Zevní strana plic: P – pravá plíce, L – levá plíce, 1 – fissura obliqua, 2 – fissura horizontalis pulmonis dextri, I – X – segmenty.

B - Vnitřní strana plic: P – pravá plíce, L – levá plíce, 1 – fissura obliqua, 2 – fissura horizontalis pulmonis dextri, I – X – segmenty.

### 2.1.3 Cévní zásobení plic

V plicích rozeznáváme 2 oběhy: funkční a nutritivní.

**Funkční oběh** slouží k výměně dýchacích plynů mezi krví a vzduchem a tvoří malý krevní oběh. Tento oběh je realizován z pravé komory jako *truncus pulmonalis*, který se dále větví na *arteria pulmonalis dextra et sinistra*. Protože mají tepny velmi dobře vyvinutou svalovou vrstvu, mají regulační vliv na průchod krve plícemi. Jednotlivé větve plicních tepen jsou v souladu s větvením průdušek až po respirační bronchioly. Zde se začnou rozpadat na hustou síť kapilár, která obepíná alveoly. *Venae pulmonales* se z alveolárních sítí sbíhají mezi *sacculi alveolares* do sept mezi plicními segmenty mimo bronchiální strom. V plicních hilech se čtyři *venae pulmonales* jednak přibližují k bronchům, ale také odvádějí okysličenou krev do levé srdeční předsíně [1]; [2].

**Nutritivní oběh** obstarávají tepenné *rami bronchiales*, které jsou větvemi hrudní aorty. Sledují větvení bronchů a vyživují je. Dále zásobují mízní uzliny, vazivo plic a zasahují až k poplicnici. Žilní odtok z bronchiálního řečiště je zajištěn hlavně díky anastomosám s plicní tepnou, díky které se případně vyrovnává nerovnoměrnost objemů malého a velkého krevního oběhu [2].

## 2.2 Dýchací systém z pohledu histologie

### 2.2.1 Obecný princip stavby stěny dýchacích cest

Dýchací cesty jsou vystlány charakteristickou sliznicí, střední vrstvou - chrupavkou, svalovinou, vazivem a na povrchu tenkou vnější vrstvou. Kolapsu stěn a lumina dýchacích cest brání většinou skelet z hyalinní chrupavky (mimo hrtan, kde se vyskytuje také chrupavka elastická), ale také sliznice, která svou pevnou vazbou k okolním strukturám, zajišťuje jejich trvalý průsvit [4].

Trubicovité orgány mají stěnu složenou ze čtyř vrstev. Výjimku netvoří ani stěna dýchacích cest, jejichž stěna se skládá z následujících vrstev:

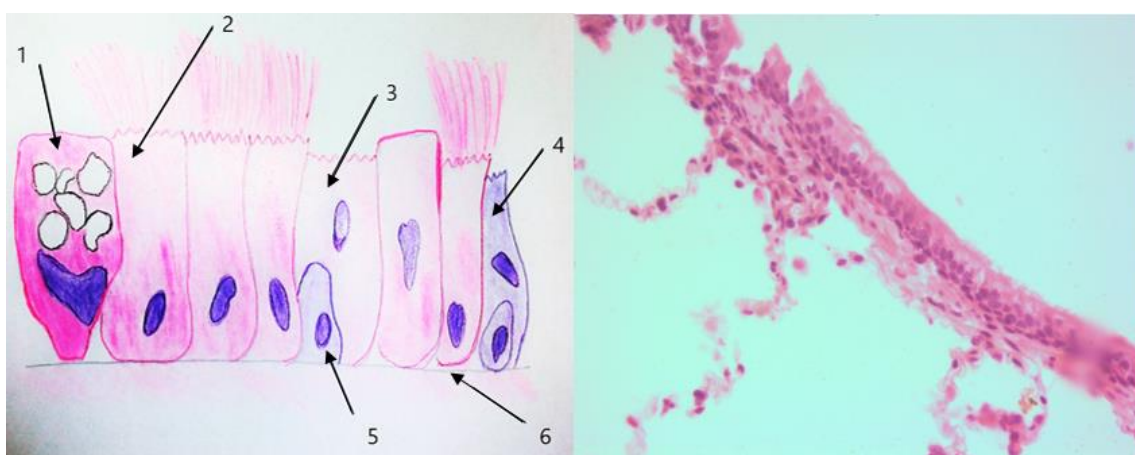
- **Sliznice (*Tunica mucosa*)** zvlhčuje, ohřívá a očišťuje vzduch od cizích partikulí. Skládá se z *lamina epithelialis* a *lamina propria mucosae*.
  - a) *Lamina epithelialis* (epitelová vrstva sliznice). Epitel vystýlající převážnou část dýchacích cest je víceřadý cylindrický epitel s řasinkami a vmezeřenými pohárkovými buňkami, neboli typický epitel dýchacích cest, v němž mají své role více typů buněk. Jejich charakteristika je uvedena v kapitole 2.2.2.
  - b) *Lamina propria mucosae* (vazivová vrstva sliznice = slizniční vazivo). Z jednotlivých typů vaziva jsou zde zastoupeny řídké kolagenní vazivo i elastická vlákna umožňující dle potřeby rozšířit jednotlivé oddíly dýchacího systému a posléze je vrátit do původního stavu. Přibývá jich směrem k bronchiálnímu stromu, čili se množství odvíjí od průměru dýchacích cest. V této vrstvě sliznice, ale i v jejích hlubších vrstvách, nacházíme seromucinózní žlázy opatřené myoepitelovými buňkami, cévní pletěň ohřívající proudící vzduch, buňky imunitního systému a místy lymfatické folikuly (BALT) [3]; [5].
- **Podslizniční vazivo (*Tela submucosa*)** se skládá z řídkého kolagenního vaziva. Tato vrstva se uplatňuje ve výše popisované průdušnici s výskytem seromucinózních žlázek. Jejich hlavní odlišnost od pohárkových buněk je v inervaci parasymptikem, který zvyšuje sekreci. Pohárkové buňky nejsou inervovány. Rozlišit rozdíl mezi sliznicí a podslizničním vazivem v mikroskopu je prakticky nemožná kvůli absenci *lamina muscularis mucosae* [3].
- **Vrstva vazivo-svalo-chrupavčitá (*Lamina fibromusculocartilaginea*)** se liší v jednotlivých úsecích dýchacích cest. V dutině nosní je tvořena kostí, v dalších částech obsahuje chrupavku (většinou se jedná o hyalinní, elastická se nachází pouze v epiglottis a malých chrupavkách hrtanu)

a na některých místech obsahuje kosterní nebo hladkou svalovinu. Stahem kosterní svaloviny se ovládá otevření hranového vchodu a hlasové štěrbin. Hladké svaloviny v průdušinkách přibývá, jejím stahem se zužuje průsvit pro regulaci průtoku vzduchu [6].

- **Adventicie (*Tunica adventitia*)** je tvořena řídkým kolagenním vazivem s výjimkou plic, jejichž povrch je pokryt poplicnicí (*pleura visceralis*) [5].

## 2.2.2 Buňky epitelu dýchacích cest

Epitel vystýlající převážnou část dýchacích cest je víceřadý cylindrický s řasinkami a vmezeřenými pohárkovými buňkami (viz Obr. 3). V tomto epitelu nacházíme buňky řasinkové, pohárkové, bazální, buňky patřící do difuzního neuroendokrinního systému (DNES) a kartáčové buňky [4].



Obr. 3 - Víceřadý epitel s řasinkami u terminálního bronchiolu, zvětšeno 40x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj).

- 1 – Pohárková buňka s granuly, 2 – řasinková buňka, 3 – buňka DNES, 4 – kartáčová buňka, 5 – bazální buňka, 6 – bazální membrána.

- a) **Buňky řasinkové** mají v epitelu největší zastoupení. Jedná se o vysoké, cylindrické buňky s oválným jádrem, uloženým bazálně. Typické řasinky, jejichž počet se pohybuje v řádu okolo 200, se nachází na jejím apikálním povrchu s funkcí přenosu hlenové vrstvy [5].
- b) **Buňky pohárkové** jsou lokalizovány až po počáteční úseky bronchiolů. Zaujímou svým pohárkovým tvarem a typickým trojúhelníkovitým jádrem.

Jejich apikální část obsahuje hlenová granula naplněná mucinem. V diagnostice se využívá jejich průkaz následujícími metodami: metodami PAS, případně Alcianovou modří. Hlen vylučovaný pohárkovými buňkami je důležitý pro samočistění dýchacích cest. Počet buněk v epitelu dýchacích cest se odráží od prodělaných zánětů dýchacích cest a výskytu jedince v prostředí s vysokou koncentrací škodlivých látek [3]; [4]; [5].

- c) **Buňky bazální** svým tvarem připomínají pyramidu. Jsou to nezralé prekurzory, později diferencované v pohárkové či v řasinkové buňky s tmavým velkým jádrem. U zdravých jedinců dochází k pomalé výměně víceřadého cylindrického epitelu, proto tyto buňky spatřujeme pod mikroskopem jako známku počínající diferenciaci směrem k řasinkovým buňkám [4].
- d) **Buňky DNES = buňky difuzního neuroendokrinního systému = Kulchitského – Feyrterovy buňky** mají specifický cylindrický tvar. V epitelu se vyskytují buď samostatně, nebo ve skupinkách, zejména mluvíme-li o bronchiolách. Na povrchu mají četné mikrovlnky, díky nimž je vazba na vdechované látky účinnější. V cytoplasmě buňky nacházíme granula s typickou vnitřní strukturou obsahující somatostatin, bombesin a serotonin, což jsou látky ovlivňující průsvit průdušek, průdušinek a cév. Buňky DNES se dají detekovat pouze specifickými imunohistochemickými reakcemi, sloužící k průkazu nádorové proliferace (vznik karcinomu) [4]; [5].
- e) **Kartáčové buňky** lze vidět pouze v elektronovém mikroskopu, kde rozeznáme jejich cylindrický až hruškovitý tvar. Podílejí se na vstřebávání a vylučování látek a jsou známé i pod termínem buňky senzitivního čítí [5].

### 2.2.3 Mukociliární čistící mechanismus

Denně vdechujeme do našich plic okolo 10 000 litrů vzduchu plného nejrůznějších nečistot, prachu, škodlivin a choroboplodných zárodků. Proto musí existovat mechanismus, do kterého se budou tyto nejrůznější částičky zachytávat [3].

Na povrchu epitelu dýchacích cest leží tenká vrstva sekretu, jež obsahuje glykosaminoglykany - produkty sekrečních buněk seromucinózních žlázek umístěných v submukóze, vyskytující se až po malé bronchy. Další vrstvou je vodní, 5  $\mu\text{m}$  silná vrstva periciliární tekutiny, produkováná epitelem. Vrstva sekretu a pohyb cílů umožňuje zajistit vitální samočistící schopnost dýchacích cest a hlen je tak spolýkán nebo vykašlán. Velké částky okolo 10  $\mu\text{m}$  jsou zachyceny v horních cestách dýchacích, menší (5 – 8  $\mu\text{m}$ ) se zachytávají v bronchech a průdušnici. Nejmenší částky (< 5  $\mu\text{m}$ ) putují do plic až do alveolů, kde se jich ujmou alveolární makrofágy a zneškodní je [3]; [4].

*„ Dalšími obrannými mechanismy v dýchacím traktu jsou v dýchacích cestách intraepitelově uložené dendritické buňky, imunitní buňky ve sliznici, IgA a antimikrobiální látky (např. lysozym, defensiny, surfaktantový protein D) ve hlenovém filmu. V respiračním oddílu dýchacích cest a v alveolech: alveolární makrofágy, surfaktantové proteiny A a D.“*  
[3, s. 299]

K narušení transportu hlenu může dojít vlivem nepravidelného upořádání kinocilií (úbytkem nebo jejich nadbytkem) nebo při výskytu nadměrného množství škodlivých elementů. K malformaci řasinek může docházet důsledkem vrozené vady (syndrom nepohyblivých dyskinetických řasinek = Kartagenský syndrom), nebo později jako reakce na poškozený epitel. Pokud dojde k narušení toku hlenu, jeho koncentrace se zahustí a partikule tak mohou pronikat k vlastním buňkám epitelu i když jsou zachyceny v hlenu, protože nebude docházet k jeho pravidelnému odtoku. Tím mohou vzniknout různé záněty dýchacích cest [4].

#### **2.2.4 Stavba stěny jednotlivých částí bronchiálního stromu**

- **Velké průdušky**, mezi které patří průdušky 1. až 3. řádu (hlavní, lalokové a segmentové průdušky), mají stejnou strukturu jako průdušnice.

Odlišnost je pouze ve tvaru chrupavky. Velké bronchy zpevňují úplné chrupavčité prstence. Hlavní bronchy se větví a u plicního hilu začínají odlišnosti. Výstelku zabezpečuje epitel víceřadý cylindrický s řasinkami, který obsahuje navíc roztroušené buňky DNES. Následující vrstvu sliznice - *lamina propria mucosae* poznáme podle charakteristicky se vyskytujících lymfatických uzlíků, objevujících se zejména v místě větvení bronchiálního stromu. Dalším charakteristickým rysem jsou zejména podélně probíhající elastická vlákna s roztroušeným imunitními buňkami (lymfocyty a žírné buňky) a seromucinózní žlázy vystlané serózními a mucinózními buňkami. Mívají poloměsíčité uspořádání a krátké vývody jim zajišťují komunikaci s lumenem dýchacích cest. *Tunica fibromusculocartilaginea* prochází změnami, čím postupujeme hlouběji do bronchiálního stromu. Buňky hladké svaloviny mají mřížkovité uspořádání, nemusí se na řezech projevovat jako samostatná vrstva a postupně této vrstvy přibývá na úkor hyalinních chrupavek. Poslední vrstva - *Tunica adventitia* je tvořena cévami a nervy s řídkým kolagenním vazivem [3]; [4]; [5].

- **Malé průdušky** mají menší tloušťku stěny. Řadíme do této skupiny průdušky 4. řádu až po asi 15. řád. Koncový řád nelze jasně určit, jelikož se malé průdušky překrývají s průdušinkami. Stavba stěny je stejná jako u velkých bronchů. Odlišností je menší počet pohárkových buněk ve sliznici, přibývá buněk DNES, ve vazivo-chrupavčité vrstvě nacházíme pouze ostrůvky hyalinní chrupavky a větší množství hladké svaloviny. Proto po smrti, kdy dochází ke kontrakci hladké svaloviny, vidíme v mikroskopu typické řasení sliznice [4]; [5]; [6].
- **Průdušinky (*bronchioli*)** mění svoji stavbu oproti průduškám. Průdušinky poznáme v mikroskopu bezpečně podle absence mízních uzlíků, žlázek

a chrupavky. Jedním z dalších znaků je snižování víceřadého cylindrického epitelu s řasinkami, až na jednovrstevný cylindrický epitel a pohárkové buňky postupně vymizí a nahradí je v koncových průdušinkách Clarovy buňky. Průdušinky obsahují také větší podíl hladké svaloviny s podélnými elastickými vlákny [4]; [5]; [6].

- **Terminální (koncové) bronchioly (*bronchioli terminales*)** jsou dalšími větvemi bronchiolů. Epitel se stává jednovrstevným cylindrickým s řasinkami a místo pohárkových buněk se objevují *Clarovy buňky* s typickým cylindrickým tvarem bez řasinek. Jsou charakteristické velkou schopností se dělit a diferencovat v řasinkové buňky. Jejich cytoplazma obsahuje sekreční granula, ze kterých se secernují proteiny ovlivňující povrchové napětí v průdušinkách. Tlumí nadměrnou zánětlivou reakci (podobně jako surfaktant v plicních sklípcích), díky oxidaci škodlivých látek ze vzduchu pomocí cytochromu P450 a monooxygenáz. Jejich proteiny jsou považovány také za opsoniny [3]; [4]; [5].
- **Respirační bronchioly (*bronchioli respiratorii*)** jsou prvním respiračním oddílem dýchacího systému. Stavba je obdobná jako u terminálních bronchiolů. Jsou vystlány jednovrstevným kubickým epitelem. Z jejich stěny se vyklenují jednotlivé alveoly. Soubor alveolů jedné průdušinky označujeme jako *Acinus pulmonalis*. Vyskytují se zde kubické buňky bez cilií, Clarovy buňky a také pneumocyty II. typu [3]; [4]; [5].
- „ Na respirační bronchioly navazují ***ductuli alveolares a sacculi alveolares***. Jsou to prostory, ze kterých se vyklenují alveoly. Jejich stěna se skládá prakticky jenom z ohraničení těsně na sebe naléhajících vstupů do alveolů. Tyto vstupy jsou zesíleny prstenem hladkých svalových buněk a kolagenních a elastických vláken [3, str. 293].“



- **Plicní sklípky (*alveoli pulmonis*)** jsou místem, kde probíhá konečná výměna plynů, jedná se o výchlípky stěny respiračních bronchiolů, *ductuli alveolares* a *sacculi alveolares*. Měří v průměru okolo 250  $\mu\text{m}$ . Stěna alveolů je vystlána jednovrstevným plochým epitelem a zároveň ji tvoří dva typy buněk – membranózní pneumocyty (I. typ) a granulární pneumocyty (II. typ). Oba typy buněk vzájemně spojují velmi těsné spoje, brání pronikání tkáňového moku do nitra plicních sklípků vyplněných vzduchem a pokrytých tenkou vrstvou surfaktantu. Stěnou alveolu probíhá velmi hustá kapilární síť malého krevního oběhu. Jednotlivé alveoly jsou odděleny vazivovou ploténkou (interalveolárními septy), kde převažují retikulární, méně elastická vlákna. Na úrovni světelné mikroskopie jsou viditelná propojení sousedních alveolů, pomocí kterých se vyrovnává tlak a ventilace i při uzavření terminálního bronchiolu. Toto propojení je označováno termínem *Kohnovy póry* [3]; [4]; [5]; [6].  
Stěna alveolů se mimo jiné neobejde bez zástupců buněk z monocytomakrofágového systému – alveolárních makrofágů. Vyskytují se nejen v alveolárních septech, ale i často na volném povrchu alveolů. Jejich základní funkcí je odstraňovat prach, choroboplodné zárodky, mrtvé buňky, případně migrovat lymfou do regionálních uzlin a usadit se v plicním parenchymu [3]; [6].

**Pneumocyty I. typu** (membranózní pneumocyty) vystýlají z největší části alveolus a jsou extrémně plochými buňkami. Jejich cytoplasmatické výběžky jsou pod hranicí rozlišitelnosti světelným mikroskopem a svým tělem pokrývají kapiláry [3]; [6].

**Pneumocyty II. typu** (granulární pneumocyty) mají kubický až oválný tvar a jsou roztroušeny mezi membranózními pneumocyty. Nachází se hlavně tam, kde neruší výměnu plynů (v rozích plicních sklípků). V cytoplasmě obsahují lamelární tělíska, jejichž obsah se exocytózně vylučuje: fosfolipidy, cholesterol a surfaktant proteiny A, B a C. Všechny buňky alveolárního epitelu jsou pospojovány pomocí tight junctions [3]; [5].

**Surfaktant = antiatelektatický faktor** se rozprostírá na povrchu alveolu a vytváří jeho povrchovou vrstvu. Skládá se z 90 % z fosfolipidů (převážně lecitinu) a z 10 % ze surfaktantových proteinů, z nichž velmi důležitý je pro novorozence protein B, jehož deficit vede k dušnosti. Fosfolipidy snižují povrchové napětí na rozhraní kapalina-vzduch a tím i sílu, která je potřeba na rozpětí alveolu a zabraňuje jeho kolapsu při výdechu. Fosfolipidy jako skupina lipidů s amfifilní povahou mají schopnost vytvořit hranici mezi kapalinou a vzduchem. Surfaktant se neustále obměňuje pneumocyty II. typu a zbytek fagocytují alveolární makrofágy. Surfaktant je mimo jiné součástí hemo-respirační bariéry [3].

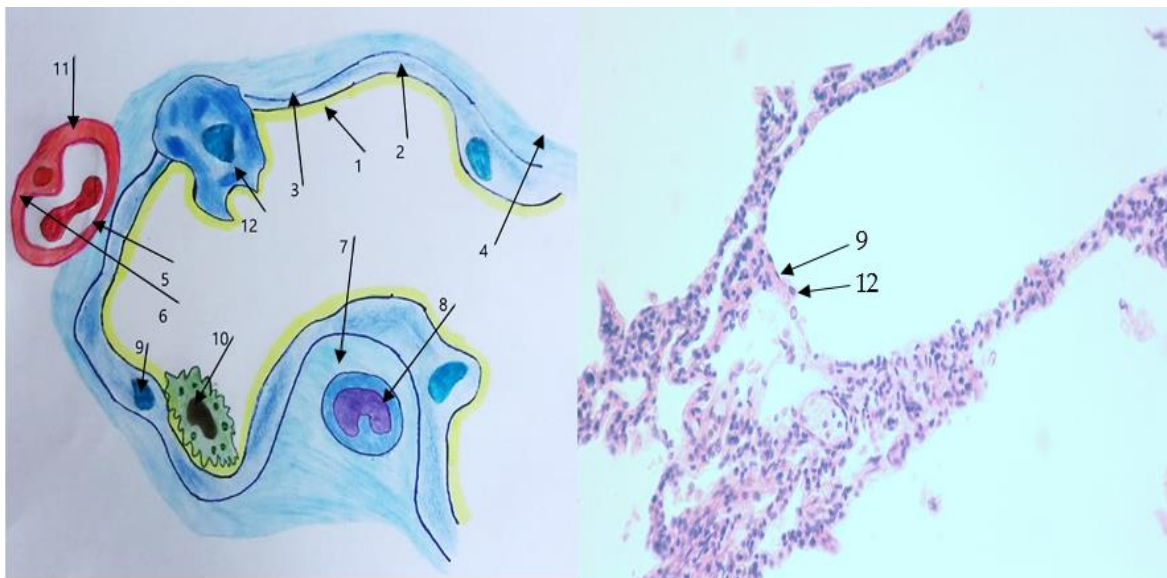
Jedná se o velmi tenkou vrstvu (kolem 0,6  $\mu\text{m}$ ) umožňující výměnu nejdůležitějších plynů - kyslíku a oxidu uhličitého mezi vzduchem a krví. Skládá se ze tří vrstev: pneumocytů I. typu, mezi nimi splynuté bazální laminy a endotelu kapilár (viz Obr. 4) [3].

Výměna dýchacích plynů mezi alveolárním vzduchem a krví je podmíněna plochou, silou bariéry a rozdílem parciálních tlaků. Čím větší je plocha a čím tenčí je bariéra, tím více plynu dokáže projít do krve. Kyslík z 97 % opouští plicní kapiláry

ve vazbě na hemoglobin erytrocytu (pokud je zvýšen parciální tlak kyslíku), zbylá 3 % jsou volně rozpuštěná v plazmě. Kyslík se ve tkáních uvolňuje z vazby na hemoglobin při sníženém parciálním tlaku. Vlivem tlakového gradientu se do krve z tkání uvolňuje oxid uhličitý[3].

