



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Prostata – fyziologická stavba a vybrané patologické stavy v histologickém obrazu

Prostate – physiological structure and selected pathological states in histological description

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Barbora Černá

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Daniela Obitková

Kladno 2020



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Černá** Jméno: **Barbora** Osobní číslo: **478176**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Prostata - fyziologická stavba a vybrané patologické stavy v histologickém obrazu

Název bakalářské práce anglicky:

Prostate - physiological structure and selected pathological states in histological description

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce je histologická stavba prostaty, vybrané patologické stavy a jejich histologická diagnostika. Teoretická část se bude podrobně zabývat stavbou a funkcí prostaty. Uveden bude přehled vybraných patologických stavů a možnosti jejich histologického průkazu. V této části nalezneme také možnosti léčby patologických stavů a následky pozdního řešení tohoto problému. Praktickou část pak tvoří komplexní popis možného zpracování vzorků prostaty od příjmu biologického materiálu ve specializovaných laboratořích až po vydání výsledku vyšetření lékaři, který o histologické vyšetření požádal. Provedeno bude kompletní histologické zpracování vzorků tkáně se základními a dalšími vybranými barvicími technikami. Porovnán bude fyziologický obraz prostatické tkáně s vybranými obrazy patologických stavů.

Seznam doporučené literatury:

- [1] 1. DYLEVSKÝ, Ivan, Somatologie: pro předmět Základy anatomie a fyziologie člověka, ed. 3. přepracované a doplněné vydání, Praha:Grada Publishing, 2019, ISBN 978-80-271-2111-3.
- [2] 2. ZACHOVAL, Roman, Ladislav DUŠEK a Marek BABJUK, Problematika screeningu karcinomu prostaty, Česká urologie [online], číslo ISSN 2336-5692, 2018, 22(1), 14-26 s.
- [3] 3. MATOUŠKOVÁ, Michaela a Tomáš SVOBODA, Multimodální přístup k nádorům močového měchýře a prostaty, ed. 1, Olomouc: Solen, 2017, ISBN 978-80-7471-216-6

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:


MUDr. Daniela Obítková

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Aneta Sekaninová, Dis.

Datum zadání bakalářské práce: **23.09.2019**

Platnost zadání bakalářské práce: **20.09.2020**


prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucího katedry


prof. MUDr. Ivan Dylevský, DrSc.
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Prostata – fyziologická stavba a vybrané patologické stavy v histologickém obrazu 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 28.05.2020

.....
Jméno autora vč. titulů
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především vedoucí mé bakalářské práce MUDr. Daniele Obitkové za všechny shovívavé kritiky, trpělivost a celkový přístup a čas, který této práci věnovala. Další poděkování patří mé konzultantce Anetě Sekaninové DiS., která mi vždy ochotně poradila a pomohla zrealizovat praktickou část. V neposlední řadě veškerému personálu Patologicko-anatomickému oddělení Oblastní nemocnice Kladno za poskytnutí místa a materiálu pro zpracování, za jejich podporu a pomoc během celého mého psaní.

ABSTRAKT

Bakalářská práce s názvem Prostata – fyziologická stavba a vybrané patologické stavy v histologickém obrazu se zabývá problematikou zhoubných i nezhooubných onemocnění prostaty. Pro bližší zkoumání byla vybrána zdravá tkáň, benigní hyperplazie a adenokarcinom. Byly vytvořeny histologické preparáty s různými druhy barvení, kdy každé vybrané speciální barvení je zaměřeno na určitou specifickou strukturu, která je barvením dobře ozřejmána. Dále pak byly tkáně podrobeny imunohistochemickému vyšetření. Veškeré výsledky byly vyhodnoceny v závislosti na možné použitelnosti pro diagnostiku vybraných onemocnění.

Výsledky ukázaly nespornou výhodu diagnostiky onemocnění prostaty pomocí imunohistochemického průkazu. Diagnostika pomocí speciálních barvicích metod je v současné době již nedostačující. U adenokarcinomu je nutné správné vyhodnocení a určení rozsahu nádorového bujení. Pro benigní hyperplazie prostaty je imunohistochemický průkaz také vyhovující. Nodulární uzly jsou však vidět i v preparátech barvených Hematoxylinem-Eosinem.

Klíčová slova

Prostata, patologie, diagnostika, histologické zpracování, speciální barvení, imunohistochemie

ABSTRACT

Bachelor's thesis named Prostate - the physiological structure and selected pathological states in histological description deals with a subject of malignant and benign prostate diseases. A healthy tissue, benign prostatic hyperplasia, and adenocarcinoma were chosen for closer examination. Histological samples were prepared using various types of staining methods where every special staining technique is focused on specific structural changes which are clearly highlighted by the specific staining process. The tissue specimens then underwent histological examination. All results were evaluated in accordance with possible usability for a diagnosis of selected diseases.

Results clearly showed the advantage of using immunohistochemical methods for prostate diseases detection. The special staining methods have been shown as insufficient for current prostatic neoplasia detection. Diagnostic procedures and the disease seriousness evaluation play a key role in adenocarcinoma determination. The immunohistochemical method is suitable for benign prostatic hyperplasia as well. Nodular changes are visible in Hematoxyline-Eosine stained samples obviously.

Keywords

Prostate, pathology, diagnostics, histological processing, special staining method, immunohistochemistry

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce.....	12
3	Přehled současného stavu.....	13
3.1	Anatomická stavba	14
3.2	Histologická stavba	15
3.3	Funkce prostaty.....	16
3.4	Vybrané patologické stavy	17
3.4.1	Záněty prostaty.....	17
3.4.2	Benigní hyperplazie prostaty (BHP).....	19
3.4.3	Prostatická intraepitelová neoplazie	20
3.4.4	Karcinom prostaty.....	21
3.5	Diagnostika.....	24
3.5.1	Diagnostika BHP	24
3.5.2	Screeningové vyšetření prostaty	24
3.5.3	Digitální rektální vyšetření	26
3.5.4	Transuretrální sonografie prostaty	26
3.5.5	Určení hladiny PSA.....	26
3.5.6	Bioptické vyšetření prostaty	27
3.5.7	Imunohistochemie.....	29
3.6	Léčba.....	30
3.6.1	Léčba BHP	30
3.6.2	Farmakologická léčba	31
3.6.3	Chemoterapie.....	32

3.6.4	Cílená radioterapie.....	33
3.6.5	Radikální prostatektomie	33
4	Metodika.....	35
4.1	Příjem.....	35
4.2	Fixace	37
4.2.1	Fyzikální metody fixace	38
4.2.2	Chemické metody fixace	38
4.3	Zalévací metody.....	40
4.3.1	Zalévání do parafínu	40
4.3.2	Zalévání do celoidinu	43
4.3.3	Zalévání do médií rozpustných ve vodě	43
4.4	Krájení	43
4.4.1	Krájení parafínových bloků	44
4.4.2	Krájení celoidinových bloků.....	45
4.5	Barvení histologických řezů.....	45
4.5.1	Barvení řezů metodou Hematoxylin-Eosin.....	46
4.5.2	Barvení Massonovým trichromem	49
4.5.3	Barvení metodou Weigert van Gieson	51
4.5.4	Průkaz polysacharidů.....	51
4.6	Metodika imunohistochemie	52
4.6.1	Fixace v imunohistochemii	52
4.6.2	Zalévání	53
4.6.3	Imunohistochemická detekce.....	54
5	Výsledky.....	57

5.1	Příjem prostatického materiálu	57
5.2	Fixace, zalévání a krájení	58
5.3	Použité druhy barvení a imunohistochemické průkazy.....	62
5.3.1	Základní barvicí metoda Hematoxylin-Eosin	62
5.3.2	Speciální barvení PAS reakce.....	64
5.3.3	Speciální barvení kolagenu, svaloviny a elastických vláken Weigert van Giesen	66
5.3.4	Speciální barvení Modrý Massonův trichrom	68
5.3.5	Imunohistochemická metoda p63 a AMACR	70
6	Diskuze	72
7	Závěr	77
8	Seznam použitých zkratk.....	78
9	Seznam použité literatury	79
10	Seznam použitých obrázků	81
11	Seznam použitých tabulek.....	83

1 ÚVOD

Patologické změny prostaty jsou velice častým onemocněním postihující dospělé muže nejen v České republice, ale na celém světě. Mezi tyto stavy patří zejména benigní hyperplazie prostaty a adenokarcinom. Onemocnění jsou velice dobře diagnostikovatelná, nicméně výskyt v populaci stále stoupá.

Benigní hyperplazie prostaty je v dnešní době poměrně běžným onemocněním, které není život ohrožující. Má však velice výrazný vliv na pacientovu pozdější kvalitu života. Toto onemocnění je v populaci velice rozšířené, a právě z tohoto důvodu jsem ho zařadila mezi mnou vybrané patologické stavy, kterými se budu zabývat.

Mnohem závažnější problém je adenokarcinom prostaty. U adenokarcinomu je velkým problémem nedokonale vedený screeningový program v naší zemi, není totiž zaveden celoplošně. Laboratorní vyšetření hladiny prostatického specifického antigenu však není pro diagnostiku nádorového onemocnění dostačující. V dnešní době je tedy provedení tohoto testu pouze na domluvě mezi lékařem a pacientem. Z tohoto důvodu je procento záchytu nemoci v ranném stádiu v populaci výrazně sníženo. V případě, že je adenokarcinom zachycen včas, je zde velká šance úplného vyléčení nebo alespoň zajištění následného kvalitního života pacienta. V případě, že je však onemocnění zachyceno pozdě, jsou problémy spojené s léčbou mnohem častější a závažnější. Metastázy prostatického adenokarcinomu se usazují v kostech, což je velice bolestivé a následná léčba již není příliš účinná.

Je nutné zmínit, že nemocnění spojená s ženskými pohlavními orgány jsou v průběhu posledních let silně medializována. O onemocněních spojených s mužskými pohlavními orgány se však prakticky nemluví. Ve veřejných médiích je standardem potkávat spoty, které nabádají ženy k periodickým návštěvám lékařů, samovyšetřením a celkově zvyšují povědomí populace o těchto problémech. Tato osvěta se však nepraktikuje u onemocnění mužské populace. To je podle mého názoru chybný krok, protože zvýšení všeobecného povědomí o těchto problémech je určitě velice důležité pro zlepšení lékařské péče, včasnou diagnostiku a pro lepší pochopení mužů postižených tímto onemocněním. Projektů zabývajících se touto problematikou je tedy buď nedostatek, nebo jsou špatně šířeny mezi veřejnost. Mezinárodní organizací zabývajících se v dostatečné míře i potřebné hlasitosti tímto problémem je Movember. Projekt zabývajících se rakovinou varlat, prostaty a jejich prevencí. Movember je však projekt celosvětový, v České republice žádná takováto organizace zatím není.

2 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem práce je porovnání morfologických změn u patologicky změněných tkání oproti tkáni zdravé. K tomuto porovnání budou vybrána určitá speciální barvení a imunohistochemické průkazy. Následně bude vyhodnocena užitečnost jednotlivých znázorňovacích metod.

V teoretické části bakalářské práce se budu zabývat anatomickou stavbou prostaty, její funkcí a vybranými patologickými stavy. Zvláštní pozornost je věnována benigní hyperplazii prostaty a prostatickému karcinomu. Tyto patologické stavy jsou totiž v dnešní době nejčastější. Dále se pak tato část zabývá možnou diagnostikou a léčbou těchto stavů.

V praktické části je pak popisován podrobný postup tvorby histologického preparátu zdravé a patologicky změněné prostaty. Tento postup se skládá z příjmu vzorku, fixace, zalévání, krájení, barvení a montování. Prostatickou tkáň je možné barvit základním barvením a speciálními metodami. V dnešní době je však velice populární imunohistochemické znázornění. Imunohistochemie je tedy nedílnou součástí této kapitoly.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

Prostata, v češtině nazývaná předstojná žláza, je největší nepárový orgán mužského pohlavního systému. Řadí se mezi přídatné pohlavní žlázy reprodukčního ústrojí. U mladého muže váží okolo 20 až 30 gramů a její rozměry jsou 4x3x2 cm, s rostoucím věkem se prostata zvětšuje. V dutině břišní je uložena v malé pánvi. Baze prostaty směřuje k močovému měchýři a apex (vrchol), směřuje k diaphragma urogenitale [1].

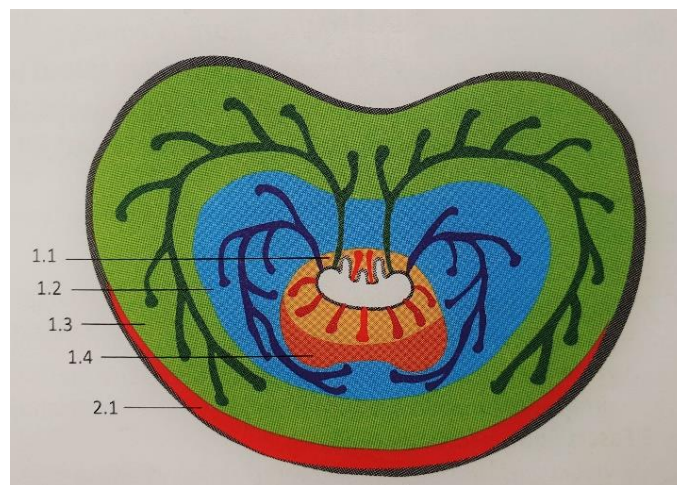
Prostatu v dnešní době můžeme dělit podle dvou hledisek:

- Členění na laloky podle Lowsleyho
- Členění na histologické zóny podle McNeala

Členění na laloky podle Lowsleyho se využívá při diagnostických biopsiích prostaty. Toto členění bere v úvahu pět nezávislých žlázových skupin, podle vývoje a polohy vůči močové trubici. Prostata je tedy dělena na lobus anterior (přední lalok), lobus posterior (zadní lalok), lobus dexter (pravý lalok), lobus sinister (levý lalok) a lobus medius (střední lalok) [1].

Členění na histologické zóny podle McNeala je v klinické praxi mnohem rozšířenější. Jde o poměrové zastoupení jednotlivých prostatických zón zdravého mladého muže. Během života se mohou procentuální zastoupení jednotlivých částí výrazně měnit, což je nutné v klinické praxi zohlednit. Prostata se dělí na žláznatou a nežláznatou část. Žláznatá část (pars glandularis) se poté dále dělí na periuretrální zónu (zona glandularum periurethralium, 1.1 – Obrázek 1), která těsně přiléhá k močové trubici a obsahuje slizniční žlázky. Dále zóna centrální (zona centralis, 1.2 – Obrázek 1), která obsahuje podslizniční žlázky a představuje asi čtvrtinu celkového obsahu prostaty. Zóna periferní (zona peripheralis, 1.3 – Obrázek 1), která obklopuje zónu centrální obsahuje hlavní sekreční žlázky a je

obsahově největší částí prostaty (70 %). Vnější zónou žláznaté části je přechodní zóna (zona transitionis, 1.4 – Obrázek 1), která obsahuje především slizniční žlázky a zepředu naléhá na periuretrální zónu. Procentuální zastoupení této části je v prostatě přibližně 5 %. Nežláznatá část (pars aglandularis, 2.1 – Obrázek 1) je tvořena hlavně stromatem. Tato část obsahuje pouze přední nežláznatou zónu (zona anteromediana), která je tvořena kolagenním a elastickým vazivem a hladkou svalovinou [1].



Obrázek 1 - Histologické zóny prostaty dle McNeala [1].

3.1 Anatomická stavba

Anatomická stavba prostaty je nejčastěji popisována od vnějšího pouzdra po jednotlivé typy prostatických žlázek a jejich uložení. Celou prostatou prochází močová trubice (v této oblasti nazývaná pars prostatica uretrae), která se uvnitř prostaty dělí na proximální a distální část. Takto se močová trubice rozděluje na úrovni colliculus seminalis (hrbolek zadní stěny prostaty). Močová trubice je v prostatě mírně ventrálně prohnutá a na spodní straně ústí do diaphragmy. Dále do prostaty ústí oba ductus ejaculatorii (společné vývodné cesty pohlavní). Tyto cesty vznikají spojením chámovodu a vývodu semenných váčků. Na povrchu prostaty je vytvořena inervovaná pleteň ze sympatických a parasympatických nervových vláken. Cévní zásobení je zajištěno z větve tepenné

arteria vesicalis inferior a arteria rectalis media. Větev žilní pak zastupuje plexus venosus prostaticu a plexus venosus vesicalis. Lymfatickou cirkulaci zajišťuje nodi lymphoidei iliaci interni et externi a nodi lymphoidei sacrales. Inervaci pak obstarává plexus prostaticus tvořený z plexus hypogasticus inferior jak po stránce sympatické, tak parasympatické [1, 2, 3].

3.2 Histologická stavba

Histologicky se prostata skládá z obalu, vazivové vrstvy capsula periprostatica, který je výběžkem pánevní fascie. Samotným pouzdem je capsula prostatica, které rozděluje prostatu na laloky, a dále se dělí na několik vrstev. Vnější vrstvou je stratum externum vasculosum, kde jsou uloženy významné tenkostěnné žilní pleteně. Dále je ve vazivové vrstvě hustá část obsahující kolagenní a elastická vlákna nazývaná stratum intermedium fibrosum. Vnitřní částí pouzdra je stratum internum musculare, která obsahuje hlavně hladkou svalovinu uspořádanou do nepravidelné sítě. Tato vrstva těsně přiléhá ke stromatu prostaty, které obklopuje prostatické vývodné žlázy. Toto fibromuskulární stroma je tvořeno kolagenním a elastickým vazivem. Mezi těmito vlákny je velké množství hladkosvalových buněk. Funkcí těchto buněk je vypuzování sekretu z prostaty do močové trubice. Během života klesá množství svalových buněk a elastických vláken a zvyšuje se množství vláken kolagenních. Stěžejní částí prostaty je žlázový parenchym. Ten se skládá z 30–50 samostatných, rozvětvených tuboalveolárních žlázek. Ty se spojují a ústí do 15–30 ductuli prostatici (žlázové vývody prostaty), které těsně obklopují močovou trubici a ústí do její distální části po obou stranách colliculus seminalis [1, 2, 3].

Tubealveolární žlázy žlázkového parenchymu mají různý průsvit a jsou opatřeny řasami, které jednotlivé žlázy rozdělují a napomáhají jejich funkci. Prvním typem žlázek jsou žlázy slizniční. Ty je možné najít v periuretrální zóně, kde jsou těsně přilehlé k močové trubici a ústí do ní. Dalším typem žlázek jsou žlázy podslizniční, které jsou součástí centrální zóny prostaty. Posledním a nejdůležitějším typem žlázek jsou žlázy hlavní, ty se nacházejí v periferní zóně. Žlázy hlavní a podslizniční svými vývody ústí přímo do močové trubice. Uvnitř žlázek se na povrchu nachází výstelka tvořená dvouřadým epitelem. Tento epitel se skládá z bazální membrány, spodní řady bazálních epitelových buněk a horní řadu tvoří buňky sekreční. Bazální buňky mají kubický tvar a jejich hlavní funkcí je obnova žlázkového epitelu. Sekreční buňky mohou podle své sekreční aktivity měnit tvar. V případě tvorby sekretu jsou buňky protáhlé až cylindrické, v klidovém stavu mohou mít až kubický tvar [2].

3.3 Funkce prostaty

Hlavní prostatické žlázy jsou vystlány cylindrickým epitelem, který tvoří mírně zásaditý sekret (pH 7,6) s vysokým obsahem fruktózy, která je hlavním zdrojem energie pro pohyb spermií. Sekret tvoří zhruba 30 % objemu ejakulátu. Další složkou, která je k ejakulátu v této fázi přidávána, je protein semenogelin. Hlavní sekreční buňky obsahují též sekreční vakuoly a lysozomy, které ze své cytoplazmy vylučují kyselou fosfatázu. Zvláštním typem lysozomů jsou prostazomy. Tyto orgány jsou lipoproteinová sekreční granula, která po ejakulaci splývou s membránou hlavičky spermie a mění její stavbu. Obsahují velké množství enzymaticky aktivních látek, iontů, zinku a vápníku. Látky enzymatického charakteru napomáhají správné funkci spermií. Ve výstelce povrchu jsou také endokrinní buňky, přesněji neuroendokrinní buňky. Tyto buňky produkují serotonin, enolázu a některé další peptidy. Funkce těchto buněk je ale zatím nejasná.

