



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Histologická stavba kůže, porovnání
fyziologické tkáně s vybranými
patologickými stavy**

**Skin histology, comparison of
physiological skin arrangement with
selected pathological conditions**

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Autor bakalářské práce: Karolína Ocetníková

Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Daniela Obitková

Kladno 2021



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Ocetníková** Jméno: **Karolína** Osobní číslo: **478147**
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:

Histologická stavba kůže, porovnání fyziologické tkáně s vybranými patologickými stavy

Název bakalářské práce anglicky:

Skin histology, comparison of physiological skin arrangement with selected pathological conditions

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude popis fyziologické stavby kůže a vybraných patologických stavů, histologická struktura a možnosti diagnostiky patologických kožních lézí se zaměřením na novotvary vycházející z dlaždicobuněčného epitelu. Praktická část se bude zabývat přípravou histologického preparátu od příjmu vzorku tkáně po dokončení histologického preparátu. Zvládnuty budou techniky základního barvení hematoxylin-eosin. Jako metoda doplňková bude použito imunohistochemické barvení vhodné k detekci buněk zhoubných novotvarů. Výstupem bude porovnání histologické stavby tkáně fyziologické s konkrétními zhoubnými i nezhooubnými kožními nádory.

Seznam doporučené literatury:

- [1] RÖCKEN, Martin, Martin SCHALLER, Elke SATTLER a Walter H. C. BURGDORF, Kapesní atlas dermatologie, Praha: Grada Publishing, 2018, ISBN ISBN 978-80-271-0106-1
- [2] DYLEVSKÝ, Ivan, Somatologie: pro předmět Základy anatomie a fyziologie člověka, ed. 3. přepracované a doplněné vydání, Praha: Grada Publishing, 2019, ISBN ISBN 978-80-271-2111-3.
- [3] Arenberger P., Ettlér J. , Bazaliom a možnosti jeho terapie, Časopis lékařů českých, 2017, 113-116 s., ISSN 1805-4420

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

MUDr. Daniela Obítková

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Aneta Sekaninová, Dis.

Datum zadání bakalářské práce: **21.9.2020**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**

prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedoucí(ho) katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Histologická stavba kůže, porovnání fyziologické tkáně s vybranými patologickými stavy 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 13.05.2021

.....
Karolína Očetníková

PODĚKOVÁNÍ

Zde bych chtěla velice poděkovat vedoucí mé bakalářské práce MUDr. Daniele Obitkové za její rady, výtky, připomínky, trpělivost, a hlavně její čas, který mi s ochotou věnovala. Dále bych chtěla poděkovat mé konzultantce Anetě Sekaninové DiS. a celému Patologicko-anatomickému oddělení Oblastní Nemocnice Kladno za poskytnutí materiálu, rad, konzultací, za jejich podporu a vřelou pomoc při celém procesu zpracování mé bakalářské práce.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce s názvem Histologická stavba kůže, porovnání fyziologické tkáně s vybranými patologickými stavy se zabývá srovnáním zdravé kůže s jejími dvěma vybranými patologickými stavy, a to bazocelulárním a spinocelulárním karcinomem. Pro toto srovnání byl použit nodulární bazaliom, endofyticky rostoucí fokálně rohovějící spinaliom a zdravá tkáň. Tento biologický materiál byl zpracován dle standardních laboratorních postupů. Z barvení byla použita základní metoda Hematoxylin-Eosin, dále doplněna imunohistochemickým vyšetřením.

Výsledné zkoumání ukázalo, že pro určení diagnózy, zdali se jedná o jeden nebo druhý typ zhoubného karcinomu, lékaři stačí barvení Hematoxylin-Eosin. Bazocelulární i spinocelulární karcinomy jsou patologické stavy epidermis a oba infiltrují do dermis. Proto jsou tyto epidermální buňky dobře rozeznatelné od buněk v dermis i za tohoto základního barvení. Imunohistochemické vyšetření je již doplňující, pokud jsou karcinomy špatně diferencované.