Oxid uhličitý koluje v plazmě v různých formách: ve vazbě na bílkoviny, fyzikálně rozpuštěný, případně jako bikarbonát, jež je součástí erytrocytu. Tlakový spád z alveolu do krve pro kyslík je větší než pro oxid uhličitý. Ten tak prostupuje přes buňky epitelu mnohem rychleji než kyslík [3]; [7].

Při průchodu erytrocytu kapilárou se z erytrocytu stane váleček o průměru asi 2  $\mu\text{m}$ . Deformovaný erytrocyt a odpor stěny v kapiláře způsobí promíchání obsahu cytoplasmy erytrocytu a dojde ke spojení hemoglobinu a difúzních plynů. Erytrocyt dodržuje kontakt s hemo-respirační bariérou asi 0,75 sekundy. Při intenzivní zátěži se čas zkracuje [7].



Obr. 4 - Hemo-respirační bariéra, zvětšeno 20x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj).

1 – Surfactant, 2 – alveolární epitel (těla pneumocytů I. řádu), 3 – bazální membrána epitelu, 4 – intersticiu, 5 – bazální membrána endotelu, 6 – endotel kapiláry, 7 – kolagenní fibrily s elastickými vlákny, 8 – monocyty, 9 – pneumocyt I. řádu, 10 – makrofág, 11 – kapilára, 12 – pneumocyt II. řádu.

## 2.3 Problematika plicních karcinomů

### 2.3.1 Kancerogeneze, základní rozdělení nádorů obecně a jejich vlastnosti

Nádorové ložisko je dle lékařské terminologie označováno jako tumor, novotvar, neoplazma nebo blastom. Růst každé tkáně našeho těla je podřízen kontrolním mechanismům. Nádory ale tvoří výjimku. Jde o růst tkáně, vycházející z buněk vlastního těla a mající autonomní povahu. Nádor obvykle přetrvává v lidském organismu, i když již nepůsobí prvotní příčina jeho vzniku [8].

Jak je zřejmé z definice, nádor roste nekontrolovaně a svým růstem ochuzuje o živiny celý organismus. U většiny typů nádorů je jejich vývoj stále předmětem zkoumání. Ví se však, že se jedná o změnu biologických vlastností buněk, způsobených různými faktory, jako jsou viry, bakterie, chemické látky nebo genetické vlivy. Tyto faktory se podílejí na změně genomu buňky [9].

V lidské DNA se vyskytují tak zvané protoonkogeny, což jsou fyziologicky se vyskytující geny, které se podílejí na růstu a diferenciaci buněk. Ty se mohou vlivem výše uvedených faktorů aktivovat a přeměnit v onkogeny různými mechanismy (např. mutací či translokací) a tyto onkogeny již souvisejí se vznikem nádorového bujení [8].

Samotný proces kancerogeneze je velmi komplikovaný, a aby si nová populace buněk zajistila přežití v hostitelském organismu, musí dojít k celé řadě změn v genetické informaci buňky – ať už k bodovým změnám v genomu na úrovni několika sekvencí, či k větším prokazatelným změnám, jako zvýšené expresi genů, či k chromosomálním aberacím [10].

Pro pokračování nekontrolovaného růstu nádorové populace se musejí přidat další faktory zajišťující převahu nad hostitelským organismem. Pouhé poškození

genomu a buněčné dělení pro expanzi nádoru nestačí. Nádorová populace si postupně zajistí ztrátu kontroly buněčného dělení. To například znamená, že se eukaryotní buňky nebudou posouvat do klidových fází buněčného cyklu (postmitotické fáze nebo G0 fáze) či mohou ztratit kontrolu nad programovanou smrtí. Zvýšenou mitogenní aktivitu si nádorová populace zajistí vlastní syntézou růstových faktorů (EGF, TGF- $\alpha$ ), případně změnou struktury a tím i celistvosti membránového receptoru pro epidermální růstový faktor (EGF) i změnou signalizace na úrovni cytoplasmatických transmiterů s GTP-ázovou aktivitou, zajišťujících přenos signálu z EGFR do jádra (např. mutace genu K-ras) [10].

Každý typ nádoru se odlišuje svým biologickým chováním. Obecně se nádorové buňky od nenádorových liší svým nekontrolovaným růstem, delší životností, schopností invazivity a destrukce okolních tkání, eventuálně schopností metastazovat. Na základě těchto dílčích vlastností lze nádory rozlišit na nádory benigní a maligní. Zatímco benigní nádory rostou pomalu, jsou ohraničené, většinou opouzdřené, často rostou expanzivně a netvoří metastázy, maligní nádory mají odlišné vlastnosti – jsou neohraničené, pronikají infiltrativně do okolních tkání, rostou obvykle rychleji a tvoří metastázy [8]; [9].

I přes pokročilou diagnostiku a možnosti léčby pacienti v pokročilém stádiu onemocnění trpí nechutenstvím, anémií, celkovou únavou a slabostí. To je důsledek uvolňování toxinů nádorovými buňkami do krevního oběhu. V konečné fázi onemocnění umírají pacienti na nádorovou kachexii [8].

### **2.3.2 Příčiny vzniku karcinomu plic, jeho prevence a klinické příznaky**

Karcinomy se obecně řadí mezi maligní nádory vycházející z povrchového či žlázového epitelu tkáně nebo orgánu. Typizace jednotlivých karcinomů plic se opírá o jejich podobnost s původním povrchovým nebo žlázoým epitelem. V případě metastazování postihují nejčastěji lymfatické uzliny, infiltrace ostatních

orgánů krevní cestou je ovšem také možná, nejčastěji do kostí, mozku nebo nadledvin [8].

U pacienta s podezřením na karcinom plic jsou vyhodnocovány i pravděpodobné příčiny jeho vzniku. Při posuzování anamnestické stránky pacientova stavu se zjišťuje zejména výskyt rizikových faktorů. Pátrá se po množství vykouřených cigaret (tzv. pack-years) nebo profesionálních, případně environmentálních vlivech (expozice azbestu, radonu, chromu, niklu či ionizujícímu záření) [11].

Detailní znalost klinické symptomatologie je důležitým předpokladem pro rozpoznání plicní rakoviny. Je nutné ale konstatovat, že tyto nádory jsou dlouho asymptomatické, jejich klinické příznaky (kašel, teplota, bolesti, chrapot) se většinou objevují v pokročilých stádiích onemocnění a imitují velmi často řadu dalších onemocnění dýchacích cest. Nejdříve je nádorový růst asymptomatický a nedetekovatelný, tedy mimo rozsah jakýchkoli zobrazovacích metod, nebo dosáhl již určité velikosti a klinicky se neprezentuje, ale jsme ho schopni rozpoznat díky počítačové tomografii, radiogramu nebo bronchoskopicky [10].

Pro lepší přehlednost se příznaky plicního karcinomu dělí do třech skupin:

1. skupina: Symptomy z lokálního postižení.
  - a) Kašel patří mezi nejčastější příznaky. Obavy by měl vzbudit dlouhotrvající a nově vzniklý kašel nereagující na medikaci u osoby netrpící chronickou bronchitidou. Všimnout by si lékař měl i změny charakteru typického kuřáckého kašle na více dráždivý, úpornější a frekventovanější.
  - b) Hemoptýza neboli vykašlávání krve, či hlenu s krví je znakem narušení bronchiální cévy primárním nádorem.
  - c) Opakované pneumonie nereagující na antibiotickou léčbu v důsledku zablokování bronchu tlakem zvenčí či růstem uvnitř lumen s rozvojem infekce za touto překážkou.

- d) Pokud se nádor šíří lokálně, je jedním z hlavních příznaků u nemocných chrapot (pacient u tohoto příznaku nepocituje bolesti v krku). Jde o postižení nervus laryngeus recurrens, inervující levou hlasivku. Na rozdíl od syndromu horní duté žíly, kdy nádor infiltruje pravou stranu krku a regionální uzliny a tím dojde k otoku krku a obličeje (tzv. Stokesův límec).
- e) Dušnost spolu s hubnutím doprovází pozdější stádia onemocnění. Může vznikat jako odpověď organismu na rostoucí nádor nebo se na ní může podílet vznikající objemnější hrudní výpotek. Při posuzování anamnézy pacienta je důležité zvážit souvislost dušnosti s ostatními přidruženými chorobami (embolie, srdeční selhávání).
- f) Bolesti na hrudi jsou spojeny s rostoucím nádorem směrem do parietální pleury, kůže, žeber nebo svalstva a často tento příznak pacient pocituje při kašli nebo při nádechu. Nesmí se opomenout zmínit zvláštní projev tzv. Pancoastova tumoru, což je palčivá bolest horní končetiny, způsobená infiltrací plexus brachialis nádorovými buňkami v kombinaci s příznaky Hornerovy triády (ptóza víčka – oční víčka dosahují až k zornici a částečně ji překrývají, zúžení zornice a enolftalmus neboli „zapadnutí“ oka) [11]; [12].
2. skupina: Mimoplicní (metastatické) příznaky karcinomu plic (mohou být prvním projevem onemocnění).
- a) Neurologické příznaky jsou vyvolané metastázami do centrálního nervového systému (CNS).
- b) Patologické fraktury či bolest pak může být způsobena metastázami do skeletu a do kostní dřeně.
- c) Rozvoj ikteru je projevem masivního metastatického postižení jaterního parenchymu, který ovšem patří mezi méně časté projevy [12].
3. skupina: S maligním nádorem jsou spojeny další heterogenní příznaky – paraneoplastické syndromy, které jsou u karcinomů plic relativně časté

a klinicky se mohou projevit dříve než příznaky lokální. Nejsou způsobeny přímou nádorovou invazí ani metastázami, ale „působky“ uvolňovanými nádorovými buňkami do krevního oběhu. Patří mezi ně následující:

- a) Paraneoplastický Cushingův syndrom vzniká díky nadprodukcí adrenokortikotropního hormonu (ACTH), pacienti mívají měsíčkovitý obličej, osteoporózu, rudé strie, trpí svalovou slabostí, otoky, hyperpigmentací.
- b) Syndrom nepřiměřené sekrece antidiuretického hormonu (ADH) - z klinických příznaků dominuje nechutenství, podrážděnost, bolesti hlavy, zmatenost a hypernatriurie, navzdory hyponatremii, díky zvýšenému plazmatickému objemu a snížené sekreci aldosteronu.
- c) Hyperkalcemie spojená s produkcí proteinu podobného parathormonu (PTHrP) v důsledku vyplavování kalcia z kostí aktivací osteoblastů a zároveň jeho retencí v ledvinách.
- d) Trombophlebitis migrans (povrchový zánět žil) postihující v daném časovém úseku různé žíly.
- e) Paraneoplastické kožní projevy (dermatózy) u adenokarcinomů jsou to např. acanthosis nigricans maligna nebo erythema gyratum repens.
- f) Paraneoplastické neurologické projevy (encefalomyelopatie, autoimunitní neuropatie) vznikají na základě postižení částí nervového systému autoimunitním procesem se specifickými protilátkami, namířenými proti antigenům nervového systému. Tyto příznaky mohou předcházet diagnózu i o několik měsíců. S léčbou nebývá jejich úprava pravidlem [13].

Prevence plicní rakoviny se dělí na primární a sekundární. Cílem primární prevence je zamezení vzniku patologického procesu, a pokud už byl tento proces z jakýchkoli příčin zahájen, zabránit progresi do klinické formy. U plicní rakoviny spočívá především v zachování nekuřáctví u nekuřáků, zanechání kouření u aktivních kuřáků, odstranění pasivního kouření v domácnosti, na pracovišti i na veřejných místech, odstranění profesionálního rizika vzniku rakoviny,



snižování obsahu kancerogenů v kouři cigaret, omezení požívání tučných jídel a zvýšení fyzické aktivity. Některé iniciální patologické změny (prekancerózy) mohou být reverzibilní, pokud přestanou kancerogeny působit [14].

Dle doporučených postupů v pneumologii jsou pro sekundární prevenci nezbytné včasné kontroly nemocných s podezřením na karcinom plic. Česká pneumologická a ftizeologická společnost doporučila u těchto pacientů především provádět fyzikální vyšetření hrudníku, plic a srdce a alespoň 1x ročně provést skiagram hrudníku a zvýšit tak možnost včasného záchytu, a tím i chirurgického zákroku v raných stádiích onemocnění, kdy mohou být ložiska ještě operabilní [15].

### **2.3.3 Epidemiologie plicního karcinomu**

Karcinom plic celosvětově zaujímá přední místo v incidenci i mortalitě v rámci nádorových onemocnění. Ne ve všech státech světa se tento druh rakoviny vyskytuje se stejnou incidencí. Jsou zde odlišnosti v geografickém rozložení jednotlivých subtypů a zajímavý je i odlišný výskyt u mužů a u žen [16].

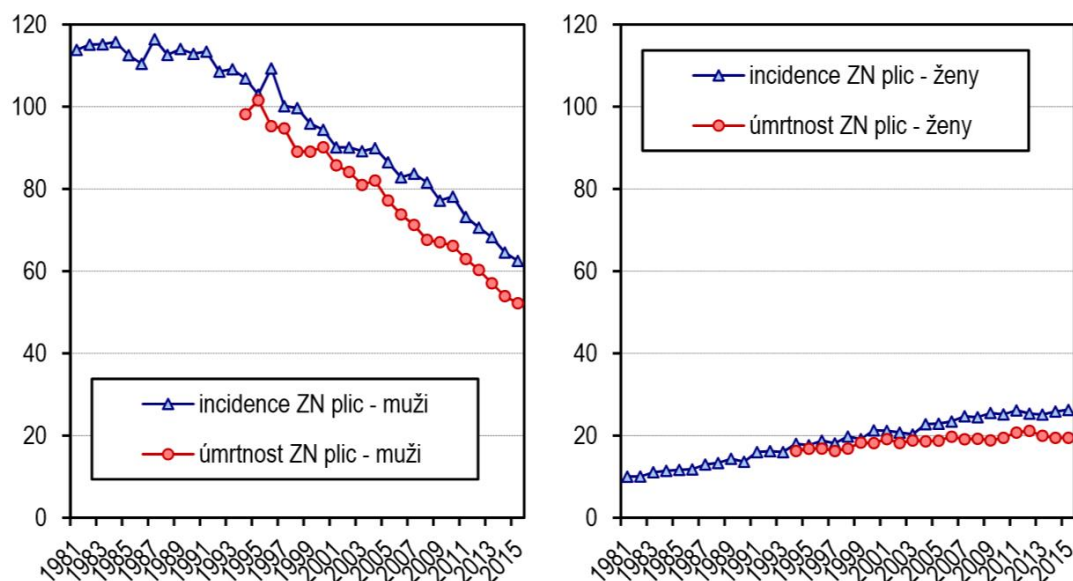
Severní Amerika, Austrálie a Nový Zéland, Jižní Amerika a zejména Východní Evropa jsou oblasti nejvyšší incidence a mortality karcinomu plic u mužů. Vyšší úmrtnost nacházíme také v Číně, Japonsku a jihovýchodní Asii. V zemích Jižní Asie (Pákistánu, Afganistánu) a v Africe není počet nově diagnostikovaných případů tak vysoký. U žen je zaznamenán nejvyšší počet případů úmrtí v Severní Americe a severozápadní Evropě, jejich průměrný výskyt se eviduje u žen v Číně, Austrálii a na Novém Zélandu [16].

Z pohledu klasifikace plicních nádorů se ve většině případech jedná o plicní karcinomy, další histologické typy se vyskytují pod hranicí jednoho procenta. Podle zpracovaných dat bez rozdílů pohlaví, malobuněčné karcinomy (SCLC) představují okolo 20 %, nemalobuněčné karcinomy blíže neklasifikované (NSCLC, NOS) okolo 9 % případů. Výskyt dalších morfologických typů je odlišný dle pohlaví: skvamózní

karcinom se vyskytuje ve 44 % u mužů a ve 25 % případů u žen, kdežto adenokarcinom ve 28 % u mužů a 42 % u žen. U mužů v určité populaci (Čína, Japonsko, USA, Kanada) incidence adenokarcinomu překročila incidenci skvamózního karcinomu. U žen je mimo Polsko a Anglii dominantní adenokarcinom ve všech světových oblastech. Rozdíly v incidenci jednotlivých typů karcinomů jsou silně ovlivněny časovým vývojem epidemie kouření a s ní související plicní rakoviny [16].

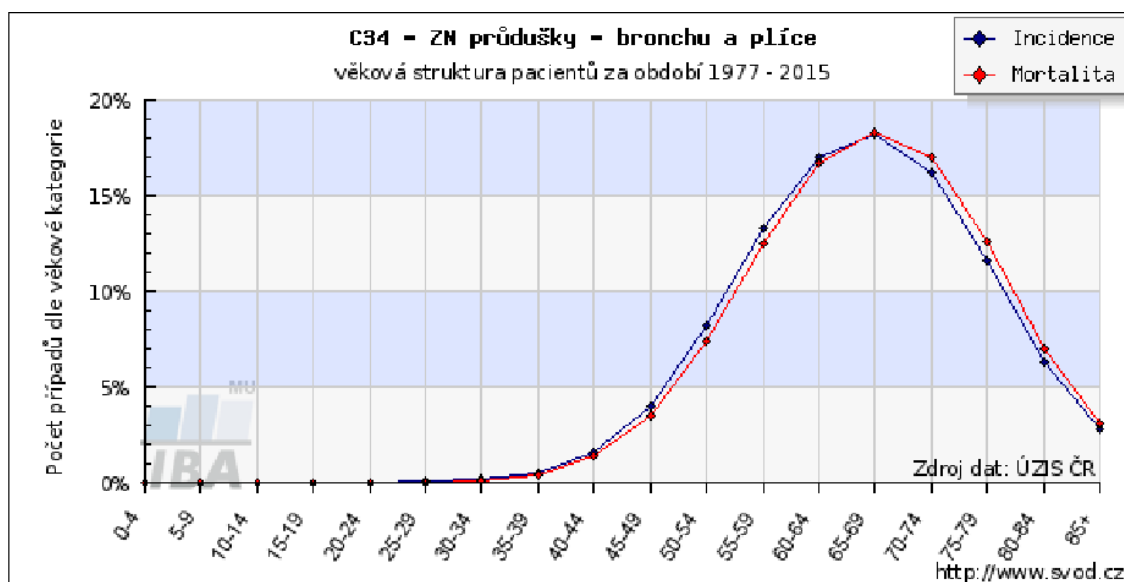
Rakovina plic se tradičně vyskytovala většinou u mužského pohlaví s mnohem vyšší incidencí než u žen, ale tato hodnota se začíná postupně vyrovnávat. Od 80. let minulého století počet nemocných mužů postupně klesá, zatímco počet hlášených nemocných žen od 90. let vzrůstá, a to zejména v západních zemích [17].

V roce 2015 bylo v České republice hlášeno celkem 6 484 zhoubných nádorů průdušnice, průdušek a plic (4 269 případů u mužů a 2 215 u žen), což je o 1 % více než v roce 2014 a přibližně 5 500 pacientů mu podlehnou. Incidence u mužů klesá, kdežto u žen výskyt mírně stoupá. Je zřejmé, že incidence se bude blížit mortalitě vzhledem k pozdnímu zachytu onemocnění (v pokročilém klinickém stádiu IV). To je patrné i z grafu na Obr. 5, na kterém je zaznamenán vývoj standardizované incidence a úmrtnosti na zhoubný nádor této lokalizace u mužů a u žen v letech 1981 - 2015. V rámci onkologických diagnóz představoval tento zhoubný nádor u obou pohlaví nejčastější příčinu úmrtí, což poukazuje na závažnost tohoto onemocnění. Pětileté přežití se u obou pohlaví pohybuje okolo 10 % (jedná se o léčené i neléčené případy z let 2010 - 2015) [15]; [18].



Obr. 5 - Vývoj standardizované incidence a úmrtnosti na zhoubný nádor průdušek a plic u mužů a u žen (na 100 000 mužů/žen, evropský standard) v ČR [18].

Nádor této lokalizace bývá podle dat za období 1977 - 2015 nejčastěji diagnostikován u obou pohlaví ve věku 60 – 74 let, k nárůstu dochází u obou pohlaví již po 55. roce věku (viz Obr. 6) [19].



Obr. 6 - Věková struktura pacientů se zhoubným nádorem bronchu a plíce za období 1977 - 2015 v ČR [19].

### 2.3.4 Klasifikace plicních karcinomů

Nejnovější WHO klasifikace nádorů této lokalizace vešla v platnost v roce 2015. Došlo v ní k úpravám v porovnání s předchozí WHO klasifikací z roku 2004, zejména v kategorii nemalobuněčných karcinomů [11]; [20].

Zásadním nedostatkem starších klasifikací byla absence kritérií pro diagnostiku malých vzorků odebraných z bronchoskopie, případně transthorakální jehlové biopsie, a cytologického materiálu. Na základě doporučení přišla s novým klasifikačním trendem mezinárodní skupina tvořená onkology a pneumology (IASLC/ATS/ERS), která se zaměřila na malé vzorky, ale neopomněla ani upřesnění diagnostiky adenokarcinomů v resekátech [11].

V současnosti se stále více řeší otázka morfologických a prediktivních genetických faktorů a dalších kritérií ovlivňujících léčbu pacienta. S ohledem na tyto požadavky došlo též k upřesnění subklasifikace těchto zhoubných nádorů a ke schválení strategických postupů, které by umožnily zlepšit diagnostiku a prognózu na základě imunohistochemických a molekulárně-genetických vyšetření. V roce 2015 z těchto důvodů vyšla nová WHO klasifikace nádorů plic, která převzala upravenou IASLC/ATS/ERS klasifikaci. Změna se dotkla zejména rozdělení jednotlivých typů adenokarcinomů, což v budoucnu povede k upřesnění morfologické diagnostiky tohoto závažného a často se vyskytujícího se onemocnění [11]; [21].