Posledním druhem epitelových buněk, které můžeme najít v prostatě, jsou buňky, které tvoří sialomucin. To je kyselý mukopolysacharid se sialovou kyselinou jako kyselou složkou [1, 2].

Ejakulát je tedy tvořen velkým množstvím složek, kdy ale pouze dvě mají diagnostický význam pro prostatu. Jde o prostatickou specifickou kyselou fosfatáz (PSAP) a prostatický specifický antigen (PSA). Fyziologickou funkcí prostatického specifického antigenu je tvorba proteáz, kdy dochází ke zkapalnění koagulovaného semene. K této koagulaci dochází štěpením semenogelinu. Rosolovitá hmota se rozpadá a dochází k opětovnému rozpočívání spermií. Funkce a růst prostaty závisí na množství hormonu dihydrotestosteronu. Tento hormon vzniká z testosteronu v epitelálních buňkách a stromatu varlat a prostaty. V dnešní době je hlavním ukazatelem nádorového bujení prostaty. Funkcí prostatické specifické kyselé fosfatázy je enzymatická aktivita, která se podílí na metabolismu a růstu epitelových buněk, které mají onu důležitou sekreční funkci. PSAP byl v minulosti hlavním ukazatelem nádorového bujení prostaty [1, 2].

3.4 Vybrané patologické stavy

Patologie je nauka o chorobných pochodech a změnách v lidském těle. Tato medicínská disciplína se zabývá zkoumáním poškozených tkání a orgánů v souvislosti s příznaky nemoci a příčinami vzniku [4].

3.4.1 Záněty prostaty

- Akutní
- Chronické
- Specifické – Tuberkulózní prostatitida

Akutní záněty bývají z velké části vyvolány bakteriální infekcí. Nejčastější bakterií, která akutní prostatitidu vyvolává je *Escherichia coli*. Mezi další bakterie, které zánět vyvolávají patří *Klebsiela*, *Proteus* nebo některé druhy *Enterobakterů*. K zánětu prostaty může docházet při zánětech močového měchýře nebo uretry, kdy dochází k rozšíření zánětu z okolních orgánů až do prostaty. K rozšíření zánětu může také velice často docházet při katetrizaci močového měchýře. Při akutní prostatidě dochází ke zvětšení a překrvení prostaty. Při histologickém zkoumání jsou viditelné lymfocyty a makrofágy. V případě hnisavé formy onemocnění i abscesy [4].

Chronické záněty velice často vznikají z akutních prostatid. Bakteriální infekce bývá obdobná jako při akutních zánětech. Problémem je, že příznaky jsou velice často nenápadné. Chorobu velice často nedoprovází akutní ataky a proto pacient často nenastoupí léčbu včas. Histologicky jsou prokazatelné lymfocyty, plazmatické buňky a makrofágy. Velmi častým původcem onemocnění bývá *Chlamydia trachomatis* a *Ureaplasma urealyticum* přenášené pohlavním stykem. V některých případech se na bakteriálního původce nepříjde, a to ani kultivací, v takových případech mluvíme o chronické nebakteriální prostatidě [4].

Dalším avšak velice ojedinělým zánětlivým onemocněním prostaty je tuberkulózní prostatitida. Ta bývá typickým projevem tuberkulózy, co se týče mužského pohlavního ústrojí. Do prostaty se dostává krevním přenosem z plic pacienta, který je tuberkulózou již nakažen. Z prostaty se může zánět dále šířit do ostatních orgánů močově-pohlavního mužského systému. Stává se tak prostoupením zánětlivé hmoty do utery [4].

3.4.2 Benigní hyperplazie prostaty (BHP)

Benigní hyperplazie může postihnout obě části prostaty, jak část žláznatou, tak stromatózní. Toto onemocnění je nejčastějším onemocněním prostaty a jeho výskyt je značně spjat s věkem. Patologicky se jedná o nezhoubné bujení stromatózních buněk nebo o změnu cylindrických buněk ve žlázkách prostaty v důsledku nadprodukce dihydrotestosteronu (DHT). Velkou roli totiž hrají hormony, které prostatu ovlivňují. Takovými hormony jsou androgeny a estrogeny. Dihydrotestosteron společně s 5-alfa-reduktázou jsou hlavní příčinou růstu prostaty. Dochází k němu však pouze u mužů, kteří nepodstoupili odstranění varlat (kastraci) před pubertou a kteří nejsou zatíženi vrozeným defektem 5-alfa-reduktázy. Makroskopicky je prostata zvětšená a hyperplasticky změněná tkáň utlačuje uretru, dochází tak tedy k příznakům dolních močových cest (LUTS). Hyperplastické oblasti prostaty se většinou vyskytují na její periuretrální části, tedy v blízkosti močové trubice. Hmotnost celé prostaty pak přesahuje hmotnost 30 gramů. Projevy jsou měštnání moči v močovém měchýři, a to může vést až ke tvorbě močových kamenů nebo dokonce zánětu ledvin. Potíže s močením se však neobjevují v každém případě a posuzovat tedy závažnost nebo přítomnost tohoto onemocnění podle mikčního průtoku je nedostačující. Žlázky jsou často vyplněny zkondenzovaným sekretem corpora amyloacea, česky známé jako prostatické konkrementy. Ve stromatózní části jsou viditelné protáhlé buňky pojivové tkáně, které v ojedinělých závažných případech mohou vytvářet infarktová ložiska. V takovýchto případech dochází k porušení kinetické funkce hladko svalových buněk. Celé onemocnění probíhá ve 3 stádiích:

1. Pacient trpí obtížemi s častým močením hlavně v nočních hodinách. V noci totiž dochází k překrvení malé pánve a prostaty, tím dochází k mikčním potřebám. Během dne není díky pohybu nucení tak velké.

2. Dochází k progresi obtíží. Pacient má pocit neustálého plného měchýře a může docházet k poruchám spánku. V této fázi může docházet k přestavbě stěny močového měchýře a velice často v této fázi dochází k infekčním onemocněním močového traktu.
3. Konečné stadium nemoci je charakterizováno zbytněním svaloviny močového měchýře, chronickým zadržováním moči. Může docházet také k inkontinenci. Subjektivně může pacient pociťovat neustálý pocit žízně, někdy také nechutenství a hubnutí [4, 5].

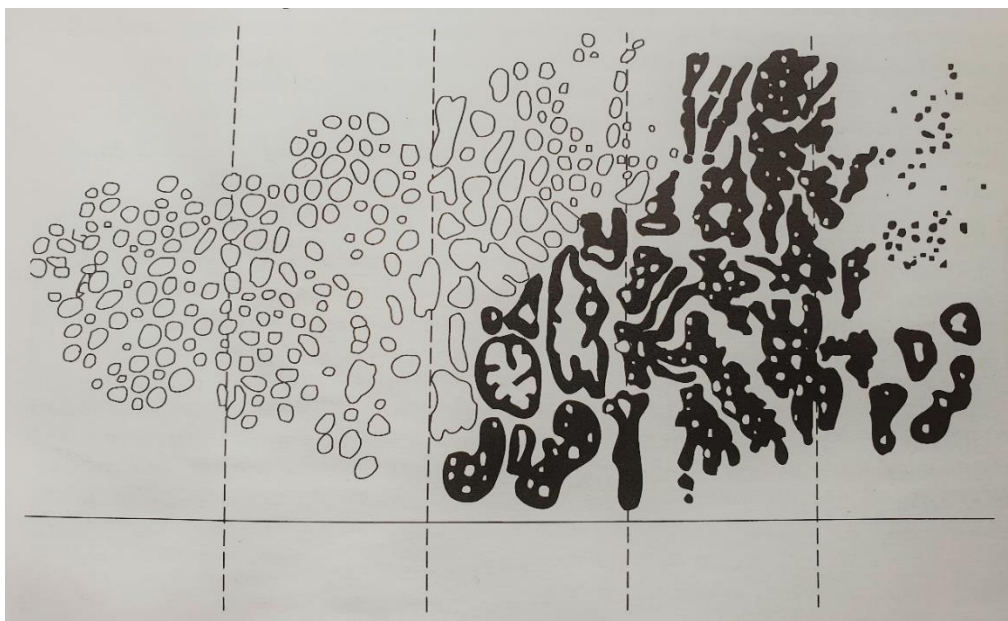
3.4.3 Prostatická intraepitelová neoplazie

Dalším příkladem nádorového onemocnění prostaty bývá prostatická intraepitelová neoplazie (PIN). Tato neoplazie je považována za předstupeň karcinomu. Bývá tedy neinvazivní a dobře léčitelná. Jsou známy dvě formy tohoto onemocnění. První forma je v nálezů dobře diferencovaná a někdy se také nazývá Low grade PIN. Mnoho patologů tento stav vůbec neuvádí, protože je klinicky prakticky nevýznamný. Druhá forma je špatně diferencovaná, v praxi se také uvádí jako High grade PIN. Tato forma je již klinicky významná a je třeba na ní brát ohled. Prostatická intraepitelová neoplazie bývá velice často předstupeň invazivního karcinomu. Mikroskopická vyšetření při této diagnóze ukazují zvětšená jádra a jádérka buněk. Toto onemocnění je pravděpodobně zapříčiněno nestandardním růstem kmenových buněk v bazální membráně epitelu. Klinickým testem, kterým se prokazuje karcinom prostaty bývá obvykle vyšetření prostatického specifického antigenu, jeho hladina bývá při karcinomu prostaty v séru zvýšená. Další možností diagnostiky bývá imunohistochemické vyšetření. Toto vyšetření je založené na vazbě protilátky proti vysokomolekulárním cytokeratinům. Toto vyšetření většinou může napovědět, zda je nádor prostaty maligní nebo benigní [4, 6, 7, 8].

3.4.4 Karcinom prostaty

Karcinom prostaty je druhou nejčastější příčinou úmrtí mužů nad 50 let. Výskyt tohoto onemocnění vzrůstá a etiologicky se uvádí mnoho příčin, které mohou ovlivnit propuknutí nebo postup této nemoci. Takovýmto vlivem může být například hormonální dysbalance, genetická predispozice k tomuto onemocnění nebo vlivy prostředí, kterými mohou v tomto případě být třeba špatné stravovací návyky. Častým stravovacím faktorem, který ovlivňuje karcinom prostaty, bývá zvýšený příjem živočišných tuků v potravě. Prostata se vyšetřuje per rectum a při tomto ohledání bývá tuhá až tvrdá. Karcinom se nejčastěji vyskytuje na periférii, a proto nedochází k utlačování uretry procházející prostatou. Proto je adenokarcinom prostaty v rané fázi často bez klinických příznaků. Velkým problémem jsou poměrně časná tvorba metastáz do okolních lymfatických uzlin. Častým místem, kam tento karcinom metastazuje v pozdějších fázích jsou kosti, obvykle bývá postižena páteř. V takovémto případě dochází k osteolytickým metastázám, kdy nastává rozrušování kostí. Druhým příkladem jsou metastáze osteoplastické, při kterých dochází k tvorbě nových kostních trámců. Tato forma metastáz je při karcinomu prostaty rozšířenější. V pokročilém stavu můžeme pozorovat nádorové šíření v semenných váčcích a také v periuretrální oblasti prostaty. Dále se pak karcinom šíří do tkání blízkých prostatě a do močového měchýře [4, 6, 7].

Histologicky je karcinom prostaty většinou acinárním adenokarcinomem s různými stupni diferenciací. Tyto stupně jsou určovány podle Gleasonova histologického gradientu (Obrázek 2), který hodnotí míru poškození tkáně napadené karcinomem a tím i odráží ve svém výsledku prognózu pacienta. V dnešní době je tento způsob diagnostiky nejvíce používán pro svou přesnost a tím pádem je také nejrozšířenější metodou, jak klasifikaci adenokarcinomu určit. Gleasonův systém dělí adenokarcinom na 5 skupin, podle závažnosti maligního bujení v epitelových strukturách prostaty [4, 6, 7].



Obrázek 2 - Gleasonův histologický gradient [2]

Gleasonův systém také zahrnuje tzv. Gleasonovo skóre, které udává součet dvou převládajících typů gradientových skupin nádorových buněk. Dobře diferencované nádory postihují stroma prostaty, prostatické žlázy jsou ohraničeny kolagenem a aciny jsou bez deformace. Při postižení žlázových struktur chybí vrstva bazálních buněk. Tako vrstva je standardně přítomna v patologicky negativní tkáni a ve tkáni postižené hyperplazií. V dnešní době je možnost klasifikovat nádorové onemocnění prostaty dvěma způsoby (Tabulka 1). Jedním způsobem je klasifikace podle Evropských států a druhou možností je rozdělení podle USA. Podle této klasifikace se celý průběh onemocnění dá rozdělit do 4 skupin. Kdy skupina 1 označuje nádorová onemocnění podle klasifikace TNM zařazená do T1. Podle tohoto číselného rozdělení jsou stejným způsobem rozřazeny i další skupiny [4, 6, 7].

USA	TNM	Nález
A1	T1a	Incidentální tumor, v řízcích po TURP nález v méně jak 5 % materiálu
A2	T1b	Incidentální tumor, v řízcích po TURP nález ve více jak 5 % materiálu
B0	T1c	Nepalpovatelný, nezobrazitelný tumor, prokázáný biopsií na základě zvýšeného PSA
B	T2	Palpovatelný, zobrazitelný tumor, ohraničený na prostatu
B1	T2a	Tumor postihuje jeden lalok prostaty
B2	T2b	Tumor postihuje oba laloky prostaty
C	T3	Tumor s lokálním extraprostatitckým šířením
C1	T3a	Extraprostatické šíření unilaterální nebo bilaterální
C2	T3b	Extraprostatické šíření do semenných váčků
C2	T4	Tumor s invazí do okolních orgánů nebo pánevní stěny
D1	A1	Pozitivní regionální uzliny
D1	M1	Vzdálené metastázy
	M1a	Metastázy do non regionálních uzlin
	M1b	Kostní metastázy
		Jiné vzdálené metastázy

Tabulka 1 – Srovnání klasifikací USA a Evropa [2]

3.5 Diagnostika

3.5.1 Diagnostika BHP

Diagnostika BHP je založena především na důkladném vypracování anamnézy, doporučených a volitelných vyšetřeních, která jsou lékařem pacientovi nabídnuta a doporučena. Velice důležitým bodem anamnézy je zjištění přesných mikčních problémů, jde hlavně o vyloučení chybné diagnózy (velice často je BHP, co se týče problémů s močením, zaměňována s diabetem). Anamnesticky je také velice důležité zmapování všech farmakologických prostředků, které pacient užívá. Určité léky mohou mít velký vliv na močový měchýř a mikci. Neopomenutelnou součástí anamnézy je i rodinné zatížení karcinomem prostaty nebo BHP. Vyšetření se provádí per rectum, kdy se hodnotí velikost, konzistence (možná ztvrdnutí zjistitelná hmatem) a hmatová bolest. Laboratorně nejvýznamnějším vyšetřením je stanovení sérového prostatického antigenu (PSA). Toto vyšetření se provádí především pro určení karcinomu prostaty, dá se však využít i pro detekci BHP. Zvýšená hodnota PSA může naznačovat budoucí zvětšování prostaty. V praxi velice často používaným vyšetřením je Uroflowmetrie. Tato metoda graficky znázorňuje kvalitu průtoku mikce pacienta. Hodnota pod 10ml/s je brána jako silné narušení funkce močového traktu. Doplňkovým vyšetřením, které stanovuje lékař, je například cytologické vyšetření moči. Tím se nejčastěji stanovují záněty močového traktu nebo hematurie [5].

3.5.2 Screeningové vyšetření prostaty

Screening je v dnešní době hojně využíván jako diagnostická metoda karcinomu prostaty, a to hlavně u pacientů, u kterých je nemoc již diagnostikovaná, ale je pouze v počáteční fázi a nemá ještě žádné vnější příznaky.

Dalším případem, kdy se tato technika používá je při sledování pacientů, kteří už nějakou formu nádorového onemocnění prodělali. Pokud je onemocnění odhaleno screeningem, je zde velká šance karcinom prostaty včas a účinně léčit. Základním pilířem této metody je včasný záchyt, a tím snížení mortality onemocnění. K tomu snižování ale dochází až při soustavném sledování po dobu 10–15 let. Se včasným záchytem souvisí i následná kvalita života pacienta, nebo alespoň udržení určitého životního standardu. Druhotným přínosem je také lepší zmapování této nemoci v jejím primárním stádiu a její mapování v určitých zeměpisných oblastech. Pro provádění vyšetření na poměrně velkém vzorku populace musí být vyšetření nenáročné, diagnosticky kvalitní a po finanční stránce úsporné. Velký význam pro včasný záchyt a diagnostiku karcinomu prostaty má v dnešní době vyšetření prostatického specifického antigenu. Jiné vyšetření se pro prvotní diagnostiku ani nepoužívá. Velkým přínosem je i snížení počtu pacientů s pokročilými stádii karcinomu. Přesto je v tuto chvíli stále velký počet zemí, kde se plošný screening karcinomu prostaty neprovádí. Ve vyspělých státech je průměrná úmrtnost na karcinom prostaty při diagnostice před pěti lety okolo 36 %, v rozvojových zemích je ale tato hodnota mnohem vyšší a to okolo 59 %. Světový průměr je pak hodnota okolo 42 %, tedy přibližně čtvrt milionu pacientů každý rok. Studie však neprokázaly přímý vztah mezi plošným screeningem a snížením mortality. Vypracované studie však byly ukončeny již před dobou 10 let, nově diagnostikovaní pacienti však většinou hranici 10 let přežívají. Provedené studie tak nejsou zcela relevantní. Studie prováděné po dobu 11 let pak prokázaly snížení mortality pacientů o 21 %. Z toho tedy jasně vyplývá, že je nutná dlouhodobá spolupráce pacienta s lékařem. Před zavedením screeningového vyšetření PSA byl většinou diagnostikován karcinom až v pokročilých stádiích, nebo v případě nalezení metastáz. Karcinom prostaty byl v takových případech příčinou úmrtí 75 % pacientů, doba přežití pak byla něco okolo tři a půl roku. Screening by měl začínat okolo 40–45 let. Když je mezi těmito lety hladina PSA vyšší než 1,0 ng/ml, je zde velice vysoké riziko onemocnění

karcinomem prostaty v pokročilém věku. V České republice v tuto chvíli není zaveden celoplošný screening a vyšetření PSA je na individuální dohodě mezi lékařem a pacientem [9].

3.5.3 Digitální rektální vyšetření

Možností, jak provést vyšetření prostaty je Digitální rektální vyšetření (DRV). Toto vyšetření je nejčastěji využívaná metoda, pro určení karcinomu prostaty. Její výhodou je nízká cena a dobrá průkaznost. Specifita tohoto vyšetření je vyšší než při vyšetření Transuretrální sonografie. Mnohem včasnější záchyt však má vyšetření PSA. I přesto je DRV hojně využíváno a je velkým pomocníkem při včasných záchytech tohoto onemocnění [7].

3.5.4 Transuretrální sonografie prostaty

Vyšetřením, které se provádí při nedostatečně průkazném vyšetření per rectum je metoda Transuretrální sonografie prostaty (TRUS). Tato metoda není příliš přesná při určování BHP nebo karcinomu prostaty. Má však nenahraditelný význam při cílených biopsiích, proto je tato metoda využívána hlavně jako doplňková k metodě DRV nebo při vyšetření PSA. Obě tyto metody mají jednu zásadní nevýhodu a tou je nutnost perfektně proškoleného personálu, metoda PSA není na této proměnné nijak závislá [5, 7].