Klíčová slova

Kůže; bazocelulární karcinom; spinocelulární karcinom; patologie; barvení; diagnostika; imunohistochemie

ABSTRACT

This bachelor's thesis, named *Skin histology*, comparison of physiological skin arrangement with selected pathological conditions, deals with the comparison of healthy skin with its two selected pathological conditions, namely basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. Nodular basal cell carcinoma, endophytic growing spinalioma focally keratinized and healthy tissue were used for the comparison. This biological material was processed according to standard laboratory procedures. The basic method Hematoxylin-Eosin was used for staining, further supplemented by immunohistochemical examination.

The resulting study showed that Hematoxylin-Eosin staining is sufficient for pathologist to determine whether one or another type of cancer is diagnosed. Both basal and squamous cell carcinomas are pathological conditions of the epidermis and both infiltrate the dermis. Therefore, these epidermal cells are well distinguishable from the cells in the dermis even under this basic staining. Immunohistochemical methods are useful for recognition of poorly differentiated cancers.

Keywords

Skin; basal cell carcinoma; squamous cell carcinoma; pathology; staining method; diagnostics; immunohistochemistry

Obsah

1	Úvod.....	10
2	Cíle práce.....	11
3	Přehled současného stavu.....	12
3.1	Epidermis.....	13
3.1.1	Stratum basale.....	13
3.1.2	Stratum spinosum	14
3.1.3	Stratum granulosum.....	15
3.1.4	Stratum lucidum.....	16
3.1.5	Stratum corneum.....	16
3.2	Dermis	17
3.2.1	Stratum papillare.....	17
3.2.2	Stratum reticulare.....	18
3.3	Hypodermis.....	18
3.4	Kožní adnexa.....	18
3.4.1	Kožní žlázy.....	19
3.4.2	Mléčná žláza (glandulae mammae).....	20
3.4.3	Chlupy (pili).....	21
3.4.4	Nehty (unguis).....	21
3.5	Vybrané patologické stavy	22
3.5.1	Bazocelulární karcinom.....	22
3.5.2	Spinocelulární karcinom	25
3.5.3	Diagnostika	27
4	Metodika.....	28

4.1	Příjem materiálu.....	28
4.2	Fixace.....	30
4.2.1	Fyzikální metody fixace	30
4.2.2	Chemické metody fixace	31
4.3	Zalévání do bločků	32
4.3.1	Zalévání do parafínových bločků	33
4.4	Krájení vzorků.....	36
4.4.1	Krájení parafínových bločků	37
4.5	Barvení histologických řezů.....	38
4.5.1	Barvení metodou Hematoxylin-Eosin (HE)	39
4.6	Montování histologických řezů.....	40
4.7	Imunohistochemie	40
4.7.1	Fixace.....	40
4.7.2	Zalévání	41
4.7.3	Krájení a napínání řezů	41
4.7.4	Imunohistochemická detekce	41
5	Výsledky.....	43
5.1	Příjem a přikrajování kožních excizí.....	43
5.2	Fixace, zalévání a krájení materiálu	43
5.3	Barvení Hematoxylin-Eosin a imunohistochemický průkaz	45
5.3.1	Zdravá kůže – barvení Hematoxylin-Eosin.....	46
5.3.2	Bazaliom – barvení Hematoxylin-Eosin.....	48
5.3.3	Bazaliom – imunohistochemická detekce protilátkami p63, CK5/6 a Bcl-2	50

5.3.4	Spinaliom – barvení Hematoxylin-Eosin	53
5.3.5	Spinaliom – imunohistochemická detekce protilátkami p63, CK5/6 a Bcl-2.....	54
6	Diskuze	57
7	Závěr	60
8	Seznam použitých zkratek.....	61
9	seznam použité literatury	62
10	Seznam použitých obrázků	67
11	Seznam použitých tabulek.....	69

1 ÚVOD

Bazocelulární a spinocelulární karcinomy patří mezi nejčastější nemelanomové nádory kůže světlého typu. To je důvod, proč jsem si tyto dvě patologické jednotky vybrala a rozepsala se o nich. Incidence těchto nádorů celosvětově roste, hlavně u starší populace, a proto by na prevenci a problematiku tohoto onemocnění mělo být víc upozorněno. Jejich výskyt je až desetkrát častější než u nebezpečnějších maligních melanomů.