#### HISTOPATOLOGICKÁ WHO KLASIFIKACE NÁDORŮ PLIC Z ROKU 2015 (modifikováno s důrazem na epitelové léze) [21]

##### 1. Epiteliální nádory

- *Benigní epitelové nádory*
  - Papilomy
    - Glandulární papilom
    - Skvamocelulární (dlaždicobuněčný) papilom

- Smíšený skvamózní a glandulární papilom
- Adenomy
  - Adenom z mucinózních žlázek
  - Mucinózní cystadenom
  - Papilární adenom
  - Alvolární adenom
  - Sklerozující pneumocytom
- *Maligní epitelové nádory*
  - Adenokarcinom
    - Lepidický adenokarcinom
    - Acinární adenokarcinom
    - Papilární adenokarcinom
    - Mikropapilární adenokarcinom
    - Solidní adenokarcinom
    - Invazivní mucinózní adenokarcinom
    - Koloidní, fetální a enterický adenokarcinom
    - Minimálně invazivní adenokarcinom  
(mucinózní x nemucinózní)
    - Preinvazivní léze
      - Atypická adenomatoidní hyperplázie
      - Adenokarcinom in situ  
(mucinózní x nemucinózní)
  - Skvamocelulární (dlaždicobuněčný) karcinom
    - Rohovějící
    - Nerohovějící
    - Bazaloidní
    - Preinvazivní léze
      - Skvamocelulární (dlaždicobuněčný) karcinom  
in situ

- Neuroendokrinní tumory
    - Malobuněčný karcinom
    - Velkobuněčný neuroendokrinní karcinom
    - Karcinoid
      - Typický
      - Atypický
    - Preinvazivní léze
      - DIPNECH
  - Sarkomatoidní karcinomy
  - Velkobuněčný karcinom
  - Adenoskvamózní karcinom
  - další typy
2. Mezenchymální nádory
  3. Lymfohistiocytární nádory
  4. Nádory ektopického původu
  5. Metastatické nádory.

## KLASIFIKACE KARCINOMU PLIC Z POHLEDU BIOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ A LÉČEBNÝCH POSTUPŮ

1. NEMALOBUNĚČNÉ KARCINOMY (NSCLC, Non-Small Cell Lung Carcinoma) - tvoří asi 80 % všech případů a ve srovnání s malobuněčným karcinomem je jejich růst pomalejší. Do této skupiny se řadí všechny výše uvedené histologické typy maligních epitelových nádorů (mimo malobuněčný karcinom). Pokud nádor v těle nevytvořil metastatická ložiska, existuje pro pacienta možnost chirurgického odstranění. V případě generalizace nádoru je k dispozici moderní chemoterapeutická léčba a u pacientů s diagnózou adenokarcinomu rovněž tzv. biologická léčba [22]; [23].

2. MALOBUNĚČNÉ KARCINOMY (SCLC, Small Cell Lung Carcinoma) – tvoří pouze 20 % případů, ale jedná se o agresivnější typ nádoru. Vyznačuje se rychlým růstem s tendencí časně vytvářet vzdálené metastázy, což limituje možnosti chirurgické léčby. Proto v první linii léčby stojí chemoterapie [22].

## 2.4 Strategické postupy pro cílenou diagnostiku adenokarcinomu plic

### 2.4.1 Makroskopické formy a morfologická diagnostika adenokarcinomu plic

Plicní adenokarcinom se dle výše uvedené klasifikace řadí mezi maligní epitelové nádory se znaky glandulární diferenciaci, s možnou intracelulární produkcí hlenu (někdy s makroskopicky patrným celkovým želatinovým vzhledem) a s expresí jaderného markeru TTF-1 a cytoplasmatického napsinu A [24]; [25].

Ze všech typů plicních nádorů tvoří adenokarcinomy 40 – 50 % a jsou tak převládajícím typem NSCLC. U karcinomů plic obecně rozlišujeme několik makroskopických forem růstu, u adenokarcinomu pak dále několik různých histologických subtypů [26].

Makroskopicky se karcinom plic prezentuje různými formami dle lokalizace růstu. *Hilová forma* postihuje stěnu bronchu I. a II. řádu v podobě bělavého ložiska a vlivem vyklenutí nádorového infiltrátu může dojít k zúžení bronchu. Další růstovou variantou je *forma peribronchiální*, která vzniká expanzí hilové formy a postupuje periferně až do plicního parenchymu přes bronchiální stěnu. Plicní karcinom může proniknout i do lymfatických cév (*forma lymfatická*). Pokud je zasažena nádorem větší část plicního laloku, z důvodu difúzního šíření infiltrátu z hilu směrem k plicní periférii, hovoříme o *formě lobární*. Z této formy se nádorová

masa dále šíří do mediastina (*forma pulmomediatinální*) nebo může prorůst do pleury a na její povrch (*forma pleuropulmonární*). Mimo tyto základní formy je z hlediska klinické symptomatologie třeba zmínit *Pancoastův nádor* lokalizovaný v plicním apexu s expanzí přes hrudní stěnu do plexus brachialis a truncus sympaticus (sympatické pleteně). Tato růstová varianta se klinicky projevuje jako Hornerova triáda (viz výše). Progrese patologických změn v nádorem infiltrované plíci provází zúžení až ucpaní bronchu, což vede k nevzdušnosti plíce (atelektáze), k nevratnému rozšíření průdušek (bronchiektázií) či vzniku postobstrukční bronchopneumonie [22].

Ve většině případů se ložisko adenokarcinomu vyskytuje na plicní periférii, méně často se léze objeví na povrchu viscerální pleury jako důsledek masivní infiltrace pleurálního prostoru nebo v podobě endobronchiálně rostoucí masy makroskopicky patrné jako špatně ohraničené šedobělavé až šedožluté ložisko. Mikroskopicky představují adenokarcinomy poměrně rozsáhlou skupinu nádorů s různými znaky glandulární diferenciaci, které se mohou kombinovat. Proto jsou rozlišovány různé subtypy s převažujícím typem růstu a buněčným složením. Z histomorfologického hlediska se léze, předcházející invazivnímu adenokarcinomu dělí na atypickou adenomatoidní hyperplázii (prekancerózu s mírnými jadernými atypii pneumocytů II. typu velikosti do 5 mm) a adenokarcinom in situ. U této prekursorové léze s ložiskem do 30 mm se nesmí prokázat šíření nádorových buněk do stromatu krevních a lymfatických cév a do pleury. Z toho vyplývá, že tuto diagnózu nelze určit pouze z jehlové biopsie, ale pro posouzení invaze je nutná kompletní chirurgická resekce ložiska. Oba typy těchto lézí mají excelentní prognózu, neboť chirurgický resekční výkon bývá kurativní. Mezi skupinu nádorů s výbornou prognózou se řadí také minimálně invazivní karcinom (podobný adenokarcinomu in situ, s maximální invazí do stromatu do 5 mm). Na základě výborné prognózy byl rovněž vyčleněn ze skupiny invazivních karcinomů. Opět se poukazuje na nutnost kompletní resekce materiálu pro cílenou diagnostiku [11]; [23]; [24]; [26].



Invazivní adenokarcinomy se podle nejnovější klasifikace rozdělují na základě převažujícího typu histologického růstu. Lepidický, acinární, papilární, mikropapilární, solidní a raritně se vyskytující subtypy koloidní, fetální a enterický. Toto rozdělení má zejména prognostický význam (adenokarcinom s převažujícím lepidickým typem růstu s výbornou prognózou, naopak mikropapilární a solidní subtypy s prognózou nejhorší). Mucinózní adenokarcinomy tvoří samostatnou skupinu. Jednak se u těchto typů nádorů vyskytuje mutace genu K-ras, ale odlišují se i jejich imunohistochemickým profilem. Lepidický adenokarcinom se vyznačuje buňkami pneumocytárního vzhledu rostoucími na povrchu alveolárních sept. Mikropapilární subtyp se od papilárního liší svým papilárním růstem, ovšem bez fibrovaskulárního stromatu. Konečně adenokarcinom s převažujícím acinárním typem růstu obsahuje struktury acinární a tubulární, jejichž povrch je tvořen z kubických až cylindrických buněk produkujících hlen [11]; [17]; [23]; [26].

Pro zkvalitnění diagnózy se užívají především imunohistochemické metody fungující na principu vazby antigenu a protilátky, ale také speciální metody histochemické (například barvení Alcianovou modří pro průkaz hlenu). Pro adenokarcinomy je specifický imunohistochemický průkaz exprese proteinů TTF-1 a napsinu A, jejichž pozitivita svědčí o primárním plicním původu nádoru (viz kapitola Metodika) [24].

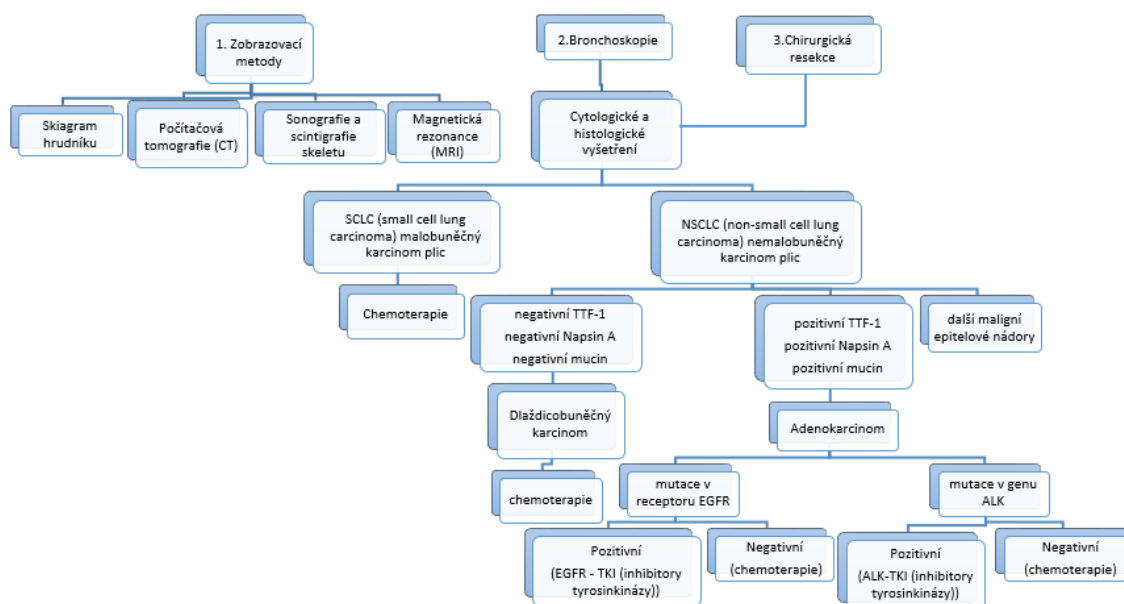
#### **2.4.2 Cytopatologie adenokarcinomů**

Význam cytologie v diagnostice adenokarcinomů spočívá především v detekci nádoru, potvrzení primárního původu metastatického procesu nebo monitorování pacienta po cílené léčbě plicního karcinomu. Podklasifikace plicních karcinomů z hlediska cytologického se neobejde bez znalosti cytomorfolgie buněk. Pro správnou interpretaci je zásadní nejen precizní znalost buněk, ale i kvalitní odběr vzorku a jeho zpracování [27].

Dle typu odběru materiálu se liší buněčnost vzniklých nátěrů. V bronchoskopických odběrech se nádorové buňky nacházejí ve velkých shlucích. Naopak v tenkojehlových aspiračních cytologických nátěrech jsou buňky spíše rozptýlené, jejich počet kolísá a také někdy tvoří plachtovité svazky. Z morfoloického hlediska mají buňky adenokarcinomu okrouhlý tvar jader, často s výskytem jadérek, pro hlenotvorbu svědčí převládající světlá cytoplasma, polymorfní jádra jsou typicky excentricky uspořádaná [24]; [28].

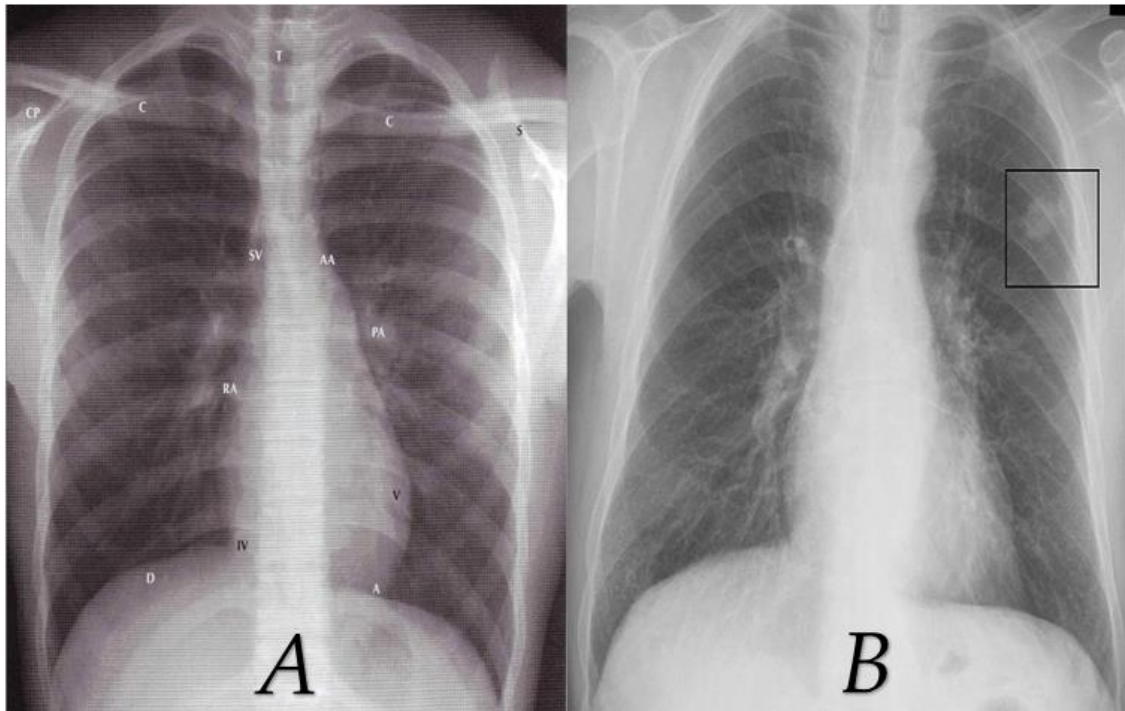
Cytologické odlišení subtypů adenokarcinomu není zcela spolehlivé a nemá praktický význam, a proto jej v cytodiagnostice nepoužíváme.

### 2.4.3 Vyšetřovací algoritmus pro stanovení optimálního léčebného postupu u nemocných s adenokarcinomem plic



Obr. 7 - Přehled správného vyšetřovacího algoritmu (vlastní zdroj).

1. Zobrazovací metody (viz Obr. 7) jsou nedílnou součástí diagnostiky plicního karcinomu. Nejen, že pomáhají lézi lokalizovat, ale na základě výsledků lze zjistit jejich vztah s okolními strukturami, případné zasažení regionálních uzlin, a přítomnost vzdálených metastáz. Často je pacient zobrazovacími metodami monitorován i v průběhu léčby. Primární metodou prováděnou v pneumologii je skiagram hrudníku. Za pomoci různých radiologických kritérií lze klasifikovat formy plicního karcinomu (například okrouhlý periferní stín, jednostranné rozšíření plicního hilu, nebo výskyt pleurálního výpotku), (viz Obr. 8). Samotná plicní léze, zejména její velikost, tvar a okraje se hodnotí pomocí počítačové tomografie (CT) s případnou aplikací intravenózní kontrastní látky. Pro hodnocení zasažení lymfatických uzlin je CT vyšetření pomocnou metodou, schopnou detekovat lymfatické uzliny o velikosti nad 10 mm. Výhodou nulové radiační zátěže a posouzení nádorové invaze do okolí žebek, srdce, okolí velkých cév či do bránice přináší magnetická rezonance (MRI) s vyšší přesností než CT. Tato metoda tak jednoznačně upřesňuje staging onemocnění (patologickými kritérii dané odstupňování pokročilosti maligního procesu). Nicméně mezi její nevýhody stojí za zmínku délka vyšetření pacienta a poměrně vysoká cena výkonu. Z ostatních zobrazovacích metod se uplatňuje sonografické vyšetření dutiny břišní, zejména se posuzují játra, ledviny a nadledviny. U symptomatických pacientů, při zvýšení parametrů kostního metabolismu v séru (alkalická fosfatáza, vápník) a patologickém nálezů v kostní dřeni se využívá ke stanovení kostních metastáz scintigrafie skeletu [10]; [11]; [14]; [15].



Obr. 8 - Scintigrafie hrudníku (zdroj FN Motol).

A – Normální obraz plic, B – ložisko karcinomu (okrouhlý periferní stín zvýrazněný čtvercem).

2. K bronchoskopii se přistupuje na podkladě podezřelého rentgenového nálezu v případě, že je možné odebrat vhodný materiál k histologickému posouzení nádoru a pacient v krátkodobé celkové anestezii není ohrožen vznikem komplikací (například při endobronchiálních odběrech hrozí vyšší riziko krvácení). Výhodou cytologické diagnostiky je odběr minimálního množství materiálu buď získaného punkčně, pomocí speciálního bronchoskopického kartáčku, aspirací bronchiálního sekretu nebo výplachu bronchu. Materiál se přímo aplikuje na podložní sklo a barví se standardními metodami (například May-Grünwald Giemsa Romanowski). Histologický materiál se získává klíčkovou biopsií. Cílem této metody je co největší výtěžnost získaných informací - potvrzení nebo vyvrácení podezření na malignitu, určení jejího rozsahu a doplnění informací již získaných z výsledků zobrazovacích metod, fyzikálního vyšetření nebo dalších laboratorních vyšetření (nádorových markerů).

Moderní bronchoskopické techniky (endobronchiální ultrazvuk – EBUS, endobronchial ultrasound) se dají využít k zobrazení patologických procesů nejen v bronchiální stěně, ale i na jejím povrchu. Nevýhodou bronchoskopie je limitace zastižení ložisek v oblasti periferního větvení bronchů. [10]; [11].

### 3. Možnosti Chirurgické resekce přesahují obsah této práce.

Na základě provedených zobrazovacích metod, seventuálním využitím bronchoskopie či jiného způsobu odběru materiálu stanoví pneumoonkolog a patolog klinické stádium onemocnění, typ karcinomu a zhodnotí další diagnostický postup. Na základě morfologie nelze v některých případech cytologické vzorky klasifikovat do jednotlivých kategorií, obtížné je to zejména při odlišení nízce diferencovaného dlaždicobuněčného karcinomu od adenokarcinomu. Proto se vedle cytologických nátěrů z bronchoskopického vyšetření odebírá i materiál na cytoblock (viz kapitola 4.1), z něhož lze provést imunohistochemické vyšetření (viz kapitola 4.4 a Obr. 7). To někdy může přispět i ke stanovení primárního původu metastatického nádorového ložiska [11]; [25].

Kvalitní subklasifikace nádorů plic patologem je vodítkem pro klinického onkologa k použití cílené terapie a stanovení prognózy onemocnění. V souvislosti s nasměrováním ke správné terapii se pacienti s pokročilým nemalobuněčným karcinomem testují na přítomnost mutací v genu EGFR molekulárně-genetickými metodami, které se vyskytují u 10 – 15 % pacientů. EGFR (receptor epidermálního růstového faktoru, Epidermal growth factor receptor) patří do skupiny proteinů monomerního charakteru s lokalizací v buněčné membráně tvořené třemi doménami – extracelulární, transmembránovou a intracelulární. Při změnách struktury receptoru se aktivují signální dráhy směrem k buněčnému jádru vlivem spuštění tyrosinkinázové aktivity, což vede k nadměrné proliferaci, schopnosti invaze a tvorbě metastáz (viz kapitola 2.3.1). Pokud se u nemocných prokáže mutace

v genu pro EGFR, je jim indikována cílená biologická léčba inhibitory tyrosinkinázy zasahujících přímo do nitrobuňčných pochodů v nádorové buňce [17]; [23].

Vyšetření in situ fluorescenční hybridizací (FISH) se u adenokarcinomů aplikuje i v případě pozitivního výsledku imunohistochemického vyšetření translokace u onkogenu EML4-ALK. Tato genová přestavba se vyskytuje přibližně u 1 – 3 % pacientů s adenokarcinomem plic. ALK (anaplastický lymfom kináza) je člen skupiny inzulínových receptorů ze souboru receptorových HGFR (hepatocyte growth factor receptor) tyrosinkináz. Při průkazu translokace genu ALK se volí jako cílená terapie podání inhibitoru ALK tyrosinkinázy [11]; [23].

V dnešní diagnostice NSCLC se rozšiřují možnosti léčit tento typ karcinomu nejen biologickou léčbou, účinnou radioterapií nebo chemoterapií, ale i samotným léčbou podpořeným imunitním systémem pacienta, který je následně schopen destruovat nádorové buňky [23].

Při diagnostice plicního karcinomu nesmí být opomenuty ani základní laboratorní testy a využití stanovení nádorových markerů. Patologické zvýšení indikovaných laboratorních parametrů lékaře upozorňuje na probíhající změny v lidském organismu. Nejčastěji se prokazuje zvýšení CRP, na metastatické postižení jater upozorní patologické jaterní testy, známkou nádorové kachexie je výrazná hypoproteinemie nebo zvýšené hodnoty alkalické fosfatázy při podezření na metastázy ve skeletu. Při výrazných změnách hodnot krevního obrazu bývá indikována i trepanobiopsie kostní dřeně [11]; [14].

Výskyt nádorových markerů v séru u pacientů s maligním nádorem se dává do souvislosti s apoptózou či nekrózou a proto se využívá především pro kontrolu účinnosti terapie. Jako nádorové markery mimo jiné slouží onkofetální antigeny. CEA je glykoprotein (patřící do skupiny  $\beta$ -globulinů) produkováný vyvíjejícím se embryem, u dospělých jedinců jsou jeho hladiny velice nízké. V nepatrném

množství bývá syntetizován z epitelových buněk střeva, bronchů a žaludku a proto byl v minulosti stanovován jako specifický marker pro nádory gastrointestinálního původu. Tento glykoprotein prokazujeme u adenokarcinomů ve zvýšených koncentracích v séru nebo v pleurálním výpotku jeho vyplavováním z glykokalyx buněčné membrány. Fragment cytokeratinu 19 – CYFRA-21-1, jakožto cytoskeletární protein, se specificky vyskytuje v epitelových buňkách spíše dlaždicobuněčného karcinomu, ale jeho stanovení se využívá se i u dalších maligních procesů (karcinomů močového měchýře, nádorů cervixu), jeho senzitivita u adenokarcinomů je nižší [14]; [29]

### 3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce s názvem „Histologická stavba zdravé plíce v porovnání s patologickým obrazem adenokarcinomu“ je nejen demonstrovat přehled nejen laboratorních metod, ale i základní strategické postupy potřebné k diagnostice tohoto typu nádoru.

Podmínkou splnění hlavního cíle je vytyčení základních dílčích úkolů, podle kterých se bude celá práce vyvíjet. Jedním z prvních úkolů je podrobně se seznámit se základní histologickou technikou potřebnou pro zpracování plicní tkáně. Po předchozím nastudování histologické stavby plic tak zvolíme vhodné barvicí metody pro zobrazení dílčích histomorfologických struktur, abychom následně výsledek mohli porovnat s dostupným patologickým obrazem. Jakožto základní přehlednou barvicí metodu použijeme Hematoxylin-eosin k odlišení základních tkáňových komponent. Barvicí metody AZAN, Orcein unna Tanzer jsou zvoleny pro výrazný barevný kontrast znázorňující pojivové tkáně a poslední barvení Alcianovou modří pro průkaz kyselých mukopolysacharidů.