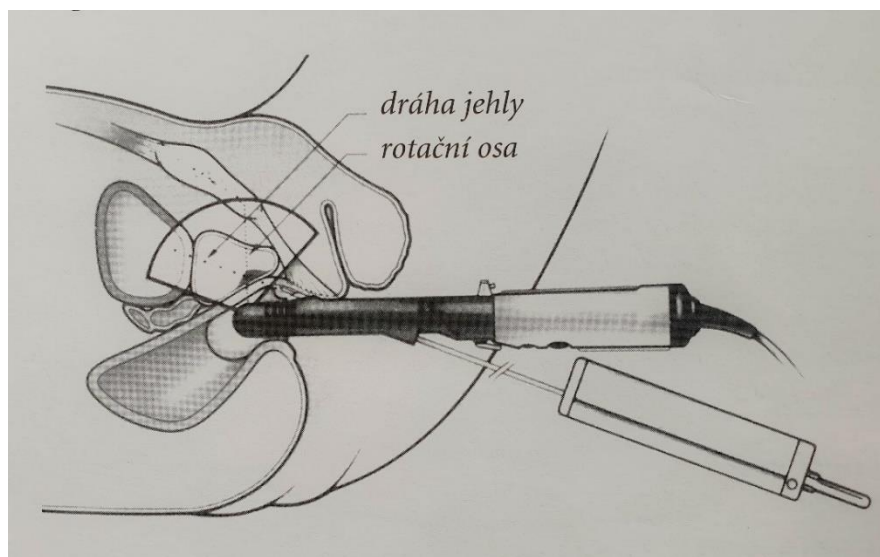
3.5.5 Určení hladiny PSA

Další možností vyšetření je určení hladiny PSA. Toto vyšetření se používá jak při zjištění diagnózy, tak při monitoringu postupující léčby již diagnostikovaného onemocnění. Velkým problémem při tomto vyšetření je fakt, že PSA je produktem prostaty, a ne samotného nádoru. Zvýšená koncentrace PSA pak není vždy automaticky spojena s nálezem adenokarcinomu prostaty, na druhé straně však ani normální koncentrace adenokarcinom nevylučuje.

Je prokázáno, že skoro polovina mužů s adenokarcinomem mají hodnoty PSA naprosto v normě. Zvýšenou koncentraci mají i muži s BHP a toto onemocnění je také největším zkreslujícím prvkem při tomto vyšetření. Další věc, která velmi ovlivňuje toto vyšetření je nastavení hranice normy pro PSA. Snížením této normy dochází sice k detekci většího počtu mužů, na druhou stranu se však zvyšuje procentu falešně pozitivních pacientů. Proto je tato norma uměle lehce zvýšena i přes možnost, že některé případy nebudou detekovány. Tento nedostatek, společně s rozlišením karcinomu od benigní hyperplazie prostaty, se snaží vynahradit možností specifických testů pro PSA, jako jsou PSA velicita. Toto vyšetření je založeno na zkoumání hladiny PSA mezi dvěma odběry, které se uskutečňují nejčastěji po jednom roce. Další možností je vyšetření PSA denzity (PSAD), která nám udává poměr hladiny PSA ku celkovému objemu prostaty zjištěnému pomocí TRUS. Využívá se též vyšetření volného PSA, to je u mužů s karcinomem v séru nižší než u mužů s BHP. Pro úspěšnou diagnostiku onemocnění se velice často využívá kombinace těchto vyšetření. Nejčastěji je to kombinace DRV a PSA. Pokud jsou v tomto případě zjištěny abnormální hladiny, přistupuje se k vyšetření TRUP, které je však pouze součástí biopsie [7].

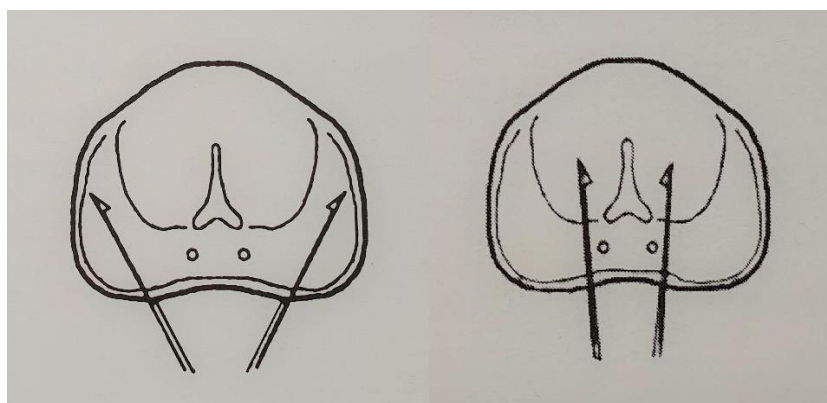
3.5.6 Bioptické vyšetření prostaty

Biopsie prostaty byla dříve využívána jako diagnostická metoda pouze v případě, že byly hmatné zatvrdliny na prostatě při vyšetření per rectum. Důvodem byla poměrně vysoká morbidita po provádění tohoto vyšetření. Velmi důležitým milníkem byl vynález bioptické pistole, která celý proces vyšetření výrazně ulehčila a vyšetření se stalo mnohem bezpečnějším. V dnešní době se nejčastěji využívá metoda Ultrasonografické kontrolované biopsie (Obrázek 3), kdy je zcela cíleně odebrán vzorek z apexu, střední části a baze každého laloku prostaty [7].



Obrázek 3 - Ultrasonografická biopsie prostaty [2]

Tyto základní odběry mohou být doplněny také o vzorky z míst, která na ultrazvuku mohou vypadat podezřele. Zvýšit záchyt tumoru lze několika způsoby. Je možné odebrat více vzorků, ale i tak není zajištěno, že se bioptickou jehlou podaří karcinom zasáhnout, nebo je možné mířit spíše do míst, kde je větší možnost výskytu karcinom, takovýmto místem bývá většinou apex prostaty. Bioptické vyšetření prostaty je možné provádět několika způsoby. Těmi nejčastějšími jsou sextantová biopsie a biopsie tranzitorní zóny. Jejich největší rozdíl je hlavně v oblasti, ve které je biopsie prováděna [7].



Obrázek 4 - Sextantová (vlevo) a tranzitorní (vpravo) bioptická zóna [2]

Biopsie prostaty je všeobecně považována za bezpečné vyšetření, i přesto však může docházet ke komplikacím. Mezi ty nejčastější patří hlavně krvácení z rekta nebo krev v moči. Později se může dostavit třes, horečka, poruchy mikce nebo hemospermie. K těmto pozdním a těžším stavům však dochází jenom v cca 4 % případů. Dalším častým problémem při tomto vyšetření je dyskomfort, který v nějaké míře udává vysoké procento pacientů [7].

3.5.7 Imunohistochemie

Imunohistochemie je metoda založená na mikroskopickém zobrazování buněčných komponent, například proteinů a jiných makromolekul, ve vzorcích nebo tkáních. Při imunohistochemických metodách se stejně jako v imunologii využívá specifická reakce antigenu s protilátkou. Oproti běžné imunologii však dochází k specifické reakci přímo v řezu odebrané tkáně. Imunohistochemii je možné provádět dvěma způsoby:

- Přímá detekce
- Nepřímá detekce

Přímá detekce je založena na specifické reakci antigenu ve tkáni s protilátkou, na kterou je již přímo navázáno detekční značení. Tato metoda je velice často využívána při imunohistochemických vyšetření z nativních preparátů [12, 13].

Mnohem častěji je využíván průkaz nepřímou detekcí. Tato metoda je více využívána hlavně proto, že většina vzorků přicházejících do laboratoře je zfixovaných. Pro zvýšení specifity reakce se využívají tzv. vícestupňové metody. Ty jsou založeny na specifické vazbě primární neznačené protilátky, navázané na antigen, se sekundární značenou protilátkou, na kterou je navázána v prvním případě další protilátka nebo detekční komplex. Výhodou nepřímé detekce je možnost navázat na konjugovanou protilátku větší množství antigenů.

U přímé detekce je velice složité najít protilátku, která by byla korespondující jak s vázaným detekčním systémem, tak s antigenem. Nejčastějším detekčním systémem bývá enzymové značení. Takovými enzymy bývá křenová peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. Takto provedená metoda bývá vysoce citlivá a velice spolehlivá, tím pádem je v praxi hojně využívána. Další možností je využití fluorescenčního značení [12].

Neodmyslitelnou součástí imunochemických vyšetření je kontrolní vzorek. Tento vzorek podává informaci o stupni citlivosti a specifity daného vyšetření. V dnešní době se využívá dvou druhů kontrol. První možností je použití pozitivní kontroly. Ta se používá pro kalibraci metody a dává záruku, že byla použita správná protilátka. Velice důležité je však použít správnou tkáň, jako kontrolní vzorek. Tato tkáň musí mít co nejvíce shodnou strukturu jako tkáň, kterou chceme imunohistochemicky vyšetřovat. Druhou možností je použití negativní kontroly. Tato kontrola nám podává informace o specifičnosti dané metody. Podává nám tedy informace, zda není naše vyšetřovaná tkáň falešně pozitivní. Dnes jsou imunohistochemická vyšetření velmi rozšířená a jsou upřednostňována před speciálními barvicími metodami. Tato vyšetření jsou pro průkaz antigenu ve tkáni vysoce specifická a tím pádem pro diagnostiku mnohem přesnější [12, 13, 14, 15].

3.6 Léčba

3.6.1 Léčba BHP

Při léčbě BHP je hlavním cílem snížení mikčních potíží a možné pozastavení šíření hyperplazie. Léčba je nastavována podle kritérií, kterými jsou hmotnost prostaty a hladina PSA. V případě, že je nemoc v primární fázi nebo nejsou obtíže příliš významné, se k terapii nepřistupuje. Volí se tzv. metoda pozorného sledování, kdy je pacient pouze sledován urologem. V případě skutečné léčby je

nejčastější farmakoterapie alfablokátory a inhibitory 5-alfa-reduktázy, či kombinací těchto skupin farmak. Různé skupiny léků se nasazují podle různých hladin PSA a závisí také na hmotnosti prostaty. Farmakoterapie je jako metoda léčby založena na snížení aktivity hormonů, které ovlivňují růst prostatické tkáně [5].

3.6.2 Farmakologická léčba

Karcinom prostaty je možné léčit několika způsoby. Prvním způsobem je použití farmakologické léčby. Farmakologickou lze dále rozdělit. První typem je léčba hormonální. Cílem této léčby je zastavit další bujení nádorových hormonálně senzitivních buněk tím, že potlačíme tvorbu androgenů nebo jejich vazbu na hormonální receptory v těle pacienta. Adenokarcinom prostaty je však složen z buněk hormonálně senzitivních i hormonálně rezistentních. Po určité době farmakologické léčby však dochází ke zvýšení tvorby buněk hormonálně rezistentních a tím pádem se hormonální léčba stává naprosto neúčinnou. Androgeny jsou v mužském těle v největší míře produkovány v Leydigových buňkách, která jsou součástí tkáně ve varlatech. Jejich zastoupení v produkci testosteronu se pohybuje mezi 90 až 95 %. Testosteron je pak metabolizován v prostatě pomocí 5-alfa-reduktázy a dihydrotestosteronem. Ve chvíli, kdy se v cytoplazmě buňky vytvoří komplex receptor-androgen, je přesunut do jádra, kde je indikátorem transkripce. Tento proces tedy vede ke stimulaci růstu prostaty. V případě, že zamezíme vazbě a vytvoření komplexu receptor-androgen, nemůže docházet rozvoji nádorového bujení. Léky, které zamezují vazbě androgenů na androgenové receptory, se nazývají antiandrogeny a jsou často využívány k léčbě nádoru. Aktuálně je v Evropě nejčastěji používaným antiandrogenem Cyproteron acetát. Hormonální léčba má řadu vedlejších účinků, mezi které patří především osteoporóza. Ta je velice nebezpečným nežádoucím příznakem, protože v průběhu hormonální léčby se rapidně zvyšuje riziko zlomenin. Dalšími vedlejšími účinky mohou být sexuální dysfunkce,

anemie, návaly horka nebo gynekomastie (zvětšení prsních žláz u mužů). Prognóza pacientů s karcinomem prostaty na hormonální léčbu je velice závislá na podílu hormonálně senzitivních buněk a na stádiu nemoci (zda jsou či nejsou přítomny metastáze). Pouze 7 % pacientů, u kterých byly diagnostikovány kostní metastáze, se dožilo hranice 10 let s hormonální léčbou. Přesto však je hormonální léčba jednou z nejúspěšnějších možností pro pacienty s karcinomem prostaty [6].

3.6.3 Chemoterapie

Druhým typem farmakologické léčby je pak léčba chemoterapeutická. K tomuto typu léčby se většinou přistupuje ve chvíli, kdy nádor již tvoří převážně buňky hormonálně rezistentní nebo v něm od počátku mají vyšší zastoupení. Mluvíme pak o karcinomu prostaty s hormonální independencí. V takovou chvíli je hormonální léčba nevyhovující, ba dokonce škodlivá. Při zvolení hormonální léčby nejsou buď zjevné žádné léčebné pokroky, nebo může docházet až k nárůstu bujení karcinomu nebo ke zvyšující se hladině PSA. Ta se také stala hlavním ukazatelem účinnosti chemoterapeutické léčby. Mezi nejčastěji používaná cytostatika (látky, která se používají k léčbě nádorového onemocnění), se v dnešní době řadí hlavně Estramustin a Mitoxantron. Účinek Estramustinu je hlavně v ovlivňování funkce mikrotubulů a tím i inhibice dělení buňky. Estramustin má ale širokou škálu vedlejších účinků mezi které patří zvracení, zadržování tekutin, které může vést až k edémům, hepatotoxicita a hluboká žilní trombóza. Aktuálně je však nutné řešit problémy s rezistencí nádoru na chemoterapeutickou léčbu. Stále častěji se tedy medicína přiklání k experimentální léčbě, tedy k používání imunoterapie, genové terapie nebo k ovlivňování kmenových buněk samotného nádoru [10].

3.6.4 Cílená radioterapie

Další možností, jak léčit adenokarcinom prostaty je cílená radioterapie. Tu lze využít buď samostatně, nebo jako spojení radioterapie a hormonální léčby. Nejčastěji využívanou je v poslední době konformní radioterapie 3D-CRT. Tato metoda je založena na ozařování cílového objemu, který je stejně velký jako trojrozměrné zobrazení daného nádoru. Jde vlastně o vypočtení dávky v prostoru, který je přímo úměrný patologické struktuře nádoru daného pacienta. Pro využití této metody je velice důležitá počítačová tomografie (CT), která vytváří onu trojrozměrnou strukturu těla pacienta a díky níž lze přesně určit objem nádoru. Dále se v radiologické praxi využívá metody IMRT, tedy radiologie s modulovanou intenzitou. Tato metoda je výhodná hlavně tím, že lépe rozkládá dávky záření v prostoru díky lepšímu tvarování svazků záření. Tím tolik nedochází k zasažení okolní zdravé tkáně v těle pacienta a na okraj nádoru je pouštěno menší množství radioaktivních látek. Nevýhodou radiologických metod je však poměrně vysoká toxicita pro organismus. Přibližně 60 % pacientů bývá postiženo gastrointestinální nebo genitourinární toxicitou. Ta se většinou projeví záhy po nastoupení léčby a přetrvává ještě několik týdnů po ukončení. Metoda 3D-CRT je co do výsledků velice pozitivní, je však také pro tělo jedna z nejtoxičtějších. Velmi častým nežádoucím účinkem bývá i erektilní dysfunkce [11].

3.6.5 Radikální prostatektomie

Poslední mnou uváděnou léčebnou metodou je radikální prostatektomie. Tato metoda je v klinické praxi stále více využívána, je tomu tak hlavně z důvodu široké možnosti použití této metody. Prostatektomie se využívá v případě terapie lokalizovaného nebo lokálně pokročilého adenokarcinomu, případně při léčbě po neúspěšné radioterapii. Prostatektomii je možné provádět dvěma způsoby. Tím prvním je retropubická radikální prostatektomie, kdy je proveden

řez břichem a prostata je odstraněna zezadu stydké kosti. Tento typ operace je využíván častěji. Druhou možností je perineální radikální prostatektomie. V tomto případě je řez veden oblastí hráze, tedy mezi konečníkem a varlaty. Tento operační postup však přináší mnohem více komplikací a z tohoto důvodu není příliš často vybírán. Mezi časně komplikace obou metod může patřit krvácení, poranění rekta nebo hluboká trombóza a embolie. Všechny tyto komplikace jsou však v procentuálním zastoupení zanedbatelné, a v důsledku se jedná o metodu bezpečnou. Mezi pozdní komplikace patří nejčastěji inkontinence nebo erektilní dysfunkce [7].

4 METODIKA

V této části mé bakalářské práce se budu zabývat přesným postupem histologického zpracování vzorků prostaty. Tento postup se obecně skládá z příjmu, fixace, zalévání do médií rozpustných či nerozpustných ve vodě, krájení, barvení a samotné diagnostiky. Každý z těchto kroků má svá pravidla, která musí být dodržena, aby bylo zajištěno správné vyhodnocení a tím pádem správně stanovena diagnóza [16].

Během celého procesu zpracování histologických vzorků je nutné dodržovat zásady BOZP (bezpečnost a ochrana zdraví při práci).

4.1 Příjem

Při příjmu biologického materiálu je nutné, aby byla zajištěna jeho jednoznačná pozdější identifikace. V první řadě musí být tedy zkontrolovány údaje na nádobě přijímaného materiálu v součinnosti s průvodním listem. Těmito údaji je jméno a příjmení pacienta, jeho rodné číslo, kód pojišťovny a číselná diagnóza. Číselná diagnóza na průvodním dokumentu je pouze orientační stanovení ošetřujícího lékaře a na uzavření skutečné diagnózy po provedení histologického rozboru nemá žádný vliv.

Do administrativní kontroly na příjmu patří kontrola průvodního listu a všech jeho náležitostí. Na průvodním listu mají být uvedeny všechny informace shodné s nádobou, ve které byl dodán biologický materiál. Dále pak musí být uveden stručný klinický popis a délka trvání onemocnění, dále také datum vytvoření průvodního dokumentu (toto datum musí korespondovat s datem provedení lékařského zákroku, ze kterého pochází odebraný biologický materiál). Nedílnou součástí je také záznam o použitém fixačním roztoku, ve kterém byl biologický materiál odeslán. Na průvodním listu musí být také identifikace klinického

žadatele společně s jeho kontaktními údaji. Když je pacientem cizinec, je nutný na průvodním listu údaj o pohlaví. V případě, že byl pacient léčen ve stejném zařízení již před časem, je nutné vyhledat předešlé záznamy a výsledky histologického vyšetření v laboratorním informačním systému (LIS).

Jako druhou provádíme kontrolu kvality odevzdávaného biologického materiálu. Ten nesmí být v nádobě nijak zatlačen, nebo být nádobou deformován. Problémem může být také nevhodná nádoba, ve které byl materiál dodán. Druhým častým problémem je nedostatečný objem fixačního roztoku. V takovémto případě není materiál zcela ponořen a fixační roztok tak nemůže do materiálu prolínat komplexně ze všech stran.

V případě, že je při příjmu materiálu nalezena neshoda, je nutné ji začít neprodleně řešit a neshodu zapsat do k tomu určených dokumentů. V případě administrativní chyby je možné neshodu vyřešit na místě nebo po telefonické domluvě. Při takové neshodě je však nutné na průvodní list dopsat informaci o tom, s kým byla ona neshoda řešena. Když se jedná o neshodu v rámci kvality přijímaného vzorku, je vzorek vrácen odesílateli a neshoda je opět zapsána do příslušných dokumentů. Průvodní list se označí razítkem „KOLIZE“ a stejnou značkou je materiál označen i v laboratorním informačním systému. V případě, že jsou obě části kontroly v pořádku, je na průvodní list natištěno datum a čas příjmu, podpis či paraafa pracovníka (který materiál přijal) a pořadové číslo. Toto číslo má biologický materiál po celou dobu průchodu laboratoří. Je jedním z hlavních identifikačních vodítek v případě, že je nutné materiál vyhledat pro další zpracování. Proto je toto číslo psáno též na nádoby, ve kterých materiál přišel, i na histologické kazety, ve kterých je materiál po celou dobu zpracováván. Pod tímto pořadovým číslem je také zadáván do laboratorního informačního systému. Každý přijatý materiál a jeho průvodní list je nutné archivovat. Biologický materiál se archivuje po dobu 2 měsíců od uzavření diagnózy.