Dalším dílčím úkolem je seznámení se s možnostmi cytologické diagnostiky od odběru materiálu po výsledné zpracování, jejím přínosem a indikacemi vyšetření v celém diagnostickém algoritmu doplňující se s metodami imunohistochemickými pracujícími na principu vazby antigenu a protilátky.

Vrcholem práce by měl být dodatek dalších vyšetřovacích metod potřebných k diagnostice s menším důrazem na biochemickou stránku problematiky.



## 4 METODIKA

I když je v současné době manuální práce bez ohledu na typ laboratoře postupně nahrazována přístroji a mnohé metody se tak zautomatizovaly, stále se histologická laboratoř neobejde bez zkušeného laboranta, který je schopen zhotovovat precizní histologickou technikou z různých orgánů a tkání kvalitní histologické preparáty pro mikroskopická vyšetření. Zvolená technika práce se odvíjí od druhu vyšetření, které je požadováno. Jiné požadavky na zpracovávání materiálu zahrnuje běžná biopsie, jiné peroperační biopsie, případně nekropsie. Běžná biopsie se odebírá za účelem stanovení histologické diagnózy z materiálu fixovaného a zpracovaného do podoby parafínového bloku. Vyšetření peroperační biopsie (zkušeným atestovaným patologem) probíhá v průběhu operace a provádí se např. k odlišení maligního procesu od benigního, ke stanovení diagnózy, posouzení okrajů odběru z hlediska mikroskopické infiltrace nádorovými buňkami. Podle výsledku peroperačního vyšetření modifikuje operatér chirurgický výkon. Nekroptické vyšetření je indikováno po smrti pacienta pro upřesnění předchozích klinických nálezů nebo příčin smrti a pro výukové účely [30].

Běžný bioptický materiál se zpracovává dle několika dílčích kroků, které jsou v této kapitole popsány. Výstupem je histologický preparát. U všech typů materiálů zpracovaných v dané laboratoři je nezbytné použít přehledné barvicí metody, nejčastěji Hematoxylin-eosin. Volba speciálních metod jako jsou metody speciálního barvení (např. Orcein nebo AZAN), metody imunohistochemické pro průkaz exprese proteinů, případně i molekulárně – biologické vyšetření nukleových kyselin závisí na typu diagnózy, posouzení patologa a jeho neustálé komunikaci s lékaři jiné odbornosti zasahujících do konkrétního diagnostického řetězce (operatér, ošetřující lékař, zobrazovací specialista, mikrobiolog a další).

V rámci prováděných vyšetření by se měl odebrat vzorek jak na histologické, tak cytologické vyšetření. Odebrané vzorky však nejsou identické, ale vzájemně

se doplňují. V rámci mé práce jsem měla možnost se setkat s jednoduchou metodou charakteru předoperačního odběru – metodou ROSE (rapid on-site evaluation), při které jsem díky zkušenému bronchologovi z Pneumologické kliniky 2. LF a FN Motol získala vzorky nádorových buněk za pomoci navigace endobronchiálním ultrazvukem (EBUS – endobronchial ultrasound), které se následně barvily komerčně dostupným rychlým přehledným barvením přímo v místě odběru materiálu, kde také proběhlo vyšetření zkušeným patologem [24].

## **4.1 Cytodiagnostika**

Hodnocení jednotlivých buněk, posuzování jejich velikosti, tvaru, počtu, barvitelnosti a dalších kritérií je předmětem morfologické diagnostické metody – cytodiagnostiky. K získání reprezentativních buněk se využívá celá řada specifických instrumentárií a typů odběrů prováděných na bronchoskopickém sále [24].

Cytodiagnostika jako taková se dělí do dvou skupin podle typu vyšetřované tkáně na exfoliativní cytologii a na punkční cytologii. Principem exfoliativní cytologie je sběr buněk z povrchu sliznice nebo patologického útvaru buď kartáčkovou biopsií, endobronchiální excizií nebo transbronchiální biopsií, případně aspirací z bronchu. Zatímco punkční cytologie se zabývá obsahem různých patologických dutin (obsahem cystických útvarů) a také vzorky získanými punkcí uzlin různé lokalizace, nejčastěji mediastinálních a hilových, za současné rentgenové nebo ultrazvukové kontroly [24].

### **4.1.1 Příprava a zpracování vzorků pro cytologické vyšetření**

Jednoznačné a nezaměnitelné označení vzorků je velice nezbytné. Ihned po odběru se materiál vkládá do 10% roztoku formolu (4% formaldehyd) s podmínkou striktního dodržení doby fixace, která by neměla přesáhnout 24 hod z důvodu zachování kvality DNA pro následné molekulární vyšetření [24].

Zpracování biologického materiálu se liší v závislosti na typu požadovaného vyšetření. Hodnotí se přítomnost nádorových buněk, jejich zastoupení a typizace. Před cytologickým vyšetřením se biologický materiál zpracovává těmito třemi základními postupy:

a) Standardní vzorky (nátěry z aspirátu, bronchu, punkce suspektních ložisek či lymfatických uzlin, otisky excize)

- tento typ materiálu nevyžaduje před samotným barvením další zpracování, provádí se pouze tenký nátěr na podložní sklo.

b) Bronchoalveolární lavážní tekutina

- nezbytné jsou alespoň 2 ml vzorku, které se vkládají do cytocentrifugy 2x po 1 ml;
- materiál se stáčí při 1000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut a k sedimentu přidáme 3-4 kapky plazmy a 2-3 kapky trombinu, tím dojde k vytvoření sraženiny, do které se vychyťají všechny přítomné buňky
- „sraženina“ se dále fixuje a zpracovává obdobně až do podoby parafínového bloku, který v tomto případě nazýváme cytoblock;
- zhotovený cytoblock vložíme do kazetek s vložkou a číslem a fixujeme 10% formolem 60 minut;
- následně vložíme do autotechnikonu přes 70% alkohol a druhý den zhotovujeme parafínový bloček, krájíme na mikrotomu a barvíme metodami zadanými lékařem
- tento odběr se využívá u periferních a plošně rostoucích nádorů (adenokarcinom s lepidickým růstem)

c) Pleurální výpotek

- získaný sekret se zpracovává v celkovém množství asi 5 ml ve zkumavce obsahující natrium citricum (antikoagulační roztok citrátu sodného);

- zkumavka se stáčí opět v cytocentrifuze 5 minut při 3000 otáčkách za minutu;
- se sedimentem pracujeme dle stejného postupu jako při zpracování bronchoalveolární lavážní tekutiny [24]; [31].

Po vlastním zpracování materiálu následuje barvení cytologických nátěrů metodou May-Grünwald Giemsa Romanowski:

- fixace naředěným methanolem – 3minuty;
- barvení v roztoku May- Grünwald 10 minut, roztok se ředí vodou v poměru 1 : 10;
- oplach destilovanou vodou;
- následně barvíme v roztoku Giemsa Romanowski 20 – 30 minut;
- oplach pramenitou vodou;
- oschnutí sklíček;
- následně se jednotlivá skla umístí do plastové krabice a jsou posléze odeslány k vyhodnocení cytologem [31].

Pro urgentní vyšetření a zpracování vzorků na bronchoskopickém sále se využívá rychlé orientační vyšetření ROSE. Jedná se o mikromorfologický výkon, při kterém je z odebraného materiálu bezprostředně proveden nátěr a obarven rychle dostupným barvením a orientačně vyhodnocen cytologem přímo na sále, nebo v předsáli. Tímto výkonem si pneumolog ověří, zdali byl jeho odběr materiálu hodnotný, případně se odběr opakuje. Za validní se odběr považuje při zastižení nádorových buněk nebo uzlin [24].

K rychle dostupnému barvení se využívá komerční souprava MGG Quick Stain. Reagencie soupravy v sobě mají obsaženy aktivní molekuly eozinového a thiazinového barviva s vysokou schopností se rychle disociovat. Toho se využívá při barvení. Díky rychlé absorpci jsou potřebné buněčné struktury během pár

sekund obarveny a může bezprostředně následovat mikroskopie. Souprava obsahuje tři roztoky (A = fixační roztok, B = eosinový roztok, C = thiazinové barvivo), (viz Obr. 9). Tyto reagenty mají podobné složení jako tradiční May-Grünwald-Giemsa. Do jednotlivých roztoků se nátěr vkládá na dobu 4-5 sekund, poté se opláchne vodou a je připraven k odečtu pod mikroskopem s následujícím barevným efektem: erytrocyty jsou růžovo-šedé, trombocyty růžové, jádra leukocytů tmavě růžová, eozinofily jasně oranžové a neutrofilů purpurové [24]; [30].



Obr. 9 - Rychle dostupné barvení s třemi roztoky MGG Quick Stain a destilovanou vodou (vlastní zdroj).

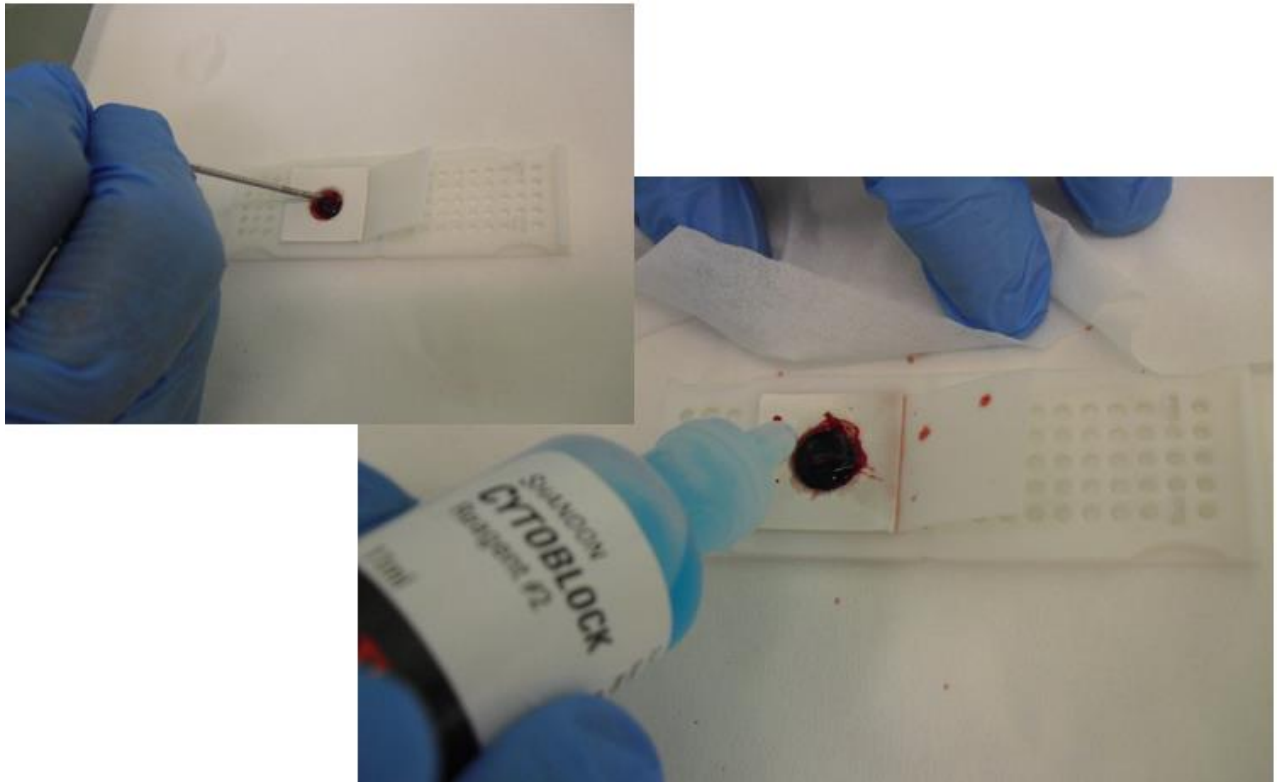
Při podezření na maligní proces, ale i na nenádorové léze se diagnostika karcinomu plic opírá o současné hodnocení cytologického nátěru s reprezentativním cytoblockem získaným z části odebraného materiálu nevyužitým pro zhotovení cytologického nátěru ihned fixovaným v 10% formolu. Ze zhotoveného cytologického nátěru se v závislosti na diagnóze a povážení morfologa, jehož úkolem je označit partie s nádorovými buňkami, provádějí molekulárně-biologické metody (PCR vyšetření mutací genu EGFR). Kvalitní cytoblok se využívá k metodám imunohistochemie, nebo FISH vyšetření zlomů v genech ALK a ROS1, které se používá pro indikaci k cílené terapii nemocných [24].

Nevýhodou endoskopicky odebraného vzorku (obvykle velikost okolo 1-5 mm) je dostupnost malého množství materiálu, což může značně limitovat hodnocení

strukturních změn parenchymu a plicních lézí. Cytoblock se zhotovuje pouze z pleurálního výpotku z materiálu získaného z punkce (lymfatických uzlin, mediastina, ložiska extrabronchiálně) k diagnostice zejména v případě, že výpotek je prvním příznakem onemocnění nebo není možné provést bioptický odběr [32].

Endoskopií získaný materiál odebraný punkční jehlou s aspirační stříkačkou se zpracovává následujícím způsobem:

- Navlhčíme kazetku cytoblocku Reagentem 1;
- Aplikujeme 3 kapky reagentu 1 do vložky umístěné uvnitř kazetky cytoblocku.
- Z punkční jehly opatřené aspirační stříkačkou přidává broncholog k reagentu 1 vzorek (materiál se obvykle odebírá 2x-3x, aby byl dostatek materiálu pro zhotovení cytoblocku) a jednu kapku aplikuje na podložní sklo, ze kterého se zhotovuje a barví cytologický nátěr.
- Každý odebraný materiál se zafixuje (fixativum Shandon Formal – Fixx).
- Při dostatku materiálu se cytoblock zakápně Reagentem 2 (viz Obr. 10), aby došlo k zaplnění reagentu s tkání a vytvoření koagula.
- Uzavřeme cytoblockovou kazetu a umístíme do fixativa (10% formol) a po transportu do laboratoře se dále zpracovává .
- V laboratoři se cytoblocková kazeta po dostatečné fixaci vkládá přes 70% ethanol do autotechnikonu a druhý den se z cytoblocku zhotovuje parafínový bloček, který se krájí na mikrotomu a barví metodami indikované patologem [31].



Obr. 10 - Aplikace biologického materiálu z punkční jehly do kazetky cytoblocku a následné zakápnutí Reagentem 2 (vlastní zdroj).

V některých případech se z pleurálního výpotku, ze kterého se získala malá koncentrace buněk, zhotovuje tzv. cytospin. Kyvetu uloženou ve sponě s označeným podložním sklem a s filtračním papírem vkládáme do cytocentrifugy a odstředíme při 1000 otáčkách po dobu 10 minut. Vlivem odstředivé síly se tekutina odsává do filtračního papíru a všechny buňky obsažené ve výpotku se „zcentrifugují“ do malé oblasti na podložním skle, která je definována otvorem ve filtračním papíru. Sediment se barví již známým postupem metodou May-Grünwald Giemsa Romanowski. Výhodou tohoto postupu je, že prakticky všechny buňky, které byly obsaženy ve výpotku, se soustředí na malém prostoru [31].

U pacienta se prokázala typická morfolgie adenokarcinomu při urgentním vyšetření na bronchoskopickém sále a ze zbytku materiálu se prováděla další nezbytná vyšetření. Při podezření na adenokarcinom je nutná subtypizace nádoru, aby se odlišil primárně plicní adenokarcinom od případné metastázy adenokarcinomu jiného primárního původu do plic (např. primární adenokarcinomy zažívacího a močového traktu).

## 4.2 Přehled histologické techniky pro zpracování bioptického materiálu

Každý materiál odeslaný k histologickému zpracování musí být vybaven pečlivě vyplněnou žádankou. Materiál se řádně označí a ponoří do nádoby s fixačním roztokem (nejčastěji formolem), kterého by mělo být dostatečné množství (50x více než je objem vzorku). V laboratoři materiál lékař přikrojí v kovové digestoři zvané flowbox (s odtahem) na reprezentativní části tkáně a laborant/ laborantka materiál umístí do jednotlivých kazetek s krátkými popisy materiálu dané lékařem a následně vloží do autotechnikonu, kde dochází k odvodnění a prosycení horkým parafínem. Následně se tkáň zalije do pečlivě popsaných parafínových bloků, které jsou krájeny na mikrotomu a barveny příslušnými metodami [33].

### 4.2.1 Fáze mimo laboratoř: odběr, fixace a transport

Technika odběru se podřizuje tomu, aby byl materiál odebrán co nejrychleji a zároveň nejšetrněji a nedošlo ke zhmoždění tkáně. Způsobů odběru je celá řada - nejznámější a v průběhu operace často využívaná technika probatorní excise, resekce, další dostupná možnost odběru je punkce dutou jehlou opatřenou injekční stříkačkou, kterou se nasávají malé kousky tkáně. Mezi další techniky odběru patří mikroexcise – pro odběr materiálu z dutého orgánu sondou (například endoskopické vyšetření žaludku) a pro gynekologické účely nejvíc využívaná mikroabraze (například pro kontrolu správně vytvořené sekreční fáze menstruačního cyklu) [33].

Abychom zabránili samovolnému rozkladu tkáně (autolýze), ke které dochází vlivem různých enzymů, jež najdeme v lysozomech, využíváme fixační prostředky. Nejčastěji používaný fixační prostředek - formol se dodává jako 40% roztok formaldehydu ve vodě s nutností tento roztok naředit na 10% formol. Pro fixaci krevních orgánů (sleziny) se nedoporučuje využívat Bouinovu tekutinu jako fixační roztok, protože krev sráží na tvrdou a těžce krájitelnou hmotu, ale rychle proniká



do tkáně, která je následně dobře barvitelná. Kromě těchto dvou nejvyužívanějších tekutin lze v praxi použít např. Bakerovu tekutinu pro fixaci lipidů, Hellyho tekutinu, případně i aceton [33]; [30].

Po odběru a fixaci následuje transport materiálu do laboratoře. Po přijetí zalitého materiálu s žádankou laboratoří se provede kontrola údajů na žádance a na nádobě, materiál se eviduje a je mu přiřazeno bioptické číslo a lékař, který provede vyšetření.

Patologický materiál využívaný pro účely práce byl získán na Ústavu patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol Praha.

#### **4.2.2 Fáze v laboratoři: zalévání do parafínu, krájení, barvení a montování**

Fixace tkáně probíhá průměrně 12 – 48 hodin podle velikosti odběru. Po fixaci tuto tkáň nemůžeme krájet na mikrotomu – je měkká a řez by se rozpadl. Médium, do kterého tkáň zaléváme (parafín) vyplní mikroskopické štěrbiny ve tkáni a tím se z ní stane pevná hmota, z níž snadno ukrojíme tenké řezy. Zalévání do parafínu probíhá v autotechnikonu (viz Obr. 11), a skládá se z několika dílčích kroků v tomto pořadí [30]:

- Odvodnění tkáně se provádí stoupající řadou alkoholů (50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%). Materiál se postupně přenáší do alkoholů s vyšší koncentrací. Nižší koncentrací se začíná, aby se předešlo smrštění tkáně. Ze všech kroků je výborné odvodnění tkáně tím nejdůležitějším pro její následné krájení a barvení.
- Prosycení intermediem následuje ihned po odvodnění tkáně. Alkohol se musí dokonale odstranit, protože v něm parafín není rozpustný. Pro prosycení využijeme intermedium, který dobře rozpouští parafín a zároveň se mísí s ethanolem (xylen).

- Prosycení parafínem se provádí postupně ve čtyřech lázních zkvalitněného parafínu v rozmezí několika hodin. Parafín má bod tání kolem 56 – 58 °C. Tato teplota nesmí být překročena, jinak tkáň tvrdne a špatně se krájí a barví. Součástí některých autotechnikonů jsou navíc dvě lázně – čistící xylene a čistící alkohol.
- Vlastní zalití se nikdy neprovádí z parafínu, který jsme využili k prosycení tkáně. Tkáň zaléváme do komůrek z umělé hmoty na parafínové zalévací lince (viz Obr. 12) a výsledkem je parafínový bloček [33].



Obr. 11 - Autotechnikon (vlastní zdroj).



Obr. 12 - Parafínová zalévací linka (vlastní zdroj).

Přístroje, na kterých se provádí vlastní krájení řezů, se nazývají mikrotomy. Tloušťka řezů se pohybuje mezi 3 - 6  $\mu\text{m}$  a dá se nastavit mikrotomovým šroubem. Dle konstrukce se v praxi nejvíce využívají dva typy mikrotomů [33]:

- Sáňkový mikrotom má blok pevně umístěn v držáku pro blok a nůž, případně žiletka jsou upevněny pod úhlem  $7^\circ$  ve speciálním držáku, který se pohybuje proti „stacionárnímu“ bloku. Tímto typem mikrotomu se zhotovují jednotlivé řezy (viz Obr. 13).
- Rotační mikrotom funguje na opačném principu - skládá se z pevného nože a pohyblivého bloku, jež je přibližován setrvačnickovým kolem. Slouží ke zhotovení sériových řezů [33].



Obr. 13 - Sáňkový mikrotom (vlastní zdroj).

Tenký ukrojený řez klademe na přehřátou vodní hladinu (37 °C). Následuje natažení řezu na předepsané podložní sklo a kladení na vyhřívanou plotnu (37 °C). Po několika minutách se série ukrojených řezů přenáší do termostatu, abychom řezy usušili. V termostatu se ponechají do druhého dne [33].

Dle požadavku lékaře se řezy barví přehlednými, ale i speciálními barvicími metodami. Přehled několika metod využívaných pro účely této práce jsou uvedeny v následující podkapitole. Aby byl preparát použit pro pozorování ve světelném mikroskopu, je nezbytné ho zamontovat. K tomu se využívají montovací média (např. DePeX). Podle počtu obarvených skel si připravíme krycí skla, kápneme kapku montovacího média a opatrně přiložíme podložní sklo s řezem. Obarvený řez musí být zcela zakryt krycím sklem s médiem. Případné bubliny vytlačíme pomocí laboratorní jehly. Hotové preparáty jsou v laboratoři kompletovány s žádankami a odevzdány lékaři, který preparáty zhodnotí a indikuje případně další vyšetření.

## 4.3 Plicní adenokarcinom – přehled použitých barvicích metod

Jako základní barvicí metoda, která umožňuje odlišení jednotlivých tkáňových struktur, byla zvolena metoda Hematoxylin - eosin. K průkazu základních pojivových tkání (vaziva a chrupavky) byly vybrány metody AZAN a Orcein unna Tanzer a konečně k průkazu kyselých mukopolysacharidů nejvhodnější metoda barvení Alcianovou modří.