Průvodní list pak musí být archivován po dobu 10 let. Biologický materiál i průvodní listy je nutné uchovávat v místě histologického zpracování, aby nedošlo k poškození nebo zničení materiálu či průvodky během transportu.

V momentě, kdy je materiál administrativně přijat, je připraven k excidaci lékařem patologem. Laboratorní personál nadepíše histologické kazety pořadovým číslem, které bylo při příjmu materiálu přiděleno. Biologický materiál je pak nakrájen a jeho části jsou naskládány do histologických kazet, které se nechají fixovat.

4.2 Fixace

Fixace je proces šetrné denaturace bílkovin nacházejících se v buňkách všech tkání. Tento proces je prováděn za účelem zastavení samovolného rozkladu odebrané tkáně. Snahou je, aby tkáň po odebrání zůstala ve stavu, který je co nejvíce podobný stavu fyziologickému. Fixace však musí být prováděna bezprostředně po odebrání, jinak enzymy obsažené v protoplazmě mohou významně změnit celkovou strukturu buněk a tím poškodit danou tkáň. Během tohoto procesu může také docházet k deformacím tkáně nebo ke tvorbě nejrůznějších buněčných či tkáňových artefaktů. Fixační roztok pak musí být zvolený tak, aby tyto strukturní změny byly co možná nejmenší. Velice zásadním požadavkem na fixační roztok je také to, že nesmí nijak narušovat pozdější barvitelnost tkáně. V neposlední řadě je pak nutné vybírat takový roztok, který fixaci odebraného materiálu provádí rychle a v celkovém rozsahu. Pokud je vybrán pomalu fixující roztok, je zde možnost, že se zfixuje pouze povrchová část materiálu a vnitřní struktury podlehnou autolýze dříve, než se k nim roztok dostane. Tkáň je možné fixovat podle dvou základních hledisek [16]:

- Fyzikální metody fixace
- Chemické metody fixace

4.2.1 Fyzikální metody fixace

Fyzikální metody jsou v histologické laboratoři využívány pouze ojediněle. Jsou to však metody, které mohou být velice přínosné při pozdějších speciálních barvicích metodách nebo při enzymatickém průkazu. Nejčastější fyzikální metodou je použití fixace vysušením za nízké teploty. Fixační metoda je celá prováděna ve strojích k tomu určených. Tyto stroje se nazývají kryostaty. Při metodě je malý fragment tkáně vložen do vakua a je šokově zmražen při teplotě okolo $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Metody je nejčastěji využíváno pro nativní vzorky. Fragment je po zmražení možné v kryostatu i krájet [16].

4.2.2 Chemické metody fixace

Druhou metodou je chemická fixace pomocí tzv. fixační tekutiny. Ta je v histologických laboratořích hojně využívána. Je to hlavně z důvodu snadné přípravy fixačních roztoků, které jsou velice efektivní.

Nejběžnější používanou tekutinou bývá formol. Jeho popularita je dána hlavně velice snadnou přípravou a poměrně nízkou cenou. Velkou výhodou je rychlé pronikání do tkání, dobrá barvitelnost a výborná konzervace. Formol je vyráběn ředěním vodného formaldehydu na svůj 4% roztok. Při manipulaci s ním je však velice důležité dodržovat zásady bezpečnosti. Formol je silně dráždivý pro sliznice a pokožku. Skladován by měl být ve skleněných lahvích z hnědého skla a do formolu bývá vmíchán uhličitán vápenatý, který zabraňuje přeměně formolu na kyselinu mravenčí. Ta má na fixaci nežádoucí účinky. Formol s uhličitánem vápenatým nazýváme neutrální formol. Fakticky je však jediným využívaným formolem tzv. certifikovaný pufrovaný formalín, který je do laboratoří již dodáván zředěný a připravený k okamžitému použití. Tkáň je nutné fixovat 24-48 hodin. Je však možné nechat tkáň fixovat i déle bez nepříznivých změn ve struktuře. Po této fixaci je tkáň přenesena do 80% ethanolu

a může být dále proprána vodou, tento postup však není nutný. Formol je vhodnou fixační tekutinou pro většinu histologických preparátů. Méně vhodnou je pak pro tvorbu preparátů cytologických. Po fixaci obyčejným formolem může docházet ke zvětšení objemu buněk tkáně. Tomuto problému však lze zamezit použitím neutrálního formolu [16].

Druhou využívanou chemickou metodou je fixační tekutina s kyselinou pikrovou, tzv. Bouinova tekutina. Její výhodou je rychlá fixace a snadná pozdější barvitelnost. Nevhodnou je však pro silně prokrvené tkáně a pro vzorky zalévané do celoidinu. Krev ve tkáni hemolyzuje a stává se velice tvrdou. Tyto tvrdé fragmenty poté dělají velký problém při krájení řezů. Po této fixaci celoidin nemůže pronikat do tkáně a tím je další proces znemožněn. Tkáně se v Bouinově tekutině obvykle nechávají fixovat přibližně 24 hodin a poté je nutný oplach v 80% ethanolu. Takto zfixované tkáně se nesmí proplachovat vodou, dochází k nevratnému poškození [16].

Dalšími fixačními tekutinami jsou například ethanol nebo oxid osmičelý. Ethanol se využívá jako fixační tekutina pouze v koncentraci 99,8%. Tato metoda se však může použít pouze pro velice malé tkáně (do 5 mm). Ethanol jako fixační roztok špatně proniká do tkáně a v potaz se musí brát také jeho charakteristická vlastnost a to, že rozpouští tuky. Pro některé tkáně je tedy naprosto nevhodný. Ethanol však vůbec nemění chemickou strukturu tkáně, proto je pro využíván hlavně k určitým specifickým průkazům (vápník, železo). Doba fixace bývá obvykle mezi 3 až 8 hodinami dle velikosti fixované tkáně. Oxid osmičelý je jako fixační tekutina využívána v koncentraci okolo 2 %. Tato metoda poskytuje možnost fixovat tekutinou nebo pouze parami. Páry jsou však využívány pouze k fixacím nátěrů, pro tkáňové řezy je využívána vodná forma. Doba fixace se pohybuje okolo 24 hodin. Je nejlepší volbou pro cytologické preparáty, protože dokonale fixuje nitrobuněčné struktury. Vhodné je také jeho použití pro fixaci

lipidů, které se zároveň s fixací barví černě, protože zde dochází k redukci oxidu. Nevýhodou je pak vysoká cena a velká nestálost připraveného roztoku. Fixační roztok proniká do tkání pomalu, avšak velice rychle může dojít k přefixování tkáně, která je pak velice špatně barvitelná [16].

4.3 Zalévací metody

Zalévání histologických preparátů je proces vytvoření histologického bločku, ve kterém je tkáň pevně usazena. Zalévací média vyplní veškeré mikroskopické otvory materiálu a následné krájení na tenké řezy je pak snadno proveditelné.

- Zalévání do parafínu
- Zalévání do celoidinu
- Zalévání do médií rozpustných ve vodě

4.3.1 Zalévání do parafínu

Zalévání do parafínu je v dnešní době nejpoužívanější zalévací metodou. Jeho nepopiratelnou výhodou je její snadné a časově nenáročné provedení. Řezy tkání zalitých do parafínu jsou velice kvalitní a výhodou je i krájení řezů v sérii. Parafín by se však neměl používat pro zalévání tvrdých tkání, jako jsou chrupavky, kosti nebo šlachy. Při tomto typu zalévání totiž dochází ke smršťování a tvrdnutí daného materiálu. Je to dáno samotným postupem této metody. Pro takové tkáně musíme tedy zvolit zalévací médium, které je tužší konzistence, než je samotná zalévaná tkáň. Naprosto nevhodná je tato metoda pro tkáně, ve kterých chceme následně prokazovat lipidy. Ethanol používaný při zalévání do parafínu a celoidinu totiž lipidy ze tkání extrahuje a po zalévání tedy není možné tyto struktury ve tkáních barvit, a tedy ani stanovovat. Zalévání do parafínu má 4 fáze, kdy každá z nich je neodmyslitelnou součástí daného procesu.

1.Fáze: Odvodnění

Odvodňování tkání je proces, při kterém je tkáň zbavena veškeré vody, která byla použita při fixaci. Odvodnění se provádí vzestupnou řadou ethanolů. Nejčastěji se začíná s 70% koncentrací ethanolu, následně se tkáň přenáší do ethanolu o koncentraci 80% a koncentraci 96%. Proces odvodnění vzestupnou řadou je prováděn hlavně proto, že by se tkáň po vložení do koncentrovaného ethanolu mohly smrštit a tím by byla porušena jejich fyziologická struktura. Vzestupná řada začínající 70% ethanolem je využívána hlavně při fixaci formolem. Při jiném typu fixace je pak také možné začínat při vyšších koncentracích. Doba odvodňování má úzkou souvislost s velikostí a strukturou dané tkáně. Standardně se tato doba pohybuje v řádu 1 až 2 dnů. V případě, že je však tkáň ponechána v koncentrovaném ethanolu příliš dlouho, může docházet ke ztvrdnutí tkáně. Takto ztvrdlá tkáň se pak v dalším procesu velice špatně krájí.

2.Fáze: Prosycení tkání látkou rozpouštějící parafín

Prosycení tkání je proces, kdy musí být ze tkání zcela odstraněn ethanol. Parafín totiž v ethanolu není rozpustný, a to by zabránilo následnému zalévání. Je tedy nutné použít takovou látku, která je dobře mísitelná s bezvodým ethanolem a také dobře rozpouští parafín. Většinou jsou využívány látky s nižším bodem varu, mezi které patří například benzen nebo xylen. Tkáně jsou ponořeny na 15 minut do po sobě následujících tří lázní. Benzen i xylen mají vysoký index lomu, proto při prosycení těmito látkami dochází k tzv. projasnění tkání, kdy se tkáň stává průsvitnou. Při dlouhém pobytu v těchto látkách však opětovně může docházet ke ztvrdnutí tkání, je tak velice důležité být při prosycování důkladný a tkáň nenechávat v těchto látkách příliš dlouho. Je možné však použít i látky s vyšším bodem varu jako jsou methylbenzoát nebo methylsalicylát. Ty jsou pro zalévání do parafínu vhodnější, protože při nich nedochází ke ztvrdnutí tkání.

V praxi se tyto látky ale používají pouze omezeně, jelikož prosycování trvá déle. Celý tento proces může trvat 18 až 26 hodin.

3.Fáze: Prosycení tkání parafínem

Po prosycení tkání benzenem či xylenem jsou tkáně přenášeny do tekutého parafínu. Tento parafín bývá zkvalitňován včelím voskem, který napomáhá krájení tenkých řezů. Před první lázní samostatného parafínu je možnost tkáně přenést do lázně benzen-parafín. Tento krok však není nutný. Všechny lázně parafínu musí být přehřáté na 56-58°C. Je to dáno hodnotou bodu tání, která je pro tento proces velice důležitá. Teplota parafínu nesmí nikdy přesáhnout hodnotu 58°C, mohlo by dojít ke smrštění vzorku, který se pak špatně krájí a barví. Prosycení parafínem se provádí, aby byl ze tkáně dokonale odstraněn benzen a tkáně se tak snadněji krájely. V první lázni se tkáně nechávají 2-4 hodiny, v druhé 4-6 hodin a ve třetí 8-12 hodin. Během celého procesu musíme dbát na čistotu parafínu a nesmíme tkáně přesouvat do lázně, která už byla jednou použita.

4.Fáze: Vlastní zalití do parafínu

K samotnému zalévání se používá zkvalitněný a přefiltrovaný parafín, který před tím nebyl použit při prosycování. Zalévání se provádí v kovových nebo plastových komůrkách, které ohraničují danou tkáň. Komůrka však musí mít kolem tkáně dostatečnou vůli, aby byla zalita celá tkáň. Během tohoto procesu je nutné dodržovat zvýšené bezpečnostní opatření, kdy je nutné otevírat histologické kazety se vzorky po jednom. V tomto případě je totiž zvýšené riziko záměny vzorků. Do komůrky je nalito malé množství parafínu, do kterého je následně pinzetou přenesena tkáň a orientována potřebným směrem. Poté je tkáň zalita parafínem a na hladinu je položena histologická kazeta, ve které byl vzorek celou dobu uzavřen. Kovová komůrka s tkání, přiklopená kazetou je poté šokově

zchlazena ve studené vodě, nebo na namražených plotýnkách. Druhý způsob je v dnešní době jediný používaný. Po zchlazení parafínu v celém rozsahu je kovová komůrka odstraněna a vzorek je připraven na krájení [16].

4.3.2 Zalévání do celoidinu

Zalévání tkání do celoidinu je metoda využívaná u tvrdých tkání jako jsou kosti, chrupavky nebo zuby. Výhodou této metody je její šetrný přístup ke tvrdým tkáním. Celá tato metoda probíhá při pokojové teplotě, takže nedochází ke ztvrdnutí tkání vlivem vyšších teplot. Nevýhodou je pak veliká časová náročnost, kdy u velmi tuhých tkání může zalévání trvat i několik měsíců [16].

4.3.3 Zalévání do médií rozpustných ve vodě

Zalévání do médií rozpustných ve vodě se využívá ve chvíli, kdy tkáň nesmí přijít do kontaktu s organickými rozpouštědly. Takovými rozpouštědly jsou například benzen, xylen nebo ethanol používaná při zalévání do parafínu, nebo éter používaný při zalévání do celoidinu. Tato média jsou využívána při průkazu lipidů. Zalévání do takovýchto médií má však i jiné výhody. Při těchto metodách tkáň nemusí být odvodňována a nejsou nutné vyšší teploty. Nejčastějším médiem tohoto typu je želatina nebo vosky rozpustné ve vodě. Tyto média jsou však využívána pouze při speciálním druhu histologických vyšetření [16].

4.4 Krájení

Po zalití jsou histologické bločky připraveny na krájení. Smyslem této operace je zhotovení tenkých histologických řezů z materiálu zalitého do média. Krájení histologických bloček se provádí na specializovaných k tomu určených přístrojích tzv. mikrotomech. Přístroje pro zhotovení tenkých řezů jsou dva druhy, mikrotomy sáňkové a rotační. Sáňkový mikrotom je využíván pro krájení

tkání zalitých do parafínu nebo celoidinu. Jak název napovídá, charakteristickou součástí mikrotomu je kluzná plocha s mikrotomovým nožem. Mezi mikrotomovým nožem a zafixovaným histologickým blokem je možno měnit sklon nože ke směru řezu (horizontální rovina), i sklon nože k rovině řezu (vertikální rovina). Jako fixace bločku je v tomto případě využívána tzv. neapolská svorka. Ta je velice důležitá pro správné nastavení bločku proti mikrotomovému noži před samotným krájením. Druhou možností mikrotomů jsou mikrotomy rotační. Ty jsou používány výhradně ke krájení histologických bloků zalévaných do parafínu. Jejich velkou výhodou je možnost zhotovení sériových řezů. To znamená, že jsou všechny krájené řezy spojeny v jednu souvislou linku. U tohoto typu mikrotomu je fixován mikrotomový nůž a po kruhové trajektorii je proti noži otáčen histologický bloček. Nedílnou součástí obou mikrotomů je mikrometrický šroub. Podle stupnice, kterou obsahuje, je možné si navolit přesný počet μm , o který se bloček nebo nůž přiblíží k fixované části (tedy bločku nebo noži, podle volby mikrotomu). Tento údaj nám také udává tloušťku vytvořených řezů. Požadovaná tloušťka se může výrazně lišit podle materiálu, který je nutné ukrojit. A to je důležitá podmínka, na kterou musíme během krájení brát zřetel [16].

4.4.1 Krájení parafínových bloků

Bloky zalité do parafínu můžeme krájet na sáňkovém i rotačním mikrotomu. Při fixaci bloku v neapolské svorce je nutné dodržet úhel sklonu nože menší než 10° . Před samotným krájením je nutné si správně nastavit úhel mezi nožem a bločkem pomocí neapolské svorky a mikrometrického šroubu. Dále je nutné histologické bločky po stranách seříznout, aby byl nůž přesně kolmý na fixovaný bloček. V případě nedodržení tohoto postupu, je možné, že řezy nebude možné dále využít. Nejčastějším problémem bývá svinování řezů, které bývá často zapříčiněno snahou ukrojit příliš tlustý řez, může však být na vině i příliš tvrdý parafín nebo nízká teplota v místnosti. Druhým častým

problémem bývá stlačování řezů, a to bývá zapříčiněno malým sklonem nože nebo jeho nedostatečnou ostrostí, ale také příliš měkkým parafínem nebo zvýšenou teplotou v místnosti. Ve chvíli, kdy je z bloku ukrojen řez, je nutné ho přenést na podložní sklo. Nejčastější metodou je napínání parafínových řezů pomocí teplé vody. Řezy jsou přeneseny na hladinu teplé destilované vody ve skleněné nádobě (37-40°C). Ty se pomocí tepla na hladině narovnaj. Pod hladinu je poté zasunulo minimálně z poloviny podložní sklo a pomocí histologické jehly je řez přisunut ke sklu. Sklo je poté pod úhlem vytahováno z vody a řezy jsou pomocí jehly přilepeny na sklo, které se poté pomalu vytahuje z vody a řez se rovnoměrně rozprostře na podložní sklo. Vodu necháme ze skla okapat a sklo s řezy jsou poté přesunuty do sušárny k důkladnému osušení [16].

4.4.2 Krájení celoidinových bloků

Pro krájení celoidinových bločků je využíván výhradně sáňkový mikrotom, který je opatřený dlouhým těžkým nožem. Během celého krájení je nutné nůž i bloček vlhčit ethanolem. Během tohoto krájení naopak musí být úhel nože ku bločku větší než 10° a nůž musí být ku bločku v šikmé poloze. Vlhčení ethanolem se zde provádí pro jednodušší manipulaci s řezy. Právě ukrojené řezy jsou totiž pomocí štětce namočeného v ethanolu narovnávány a přenášeny k dalšímu zpracování. Celoidonové řezy jsou velice často lepeny pomocí éterových par, kdy jsou pomocí 96% ethanolu nataženy na sklo a pak jsou v uzavřené nádobě s párami éteru ponechány na dobu 5 minut [16].

4.5 Barvení histologických řezů

Barvení histologických preparátů se provádí pro zvýraznění jednotlivých struktur tkáně. Bez obarvení jsou jednotlivé struktury ve světelném mikroskopu prakticky neodlišitelné, protože lom světla jednotlivých struktur není příliš odlišný. Barvení využívá toho, že jednotlivé struktury tkáně dokážou vstřebávat

určitá barviva. V histologii je využíváno několik druhů barev. Nejčastější dělení je podle volných radikálů v barvivech. Podle těchto radikálů můžeme barviva dělit na barviva zásaditá a kyselá. Kyselá barviva barví cytoplazmu buněk, proto je pro ně možné použít i název plazmatická barviva. Zásaditá barviva zase barví jádra, proto je možné pro ně použít název jaderná barviva. Podle barvy, kterou se jednotlivé struktury tkáně barví, můžeme hovořit o strukturách eosinofilních, bazofilních a neutrofilních. Eosinofilní struktury se kvůli svému kyselému charakteru barví kyselými barvivy, jako je například Eosin, po kterém je celá tato skupina pojmenovaná. Další možností jsou struktury bazofilní, které jsou barveny zásaditými barvivy jako například Hematoxylin. Struktury neutrofilní jsou barveny zásaditými i kyselými barvivy, ale jejich konečné zbarvení je kvůli obojímu charakteru vybledlé. V histologických laboratořích se však mnohem více než barvení pouze jedním druhem barvy, používá barvení zásaditým i kyselým barvivem najednou. V takovou chvíli je obarven celý preparát podle charakteru jednotlivých struktur. Nejpoužívanější a nezákladnější metoda je v takovém případě metoda Hematoxylin-Eosin. Mezi další možnosti barvení patří barvení pomocí metachromatických barviv. V případě, že je ve struktuře určitá složka, je její barva odlišná o barvy, kterou daná struktura za normálních podmínek má [16].

4.5.1 Barvení řezů metodou Hematoxylin-Eosin

Tato základní metoda je složena z několika kroků, které musí být dodrženy. V opačném případě buď k obarvení řezů vůbec nedojde, nebo jsou řezy obarveny nedostatečně. Mezi tyto kroky patří:

- Odparafinování řezů / Deparafinace
- Vlastní barvení řez
- Odvodnění
- Projasnění

- Montování obarvených řezů

1. Fáze: Odparafinování řezů

Deparafinace je důležitá hlavně proto, že většina barev je připravována jako vodné roztoky. Tkáňové řezy na obarvení jsou však po ukrojení stále obaleny parafínem. Ten je však hydrofobní, proto je nemožné barvit tkáň před odparafinováním. Barvy by do tkáně vůbec nepronikly a tím by nedošlo k jejich obarvení. Pro odstranění parafínu ze tkáně je zapotřebí dvou lázní xylenů po dobu zhruba 5 minut. Xylen je však s vodou nemísitelný stejně jako parafín. Je tedy nutné řezy provést ještě sestupnou řadou alkoholů a tím tkáň tzv. zavodnit.

Tkáň jsou nejdříve přeneseny do koncentrovaného ethanolu na zhruba 5 minut a pak na stejně dlouhou dobu do ethanolu o koncentraci 96 %. Poté jsou řezy přeneseny do vody. Tímto krokem končí přípravné procesy před vlastním barvením.

2. Fáze: Vlastní barvení řezů

Odparafinované řezy jsou poté přeneseny na 10 minut do Hematoxylinu. Přesná doba barvení je velice ovlivněna stářím roztoku, velikostí i typem tkáně. V případě, že je barveno v jednu chvíli více různých tkání, je nejdříve nutné obarvit jeden vybraný řez, aby byla předem zjištěna optimální doba barvení. Po obarvení hematoxylinem je nutné řezy opláchnout vodou a zdiferencovat kyselým ethanolem. Kromě jader totiž hematoxylin obarví i jiné složky tkáně, které musí být odbarveny, proto je využíván kyselý ethanol (3-5 kapek kyseliny chlorovodíkové nebo octové smíchaných se 100 ml 96% ethanolem). Po zdiferencování řezů je nutné řezy důkladně opláchnout pod tekoucí vodou do zmodrání jader. Poté jsou řezy dobarčovány Eosinem po dobu zhruba 5 minut a poté jsou znovu opláchnuty ve vodě.

3. Fáze: Odvodnění

Po samotném obarvení je nutné řezy odvodnit vzestupnou řadou alkoholů. Kdy je tkáň opět zbavena vody.

4. Fáze: Projasnění

Po odvodnění jsou řezy přeneseny do dvou lázní xylenu.

5. Fáze: Montování obarvených řezů

Posledním krokem barvení je již obarvené řezy tzv. zamontovat. Kdy jsou řezy na podložním skle uzavřeny sklem krycím, které je k podložnímu sklu upevněno pomocí montovacího média. Stejně jako zalévací tak i montovací média se dělí na média rozpustná a nerozpustná ve vodě. Látka, která je montovacím médiem, musí být dokonale průhledná, její index lomu musí být co nejvíce podobný indexu lomu vzduchu, a nesmí nijak interferovat s barvami řezu. Nejčastějším montovacím médiem je kanadský balzám. Tedy pryskyřice rozpuštěná v xylenu. Řez na podložním skle je pokapán kanadským balzámem a je přiloženo krycí sklo, které je pinzetou opatrně přitlačeno k řezu, aby byl balzám roztláčen po celém povrchu řezu. Je nutné dávat pozor, aby pod krycím sklem nezůstaly bublinky vzduchu, které poté mohou v mikroskopu znemožnit pozorování preparátu. Přebytečné médium, které po přitlačení vyteklo zpod krycího sklíčka je otřeno hadříkem, který byl namočen do xylenu. Při otírání je nutné dávat pozor, aby s krycím sklem nebylo pohnuto, mohlo by dojít k potrhání preparátu. Po otření je hotový preparát ponechán na 2 až 3 dny v sušárně, aby došlo k odpaření xylenu, a tím je balzám vytvrzen. V této chvíli je již možné preparát pozorovat pod mikroskopem bez dalších nutných postupů [16].

Krok č.	Úkon	Doba
1.	Deparafinace v xylenu	20 min
2.	Proplach řadou 96% ethanolu	
3.	Oplach v destilované vodě	
4.	Lázeň Mayerova hematoxylinu	5 min
5.	Diferenciace pod tekoucí vodou	
6.	Oplach v destilované vodě	
7.	Lázeň 0,5% roztoku Eosinu	2 min
8.	Oplach v destilované vodě	
9.	Odvodnění řadou 96% etanolu	
10.	Projasnění v xylenu	

Tabulka 2: Postup barvení Hematoxylin-Eosin [18]

4.5.2 Barvení Massonovým trichromem

Barvení Masonovými trichromy se využívá pro zvýraznění kolagenních vláken ve tkáních. Pro barvení jader se u všech typů trichromů využívá Hematoxylin. U žlutého trichromu je využíván Harrisův hematoxylin, u modrého trichromu je to Weigertův železitý hematoxylin a u zeleného trichromu je možné použít jeden z dříve zmíněných. Podle barvení kolagenního vaziva poté můžeme trichromy dělit na:

- Modrý trichrom – kolagenní vazivo se barví modře
- Zelený trichrom – kolagenní vazivo se barví zeleně
- Žlutý trichrom – kolagenní vazivo se barví žlutě

Modrý trichrom je složen z několika barviv. V dnešní době jsou těmito barvivy azokarmín, anilinová modř a orange G. Dříve byla tato směs složena ze železitého hematoxilinu a kyselého fuchsinu. Výsledkem tohoto barvení je modře zbarvené kolagenní vazivo a jádra buněk, svalovina se barví červeně.

Krok č.	Úkon	Doba
1.	Deparafínace v xylenu	20 min
2.	Proplach řadou 96% ethanolu	
3.	Oplach v destilované vodě	
4.	Lázeň Weigertova železitého hematoxylinu	5 min
5.	Diferencovat pod tekoucí vodou	5 min
6.	Oplach v destilované vodě	
7.	Lázeň Massonova fuchsinu	3 min
8.	Oplach v destilované vodě	
9.	Diferencování v 1% kyselině fosfowolframové	5 min
10.	Oplach v destilované vodě	
11.	Lázeň Anilínové modři	3 min
12.	Oplach v destilované vodě	
13.	Diferenciace v 1% kyselině octové	1-2 min
14.	Oplach v destilované vodě	
15.	Odvodnění řadou 96% ethanolu	
16.	Projasnění v xylenu	

Tabulka 3: Postup barvení Modrý Massonův trichrom [18]

Zelený trichrom je metoda velice často využívaná pro své jedinečné a typické barvení jednotlivých struktur ve tkáni. Barvit může buď standardním způsobem, nebo způsobem zrychleným, kdy je světlá zeleň vmíchána do barvicí směsi s orange G. Výsledkem barvení jsou modře zbarvená jádra, červeně zbarvená svalovina, erytrocyty jsou oranžové a kolagenní vazivo zelené.

Při barvení řezů žlutým trichromem je využívána jako žlutá barvicí složka roztok šafránu. Při tomto barvení nám jádra vychází modře, svalovina červeně a kolagenní vazivo má žlutou až oranžovou barvu. Barvení žlutým trichromem však musí být po obarvení a zamontování rychle odečteno, po delší době začíná žluté barvivo v kolagenních vláknech blednout, a to by mohlo ovlivnit případnou diagnostiku [16].

4.5.3 Barvení metodou Weigert van Gieson

Při tomto barvení je pro jádra využít Weigertův železitý hematoxylin, což je směs 96% ethanolu, Hematoxylinu, chloridu železitého a kyseliny chlorovodíkové, kde jsou řezy naloženy na dobu přibližně 10 minut. Po následném oplachu jsou řezy dobarvovány roztokem pikrofuchsinu a následně opláchnuty ethanolem. Výsledkem pak tedy jsou modročerná až hnědočerná jádra, červeně zbarvené kolagenní vazivo a žlutá svalovina. Je důležité si uvědomit, že zbarvení jednotlivých struktur ve tkáních je u svaloviny a vaziva obráceně oproti přehledovému barvení žlutým trichromem [16].

Krok č.	Úkon	Doba
1.	Deparafinace v xylenu	20 min
2.	Proplach řadou 96% ethanolu	
3.	Oplach v destilované vodě	
4.	Lázeň Resorcin-fuchsinu	30 min
5.	Diferenciace pod tekoucí vodou	
6.	Diferenciace v 1% kyselém alkoholu	
7.	Oplach v destilované vodě	
8.	Lázeň Weigertova železitého hematoxylinu	10 min
9.	Diferenciace pod tekoucí vodou	
10.	Oplach v destilované vodě	
11.	Lázeň Pikrofuchsinu	5 min
12.	Lázeň zředěného Pikrofuchsinu	2-4 sek
13.	Odvodnění řadou 96% ethanolu	
14.	Projasnění v xylenu	

Tabulka 4: Postup barvení Weigert van Giesen [18]

4.5.4 Průkaz polysacharidů

Jako specifické barvení je možné použít reakce na průkaz polysacharidů. Tyto reakce jsou založeny na interakci s polysacharidovou složkou jednotlivých buněk vyšetřované tkáně. Základní reakcí, která se pro polysacharidy využívá, je PAS reakce. Při tomto barvení je jako barvicí směs použita kyselina jodistá se Schiffovým činidlem. Toto činidlo však musí být před použitím zcela čiré.

Ve chvíli, kdy je již lehce narůžovělé, je nutné ho okamžitě vyměnit za nové. Tento roztok je nutné skladovat v lednici v hnědých skleněných lahvích, jinak dochází k jeho znehodnocení. Samotná reakce je založena na oxidaci polysacharidů. Při ní vznikají aldehydové skupiny, které následně reagují se Schiffovým činidlem. Výsledkem je fialově červené zbarvení polysacharidových struktur jako jsou glykogen, mukopolysacharidy nebo mukoproteiny. Pro dobarvení je možné využít Hematoxylin, který nám jádra zbarví do modra [16].

Krok č.	Úkon	Doba
1.	Deparafinace v xylenu	20 min
2.	Proplach řadou 96% ethanolu	
3.	Oplach v destilované vodě	
4.	Opláchnout v 3% kyselině octové	
5.	Bez oplachu naložit do Alcianové modři (pH 2,5)	30 min
6.	Oplach v destilované vodě	
7.	Naložit do 1% kyseliny jodisté	10 min
8.	Oplach v destilované vodě	
9.	Naložit do Schiffova činidla	30 min
10.	Diferencovat pod tekoucí vodou	
11.	Dobarvit v Mayerově hematoxylinu	5 min
12.	Diferencovat pod tekoucí vodou	
13.	Odvodnění řadou 96% etanolu	
14.	Projasnění v xylenu	

Tabulka 5: Postup barvení PAS reakce [18]

4.6 Metodika imunohistochemie

4.6.1 Fixace v imunohistochemii

Fixační roztok pro imunohistochemii je nutné volit tak, aby byl vůči tkáni naprosto inertní a aby byly zachovány veškeré struktury ve tkáních. Stejně jako při fixaci vzorků pro klasické barvení, se fixace využívá, aby nedošlo k autolýze buněk, a tím nebyla znehodnocena odebraná tkáň. Dochází však ke změnám v důsledku vlastní fixace jako jsou změny propustnosti membrán nebo změna ve struktuře cytoplazmy. Fixace je však pro imunohistochemii nezbytná, nativní

antigen přítomný ve vzorku by totiž během další manipulace mohl být nedopatřením ze vzorku odstraněn. Jako nejběžnější fixační tekutina je využíván formalín. Velice důležité je však jeho pH. V případě, že je použit nepufrovaný formalín s pH okolo 4, je nutné brát ohled na jeho pomalou reakci.

Když je použit formalín pufrovaný, který má pH v rozmezí 4,5 – 5,5, probíhá reakce mnohem rychleji. Jde o množství vazeb mezi formalínem a tkání. Fixací formalínem však může dojít ke ztrátě některých epitopů v rámci antigenu, je tedy nutné s touto eventualitou počítat. Vzorky pro imunohistochemické vyšetření musí být fixovány v malých kusech, fixace totiž nesmí být delší než 24 hodin. Při fixaci větších tkání může dojít k přefixování horní části materiálu a vnitřní struktury mohou být stále nativní. Tato chyba může naprosto znemožnit odečet imunohistochemického preparátu. Pufrovaný formalín je však i přes svá negativa používán jako standardní metoda. Jinou možností fixační tekutiny je Bouinův roztok, což je směs formalínu a kyseliny pikrové. Bouinův roztok však reaguje s lipidy, proto není vhodné jej využívat ve chvíli, kdy je nutné tyto antigeny prokazovat. Další možností je fixace ethanolem nebo acetonem, tento proces je však velice pomalý a z toho důvodu není příliš využíván [17].

4.6.2 Zalévání

Nejčastější zalévacím médiem v imunohistochemii je parafín. Při zalévání do parafínu se postupuje stejně jako při zalévání vzorků určených k základnímu histologickému barvení. Je však nutné brát zvýšený zřetel na optimální teplotu během zalévání. Některé epitopy antigenu mohou být vysoce citlivé na teplotu již okolo 60°C. Je tedy nutné použít parafín o nižší teplotě tání [17].

4.6.3 Imunohistochemická detekce

Před samotnou detekcí je důležité demaskovat epitopy. Části antigenu mohou být během fixace zablokovány nebo maskovány. Aby mohla samotná imunohistochemická detekce proběhnout, je nutné epitopy antigenu demaskovat. V případě, že epitop nebude demaskován, mohlo by dojít ke zkreslení výsledku nebo by reakce nemusela proběhnout vůbec a vést k falešné negativitě.

K demaskování epitopů jsou v dnešní době využívány především proteolytické enzymy. Ty degradují nežádoucí vazby, může však docházet k uvolnění řezů z podložního skla. Proto jsou podložní skla pro imunohistochemické vyšetření potažena látkami, které tomuto uvolnění zabrání. Vrstva těchto adhezivních látek však musí být přiměřená, jinak může docházet k nechtěnému zabarvení reakce. Při krájení řezů pro imunohistochemické vyšetření je velice důležité správné natažení řezů na sklo a ponechání natažených řezů v termostatu po dobu minimálně 30 minut. Tím je zajištěno správné přilnutí řezů na podložní sklo. Nejčastěji používaným proteolytickým enzymem je trypsin, který štěpí vazby mezi lysinem a kteroukoliv jinou aminokyselinou. Pro správnou funkci těchto enzymů je nezbytná vhodná teplota. Ta musí být tedy v termostatu 37°C. Při nižší teplotě je aktivita enzymu snížena, při vyšší teplotě je enzym inaktivní [17].

Antigen je detekován pomocí protilátek, na které jsou navázány další komponenty pro její zviditelnění. Tato metoda je založena na reakci primární protilátky s antigenem. Na primární protilátku je navázána sekundární protilátka s biotinem. Na komplex protilátka-biotin je pak navázán enzym, který zesiluje reakci. V posledním kroku je přidán substrát. Enzymatickou přeměnou je pak substrát přeměněn na barevný produkt, který je možné detekovat. Primární protilátkou je neznačená myší protilátka a jako sekundární protilátka se využívá protilátka, na kterou je již navázán enzym nebo biotin. Jako enzym je

nejčastěji využívána peroxidáza nebo alkalická fosfatáza. Peroxidáza však může vytvářet falešnou pozitivitu zkoumané tkáně. Tu je tedy nutné předem utlumit. Falešnou pozitivitu je možné pozorovat ve tkáních, kde jsou přítomny hemoproteiny. Takovými tkáněmi mohou být například erytrocyty, svalová tkáň nebo játra. Utlumení peroxidázové nebo pseudoperoxidázové aktivity můžeme dosáhnout krátkodobou inkubací ve vodném peroxidu vodíku. Druhou možností enzymu je alkalická fosfatáza využívaná pro svou nezávislost na peroxidázové aktivitě potažmo hemoproteinech. Je tedy využívána u vzorků, které byly odebrány z prokrvených tkání [17].

Během celé imunochemické detekce antigenu je nutné dodržovat a řídit se pokyny od výrobce reagensů, které jsou během vyšetření použity. Je zde například uvedeno, zda je nutné před použitím dodávané protilátky ředit nebo jsou již dodávány v požadované koncentraci. Je možné zde najít i informace o přesném postupu, teplotách nebo časech pro danou šarži reagensů. V okamžiku, kdy je zviditelněna reakce antigenu s protilátkou, je možné řezy zamontovat. Montování probíhá obdobným způsobem jako u řezů barvených základní histologickou metodou Hematoxylin-Eosin. Po zamontování lze řezy okamžitě prohlížet ve světelném mikroskopu [17].

Pro průkaz patologií prostaty se nejčastěji využívá protilátka p63 jako průkaz benigní hyperplazie prostaty a protilátka AMACR jako průkaz adenokarcinomu.

Krok č.	Úkon	Doba
1.	Deparafinace v xylenu	
2.	Vložení do čerstvě připraveného fosfátového pufru (pH 9)	
3.	Inkubace ve vodní lázni při 97 °C	65 min
4.	Chlazení nádoby	20 min
5.	Proplach ve fosfátovém pufru (pH 7,4 – 7,5)	
6.	Aplikace čerstvého 3% peroxidu vodíku (ve tmě)	10 min
7.	Oplach fosfátovým pufrem (pH 7,4 – 7,5)	2x2 min
8.	Aplikace primární protilátky v našem případě AMACR a p63	20 min
9.	Aplikace vizualizačního činidla Chromogen DAB	5-10 min
10.	Oplach v destilované vodě	
11.	Lázeň Mayerova hematoxylinu	5-8 min
12.	Oplach pod tekoucí vodou	3-5 min
13.	Odvodnění řadou 96% etanolu	
14.	Projasnění v lázni ethanol: xylenu (1:1)	
15.	Projasnění v xylenu	

Tabulka 6: Postup průkazu protilátkami AMACR a p63 [18]

5 VÝSLEDKY

5.1 Příjem prostatického materiálu

Prostatická tkáň může přicházet na Patologicko-anatomické oddělení Oblastní nemocnice Kladno v několika možných formách:

- Punkční biopsie prostaty
- Prostatické resekáty
- Prostata jako celý orgán

Prostatická tkáň může přijít ve formě punkčních válečků. V takovém případě je nutné každý váleček dále zpracovávat samostatně. Tento postup se volí především pro snížení rizika poškození prostatické tkáně. Každý váleček je do kazet ukládán na speciální podložky, které zamezí nežádoucímu pohybu v průběhu další práce se vzorkem. Váleček by měl být v histologické kazetě narovnaný a v případě, že není celistvý, je nutné váleček poskládat co nejpřesněji v jeden celek. Struktury tkáně pozměněné karcinomem bývají velice často při okrajích a jsou zde ve velmi malém množství. Je tedy nutná dobrá spolupráce s odběrovými centry. Punkční válečky jsou biologickým materiálem, který je velice náchylný na špatný odběr, transport a zacházení. Obávaným rizikem při znehodnocení pak bývá falešná negativita diagnostikovaného výsledku. Do průvodního listu je poté zapsán přesný počet punkčních válečků a popřípadě jejich stav po přijetí.

Druhou možností, jak je možné prostatický materiál na oddělení dodat, jsou resekáty. Administrativní příjem probíhá stejně jako při jiném materiálu pro histologické zpracování. Důležité je však v tomto případě zohlednit velké množství samostatných malých kousků odebrané tkáně. V makroskopickém opisu tkáně se velice často před ukládáním resekátů do histologických kazet

změří celkový objem dodaného materiálu. Je možné také přibližně změřit jednotlivé resekáty pro lepší dokreslení předběžné diagnózy. Tento údaj nám může napovědět, jaká byla přibližně z prostaty odebrána část. Z tohoto důvodu je potřeba připravit dostatečné množství histologických kazet. Resekáty se v kazetách nesmí překrývat a každý musí být umístěn tak, že bude v následné řezné ploše při krájení.