### 4.3.1 Základní barvicí metoda Hematoxylin - eosin

Jedná se o základní přehlednou barvicí metodu, která využívá kombinaci dvou barviv – bazického hematoxylinu a kyselého eosinu.

Hematoxylin je přírodní barvivo izolované z Kreveně obecné (kampeškového dubu). Do laboratoří je dodáván jako nažloutlý krystalický prášek. Samotné barvivo postrádá barvicí schopnosti. Ty získává oxidací vzdušným kyslíkem, což se z časového hlediska nevyplatí. Proto se využívají k oxidaci oxidační činidla (jodičnan sodný, či železité ionty), díky nimž získáme tzv. hematein. Tento roztok stále nemůže být použit k barvení pro svou nízkou afinitu ke tkáni. Z hemateinu se dále musí vytvořit lak hemateinu pomocí mořidla (síran hlinito-draselný) a podle použitého mořidla rozlišujeme jednotlivé druhy hematoxylinů (kamencové hematoxyliny Mayerův a Harrisův nebo železitý Weigertův hematoxylin). Získáváme komplex, který je schopný se vázat na bazofilní struktury jádra např. jaderný chromatin. Abychom vytvořili barevný kontrast, v kombinaci s hematoxylinem je výborné syntetické barvivo eosin [33]; [30].

Eosin na rozdíl od hematoxylinu, jež barví především jádra buněk a chrupavku, má schopnost barvit nejen cytoplasmu, kolagen, svalstvo a erytrocyty, ale i mezibuněčnou hmotu, což ulehčí rozlišení v mikroskopu [33].

Před samotným barvením si připravíme jednotlivé roztoky:

- Roztok eosinu - 0,5% roztok (5 g eosinu a 1000 ml destilované vody).
- Roztok NaHCO<sub>3</sub> - 2% roztok (20 g NaHCO<sub>3</sub> a 1 l destilované vody).
- Xylen a ethanol - použijeme z původních lahví od výrobce.
- Harrisův hematoxylin – bez přípravy, dodán od výrobce, před použitím nutno přefiltrovat.
- Kyselý alkohol - 3-5 kapek HCl do 100 ml 70% alkoholu.
- Karbol-xylen - xylen a fenol v poměru 3:1.

Postup barvení:

- 1. fáze – DEPARAFINACE (odstraníme parafín, který nepropouští do tkáně barvy),(viz Obr. 14).
  - Xylen I. 5 minut
  - Xylen II. 5 minut
  - 100% ethanol I. 5 minut
  - 96% ethanol II. 5 minut
  - Praní pod tekoucí vodou 5 minut
  - Oplach v destilované vodě
- 2. fáze – VLASTNÍ BARVENÍ (viz. Obr. 15 a Obr. 16).
  - Harrisův hematoxylin 5 minut (dle intenzity)
  - Praní ve vodě 10 minut
  - Diferencování v kyselém alkoholu (HCl) namočit
  - Zčernání jader proudem pramenité vody 10 minut
  - 2% NaHCO<sub>3</sub> pro zmodrání jader namočit
  - Praní ve vodě 5 minut
  - Oplach v destilované vodě
  - 0,5% roztok eosinu 5 minut

- Oplach ve vodě 3 květy
- Řádně usušit



Obr. 14 - 1. fáze – DEPARAFINACE (vlastní zdroj).

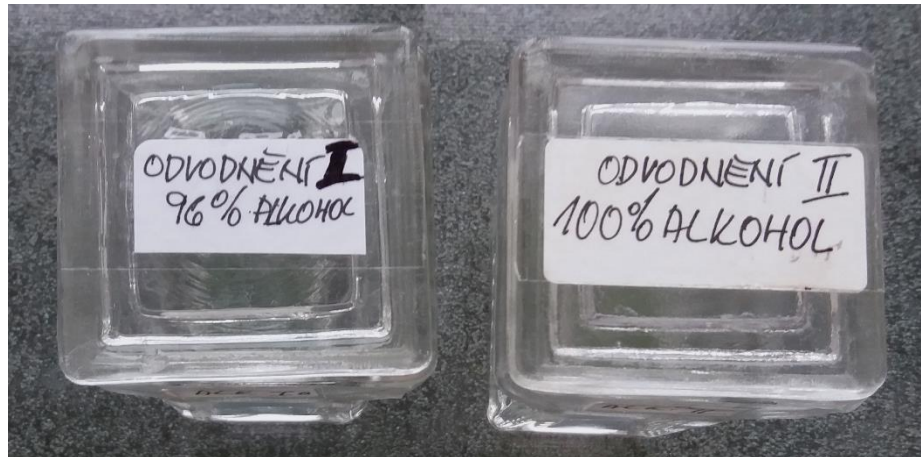


Obr. 15 - 2. fáze - VLASTNÍ BARVENÍ (1. část), (vlastní zdroj).



Obr. 16 - 2. fáze - VLASTNÍ BARVENÍ (2. část), (vlastní zdroj).

- 3. fáze – ODVODNĚNÍ (viz Obr. 17).
  - 96% ethanol I. rychle předat
  - 100% ethanol II. rychle předat



Obr. 17 - 3. fáze - ODVODNĚNÍ (vlastní zdroj).

- 4. fáze – PROJASNĚNÍ (viz Obr. 18).
  - Karbol-xylén 5 minut
  - Xylén I. 5 minut
  - Xylén II. 5 minut



Obr. 18 - 4. fáze - PROJASNĚNÍ (vlastní zdroj).

- 5. fáze – MONTOVÁNÍ.

Výsledky barvení: Jádra buněk a chrupavka se obarví modře, kolagenní vazivo růžově, svalovina červeně, erytrocyty oranžovo - červeně [30].



### 4.3.2 Průkaz kolagenních vláken metodou AZAN

Tato metoda se někdy počítá mezi trichromová barvení jako modrý trichrom.

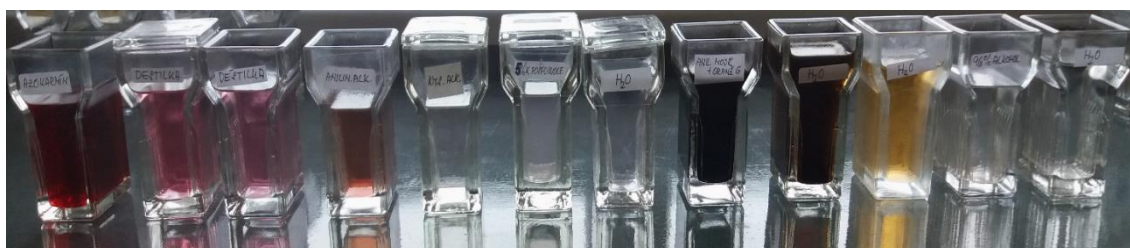
Před barvením je nutná příprava potřebných roztoků:

- Azokarmín - 0,1 g azokarmínu do 100 ml destilované vody, zahřejeme ve vodní lázni, přefiltrujeme a po zchladnutí přidáme 1 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$ .
- Anilinová modř – oranž G – navážíme 0,5 g anilinové modře, 2 g oranže G a 1 g kyseliny fosfowolframové. Vše přidáme do 100 ml destilované vody. Následně okyselíme přidáním 8 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , svaříme a po zchladnutí přefiltrujeme. Před samotným upotřebením je nutné ředění 1:1 s destilovanou vodou.
- Anilinový alkohol – odměříme si 1 ml anilinového oleje, který slijeme do 1000 ml 96% alkoholu.
- Kyselý alkohol – odměříme 1 ml  $\text{CH}_3\text{COOH}$  a napipetujeme do 100 ml 96% alkoholu.
- 5% kyselina fosfowolframová – odvážíme 5 g kyseliny fosfowolframové a kvantitativně přeneseme do 100 ml destilované vody.

Provedení:

- 1. fáze – DEPARAFINACE.
- 2. fáze – VLASTNÍ BARVENÍ (viz Obr. 19).
  - Barvení 30 minut v roztoku azokarmínu v termostatu při 58 °C.
  - Oplach destilovanou vodou.
  - Diferenciace v anilinovém alkoholu (kontrola v mikroskopu – červená jádra na růžovém podkladě) – 40 sekund.
  - Kyselý alkohol (1% kyselina octová v 96% alkoholu) – 25 sekund.
  - Moření 8-9 minut v 5% roztoku kyseliny fosfowolframové.
  - Oplach destilovanou vodou.

- Roztok anilinové modře + oranže G – 8 minut.
- Oplach vodou 10 minut.
- Diferenciace v 96% alkoholu – 8 minut.
- Destilovaná voda oplach.
- 3. fáze – ODVODNĚNÍ.
- 4. fáze – PROJASNĚNÍ.
- 5. fáze – MONTOVÁNÍ.



Obr. 19 - 2. fáze - VLASTNÍ BARVENÍ metoda AZAN (vlastní zdroj).

Výsledky barvení: Jádra se obarví karmínově červeně, erytrocyty oranžovo-červeně, kolagenní vazivo modře a svalovina červeně [30].

### 4.3.3 Průkaz elastických vláken metodou Orcein unna Tanzer

#### Příprava roztoků před barvením:

- Orcein se rozpustí v alkoholu za tepla ve vodní lázni a po zchladnutí se doporučuje barvička přefiltrovat a přidat 1 ml HCl.
- Kyselý alkohol se připraví odměřením 70% alkoholu 100 ml + 0,5 ml 35% HCl.

#### Postup barvení:

- 1. fáze – DEPARAFINACE
- 2. fáze – VLASTNÍ BARVENÍ
  - 70% alkohol oplach.
  - V roztoku Orceinu barvit řezy 30 minut při 58 °C.

- Oplach destilovanou vodou.
- Diferenciace v kyselém alkoholu – vyniknou červenohnědá elastická vlákna.
- Oplach ve vodě.
- Dobarvíme hematoxylinem 5 minut.
- Praní ve vodě 10 minut.
- 2% NaHCO<sub>3</sub> pouze namočit.
- Praní ve vodě 5 minut.
- 3. fáze – ODVODNĚNÍ
- 4. fáze – PROJASNĚNÍ
- 5. fáze – MONTOVÁNÍ

Jednotlivé fáze barvení jsou vyobrazeny na Obr. 20.



Obr. 20 – Průkaz elastických vláken metodou Orcein unna Tanzer (vlastní zdroj).

Výsledky barvení: Jádra se obarví modře, elastická vlákna sytě hnědočerveně, kolagen modrozeleně a erythrocyty + svalovina žlutě [30].

#### 4.3.4 Průkaz kyselých mukopolysacharidů metodou Alciánové modře

Prokazujeme hlen, obsahující kyselé mukopolysacharidy, produkovaný pohárkovými buňkami epitelu dýchacích cest, sloužící pro jejich samočistící schopnost. Mucin je směs kyselých mukopolysacharidů (glykosaminoglykanů) a lineárních polysacharidů s opakující se disacharidovou částí. Kyselé mukopolysacharidy obsahují hlavně kyselinu hyaluronovou, chondroitinsulfát a heparin [5].

Před barvením si připravíme roztoky určené k barvení následujícím způsobem:

- Alciánová modř – odvážíme 1 g Alciánové modře 8GX, kterou kvantitativně přeneseme do 3% kyseliny octové.
- Jádrová červeň – odvážíme 0,5 g jádrové červeně a kvantitativně převedeme do 5% síranu měďnatého za tepla. Po zchlazení je nutná filtrace.

Postup barvení:

- 1. fáze – DEPARAFINACE
- 2. fáze – VLASTNÍ BARVENÍ
  - Destilovaná voda oplach
  - 1% roztokem Alciánové modře 8GX barvíme řezy 2 hodiny.
  - Destilovaná voda oplach.
  - Jádra dobarvíme jádrovou červení 3 minuty.
  - Oplach vodou.
- 3. fáze – ODVODNĚNÍ
- 4. fáze – PROJASNĚNÍ

- 5. fáze – MONTOVÁNÍ

Jednotlivé fáze barvicí metody lze vidět na Obr. 21.



Obr. 21 - Průkaz kyselých mukopolysacharidů metodou Alcianové modře (vlastní zdroj).

Výsledky barvení: Jádra buněk se prokáží díky dobarvení jádrovou červení červeně a kyselé mukopolysacharidy modrozeleně [30].

## 4.4 Imunohistochemie

Imunohistochemické techniky se používají k průkazu exprese proteinů a jiných makromolekul in situ v histologickém řezu formolem fixované a do parafínu zalité tkáně. Imunohistochemie detekuje přítomnou specifickou antigení determinantu daného proteinu pomocí vazby specifické protilátky. Antigeny endogenního původu (cytoskeletární, membránové, jaderné) prokazujeme nejčastěji a jedná se o antigeny, které jsou přirozenou součástí buněk a tkání. Naproti tomu antigeny

exogenní (bakteriální, virové) nejsou běžnou součástí buňky. Protilátka (nazývaná primární) se na antigen, který může nebo nemusí být ve tkáni přítomen, naváže svým Fab fragmentem. Využívají se protilátky monoklonální (váží se na jeden epitop antigenu) nebo polyklonální (váží se na více epitopů antigenu) [34].

Imunohistochemická detekce využívá dva základní typy imunohistochemických metod – metodu přímou a metodu nepřímou. U přímé metody se musí antigen ve tkáni vyskytovat v dostatečně vysoké koncentraci, k jehož vizualizaci využíváme značenou primární protilátku (například fluorochromem), která se na epitop antigenu naváže svým Fab fragmentem. Výsledek pak hodnotíme „přímo“ ve fluorescenčním mikroskopu jako fluorescenci v místě, kde se primární protilátka navázala na epitop prokazovaného antigenu. Tento princip se v praxi využívá pouze zřídka, pro hodnocení je potřeba poměrně finančně náročný fluorescenční mikroskop. Z hlediska citlivosti není fluorescenční značení vhodné pro parafínové řezy, používá se spíše na tkáních zmrazených [34], [35].

Nepřímé metody se v praxi využívají častěji, jelikož jsou citlivější z hlediska detekce menšího množství antigenu ve tkáni. V různých modifikacích nepřímých metod (na principu biotin-avidinového komplexu nebo v našem případě polymerního peroxidázového komplexu) dochází ke stejně specifické vazbě jako u metod přímých - tedy vyrobené primární protilátky na antigenní determinant. Zásadní rozdíl od metod přímých je v primární protilátce, ta není značená. Vazbu nezačené protilátky na stanovený antigen je třeba zviditelnit, aby byl výsledek hodnotitelný ve světelném mikroskopu a to sekundární protilátkou, jež se váže na protilátku primární na základě mezidruhové specifity a vazba je vysoce specifická. Sekundární protilátka se vyrábí proti Fc fragmentu myšího imunoglobulinu (obecně zvířete, které produkovalo primární protilátky). Při použití metody „biotin-avidinového komplexu“ se sekundární protilátka značí biotinem. Na biotin se naváže komplex avidin-peroxidáza přes biotin-avidinový můstek. Následuje přidání roztoku substrátu a kosubstrátu. Při použití metody

„polymerního peroxidázového komplexu“ je jak sekundární protilátka, tak peroxidáza navázaná na polymer – vazba tedy probíhá v jednom kroku bez nutnosti použití biotin-avidinového můstku a následuje přidání roztoku substrátu a kosubstrátu. Enzym, který se pro detekci používá nejčastěji je křenová peroxidáza (HRP z anglického HorseRadish peroxidase). Substrát peroxidázy (peroxid vodíku) se přidává jako nedílná součást pro průběh reakce a je sám o sobě bezbarvý. Pro barevný výsledek enzymatické reakce do roztoku substrátu přidáváme kosubstrát, neboli chromogen (v našem případě 3,3 - diaminobenzidin – DAB<sup>+</sup>), který slouží jako donor elektronů a v místě enzymatické reakce tak spatřujeme hnědou sraženinu [35].

Pro potvrzení diagnózy adenokarcinomu primárního plicního původu bylo zvoleno testování exprese těchto proteinů: jaderného Thyreoidního Transkripčního Faktoru (TTF-1) a cytoplasmatického proteinu napsinu A. Použili jsme specifické primární protilátky: monoklonální myši anti-TTF-1 (klon SPT24; izotyp IgG1, kappa; ZYTOMED SYSTEMS) a monoklonální myši protilátka anti-napsin A (klon IP64; izotyp IgG2b; Novocastra) [36].

TTF-1 je transkripční faktor - 1 štítné žlázy, lokalizovaný v jádrech buněk. Podílí se na regulacích transkripce genů buněk pro štítnou žlázu a pro plíce (surfaktantové proteiny A, B, C i sekreční proteiny Clarových buněk). Původně byla exprese zjištěna u buněk štítné žlázy, proto tomuto faktoru již zůstalo specifické označení TTF-1. Později se prokázalo, že zajišťuje stejnou funkci i u buněk plic. Exprese TTF-1 je charakteristická pro karcinomy štítné žlázy a z plic, i pro jejich metastázy do jiných lokalizací [37].

Proteináza pepsinu - napsin A patří mezi nezbytné cytoplasmatické markery, podílející se na zrání surfaktanového proteinu B vyskytující se primárně v alveolárních makrofázích a v pneumocytech II. typu [37].

#### 4.4.1 Vlastní imunohistochemický průkaz provedený z parafinových bloků

1. Odběr, fixace a zalévání tkáně do parafínu jsou totožné jako u přípravy histologických preparátů.
2. Bloky pro imunohistochemický průkaz se mrazí v mrazicím boxu (lépe se pak krájí na tenké řezy) a na rotačním mikrotomu se zhotoví řez o síle 1-2  $\mu\text{m}$ . Ty jsou laborantkou nataženy z přehřáté vodní hladiny na speciálně upravené podložní sklo (silanizované a natřené poly-L-lysinem, aby se zabránilo „odplavání“ řezu z podložního skla během následné přípravy tkáně). Přes noc se nativní řezy uchovávají při laboratorní teplotě a těsně před zahájením imunohistochemického vyšetření je vkládáme na 30 minut do termostatu (56 °C).
3. Deparafinace probíhá řadou xylenů (3x5 minut). Tímto procesem se tkáň zbaví parafínu. Na tento krok se klade největší důraz (viz Obr. 22). Pokud by nedošlo k důkladné deparafinaci, hrozilo by nedokonalé navázání protilátky. Následně tkáň zbavujeme xylenem, který se nemísí s vodou, a tkáň by nemohla být zavodněna. Řezy proto vkládáme do řady izopropylalkoholů (2x5 minut). Jelikož větší část následujícího postupu probíhá ve vodném prostředí, tkáň promýváme i z izopropylalkoholu sestupnou ethanolovou řadou a převádíme řezy do destilované vody (1x5 minut).





Obr. 22 - Důkladná deparafinace imunohistochemických řezů (vlastní zdroj).

4. Aby se na antigenní determinanta ve tkáni mohla navázat primární protilátka, je třeba tyto epitopy demaskovat. Počet determinant na molekule antigenu souvisí s jeho velikostí a jejich počet je proto různý. Při chemickém způsobu přípravy tkáně (formaldehydem, xylenem, parafínem, ale i jinými chemickými látkami) dochází k zamaskování vazebných míst ve tkáni (například zesífováním molekul aldehydovou fixací). Výrobce protilátky doporučí v pracovním návodu postup pro konkrétní protilátku, jež si každá laboratoř sama optimalizuje. Pro stanovení exprese proteinů TTF-1 a napsinu A se doporučuje var v demaskovacím roztoku v přehřáté vodní lázni 40 minut. Pro napsin A se používá 10 Mm citrátový pufr o pH 6,0, o jehož složení a pH ručí ve FN Motol místní lékárna, která roztok do laboratoře dodává. Pro TTF-1 je demaskovací roztok komerčně dodáván od firmy DAKO (DAKO S1700).
5. Demaskování ukončíme promytím řezů PBS pufrem (3x5 minut) o pH 7,2.
6. Následujícím krokem je blokování potenciální zbytkové aktivity endogenní peroxidázy, nejčastěji nadbytkem jejího substrátu (peroxidu vodíku). V tkáních a buňkách zůstává poměrně velké množství

makromolekul s peroxidázovou aktivitou. Pokud bychom tuto endogenní peroxidázovou aktivitu nezablokovali, přeměňovala by substrát a kosubstrát na hnědou sraženinu stejně, jako křenová peroxidáza použitá pro detekci vazby primární protilátky. Získali bychom tak falešně pozitivní výsledky. Proto preparáty inkubujeme 15 minut v 3% peroxidu vodíku (10 ml 30% peroxid vodíku a 100 ml PBS pufru). Opět po 15 minutách promyjeme PBS pufrem (3x5 minut).

7. Před aplikací primární protilátky se oblast tkáně na histologickém skle vymezí hydrofobním perem kvůli nechtěnému slití protilátky v průběhu inkubace a také její úspoře. Primární protilátky před aplikací ředíme komerčně dodávaným ředícím roztokem od firmy BIO SB (Immunodetector protein blocker/antibody diluent BSB 0114). Napsin A ředíme 1:200, TTF-1 1:100. Skla vkládáme do vlhké komůrky, aby v době inkubace (přes noc, 4 °C v lednici) nedošlo k vyschnutí ředícího roztoku a ke zvýšení koncentrace protilátek (viz. Obr. 23).



Obr. 23 - Řezy s primární protilátkou ve vlhké komůrce (vlastní zdroj).

8. Druhý den ukončíme inkubaci s primární protilátkou, a to ponecháním komůrek při laboratorní teplotě (vyrovnání teploty z lednice), po oteplení opět promýváme PBS pufrem (3x5 minut) a aplikujeme detekční systém

dle návodu (Mouse/ Rabbit PolyDetector DAB/ HRP Detection system) od firmy BIO SB. Jedná se o polymerní detekční systém (na polymeru jsou navázané sekundární protilátky i molekuly peroxidázy).

9. PolyDetector HRP Label – sekundární protilátku necháme s tkání inkubovat 45 minut při laboratorní teplotě a nadbytek promýváme PBS pufrem (3x5 minut).
10. Reakci (vytvořený komplex – primární protilátka, sekundární protilátka, peroxidáza) vizualizujeme chromogenem – DAB pracovním roztokem (50 µl PolyDetector DAB Chromogenu + 1 ml PolyDetector DAB Buffer), který ponecháme na řezu 10 minut a následně důkladně promyjeme tekoucí vodou (3x5 minut).
11. Pro lepší přehlednost a orientaci ve tkáni se dobarvují jádra buněk Harrisovým hematoxylinem. Jaderné antigeny (TTF-1) 5 vteřin – kratší dobu, aby nebyla případná slabší jaderná pozitivita překryta hematoxylinem a cytoplasmatické antigeny (napsin A) 60 vteřin. Poté necháme jádra modrat pod pramenitou vodou.
12. Preparáty přes destilovanou vodu převedeme do vzestupné ethanolové řady, až po 96% ethanol. Projasníme rychlým promytím v acetonu a směsi acetonu s xylenem (1:1) po dobu 2x3 minuty a následně preparáty převedeme do čistého xylenu (2x5 minut).
13. Posledním krokem je zhotovení trvalého preparátu aplikací montovacího média (solakrylu) a krycího skla [36].