V případě, že je excidována celá prostata, je nutné mít od ošetřujícího lékaře viditelně označenou stranovou orientaci prostaty. Často je tak na pravé straně udělán chirurgickou nití steh a v průvodním listu je pak napsáno, že stehem je značena právě pravá strana. Prostata je velice často vyjímána i se semennými váčky. Excize se tedy provádí jak z obou semenných váčků, tak z obou laloků prostaty. V případě, že je na průvodním listu v klinickém průběhu zapsán pozitivní nález v určitém místě, je toto místo zpracováno celé. Velice často se tak děje v případě, že vyšla pozitivní předcházející punkční biopsie v jednom z laloků. Řezy semennými váčky se provádějí hlavně pro průkaz, jestli se onemocnění již rozšířilo mimo prostatu. Dalším používaným ukazatelem možného rozšíření mimo orgán je znázornění okrajových částí černou tuží. Tuž znázorňuje jakoukoliv strukturu, pro nás je však prioritní obarvení okrajů. Proto se na řezy aplikuje až ve chvíli, kdy už jsou v histologických kazetách, aby nedošlo ke kontaminaci nežádoucích částí.

5.2 Fixace, zalévání a krájení

Po přijetí a excidaci prostatického materiálu je s ním nakládáno stejně, jako s ostatními vzorky, které laboratoř přijme. Fixace je prováděna v nádobách, které jsou naplněny koncentrovaným pufrovaným formalínem HistoFOR BFS-L 10.

Na Patologicko-anatomickém oddělení Oblastní nemocnice Kladno je jako jediná zalévací metoda využívána metoda zalévání do parafínu. Z tohoto důvodu jsou po 5 až 8 hodinách fixace vzorky přesunuty do Tkáňového automatu TPC 15 DUO. Zde je zvolen program Standard 1 (viz. Tabulka 2) a vzorky v histologických kazetách jsou ve speciálních koších do tohoto automatu umístěny.

1 AAF 1:15 hodiny	2 AAF 1:15 hodiny	3 96% Ethanol 1 hodina	4 96% Ethanol 1 hodina	5 96% Ethanol 1 hodina
10 Xylen 1 hodina	9 Xylen 1 hodina	8 96% Ethanol 1 hodina	7 96% Ethanol 1 hodina	6 96% Ethanol 1 hodina
11 Xylen 1 hodina	12 Zkvalitněný parafín 1 hodina	13 Zkvalitněný parafín 1 hodina	14 Zkvalitněný parafín 1:15 hodiny	15 Zkvalitněný parafín 1:15 hodiny

Tabulka 7: Konfigurace roztoků ve tkáňovém automatu TPC 15 DUO [18]



Obrázek 5: Tkáňový automat TCP 15 DUO (vlastní foto)

Následující den ráno jsou vzorky připraveny k zalévání. Pro zalévání je využívána zalévací linka Medite TES Valida. Po zalití a zchlazení jsou vzorky přeneseny do mrazících boxů v laboratoři určené ke krájení.



Obrázek 6: Zalévací linka Medite TES Valida (vlastní foto)

Vzorky jsou poté krájeny na sáňkových mikrotomech Leica SM2010R. Řezy jsou nalepeny na podložní skla a ve stojácích jsou přeneseny do barvicího automatu Tissue-Tek Prisma. V barvicím automatu jsou všechna skla deparafinována a je zde možné i automaticky obarvit metodu Hematoxylin-Eosin a některá další speciální barvení jako je například PAS reakce.



Obrázek 7: Sářkový mikrotom Leica SM2010R (vlastní foto)

Společně s barvicím automatem je linka tvořena také montovacím strojem Tissue-Tek Film. Všechna skla jsou tedy automaticky předávána po obarvení k zamontování. K zamontování je používána speciální montovací páska Tissue-Tek Coverslipping Film, která plně nahrazuje krycí skla používaná při ruční metodě montování.



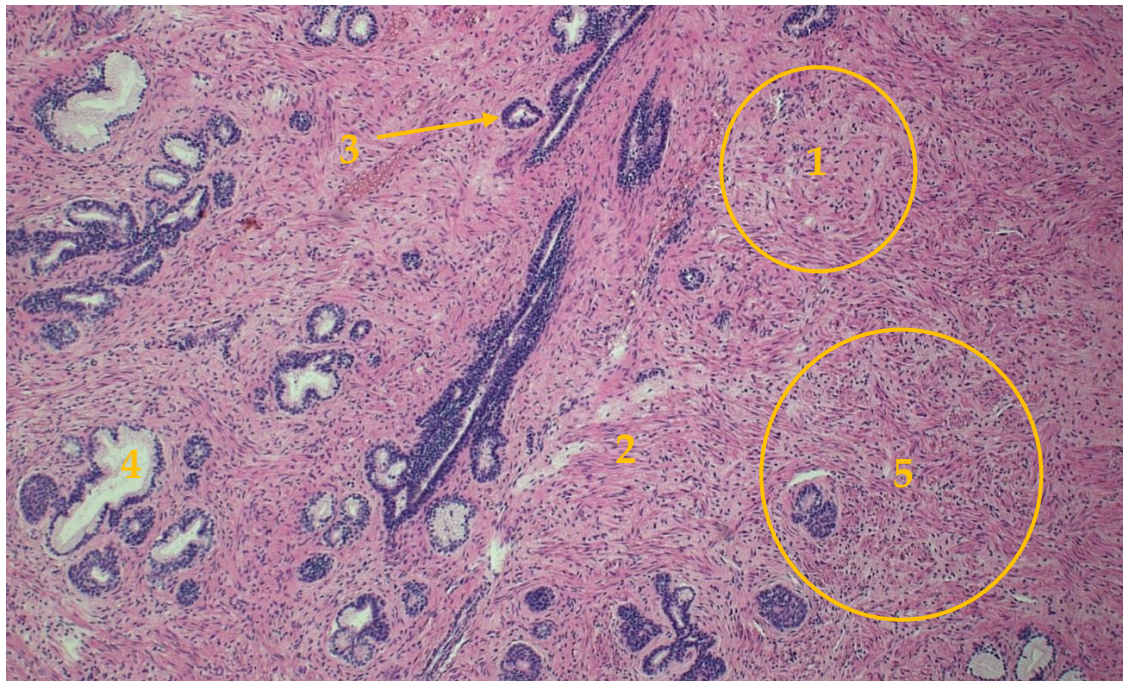
Obrázek 8: Barvicí a montovací automat Tissue-Tek (vlastní foto)

V případě, že barvicí metoda není zahrnuta v barvicím automatu, jsou vzorky pouze deparafinovány a dále jsou barveny ručními metodami, stejně jako vzorky pro imunohistochemii.

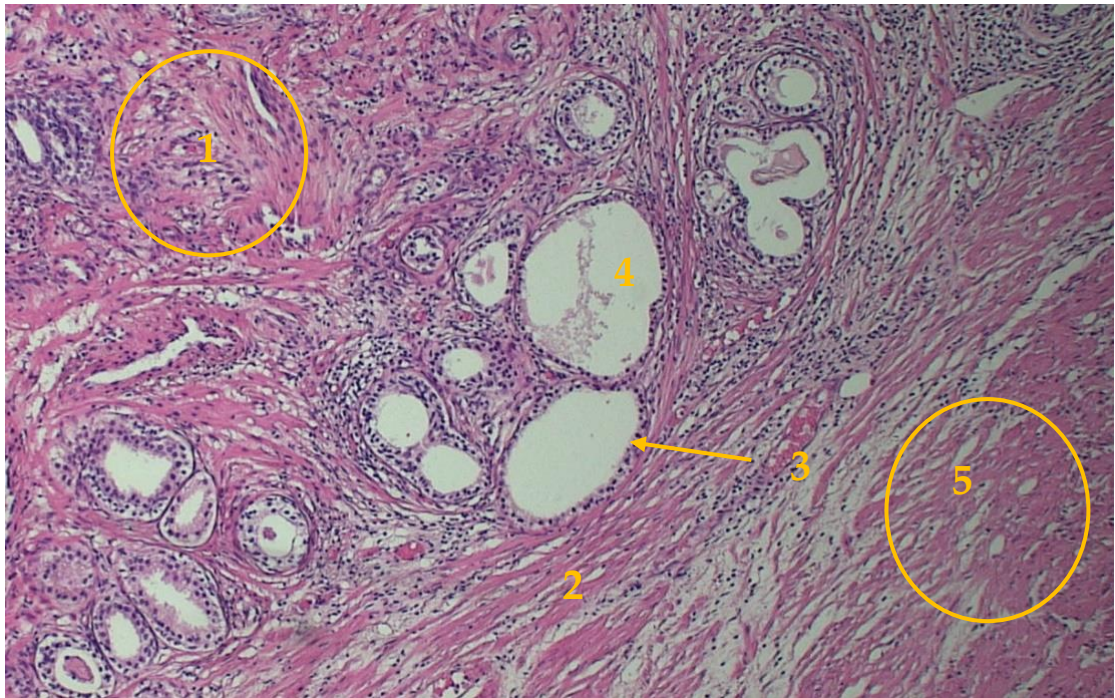
5.3 Použité druhy barvení a imunohistochemické průkazy

5.3.1 Základní barvicí metoda Hematoxylin-Eosin

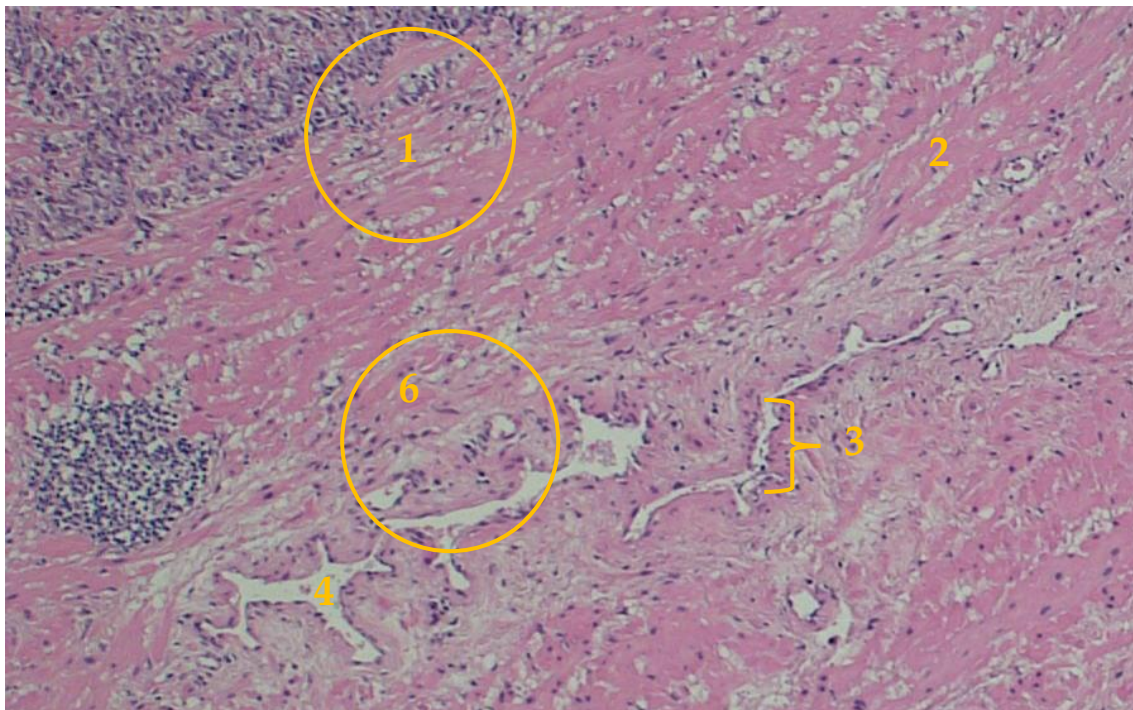
Při použití základní barvicí metody Hematoxylin-Eosin je patrných mnoho prostatických struktur. Z podstaty této metody se jádra buněk barví fialově a cytoplazma růžově. Fibromuskulární stroma (1) je tvořeno kolagenním a elastickým vazivem, které je protkáno velkým množstvím buněk hladké svaloviny (2). Dále je na snímcích patrný žlázo­vý parenchym (3), který je tvořen cylindrickým žlázo­vým epitelem. Epitel ohraničuje průsvit tuboalveolárních žlázek (4), které produkují sekret. V preparátu s benigní hyperplazií je patrná přestavba stromatózní části prostaty (5). V preparátu s adenokarcinomem je naopak patrná přestavba tuboalveolárních žlázek (6).



Obrázek 9: Zdravá prostatická tkáň metodou Hematoxyli-Eosin, zvětšeno 200x (vlastní foto)



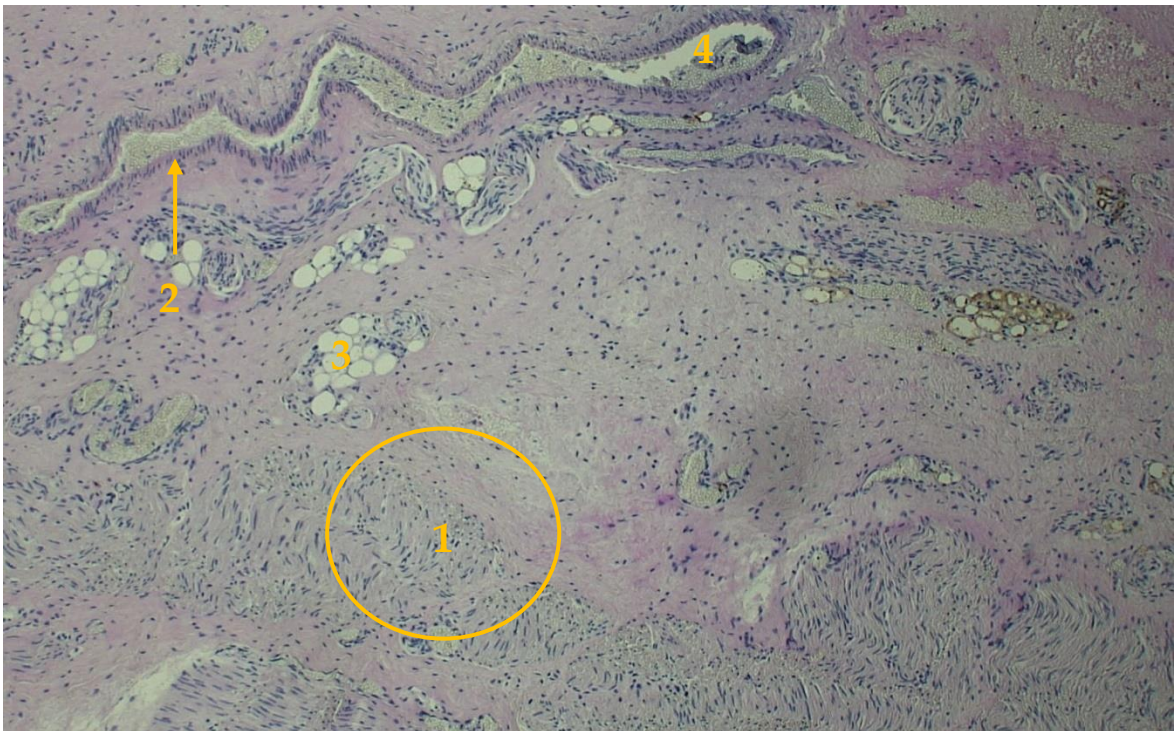
Obrázek 10: Benigní hyperplazie prostaty metodou Hematoxylin-Eosin, zvětšení 200x
(vlastní foto)



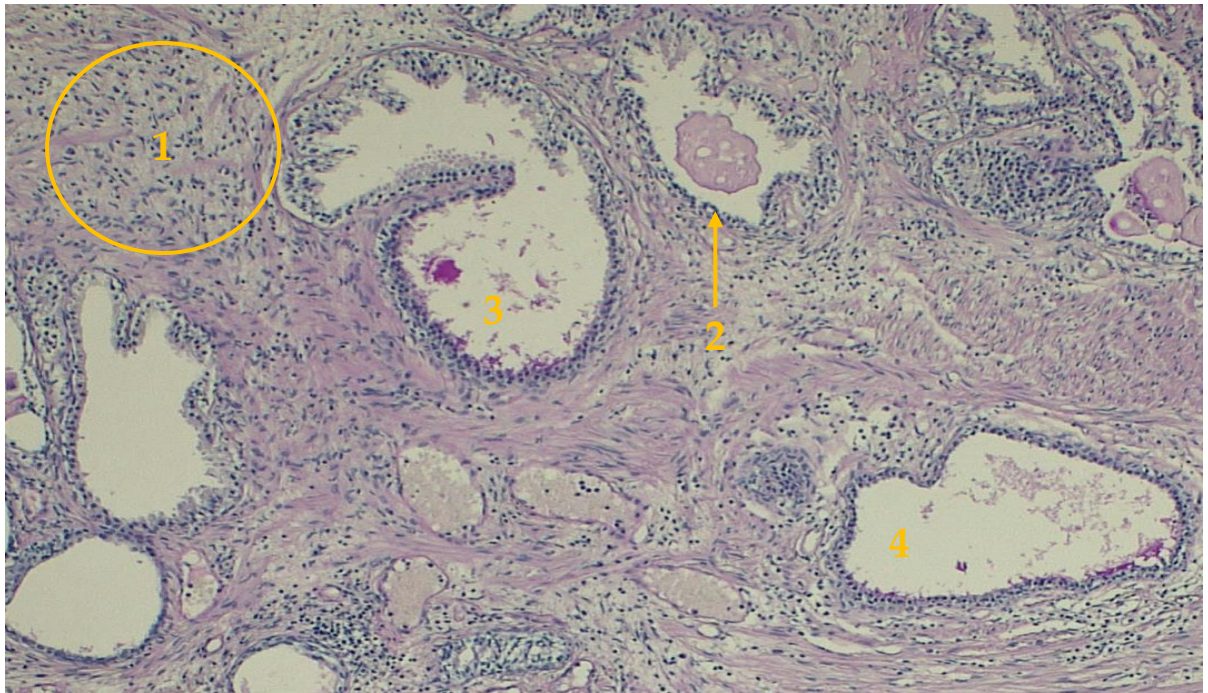
Obrázek 11: Adenokarcinom prostaty metodou Hematoxylin-Eosin, zvětšení 400x (vlastní foto)

5.3.2 Speciální barvení PAS reakce

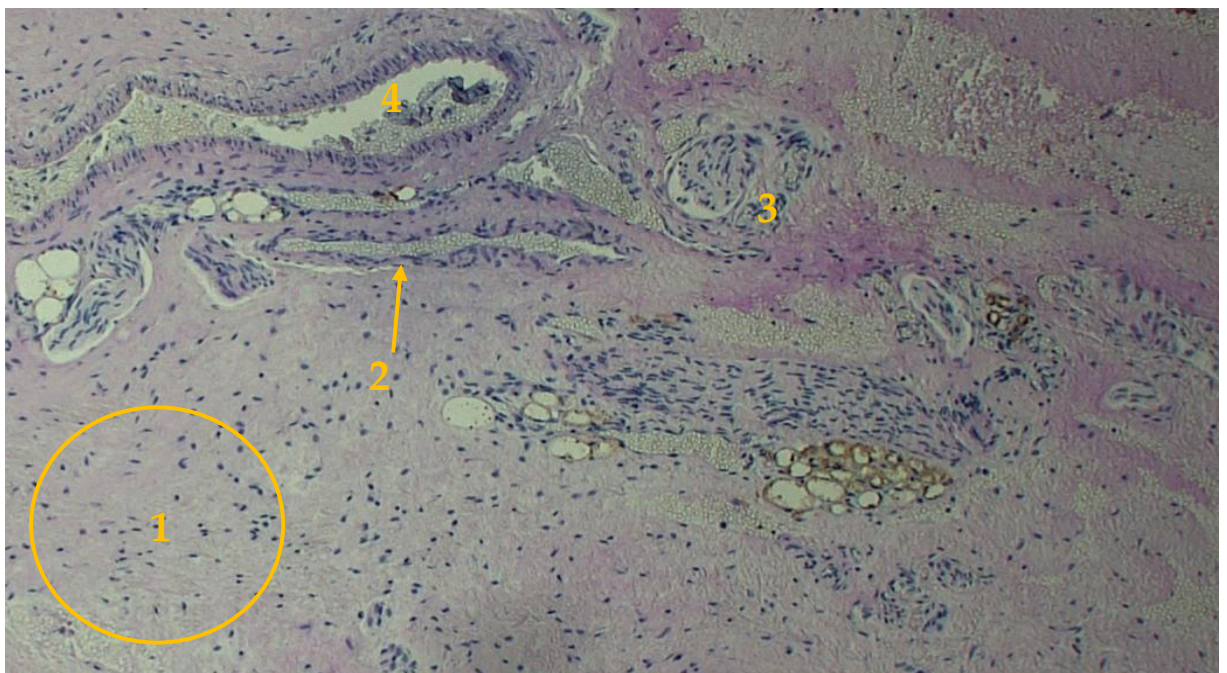
Pro znázornění polysacharidů, glykoproteinů a glykogenu je využívána PAS reakce. V místě průřezu je patrné purpurové zbarvení, jádra se barví modře. Na preparátech je patrné vazivově svalové stroma (1). Dále pak tuboalveolární žlázy (2) tvořící průsvit. V těchto místech je patrné purpurové zabarvení, které je následkem složení sekretu v těchto buňkách (3). Purpurové zbarvení je patrné i v průsvitu žlázek (4). Z tohoto důvodu se PAS reakce využívá hlavně pro znázornění těchto žlázek. Stromatózní část žlázy neobsahuje, proto není tento druh barvení pro znázornění benigní hyperplazie příliš vhodný.