Výsledek imunohistochemické detekce exprese proteinů TTF-1 a napsinu A následně zhodnotíme pod světelným mikroskopem.

## 5 VÝSLEDKY

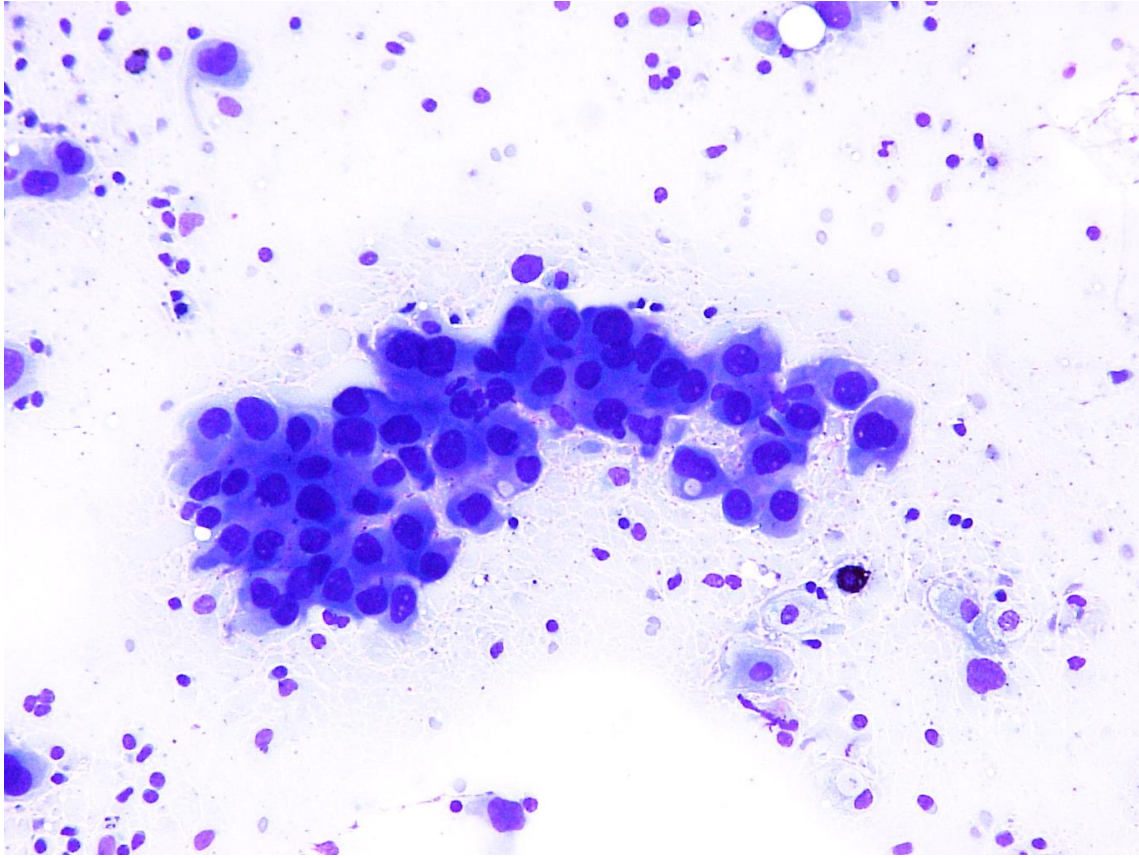
Tato kapitola je zaměřena na fotografie preparátů zachycující patrné rozdíly mezi zdravými a patologickými plícemi postiženými adenokarcinomem. K samotné cytologické detekci nádoru byla využita orientační metoda ROSE s následným dostupným barvením MGG Quick Stain reagensii.

Pro zachycení jednotlivých histologických struktur plic jsme použily barvicí metody Hematoxylin-eosin, AZAN a Orcein unna Tanzer (k průkazu pojivové tkáně) či Alcianová modř (ke znázornění kyselých mukopolysacharidů). Postupy těchto barvení jsou uvedeny v kapitole 4.3.

K prokázání primárně plicního původu nádoru byl zvolen imunohistochemický průkaz jaderného faktoru TTF-1 a cytoplasmatického proteinu napsinu A s využitím specifických mnoklonálních protilátek. Fotografie byly pořízeny na Ústavu histologie a embryologie 1. LF UK mikroskopem značky LEICA DMLB kamerou LEICA MC 170 HD a zaostřeny programem LAS V 4.8.0.

## 5.1 Cytologický průkaz

### Adenokarcinom

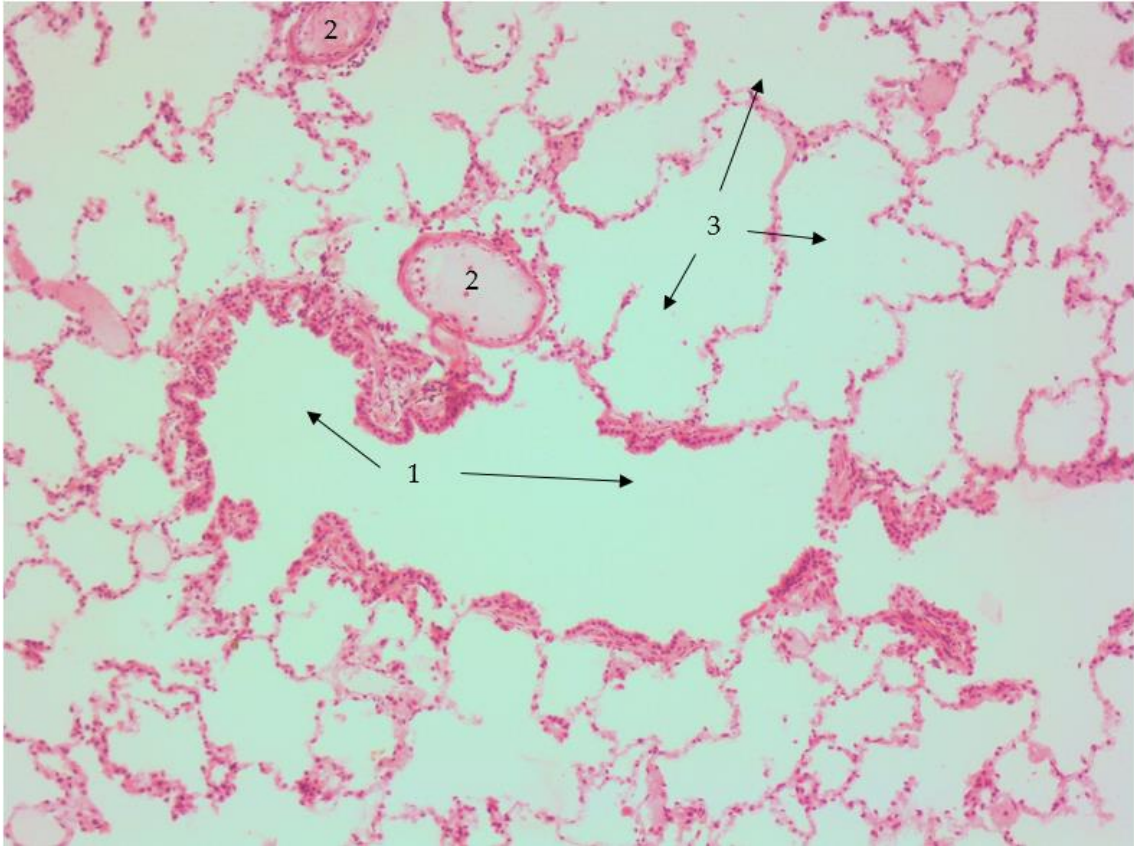


Obr. 24 - Průkaz adenokarcinomu z bronchoskopie, zvětšeno 400x, barvení Diff-Quick (vlastní zdroj).

Na fotografii je patrná morfologie adenokarcinomu. Diagnózu dokazují buňky s excentricky umístěnými hyperchromními nepravidelnými jádry a místy patrnou vakuolizací cytoplasmy. Nátěr byl pořízen ze stěru bronchiální sliznice.

## 5.2 Barvicí metoda hematoxylin-eosin

### Zdravá plíce: terminální bronchiolus

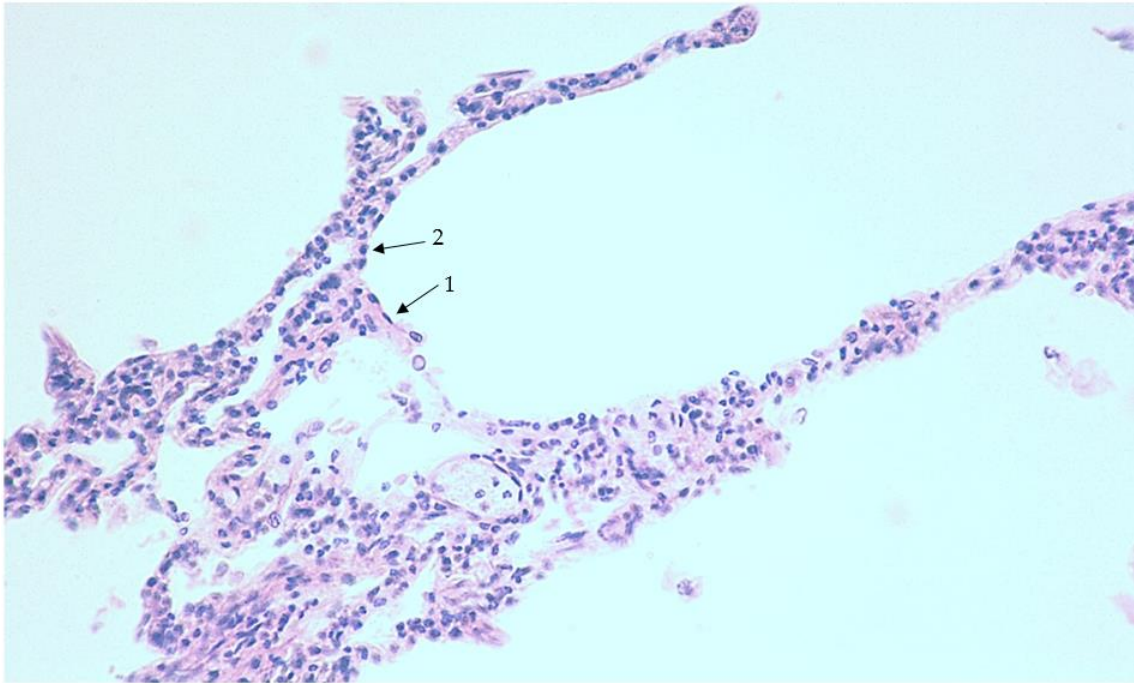


Obr. 25 - Terminální bronchiolus zdravé plíce s průřezem cévy a ductuli alveolares, zvětšeno 100x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj).

1 – Terminální bronchiolus, 2 – průřez cévou, 3 – ductuli alveolares.

Jedna z větví bronchiolu – terminální bronchiolus s jednovrstevným cylindrickým epitelem s řasinkami a Clarovými buňkami obsahujícími sekreční granula s proteiny. Na fotografii je patrná i další vrstva pod epitelem tvořená hladkými svalovými buňkami. Dalším oddílem dýchacích cest je respirační bronchiolus, který přechází do ductuli alveolares s navazujícími alveolárními váčky. Na fotografii jsou zachycené i průřezy cévami se zbytky erytrocytů.

## Zdravá plíce: intraalveolární septum

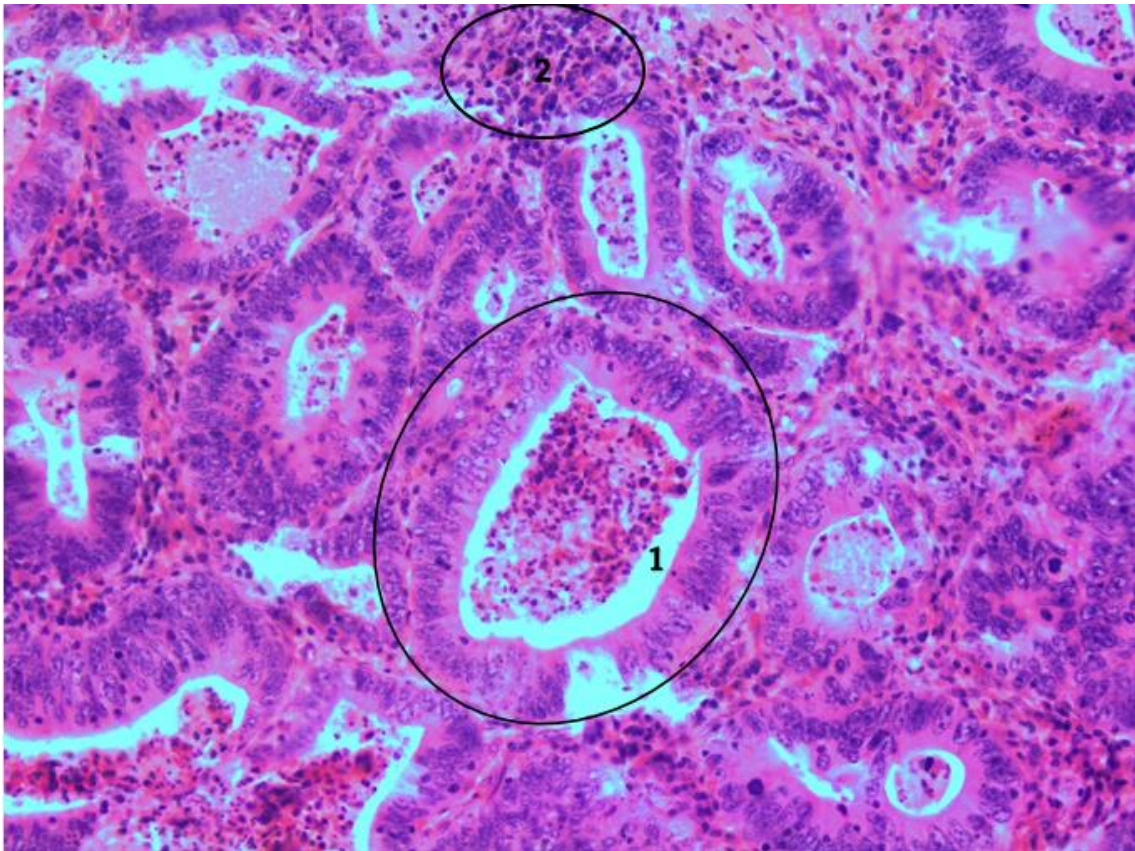


Obr. 26 - Intraalveolární septum tvořené pneumocyty I. a II. typu, zvětšeno 200x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj).

1 – Pneumocyt I. typu, 2 – pneumocyt II. typu.

Oddělení jednotlivých alveol – intraalveolární septa s převažujícími retikulárními a méně zastoupenými elastickými vlákny. Stěna alveolů je tvořena zástupci buněk monocytomakrofágového systému (alveolárních makrofágů), dále pneumocyty I. typu (ploché buňky) tvořícími hemo-respirační bariéru a pneumocyty II. typu s kubickým, až oválným tvarem vylučující surfaktant.

## Acinární adenokarcinom



Obr. 27 - Acinární adenokarcinom, zvětšeno 200x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj).

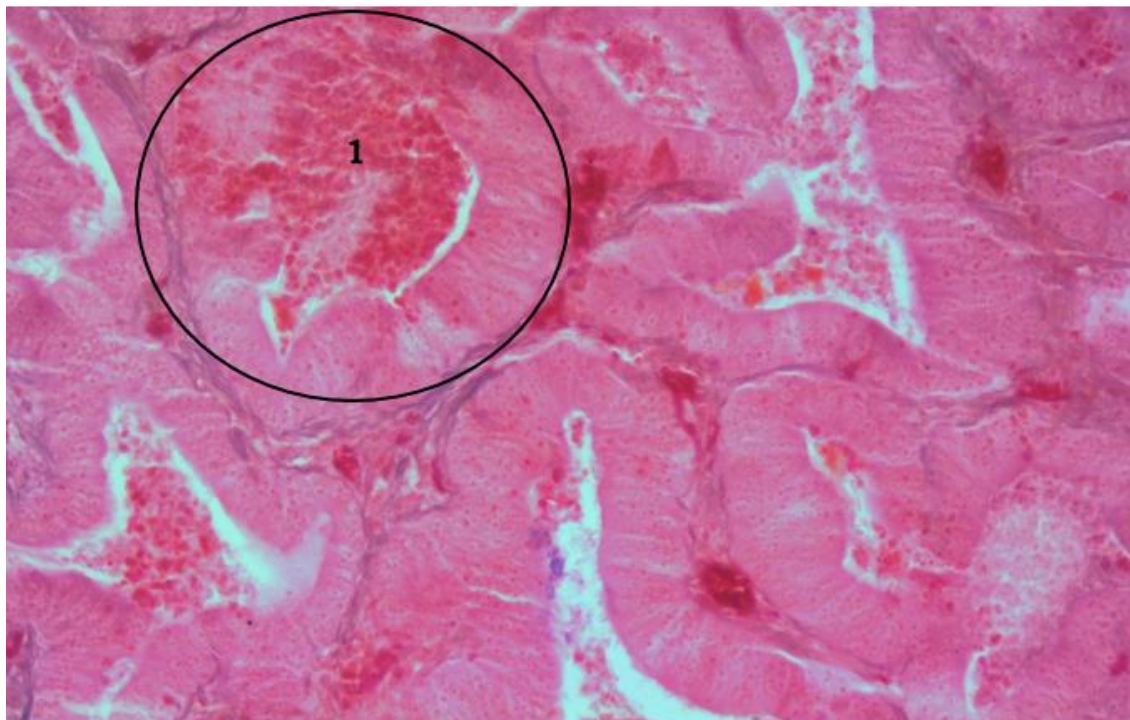
1 – V centru acinární struktury nádorového původu přítomna nekrotická debris tvořená neutrofilními granulocyty a udumřelými buňkami, 2 – nádorové stroma s lymfocytární infiltrací.

Acinární adenokarcinom tvoří žlázové a kribriformní (síťovité) struktury s podobou acinů. Nádorové buňky jsou kubické až cylindrické s eosinofilní cytoplasmou a atypickými hyperchromními jádry, s místy patrnými jadérky.



## 5.3 Barvicí metoda AZAN

### Acinární adenokarcinom



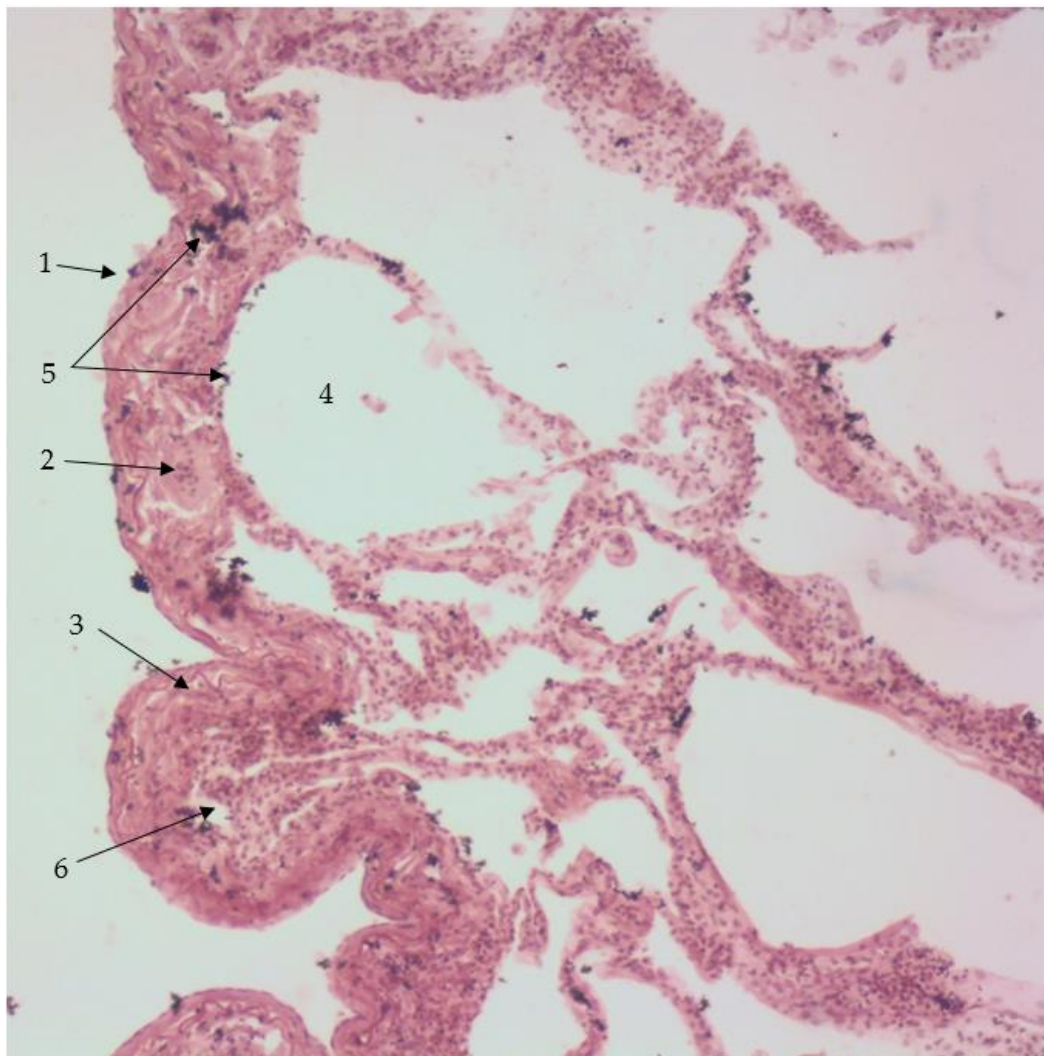
Obr. 28 - Acinární adenokarcinom, zvětšeno 200x, barvení AZAN (vlastní zdroj).

1 – Nekrotická debris v centru lumina nádorových struktur, tvořená neutrofily a odumřelými buňkami.

Pro znázornění pojivové tkáně byla zvolena metoda AZAN. Jádra buněk se obarvila karmínově červeně, erythrocyty oranžovo červeně, kolagenní vazivo modře a svalovina červeně. Nádorové stroma je v tomto případě tvořené minimálním množstvím kolagenních vláken.