Obrázek 12: Zdravá prostatická tkáň metodou PAS reakce, zvětšeno 200x (vlastní foto)



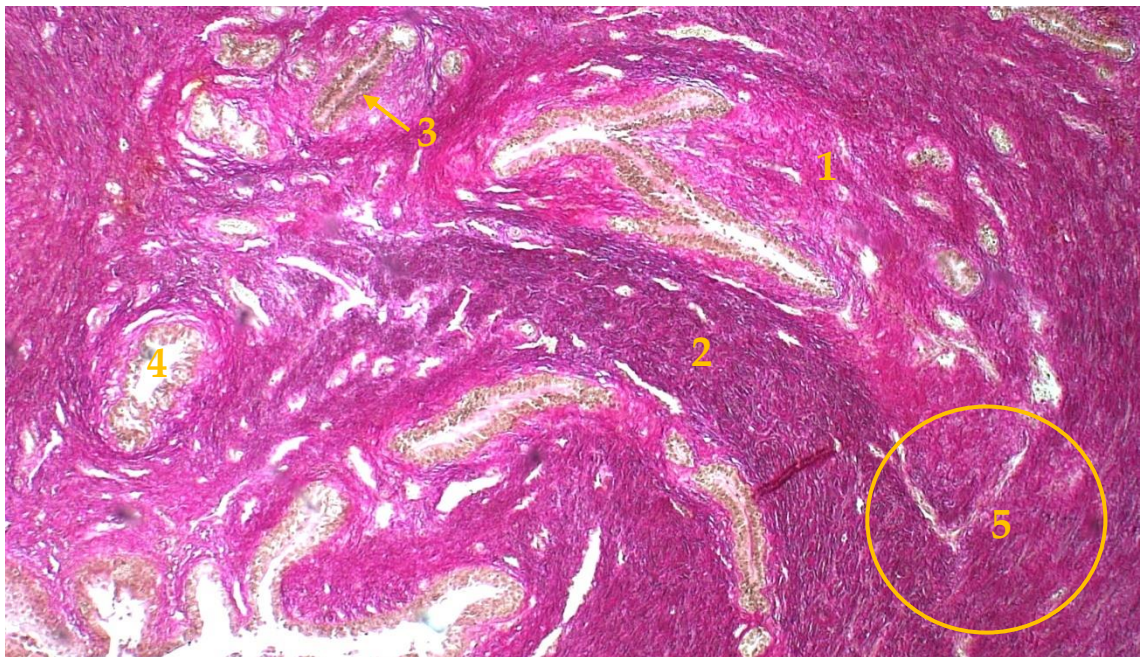
Obrázek 13: Benigní hyperplazie prostaty metodou PAS reakce, zvětšení 200x (vlastní foto)



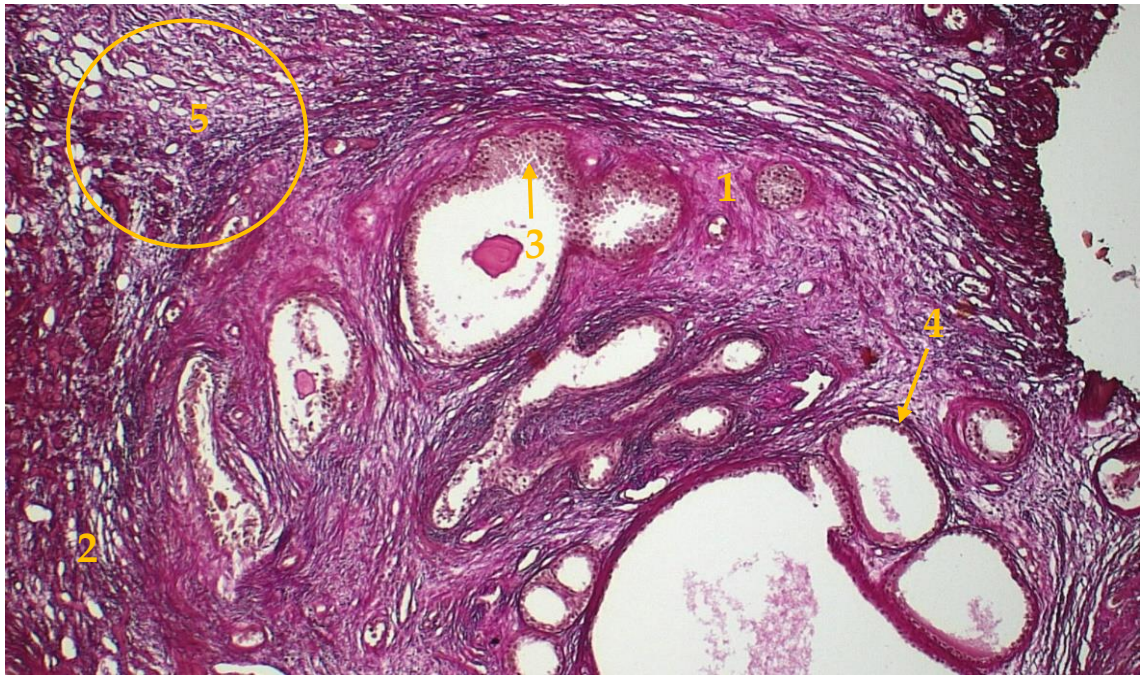
Obrázek 14: Adenokarcinom prostaty metodou PAS reakce, zvětšení 200x (vlastní foto)

5.3.3 Speciální barvení kolagenu, svaloviny a elastických vláken Weigert van Giesen

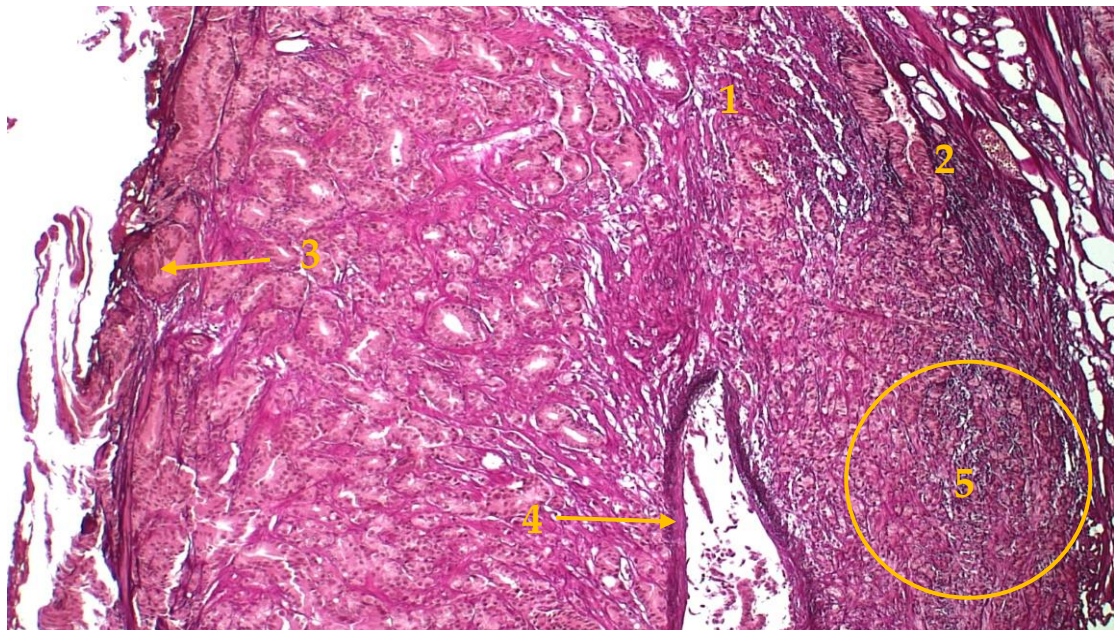
V našem případě metodou Weigert van Giesen chceme znázorňovat hlavně kolagenní a elastická vlákna přítomná ve fibromuskulárním stromatu prostaty. Kolagenní vazivo se zbarví do sytě červené (1) a elastická vlákna do fialové barvy (2). Jádra buněk se zbarvují do hnědočerna z důvodu dobarvení Weigertovým železitým hematoxylinem (3). V tomto barvení je dobře vidět úbytek svalových buněk a elastických vláken u benigní hyperplazie. V preparátu adenokarcinomu patologie není příliš patrná. Onemocnění se týká tuboalveolárních žlázek (4), ne stromatózní části (5).



Obrázek 15: Zdravá prostatická tkáň metodou Weigert van Giesen, zvětšeno 200x (vlastní foto)



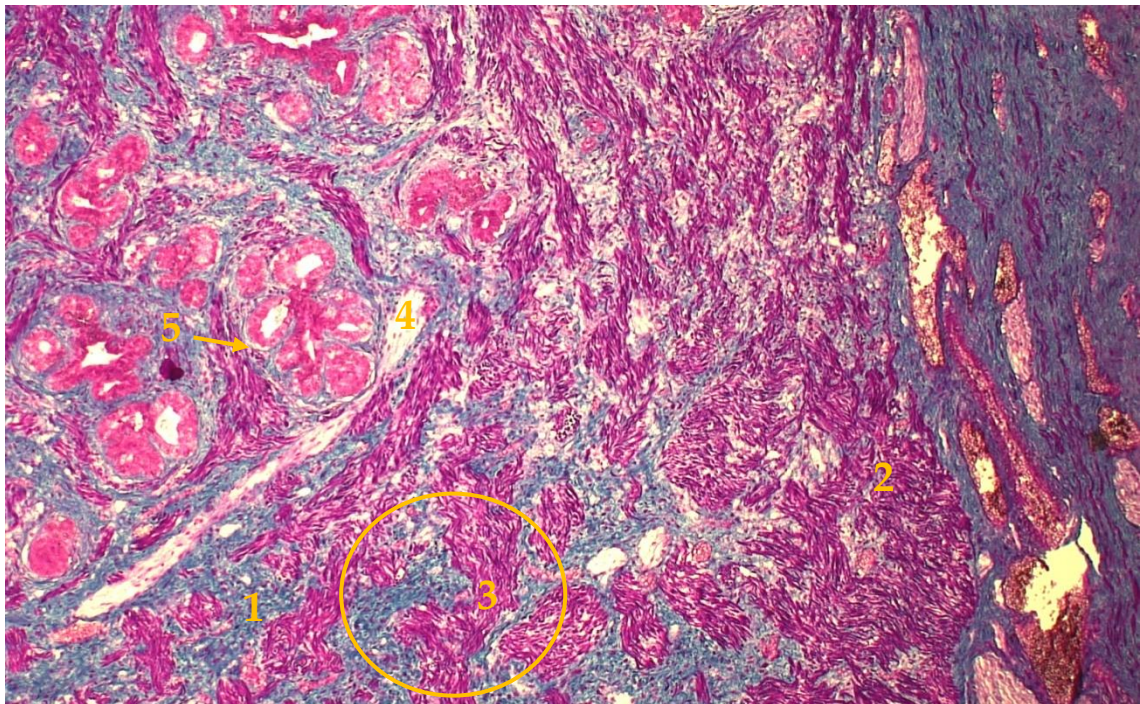
Obrázek 16: Benigní hyperplazie prostaty metodou Weigert van Giesen, zvětšeno 200x
(vlastní foto)



Obrázek 17: Adenokarcinom prostaty metodou Weigert van Giesen, zvětšení 200x (vlastní foto)

5.3.4 Speciální barvení Modrý Massonův trichrom

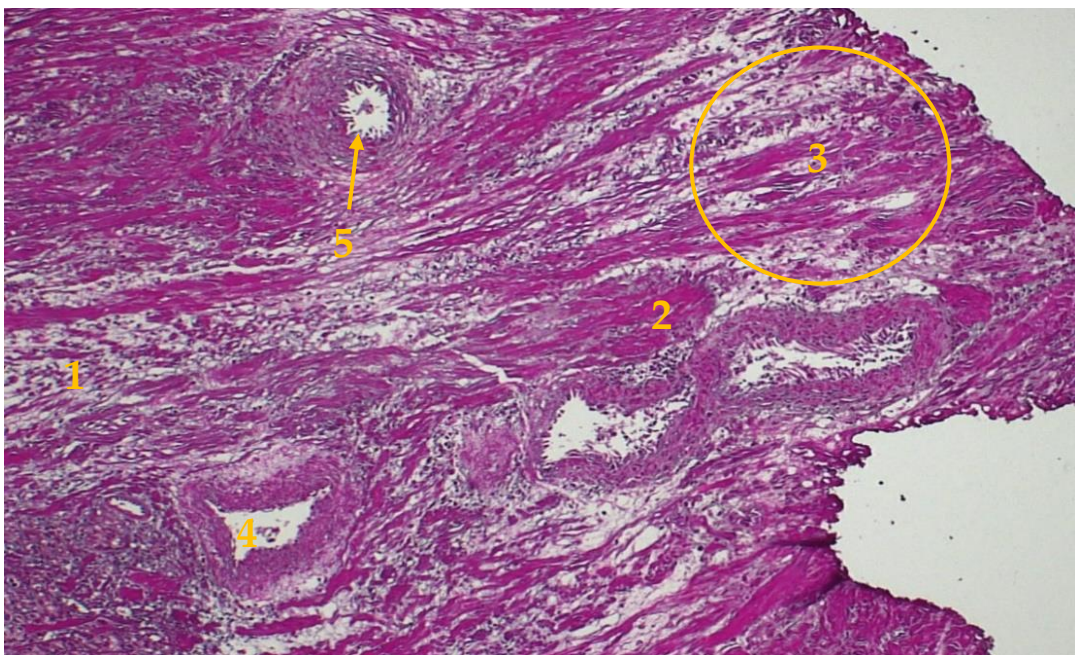
Všechny druhy Masoonových trichromů se považují ke znázornění kolagenních vláken. V případě Modrého Massonova trichromu jsou tedy kolagenní vlákna modrá (1). Svalovina se barví červeně (2) a jádra buněk jsou modročerná. V tomto barvení se tedy dají výborně rozlišit jednotlivé části fibromuskulárního stromatu (3). Průsvit tuboalveolárních žlázek (4) je ohraničen epitelem (5), který však v tomto barvení není příliš dobře rozeznatelný. Nedá se tedy z tohoto barvení příliš dobře určovat adenokarcinom.



Obrázek 18: Zdravá prostatická tkáň metodou Modrý Massonův trichrom, zvětšeno 200x
(vlastní foto)



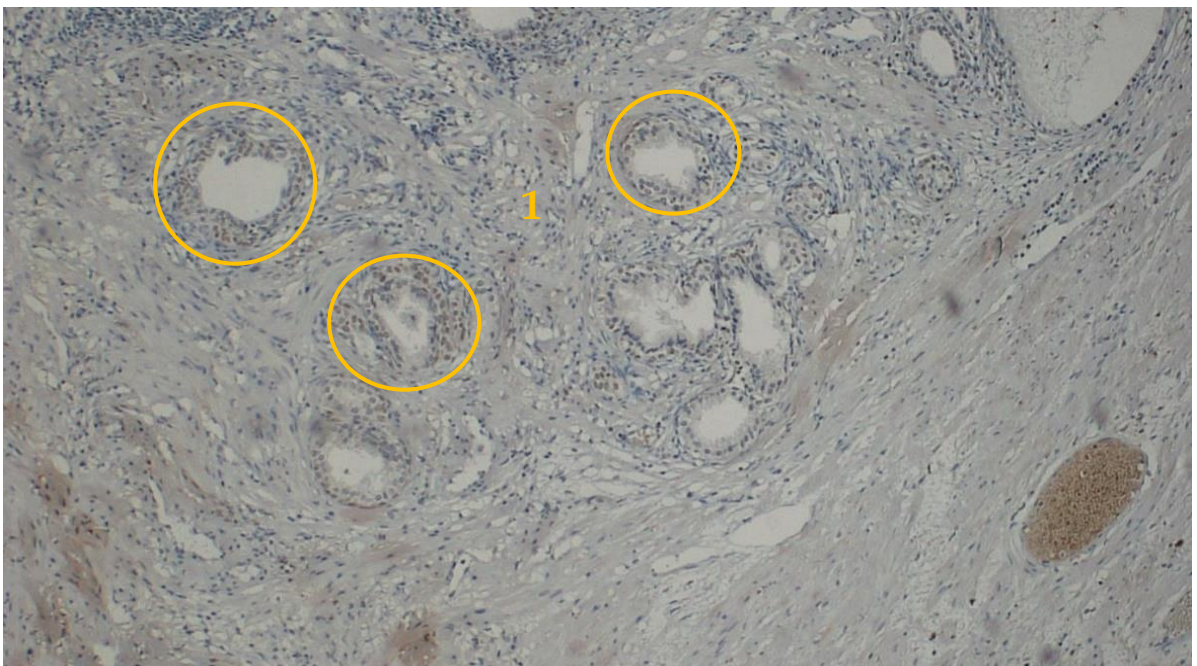
Obrázek 19: Benigní hyperplazie prostaty metodou Modrý Massonův trichrom, zvětšení 400x
(vlastní foto)



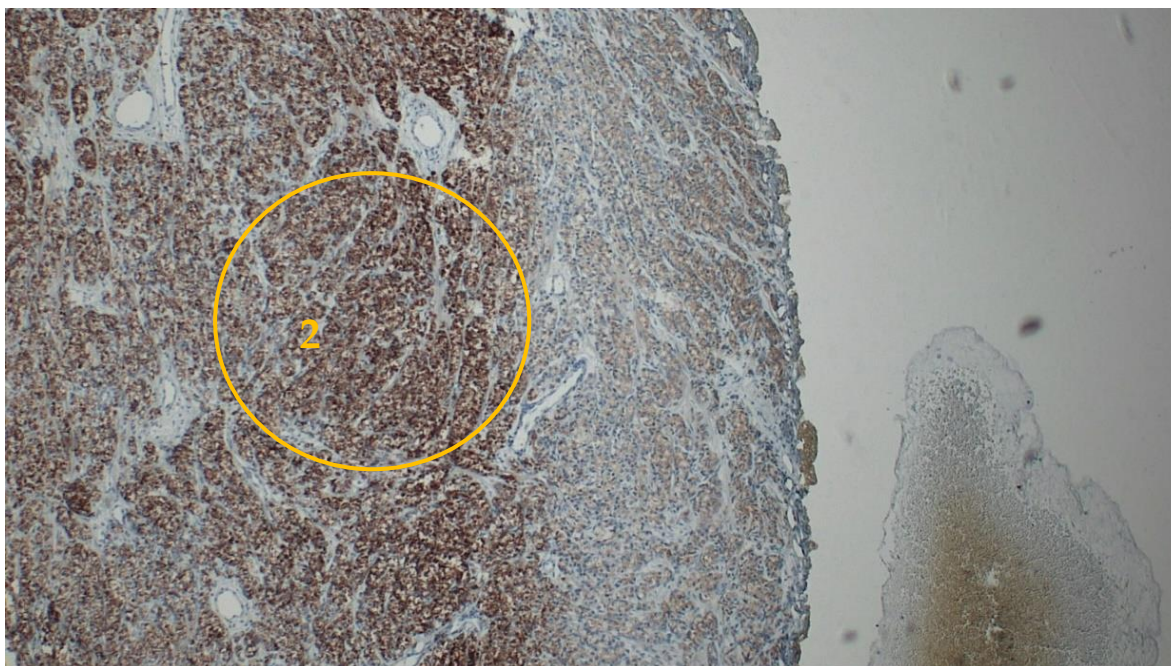
Obrázek 20: Adenokarcinom prostaty metodou Modrý Massonův trichrom, zvětšení 200x
(vlastní foto)

5.3.5 Imunohistochemická metoda p63 a AMACR

Imunohistochemické metody jsou založeny na specifické interakci antigenu ve tkáni a dodané protilátky. Vzniklá pozitivita pak může být dvojího druhu. V našem případě má protilátka p63 (1) jadernou pozitivitu, proto je při pozitivním nálezů benigní hyperplazie viditelné zbarvení jader. Protilátka AMACR (2) pak nese druhou možnost, a to pozitivitu cytoplazmatickou. Je tedy z preparátu patrné, že nejsou zbarvena pouze jádra, jako u protilátky p63, ale prakticky celá buňka. U benigní hyperplazie jsou prokazovány struktury v celém preparátu prostaty. U adenokarcinomu jsou prokazovány pouze tuboalveolární žlázy.