## 5.4 Barvicí metoda Orcein unna Tanzer

### Detail pleury



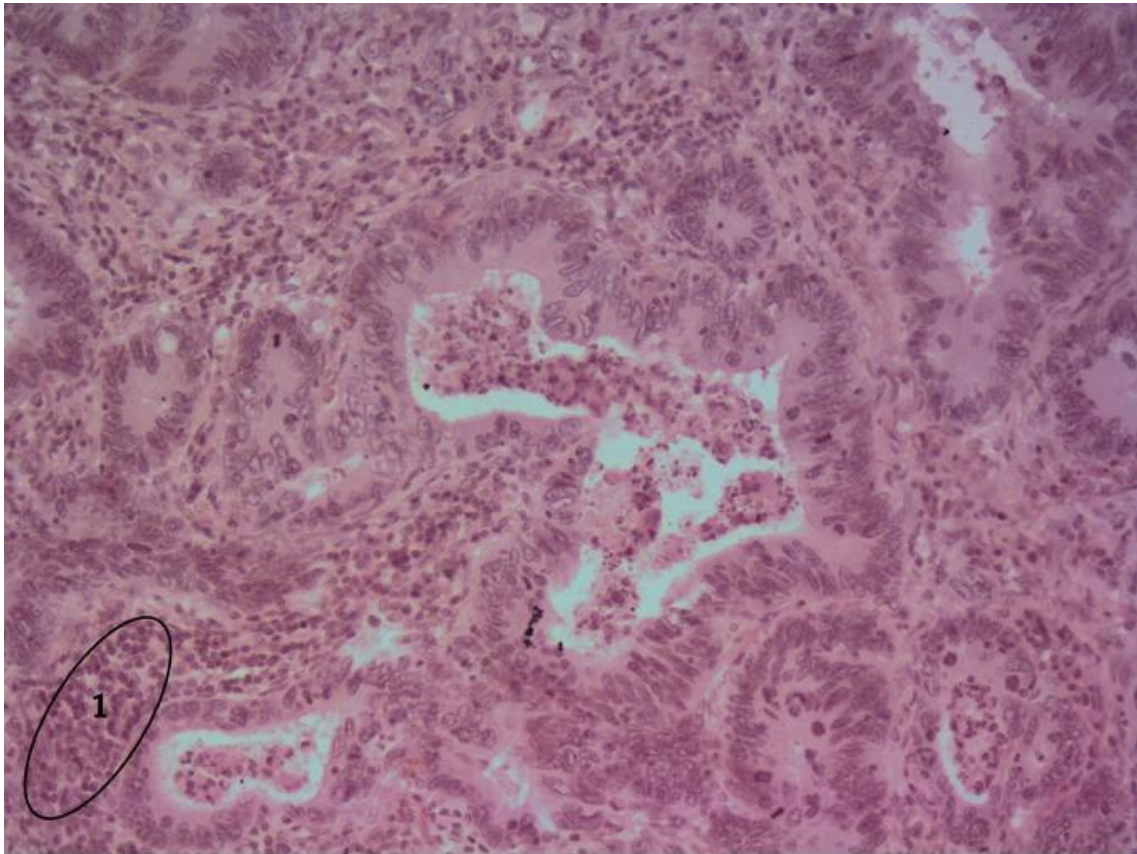
Obr. 29 - Pleura, zvětšeno 100x, barvení Orcein unna Tanzer (vlastní zdroj).

1 – Mezotel, 2 – céva, 3 – elastická vlákna, 4 – alveolus, 5 – koniofágy, 6 – lymfatická céva.

Znázorněním pojivových tkání je zde patrná struktura pleury jako tenké serózní blány na povrchu plic, která je v přímém kontaktu s plicním parenchymem. Orcein unna Tanzer barví jádra buněk modře, elastická vlákna sytě hnědočerveně, kolagen modrozeleně a erytrocyty a svalová vlákna žlutě.

Pleura je vystlána mezotelem produkujícím pleurální tekutinu. Vazivo obsahuje bohatá kolagenní a elastická vlákna s krevními a lymfatickými cévami. Na fotografii jsou patrné také koniofágy - prашné buňky, obarvené černě.

### Acinární adenokarcinom



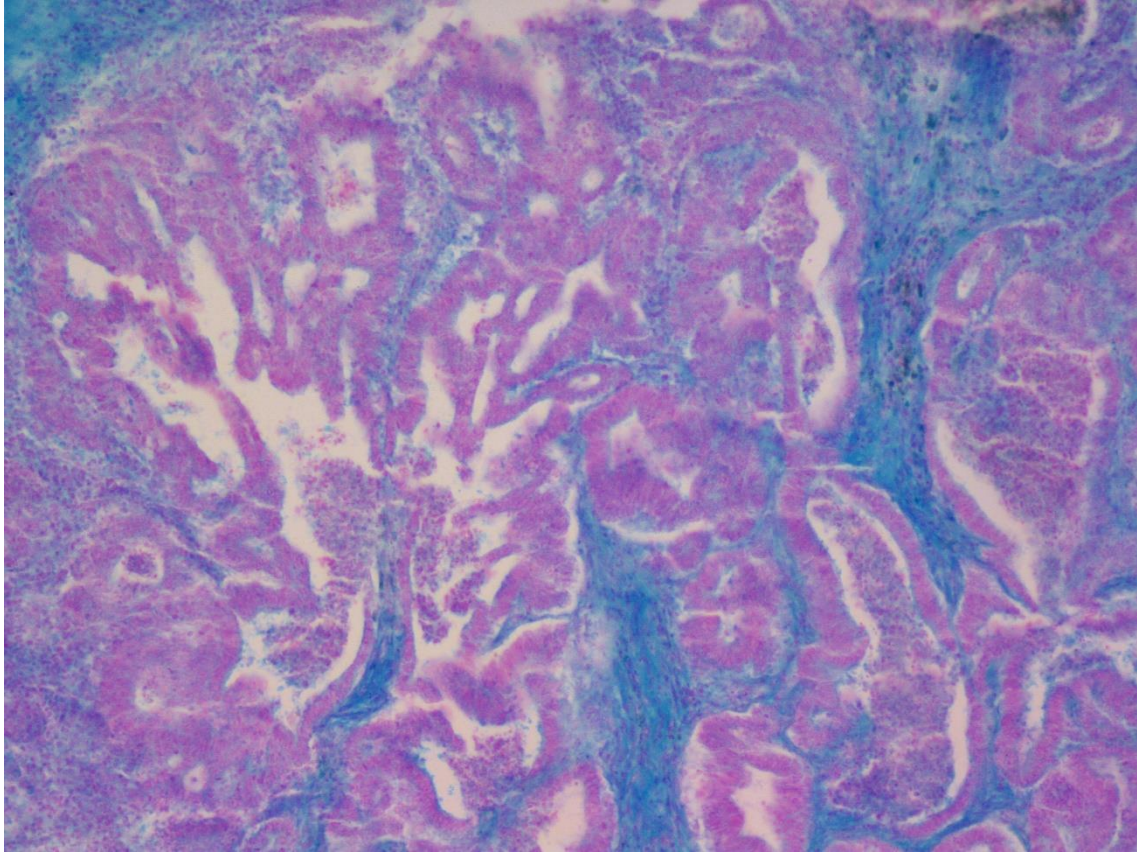
Obr. 30 - Acinární adenokarcinom, zvětšeno 200x, barvení Orcein unna Tanzer (vlastní zdroj).

1 – Lymfocytární celulizace.

Na preparátu je patrná absence elastických vláken v nádorovém stromatu, kde lze zachytit kolagenní vazivo (viz barvení AZAN) a lymfocytární celulizaci.

## 5.5 Barvicí metoda Alciánová modř

### Acinární adenokarcinom

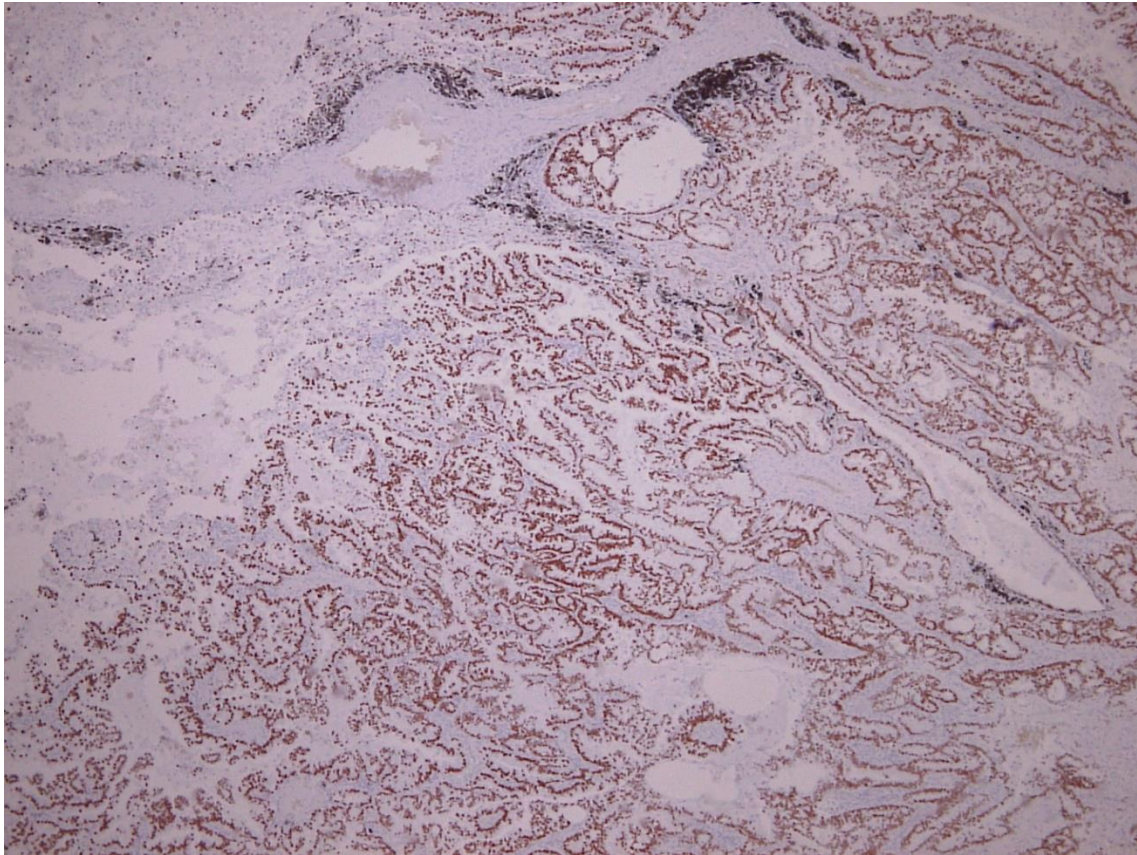


Obr. 31 - Acinární adenokarcinom, zvětšení 100x, barvení Alciánová modř (vlastní zdroj).

K průkazu kyselých mukopolysacharidů ve tkáni se využila metoda Alciánové modře. Jádra buněk jsou červená a kyselé mukopolysacharidy se znázorní modrozeleně.

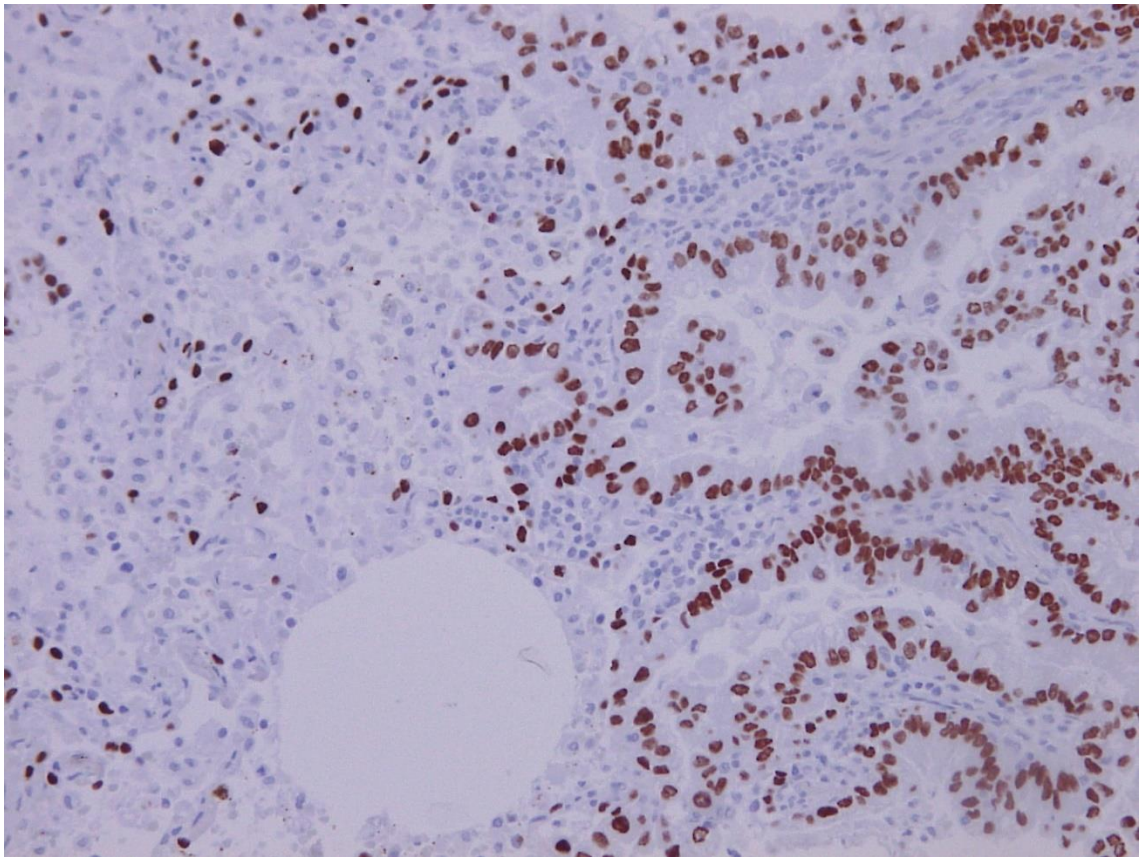
## 5.6 Imunohistochemický průkaz

**Průkaz jaderného faktoru TTF-1 (Tyreoidálního Transkripčního Faktoru- 1) v adenokarcinomu primárně plicního původu**



Obr. 32 - Acinární adenokarcinom, zvětšení 40x, barvení TTF-1 (vlastní zdroj).

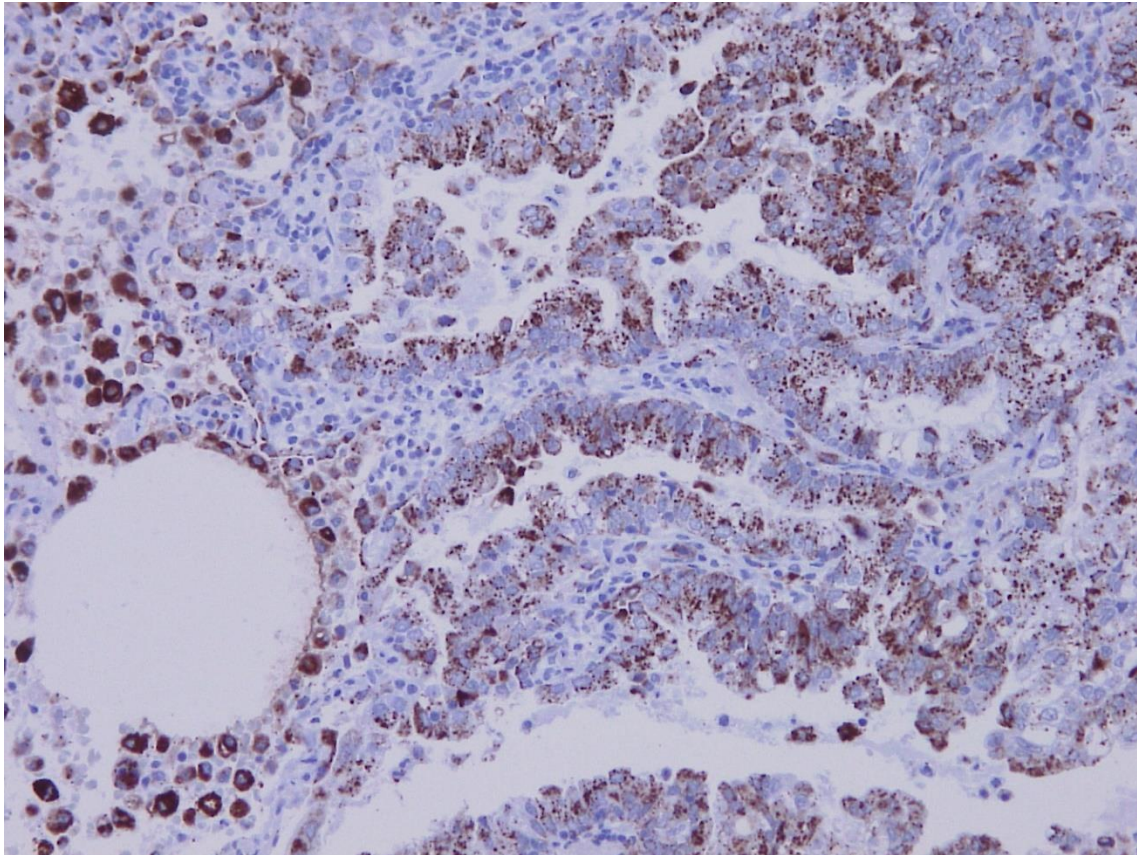
Acinární adenokarcinom s difúzní silnou jadernou pozitivitou průkazu TTF-1. V okraji nádoru je patrné intersticiium tvořené řídkým kolagenním vazivem s cévou a antrakotickou pigmentací.



Obr. 33 – Acinární adenokarcinom – detail, zvětšeno 200x, barvení TTF-1 (vlastní zdroj).

Patrná je jaderná pozitivita nádorových buněk v průkazu TTF-1 a přechod do nepostíženého plicního parenchymu, kde se barví jádra pneumocytů II. typu (což slouží jako pozitivní vnitřní kontrola proběhlé imunohistochemické reakce).

## Průkaz cytoplasmatického proteinu napsinu A



Obr. 34 - Acinární adenokarcinom, zvětšeno 200x, průkaz napsinu A (vlastní zdroj).

Pozitivita nádorových buněk je patrná jako difuzní granulární cytoplasmatická pozitivita. V levé části obrázku lze pozorovat úsek plicního parenchymu bez nádoru se silnou cytoplasmatickou pozitivitou alveolárních makrofágů (pozitivní vnitřní kontrola proběhlé imunohistochemické reakce s protilátkou proti napsinu A)

## 6 DISKUZE

Hlavním cílem bakalářské práce je demonstrovat přehled nejen laboratorních metod, ale i základních postupů potřebných k diagnostice plicního nádoru. Mezi základní postupy patří rentgenový snímek hrudníku. Ten nemusí odhalit, že pacient tímto onemocněním trpí. V dnešní době se stávají dominantní jiné zobrazovací techniky jako počítačová tomografie (CT), z přehledových metod pozitronová emisní tomografie s výpočetní tomografií (PET-CT). Díky těmto technikám se podaří odhalit nádor v plicích a vyjádřit se k případnému šíření do okolních struktur, přičemž jistou nevýhodou je radiologická zátěž pacienta. Mezi finančně i časově náročná vyšetření se řadí magnetická rezonance, a proto není na každém pracovišti k dispozici, i když přináší mnohé výhody (vysoké rozlišení či pořízení kvalitního 3D obrazu požadovaného orgánu a další).

Zrádnost rakoviny plic je v tom, že se v časných stádiích většinou neprojeví a proto bývají časná stadia diagnostikována spíše jako náhodný nález např. u pacientů, kteří se chystají na plánovaný chirurgický výkon, a je jim proveden skiagram hrudníku nebo se může jednat o pacienty po úraze, kteří se tak náhodně dostanou do nemocnice a je jim provedeno důkladné vyšetření. Pacient by se v sebemenším podezření měl nechat vyšetřit, jelikož diagnostika není jednoduchá.

Souvislost kouření se vznikem rakoviny plic je k nalezení v mnoha odborných publikacích či člancích a dostala se do povědomí i široké veřejnosti. Dává se v nich do silného vztahu kouření se všemi histologickými subtypy – adenokarcinomem, dlaždicobuněčným karcinomem, malobuněčným či velkobuněčným karcinomem. Nejsilnější spojitost se však začíná prokazovat v průběhu let u dlaždicobuněčného typu karcinomu a malobuněčného karcinomu plic. Oproti tomu u pacientů bez závislosti na tabákových výrobcích byl prokázán ve většině případů adenokarcinom s odlišnou incidencí u mužů a u žen. U kuřáků je navíc pravděpodobné, že onemocní ještě jinou nemocí, než je karcinom plic. Jedná se o chronickou



obstrukční plicní nemoc, a proto se u této rizikové skupiny lidí doporučuje v rámci prevence docházet na pravidelné kontroly (skiagram hrudníku a funkční vyšetření plic spirometrií) ve věku nad 50 let. Toto doporučení platí i pro osoby v riziku expozice rakovinotvorných látek a osoby s familiárním výskytem nádoru plic.

V ČR se z finančních důvodů neprovádí screeningová vyšetření pro včasný záchyt zhoubného novotvaru. Byly však provedeny zahraniční studie s nižší dávkou radiologického záření pro detekci rakoviny plic v nižších stádiích, ale zatím nebyl prokázán časnější záchyt.

Mezi další diagnostické postupy karcinomu plic patří endoskopické vyšetření dýchacího systému, kam se řadí bronchoskopie s odběry z místa patologické léze, ke které se přistupuje na základě výsledků zobrazovacích metod. Každá diagnóza plicní rakoviny musí být podložena mikromorfologickým průkazem (odběrem a vyšetřením v laboratoři, případně přímo na bronchoskopickém sále). Cytologická diagnostika se opírá o vyšetřování nátěrů (aspiračních, případně stěrů z bronchu), punkcí lymfatických uzlin či otisky excizií, jinými technikami se zpracovává materiál z pleurálního výpotku nebo bronchoalveolární tekutiny. Vyšetření umožňuje nejen odebrat materiál k cytologickému hodnocení, zároveň se přítomnost a typ nádoru v průduškách hodnotí také vyšetřením histologickým. Pro účely bakalářské práce byl vybrán pacient, kterému se na základě předchozích vyšetření indikoval bronchoskopický zákrok za kontroly EBUS a nátěr se následně obarvil dostupným barvením MGG Quick Stain (viz Obr. 24). Tento materiál byl posouzen cytopatologem přímo na bronchoskopickém sále metodou ROSE a byla prokázána typická morfologie adenokarcinomu (buňky s vakuolizovanou cytoplasmou, nepravidelnými a excentricky uloženými jádry). Zbylá část odebraného materiálu byla zaslána do cytologické laboratoře, kde byl zhotoven cytoblock a parafínový řez následně obarven metodou May-Grünwald Giemsa Romanowski. Zmíněný bronchoskopický odběr mi pomohl ke splnění jednoho z dílčích úkolů pro splnění hlavního cíle práce.