Obrázek 21: Imunohistochemický průkaz benigní hyperplazie prostaty protilátkou p63, zvětšení 200x (vlastní foto)



Obrázek 22: Imunohistochemický průkaz adenokarcinomu prostaty protilátkou AMACR, zvětšení 200x (vlastní foto)

6 DISKUZE

Onemocnění prostaty jsou velice častým a tíživým problémem mužů ve vyšším věku. Hlavně díky špatné životosprávě a nepříznivým okolním podmínkám je počet nově nahlášených případů těchto onemocnění každý rok vyšší. V České republice se ročně jedná o přibližně 7000 nově diagnostikovaných. Je tedy nutné tomuto trendu čelit. Jsou rozvíjeny nové metody diagnostiky, které mají za úkol odhalit patologický proces v co neranějším stádiu. Nově vzniklé diagnostické metody by měly být jednoduše použitelné ve zdravotnictví a pro pacienta by měly být co nejméně obtěžující. Kromě diagnostických metod je rozvíjena také léčba primárních nebo následných obtíží spojených s onemocněním prostaty. V dnešní době je zde velice dobrou možností léčba farmakologická nebo chemoterapeutická, není tedy již nutností odebrat celý orgán. Operace je vždy pro tělo velký zásah a je dobře, že se dnešní zdravotnictví ubírá i méně invazivní cestou, než je radikální prostatektomie. Velice důležitým krokem pro snížení nutnosti radikální léčby a celkové zlepšení pacientova života, jsou včasné záchyty těchto nemocnění [19].

Metodou včasného záchytu může v dnešní době být screeningové stanovení hladiny PSA. Nespornou výhodou je, že celé vyšetření je neinvazivní, specifita a senzitivita těchto testů však není diagnosticky přípustná. Falešně pozitivních testovaných je při použití této metody stále velké množství. V České republice není zatím plošný screening zaveden, je tedy na každém pacientovi, jak k prevenci přistoupí. V případě, že je vyšetření hladiny PSA prováděno u pacienta periodicky, je zde možnost záchytu a úspěšnost léčby vysoká. Doporučená je jednou ročně návštěva urologické ordinace nebo praktického lékaře po 50 roku života muže. Pacient, u kterého se v rodině onemocnění nachází nebo nacházelo, má prohlídky doporučeny již po 40 roku života [19].

V případě, že je tedy screeningovým testem odhalena abnormalita, je pak již invazivně odebírána prostatická tkáň a posílána v různých formách na histologické vyšetření. Zhotovení a vyhodnocení histologických preparátů je v dnešní době základním úkolem patologického oboru. Výše popsaným procesem je pak zhotoven vždy preparát základního barvení Hematoxylin-Eosin, dále mohou být zhotoveny preparáty speciálních barvení nebo může být tkáň podrobena imunohistochemickému vyšetření.

Základní barvení metoda Hematoxylin-Eosin je dobře přehledná, není však specifická, nicméně pro většinu diagnóz má nejlepší výpovědní hodnotu. Není-li patolog schopen určit diagnózu pouze v preparátu obarveném metodou Hematoxylin_eosin, je nutné připravit preparáty barvené speciálními metodami, nebo je možné použít imunohistochemický průkaz. Nejčastěji využívanou speciální metodou, která má pomoci s průkazem polysacharidových struktur ve tkáni, je PAS reakce. Ta je v prostatě využívána pro znázornění sekretu z tuboalveolárních žlázek. PAS reakce je tedy metoda využívaná pro potvrzení adenokarcinomu, benigní hyperplazie je touto metodou nezjistitelná. Speciální metodou pro průkaz svaloviny a elastických vláken je metoda Weigert van Giesen. Touto metodou je tedy diagnostikována benigní hyperplazie, při té dochází ke změnám ve strukturách fibromuskulárního stromatu. Změna v podobě nádorového bujení ve žlázkách zde není patrná. Stejně tak barvení Modrým Massonovým trichromem je zaměřeno na znázornění kolagenních struktur ve tkáni prostaty. Toto barvení je vhodné pro diagnostiku benigní hyperplazie prostaty. Tuboalveolární žlázy zde nejsou výrazně odlišitelné a pro diagnostiku adenokarcinomu je tedy tato barvicí metoda taky nevhodná.

V případě, že je základní barvení Hematoxylin-Eosin neprůkazné, je zde také možnost využít imunohistochemický průkaz. Pro průkaz patologických změn je možné využít celou řadu imunohistochemických protilátek. Nejvyužívanější

protilátkou pro odlišení maligních a benigních změn je protilátka navazující se na protein p63. Ten je součástí bazální membrány prostatické tkáně a z tohoto důvodu je velice dobrým ukazatelem, jestli tkáň prošla maligní patologickou změnou. Je-li v prostatě adenokarcinom je zničena bazální membrána, imunohistochemický průkaz p63 musí tedy vyjít negativní. Pro diagnostiku adenokarcinomu je však zapotřebí i pozitivní kontrola. Pro tu je využívána enzym Alfa-metyl CoA-racemáza (AMACR). Tento enzym je ve velkém množství produkován pouze nádorovou tkání. Jeho průkaz ve zdravé nebo hyperplastické tkáni tedy není možný. Imunohistochemický průkaz je v dnešní době hojně využívanou metodou. Speciální barvení ustoupilo do pozadí a patologické nálezy se diagnostikují pomocí imunohistochemie. V dnešní době je pak také možné vytvořit průkaz několika protilátkami. Často se využívá protilátka p63 pro detekci bazální membrány společně s markerem nádorového bujení AMACR. Nespornou výhodou této metody je tedy neskutečná variabilita a specifičnost. Pomocí imunohistochemického průkazu je možné stanovit jakoukoliv struktura jakékoliv tkáně, je nutné mít pouze správnou protilátku, která s danou strukturou vytvoří specifickou vazbu. Nevýhodou je pak poměrně vysoká cena. Na každý preparát na sklech je nutné použít vlastní reagentie. V případě speciálního barvení je možné barvit více skel v předem připravených barevných lázních. Ekonomická stránka věci tedy jasně hovoří ve prospěch používání speciálních barvicích metod. Ty jsou samozřejmě na vybraných strukturách mnohem specifičtější, než je základní barvení Hematoxylin-Eosin, v dnešní době jsou však pro diagnostiku nedostačující. Jednotlivé struktury jsou od sebe dobře odlišitelné, ale uvnitř struktur jsou pak již změny špatně rozeznatelné a nejsou tedy diagnosticky zcela relevantní. Imunohistochemický průkaz je v mikroskopu mnohem lépe čitelný a vydaný výsledek je mnohem spolehlivější. Diagnostická stránka věci tedy v tuto chvíli převyšuje stránku ekonomickou, což je samozřejmě pro pacienta pozitivní. Speciální barvení má však nadále své místo v histologických laboratořích a jsou tkáně, které je

naprosto dostačující diagnostikovat pomocí speciálních barvení. Prostata je však jednou z těch tkání, kde je imunohistochemický průkaz velkým přínosem.

Benigní hyperplazie prostaty je definována jako nezhoubné bujení vazivových buněk fibromuskulární části prostaty. Mikroskopicky je však možné benigní hyperplazii diagnostikovat ve žláznaté i ve stromatózní části prostaty. V případě BHP je pod mikroskopem viditelné výrazné zmnožení vazivové hmoty oproti zdravé tkáni. V pozdějších stádiích je možné pozorovat i vazivové uzly, které se s postupem neléčené nemoci stále zvětšují a mohou utlačovat močovou trubici. V preparátu zdravé prostatické tkáně by vazivové uzly neměly být vůbec přítomné a stromatózní buňky by měly s buňkami hladké svaloviny být ve vyváženém poměru. Tento nepoměr pak způsobuje disfunkci, zvětšování rozměrů a utlačování okolních struktur. Od obrazu prostaty s adenokarcinomem se dá odlišit pohledem na žláznatou část. Tuboalveolární žlásky mají stále svůj typický vzhled. Není zde patrná odchylka struktury ani počtu buněk tvořících tuto acinární žláznatou část prostaty. Histologicky je diagnostika založena na základní barvicí metodě Hematoxylin-Eosin a v případě pozitivního nálezu je následně použit imunohistochemický průkaz protilátkou p63. Ve vybraných preparátech je benigní hyperplazie prostaty viditelná. Tento postup je tedy plně v souladu s moderními postupy v diagnostice a je tedy správnou volbou [20].

Adenokarcinom prostaty je, na rozdíl od benigní hyperplazie, zhoubným nádorovým bujením žláznaté části prostatické tkáně. Mikroskopicky je v takové tkáni přítomno různé množství buněk, které mají výrazně pozměněnou vnitřní strukturu. Tyto buňky mohou být osamoceny v jinak naprosto zdravé tkáni. V pozdějších fázích onemocnění je však nádorové bujení v preparátu nepřehlédnutelné. Podle míry diferenciací nádorových buněk ve dvou ložiscích je pak určeno Gleasonovo skóre a je následně určena prognóza a léčba, která bude v závislosti k míře poškození nejvhodnější. Ohraničení acinárních žlázek není

zcela konkrétní a okraj žlásky je prakticky neurčitelný. V preparátu zdravé prostaty jsou žlásky malé, dobře okem oddělitelné útvary, které mají svůj typický vzhled. S adenokarcinomem je ale tento typický vzhled znatelně narušen. Intracelulární struktury zdravé tkáně jsou také naprosto rozdílné. Je nutné věnovat pozornost především jaderným změnám, dále pak je možné sledovat také rozdíly v zabarvení cytoplazmy buněk. V průsvitu žlázek prostaty postižené adenokarcinomem je možné také spatřit fragmenty nekrotické tkáně. Ty samozřejmě v preparátu zdravé prostaty přítomny nejsou. Současná diagnostika je u adenokarcinomu založena na zhotovení preparátu metodou Hematoxylin-Eosin. Preparát je vždy vyšetřen pomocí imunohistochemického průkazu. Jako protilátku je možné použít například AMACR. Tento postup byl zvolen i v mém případě. V preparátech je při tomto postupu adenokarcinom zřetelný. Je však nutné, aby preparát odečítal zkušený lékař patolog [20].

7 ZÁVĚR

Patologické změny prostaty jsou v dnešní době velice častým problémem mužů staršího věku. Benigní hyperplazie sice není život ohrožující stav, je však velice častý a problémy spojené s mikcí jsou pro pacienta často velice obtěžující. Adenokarcinom prostaty je nádorové onemocnění s velice dobrou prognózou, musí však být zachycen včas. K tomu slouží screeningová vyšetření hladiny PSA, která jsou kvalitním ukazatelem onemocnění prostaty.

Hlavním úkolem této práce bylo porovnání histologické stavby zdravé prostatické tkáně a tkáně s patologickou abnormalitou. K pochopení jednotlivých patologií bylo za potřebí znát anatomickou stavbu zdravé prostatické tkáně a zevrubně se seznámit s jednotlivými patologickými stavy. Pro jednotlivá onemocnění pak byla v praktické části vybrána řada barvicích technik, kdy každá z nich byla vhodná k průkazu určité patologie. V dnešní době je však zásadní průkaz pomocí imunohistochemie. Proto byla část této práce věnována také tomuto průkazu.

Pro pochopení celé problematiky komplexně bylo dílčím úkolem teoretické části také seznámení s možnými diagnostickými postupy a následnou možností léčby, která je v dnešní době na velice dobré úrovni. Tuto práci je tedy možné chápat jako studijní materiál pro laboratorní diagnostiku patologické prostatické tkáně s malým přesahem do oblasti klinické medicínské praxe.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

3D-CRT Three-dimensional Conformal radiation therapy

AMACR Alfa-metyl CoA-racemáza

BHP Benigní hyperplazie prostaty

BOZP Bezpečnost a ochrana zdraví při práci

CT Computer tomography (Počítačová tomografie)

DHT Dihydrotestosteron

DRV Digitální rektální vyšetření

LIS Laboratorní informační systém

LUTS Příznaky dolních močových cest

p63 Jaderný protein

PAS Periodic Acid Schiff

PIN Prostatická intraepitelová neoplazie

PSA Prostatický specifický antigen

PSAP Prostatická specifická kyselá fosfatáza

TRUS Transuretrální sonografie prostaty

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. Memorix histologie. 2. vydání. Praha: Triton, 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.
2. LÜLLMANN-RAUCH, Renate. Histologie. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024737294.
3. HUDÁK, Radovan a David KACHLÍK. Memorix anatomie. 4. vydání. Ilustroval Jan BALKO, ilustroval Šárka ZAVÁZALOVÁ. Praha: Triton, 2017. ISBN 9788075534200.
4. MAČÁK, Jiří, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. Patologie. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 9788024735306.
5. VERNER, Pavel. Benigní hyperplazie prostaty: současný přístup k farmakologické léčbě. Praha: Maxdorf, c2005. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 8073450747.
6. DUŠEK, Pavel. Farmakologická léčba karcinomu prostaty: průvodce ošetřujícího lékaře. Praha: Maxdorf, c2010. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 9788073452155.
7. FIALA, Richard, František ZÁŤURA a Jaroslav ŽENÍŠEK. Adenokarcinom prostaty: od PSA k terapii. Praha: StudiaGeo, 2001. Urolog ;, č. 1/01.
8. BRYCHTOVÁ, Svetlana a Alice HLOBILKOVÁ. Histopatologický atlas. Praha: Grada, 2008. ISBN 9788024716503.
9. ZACHOVAL, Roman, Ladislav DUŠEK a Marek BABJUK. Problematika screeningu karcinomu prostaty. Česká urologie. 2018, 22(1), 14-26. ISSN 2336-5692.
10. BELEJ, Kamil, Marie BELEJOVÁ a František ZÁŤURA. Hormonální léčba adenokarcinomu prostaty. Praha: StudiaGeo, 2004. ISBN 802392270x.
11. DOLEŽEL, Martin. Cílená radioterapie karcinomu prostaty. Hradec Králové: Nucleus HK, 2011. ISBN 9788087009819.

12. Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice. Brno: Masarykova univerzita, 1997. Acta facultatis medicae Universitatis Brunensis Masarykianae. ISBN 802100620x.
13. The human protein atlas: Immunohistochemistry [online]. PubMed, 2015 [cit. 2019-11-28]. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>
14. Immunohistochemistry and Immunofluorescent Staining Methods [online]. 2019 [cit. 2019-11-28]. Dostupné z: <https://www.mdbhistopath.com/immunohistochemical>
15. TORLAKOVIC, MD, PHD, Emina E. Standardization of Negative Controls in Diagnostic Immunohistochemistry: Recommendations From the International Ad Hoc Expert Panel [online]. 2014 dubna, , 1-21 [cit. 2019-11-28]. DOI: 10.1097/PAI. Dostupné z: 10.1097/PAI. 0000000000000069
16. VACEK, Zdeněk. Histologie a histologická technika. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995. ISBN 80-7013-202-7.
17. LUKÁŠ, Zdeněk. Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice. Brno: Masarykova univerzita, 1997. Acta facultatis medicae Universitatis Brunensis Masarykianae. ISBN 80-210-0620-x.
18. Sekaninová, Aneta, DiS. Laboratorní příručka oddělení patologické anatomie. Kladno, 2019.
19. Klinická onkologie: Na prevenci záleží. U rakoviny prostaty to platí dvakrát [online]. Praha: Ambit Media [cit. 2020-05-04]. ISSN 0862-495X. Dostupné z: <https://www.mou.cz/na-prevenci-zalezi-u-rakoviny-prostaty-to-plati-dvakrat/t4240>
20. COTRAN, Ramzi S, Vinay KUMAR, Tucker COLLINS a Stanley L ROBBINS. Robbins Pathologic Basis of Disease. Sixth Edition. Philadelphia, Pennsylvania 19106: W.B. Saunders Company, 1999, 1424 s. ISBN 072167335X.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Histologické zóny prostaty dle McNeala [1]	17
Obrázek 2: Gleasonův histologický gradient [2]... ..	25
Obrázek 3: Ultrasonografická biopsie prostaty [2]	31
Obrázek 4: Sextantová (vlevo) a tranzitorní (vpravo) bioptická zóna [2].....	32
Obrázek 5: Tkáňový automat TCP 15 DUO (vlastní foto).....	59
Obrázek 6: Zalévací linka Medite TES Valida (vlastní foto).....	60
Obrázek 7: Sáčkový mikrotom Leica SM2010R(vlastní foto).....	61
Obrázek 8: Barvicí a montovací automat Tissue-Tek (vlastní foto).....	61
Obrázek 9: Zdravá prostatická tkáň metodou Hematoxylin-Eosin, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	62
Obrázek 10: Benigní hyperplazie prostaty metodou Hematoxylin-Eosin, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	63
Obrázek 11: Adenokarcinom prostaty metodou Hematoxylin-Eosin, zvětšeno 400x (vlastní foto).....	63
Obrázek 12: Zdravá prostatická tkáň metodou PAS reakce, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	64
Obrázek 13: Benigní hyperplazie prostaty metodou PAS reakce, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	65
Obrázek 14: Adenokarcinom prostaty metodou PAS reakce, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	65
Obrázek 15: Zdravá prostatická tkáň metodou Weigert van Giesen, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	66
Obrázek 16: Benigní hyperplazie prostaty metodou Weigert van Giesen zvětšeno 200x (vlastní foto).....	67
Obrázek 17: Adenokarcinom prostaty metodou Weigert van Giesen zvětšeno 200x (vlastní foto).....	67

Obrázek 18: Zdravá prostatická tkáň metodou Modrý Massonův trichrom, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	68
Obrázek 19: Benigní hyperplazie prostaty metodou Modrý Massonův trichrom, zvětšeno 400x (vlastní foto).....	69
Obrázek 20: Adenokarcinom prostaty metodou Modrý Massonův trichrom, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	69
Obrázek 21: Imunohistochemický průkaz benigní hyperplazie prostaty protilátkou p63, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	70
Obrázek 22: Imunohistochemický průkaz adenokarcinomu prostaty protilátkou AMACR, zvětšeno 200X (vlastní foto).....	71

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Srovnání klasifikací USA a Evropa [2]	26
Tabulka 2: Postup barvení Hematoxylin-Eosin [18]	50
Tabulka 3: Postup barvení Modrý Massonův trichrom [18].....	51
Tabulka 4: Postup barvení Weigert van Giesen [18]	52
Tabulka 5: Postup barvení PAS reakce [18].....	53
Tabulka 6: Postup průkazu protilátkami AMACR a p63 [18]	57
Tabulka 7: Konfigurace roztoků ve tkáňovém automatu TPC 15 DUO [18]....	60