Obor patologie se řadí k základním pilířům lékařských oborů. V minulosti tento obor dominoval spíše pitevní technikou a pitvami zemřelých. V současné době se zaměřuje na vyšetřování živých nemocných. Patologická oblast klasifikace nádorů plic zaznamenává v poslední době prudký rozvoj a to zejména ve skupině nemalobuněčných karcinomů. Změny jsou podmíněny stále se rozšiřujícími možnostmi morfologického zařazení do jednotlivých subtypů nemalobuněčných karcinomů především díky imunohistochemickým metodám. Dále se přikládá větší akcent na molekulární podstatu nádorů (aktivační mutace genu EGFR, přestavby genu ALK). Jelikož se jedná o obtížně diagnostikovatelný typ nádoru, ne vždy chirurgicky odstranitelný a v mnoha případech s ne příliš příznivou prognózou, neobejdeme se v budoucnu bez využití dalších modalit pro zpřesnění výsledků bioptických vyšetření. Je to zejména terapeuticko-indikační diagnostika prostřednictvím bioptických preparátů, která napomáhá cílené léčbě nemocných. Bez kvalitního bioptického vyšetření není ve většině případů možné léčbu vůbec zahájit a patologie se tak stává významnou diagnostickou složkou, která rozvíjí možnosti cíleně léčit pacienty.

Histologická vyšetření tkání, orgánů a dalšího biologického materiálu nezbytnou součástí diagnostického algoritmu jakéhokoli nádorového onemocnění. Nejedná se jen o odběr klasické biopsie (ať technikami chirurgickými či endoskopickými), určující typ a rozsah nádoru, ale nedocenitelný je též význam peroperačních biopsií, ovlivňujících průběh operačního výkonu jako takého. Materiál pro histologické vyšetření se zpracovává klasickou formol-parafinovou technikou, v současné době již za značného využití automatizace (autotechnikony, barvicí a lepicích automaty) s výhodami standardizace a rychlosti přípravy parafinových bločků. Ty se následně krájí a řezy o síle 1 – 3 mikrometrů se kladou na podložní sklo. Pro zviditelnění jednotlivých ultrastruktur tkáně se řezy kontrastují, aby se daly mikroskopicky hodnotit. Jejich zpracování může trvat i několik dní, a proto se mnohdy lékařská zpráva dostane k pacientovi během jednoho (u obtížněji diagnostikovatelných případů i více) týdnů.

Vedle základní barvicí metody – Hematoxylin-eosin se využívá další řada barvicích technik, které napomáhají v detekci určitých tkáňových a buněčných komponent (AZAN, Orcein unna Tanzer a Alciánová modř). Postupy těchto metod jsou dané návodem, nicméně každá laboratoř si postup metody modifikuje podle svých interních podmínek. Úprava se týká zejména časových intervalů jednotlivých kroků.

Metoda Hematoxylin-eosin se řadí nejen mezi základní metody, ale i mezi přehledná barvení, kterým se barví všechny připravené histologické řezy zejména kvůli výraznému barevnému kontrastu. Doba barvení se odvíjí od druhu hematoxylinu, druhu tkáně a také na doby fixace. Výsledkem barvení jsou jádra buněk a chrupavka do modra, kolagenní vazivo do odstínů růžové, svalovina se obarví červeně a erythrocyty oranžovo-červeně. Na Obr. 25 a Obr. 26 jsou sledovány struktury typické pro zdravé plicé, kdežto na Obr. 27 můžeme porovnat struktury již typické pro acinární typ adenokarcinomu.

Jedna ze speciálních barvicích metod (AZAN) se využívá jako technika pro znázornění kolagenních vláken. Ve zdravých plicích nacházíme kolagenní vlákna zejména v intraalveolárních septech. Tímto barvením jsme prokázali, že nádorové stroma je v některých případech tvořeno minimálním množstvím kolagenního vaziva, jinak zbarveného do modré barvy (viz Obr. 28).

Stejně jako v případě metody AZAN, i metoda Orcein unna Tanzer se řadí mezi speciální barvicí metody, znázorňující elastická vlákna do sytě hnědočervené barvy. Na elastická vlákna je bohatá např. pleura (viz Obr. 29). V nádorem změněné tkáni jsme touto metodou prokázali absenci elastických vláken oproti vláknům kolagenním, které byly méně patrné v případě barvení metodou AZAN (viz Obr. 30).

Poslední využitá barvicí metoda (Alciánová modř) slouží k průkazu kyselých mukopolysacharidů. Adenokarcinom plic je nádor, vycházející ze žlázového epitelu plic. Jeho součástí jsou pohárkové buňky, produkující kyselé mukopolysacharidy. Modro-zeleným kontrastem (viz Obr. 31) jsme prokázali, že produkce hlenu zůstala v tomto případě zachována.

Diagnóza by nebyla kompletní bez imunohistochemického průkazu, díky kterému zjistíme nejen původ nádorové populace buněk, kterou dále specifikujeme, ale napomáhá především k diferenciaci primárního a metastatického procesu. Nádorová populace nemusí být dostatečně diferencovaná a pouhým přehledným barvením tak není vždy zařaditelná. Imunohistochemie umožňuje in situ identifikaci antigenních částí buněk či tkáňových struktur technikou využívající monoklonální nebo polyklonální protilátky. V našem případě jsme využili monoklonální protilátky anti-TTF-1 (klon SPT24; izotyp IgG1, kappa; ZYTOMED SYSTEMS) a anti-napsin A (klon IP64; izotyp IgG2b; Novocastra) k průkazu primárního původu nádoru. Prokázaný imunofenotyp (exprese jaderného faktoru TTF-1 (viz Obr. 32, Obr. 33) a cytoplasmatického proteinu napsinu A (viz Obr. 34) svědčí pro primárně plicní původ nádoru. I přes vysokou cenu se imunohistochemické metody využívají ve většině histologických laboratoří České republiky a pomáhají tak v indikaci nových cílených terapií pomocí humanizovaných protilátek.

Posledním krokem k doplnění diagnózy plicního adenokarcinomu je molekulárně-patologická část, prokazující přítomnost či nepřítomnost mutace v receptoru EGFR (jež reguluje množení a apoptózu buněk, ale také angiogenezi nádoru) nezbytnou k zahájení léčby inhibitory tyrosinkináz či přestavbu v genu ALK, která vede k aktivaci signální dráhy a rozvoji plicního karcinomu. Vyšetření těchto přestaveb je nad rámec této práce a proto bych v navazující části studia chtěla v této práci pokračovat. Konkrétně by se jednalo o zjišťování prognostického

či prediktivního významu zvýšeného počtu kopií v genu ALK u pacientů s plicním adenokarcinomem, kteří mají fyziologický počet kopií genu EGFR.

Časná diagnostika rakoviny plic z krve zatím není rutinně možná, i když se touto cestou ubírá výzkum na poli této problematiky. V současné době se dynamika určitých onkomarkerů (např. CEA, CYFRA-21-1, viz kapitola 2.4.3) v krvi sleduje zejména pro kontrolu účinnosti léčby.

## 7 ZÁVĚR

Tato práce s názvem „ Histologická stavba zdravé plíce v porovnání s patologickým obrazem adenokarcinomu“ podává přehled nejen laboratorních metod potřebných k diagnostice plicního adenokarcinomu. Zároveň se problematika tohoto onemocnění stává hlavním cílem práce.

Hlavní cíl by nebylo možné splnit bez vytyčených dílčích úkolů. Základem bylo se seznámit s histologií plic a plicního parenchymu a vhodně zvolit barvicí techniky potřebné pro následné porovnání obrazu adenokarcinomu se zdravou plicní tkání. Zřetelný rozdíl mezi morfologií zdravých a patologických plic demonstrují pořízené fotografie ze světelného mikroskopu v kapitole Výsledky.

Důležitý přínos v celém vyšetřovacím algoritmu má rovněž cytologická diagnostika. Na základě provedené bronchoskopie se přistoupilo u konkrétního vybraného pacienta k resekci plicní tkáně, která se kontrastovala vhodně zvolenými barvicími metodami.

Do kompletní diagnostické problematiky se zcela zásadním způsobem začleňuje imunohistochemické vyšetření umožňující bližší specifikaci typu nádoru a v některých případech ovlivňující výběr léčebného protokolu.

Kontrola účinnosti léčby se neobejde bez biochemických testů z krve pacienta, kdy se sleduje dynamika charakteristických nádorových markerů.

Tato práce proto může sloužit ke studiu nejen fyziologického vzhledu plicní tkáně, ale zejména by měla poskytnout návod pro laboratorní diagnostiku plicního adenokarcinomu.

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

C6	označení pro jeden ze sedmi krčních obratlů (vertebrae cervicales)
ACTH	adrenokortikotropní hormon
ADH	antidiuretický hormon
ALK	Anaplastický Lymfom Kinázy
ATS	American Thoracic Society
BALT	bronchus associated lymphoid tissue
CEA	karcinoembryonální antigen
CNS	centrální nervový systém
CRP	C-reaktivní protein
CT	computer tomography (počítačová tomografie)
DAB+	3,3 - diaminobenzidin
DIPNECH	difuzní idiopatická plicní hyperplazie neuroendokrinních buněk
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DNES	buňky Difúzního Neuroendokrinního Systému
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	epidermal factor growth receptor (receptor epidermálního růstového faktoru)
ERS	European Respiratory Society
FISH	Fluorescent In Situ Hybridisation
GTP	guanosintrifosfát
HGFR	Hepatocyte Growth Factor Receptor
HRP	HorseRadish Peroxidase
IASLC	International Association for the study of Lung Cancer
K-ras	Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog
MRI	magnetic resonance imaging (magnetická rezonance)
NSCLC	non-small cell carcinoma (nemalobuněčný karcinom plic)

PAS	Periodic Acid Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
pCO <sub>2</sub>	parciální tlak oxidu uhličitého
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
pO <sub>2</sub>	parciální tlak kyslíku
PTHrP	parathyroid hormon related protein (protein podobný parathormonu)
ROS-1	gen, kódující Proto-oncogene tyrosine-protein kinase (ROS)
ROSE	Rapid On Site Evaluation
SCLC	small cell carcinoma of the lung (malobuněčný karcinom plic)
TGF- $\alpha$	transformující růstový faktor
Th 4 – 5	označení pro hrudní obratle (vertebrae thoracicae)
TTF-1	Thyreoidní Transkripční Faktor
WHO	World Health Organization (Světová zdravotnická organizace)



## 9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. 1.vyd. Praha: Grada, 2009. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [2] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 2. 3.* Grada Publishing, a.s., 2013. ISBN 978-80-247-4788-0.
- [3] LULLMAN- RAUCH, Renate. *Histologie*. 2011. Praha: Grada, b.r. ISBN 978-80-247-3729-4.
- [4] KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie. 2.* Jinočany: H&H, 2000. ISBN 80-86022-80-3.
- [5] BALKO, Jan, Radovan HUDÁK a Zbyněk TONAR. *Memorix histologie. 1.* Praha: Triton, 2016. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [6] MALÍNSKÝ, Jiří, Václav LICHNOVSKÝ a Zdeňka MICHALÍKOVÁ. *Přehled histologie člověka v obrazech II. díl. 2.* Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2009. ISBN 978-80-244-2277-0.
- [7] TROJAN, Stanislav. *Lékařská fyziologie. 4.* Praha: Grada Publishing, a.s., 2003. ISBN 80-247-0512-5.
- [8] MAČÁK, Jiří a Jana MAČÁKOVÁ. *Patologie. 2.* doplněné vydání. Praha 7: Grada Publishing, a.s., 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.

- [9] STŘÍTESKÝ, Jan. *Patologie: Učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium*. 1. Epava, 2001. ISBN 978-80-86297-06-4.
- [10] KLEIN, Jiří. *Chirurgie karcinomu plic*. 1. vydání. Praha 7: Grada Publishing, a.s., 2006. ISBN 80-247-1384-5.
- [11] HRNČIARIK, Michal, Helena HORNYCHOVÁ a Michal JIROUŠEK. Diagnostika bronchogenního karcinomu. *Postgraduální medicína: Pneumoonkologie*. Praha 4, 2016, **18**(1), 6-14.
- [12] SKŘIČKOVÁ, Jana a Bohdan KADLEC. Příznaky a rizika karcinomu plic. *Medicína pro praxi*. Brno, 2014, **2014**(111), 30-33.
- [13] SKŘIČKOVÁ, Jana, Bohdan KADLEC a Ondřej VENCLÍČEK. Paraneoplastické projevy u karcinomu plic. *Postgraduální medicína: Postižení plic u systémových onemocnění a plicní nemoci se systémovými projevy*. Praha 4: Mladá fronta a.s., 2017, **19**(2), 16-21. ISSN 1212-4184.
- [14] ZATLOUKAL, Petr a Luboš PETRUŽELKA. *Karcinom plic*. 1.vydání. Praha: Grada Publishing, spol. s.r.o., 2001. ISBN 80-7169-819-9.
- [15] KOLEK, Vítězslav. *Doporučené postupy v pneumologii*. 2. doplněné vydání. Praha 4: Maxdorf s.r.o., 2016. ISBN 978-80-7345-507-1.
- [16] TRAVIS, William, E. BRAMBILLA a H.K. MULLER-HEMERLINK. *World Health Organization Classification of Tumours.: Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 2nd ed. Lyon: IARC Press, 2004. ISBN 92-832-2418-3.

- [17] TRAVIS, William a Elisabeth BRAMBILLA. *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. 4th edition. France: International Agency for Research on Cancer, 2015. ISBN 978-92-832-2436-5.
- [18] *Novotvary 2015 ČR: Zhoubný novotvar plic* [online]. Praha 2: Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, 2015 [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/category/tematicke-rady/zdravotnicka-statistika/novotvary>
- [19] *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice: věková struktura pacientů se ZN průdušek, bronchů a plic* [online]. Brno: Institut biostatistiky a analýz Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, Masarykův onkologický ústav v Brně, 2015 [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: <http://svod.cz/prehled.php#>
- [20] ŠKARDA, J. a T. TICHÝ. Novinky v klasifikaci adenokarcinomů plic a potenciální prognostické a prediktivní faktory u nemalobuněčných plicních karcinomů. *Česko - slovenská patologie* [online]. Olomouc, 2011, 47(4), 168-172 [cit. 2017-10-29]. ISSN 1803-6597. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/cesko-slovenska-patologie-clanek/novinky-v-klasifikaci-adenokarcinomu-plic-a-potencialni-prognosticke-a-prediktivni-faktory-u-nemalobunecnych-37221>
- [21] PEŠEK, Miloš. Nová WHO klasifikace nádorů plic. *Onkologie* [online]. Olomouc: Solen, s.r.o., 2016, 10(1), 20-24 [cit. 2017-10-29]. ISSN 1803-5345. Dostupné z: [https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201601-0002\\_Nova\\_WHO\\_klasifikace\\_nadoru\\_plic.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DNov%25E1%2BWHO%2Bklasifikace%2Bplicn%25EDch%2Bn%25E1dor%25F9%26sfrom%3D0%26spage%3D30](https://www.onkologiecs.cz/artkey/xon-201601-0002_Nova_WHO_klasifikace_nadoru_plic.php?back=%2Fsearch.php%3Fquery%3DNov%25E1%2BWHO%2Bklasifikace%2Bplicn%25EDch%2Bn%25E1dor%25F9%26sfrom%3D0%26spage%3D30)

- [22] POVÝŠIL, Ctibor. *Speciální patologie*. 2. Galén, 2007. ISBN 9788072624942.
- [23] SKŘIČKOVÁ, Jana, Ondřej VENCLÍČEK a Bohdan KADLEC. Nemalobuněčný karcinom plic. *Postgraduální medicína: Pneumoonkologie*. Praha 4: Mladá fronta a.s., 2016, **18**(1), 21-27. ISSN 1212-4184.
- [24] VAŠÁKOVÁ, Martina. *Bronchologie a pneumologická cytodiagnostika*. 1. Praha 4: Maxdorf s.r.o., 2017. ISBN 978-80-7345-533-0.
- [25] FLETCHER, Christopher. *Diagnostic histopathology of tumors*. 4th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013. ISBN 978-1-4377-1534-7.
- [26] ROSAI, Juan. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology*. 10th edition. Mosby: Elsevier, 2011. ISBN 9780323248662.
- [27] Cytologie dýchacích cest. *Eurocytology* [online]. London: International Academy of Cytology, 2015 [cit. 2018-02-12]. Dostupné z: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/820>
- [28] KOBILKOVÁ, Jitka a Jaroslava DUŠKOVÁ. *Základy cytopatologie: Část II. Negynekologická cytopatologie*. 1. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1143-0.
- [29] VALÍK, D., T. ZIMA a M. NEKULOVÁ. Doporučení k využití nádorových markerů v klinické praxi. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2014, **22**(1), 22-39 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2014/2014-1/KBM-2014-1-Dopor-TM-22.pdf>

- [30] JIRKOVSKÁ, Marie. *Histologická technika: Pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 1. Praha 5: Galén, 2006. ISBN 80-72-62-263-3.
- [31] SOP - *Cytologické vyšetření a diagnostika pro Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol*. Ústav patologie a molekulární medicíny 2.LF a FN Motol, 2017.
- [32] DUNDR, Pavel a Helena HORNYCHOVÁ. *Doporučený postup pro histologické vyšetření karcinomu plic* [online]. 1. Praha 2: Společnost českých patoložů ČLS JEP, 2013, 1(1) [cit. 2018-02-05]. Dostupné z: <http://patologie.info/standardy/21>
- [33] SOP *Histologické vyšetření tkání a diagnostika pro Ústav patologie a molekulární medicíny 2.LF UK a FN Motol*. Ústav patologie a molekulární medicíny 2.LF a FN Motol, Vladimíra Kratinová, 2017.
- [34] DVOŘÁK, Karel, Zdeňka DVOŘÁKOVÁ a Josef FEJT. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod*. Brno, 2008. Dostupné také z: [https://is.muni.cz/el/1411/jaro2016/BLKHM0422c/um/Zaklady\\_histopatologicky\\_vysetrovacich\\_metod.pdf](https://is.muni.cz/el/1411/jaro2016/BLKHM0422c/um/Zaklady_histopatologicky_vysetrovacich_metod.pdf)
- [35] BERANOVÁ, PhD., a Mgr. TONAR. *Principy a příklady imunohistochemie: Příručka pro studenty*. Ústav embryologie LF UK v Plzni, 2002. Dostupné také z: [http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc\\_hi\\_res.pdf](http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf)
- [36] SOP *Imunohistochemické vyšetření exprese makromolekul in situ v histochemickém řezu pro Ústav patologie a molekulární medicíny 2. LF UK a FN Motol*. Ústav patologie a molekulární medicíny 2.LF UK a FN Motol, Praha, Vladimíra Kratinová, 2017.

[37] TTF-1 a napsin. *PathologyOutlines.com: find pathology information fast* [online]. Michigan (USA): Armed Forces Institute of Pathology, 2015 [cit. 2018-01-31]. Dostupné z: <http://www.pathologyoutlines.com/stains.html>

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obr. 1 - Stavba plic (vlastní zdroj).....	17
Obr. 2 - Průběh plicních segmentů a mezilalokových rýh u pravé a levé plíce (vlastní zdroj).....	17
Obr. 3 - Víceřadý epitel s řasinkami u terminálního bronchiolu, zvětšeno 40x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj). ....	20
Obr. 4 - Hemo-respirační bariéra, zvětšeno 20x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj).....	27
Obr. 5 - Vývoj standardizované incidence a úmrtnosti na zhoubný nádor průdušek a plic u mužů a u žen (na 100 000 mužů/žen, evropský standard) v ČR [18].....	35
Obr. 6 - Věková struktura pacientů se zhoubným nádorem bronchu a plíce za období 1977 - 2015 v ČR [19]. ....	35
Obr. 7 - Přehled správného vyšetřovacího algoritmu (vlastní zdroj). ....	42
Obr. 8 - Scintigrafie hrudníku (zdroj FN Motol). ....	44
Obr. 9 - Rychle dostupné barvení s třemi roztoky MGG Quick Stain a destilovanou vodou (vlastní zdroj).....	53
Obr. 10 - Aplikace biologického materiálu z punkční jehly do kazetky cytoblocku a následné zakápnutí Reagentem 2 (vlastní zdroj).....	55
Obr. 11 - Autotechnikon (vlastní zdroj).....	58
Obr. 12 - Parafínová zalévací linka (vlastní zdroj).....	59
Obr. 13 - Sáňkový mikrotom (vlastní zdroj).....	60
Obr. 14 - 1. fáze – DEPARAFINACE (vlastní zdroj).....	63
Obr. 15 - 2. fáze - VLASTNÍ BARVENÍ (1. část), (vlastní zdroj).....	63
Obr. 16 - 2. fáze - VLASTNÍ BARVENÍ (2. část), (vlastní zdroj). ....	63
Obr. 17 - 3. fáze - ODVODNĚNÍ (vlastní zdroj).....	64
Obr. 18 - 4. fáze - PROJASNĚNÍ (vlastní zdroj). ....	64
Obr. 19 - 2. fáze - VLASTNÍ BARVENÍ metoda AZAN (vlastní zdroj).....	66

Obr. 20 – Průkaz elastických vláken metodou Orcein unna Tanzer (vlastní zdroj). .....	67
Obr. 21 - Průkaz kyselých mukopolysacharidů metodou Alciánové modře (vlastní zdroj).....	69
Obr. 22 - Důkladná deparafinace imunohistochemických řezů (vlastní zdroj)...	73
Obr. 23 - Řezy s primární protilátkou ve vlhké komůrce (vlastní zdroj). ....	74
Obr. 24 - Průkaz adenokarcinomu z bronchoskopie, zvětšeno 400x, barvení Diff- Quick (vlastní zdroj). ....	77
Obr. 25 - Terminální bronchiolus zdravé plicé s průřezem cévy a ductuli alveolares, zvětšeno 100x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj). 78	78
Obr. 26 - Intraalveolární septum tvořené pneumocyty I. a II. typu, zvětšeno 200x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj). ....	79
Obr. 27 - Acinární adenokarcinom, zvětšeno 200x, barvení Hematoxylin-eosin (vlastní zdroj).....	80
Obr. 28 - Acinární adenokarcinom, zvětšeno 200x, barvení AZAN (vlastní zdroj). .....	81
Obr. 29 - Pleura, zvětšeno 100x, barvení Orcein unna Tanzer (vlastní zdroj).....	82
Obr. 30 - Acinární adenokarcinom, zvětšeno 200x, barvení Orcein unna Tanzer (vlastní zdroj).....	83
Obr. 31 - Acinární adenokarcinom, zvětšení 100x, barvení Alciánová modř (vlastní zdroj). ....	84
Obr. 32 - Acinární adenokarcinom, zvětšení 40x, barvení TTF-1 (vlastní zdroj)..	85
Obr. 33 – Acinární adenokarcinom – detail, zvětšeno 200x, barvení TTF-1 (vlastní zdroj). ....	86
Obr. 34 - Acinární adenokarcinom, zvětšeno 200x, průkaz napsinu A (vlastní zdroj). ....	87