Bazaliomy patří mezi ty méně nebezpečné karcinomy, které jsou častější než spinaliomy. Tyto karcinomy téměř nemetastazují. Navzdory tomuto faktu i tak dokáže tento nádor pacientovi uškodit, svým destruktivním růstem. Nejčastěji se vyskytuje na slunci nejvíce exponovaných částech těla, tedy hlavě, pažích a krku. Bazocelulární karcinom má několik podtypů, ale nejběžnějším je bazaliom nodulární.

Spinaliomy jsou méně časté, za to více agresivní s možností růstu na sliznicích. Na lidském těle se vyskytují také na místech, kam nejvíce dopadá sluneční záření, ale také na jazyku nebo genitáliích. Na kůži často spinocelulárnímu karcinomu předchází prekancerózní stav zvaný aktinická keratóza. Tento nádor má také několik variant a nejčastější bývá keratoakantom.

Tato práce by mohla čtenáře dovézt k zamyšlení nad prevencí před těmito nádory; tedy hlavně ochranou před slunečním zářením, nad návštěvami u dermatologů a celkově nad tím, že je potřeba svůj největší orgán chránit. Dále by práce mohla čtenářům přiblížit proces v histologické laboratoři, který je velice důležitý pro finální stanovení diagnózy.

2 CÍLE PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je porovnání fyziologické stavby kůže s vybranými patologickými stavy. Tato srovnání budou provedena histologickou technikou pomocí základního barvení i speciálních imunohistochemických barvicích technik.

Teoretická část se bude zabývat anatomickou stavbou kůže, tedy jejími třemi základními vrstvami, kde bude popsáno, z jakých dalších podvrstev a buněk se skládají. Pozornost bude věnována i kožním adnexům. Dále bude práce zaměřena na patologickou část, a to maligní nádory epidermis jako jsou bazaliomy a spinaliomy. Bude zde popsána jejich histopatologie a diagnostika.

V praktické části bude podrobně popsáno zpracování kožní tkáně v histologické laboratoři. Jedním z cílů práce bude popis příjmu materiálu, jeho fixace, zalévání do bločků, krájení, barvení a montování. U barvení bude popsáno základní barvení Hematoxylin-Eosin, dále doplněno speciálními imunohistochemickými barvicími metodami. Dalším z cílů bude porovnání mikroskopických struktur zdravé kůže oproti dvěma vybraným patologickým jednotkám.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

Kůže je největším lidským orgánem. U dospělého člověka tvoří 8-16 % hmotnosti těla a zaujímá plochu o průměru 1,73 m². U dětí je celková plocha kůže, ve vztahu k váze, 3x větší a u nedonošenců je větší až 7x. Kůži můžeme dělit podle její lišící se tloušťky na slabý (tenký) a silný (tlustý) typ. Tenký typ, který má průměrně 0,1 mm, pokrývá celé tělo kromě mechanicky namáhaných oblastí jako jsou chodidla a dlaně. Tam se vyskytuje tlustý typ kůže a její síla je průměrně 0,5 mm. Na obličeji je pokožka nejtenčí [1].

Nejdůležitější funkcí kůže je ochrana celého organismu před vnějšími vlivy jako jsou mikroby, UV záření, toxické látky a termické vlivy. Má ale mnoho dalších rolí, jako je například udržení stálosti vnitřního prostředí, zásobárna energie, termoregulace, smyslové vjemy, imunitní ochrana, vylučování nebo výměna látek. Kůže je také dobrým komunikačním prostředkem, kdy díky ní můžeme vyjadřovat emoce nebo psychické stavy [1].

Kůže sestává ze tří základních vrstev:

- pokožka (epidermis);
- škára (dermis/corium);
- podkoží (hypodermis/subcutis/tela subcutanea).

Mezi přídatné kožní orgány (adnexa) patří:

- kožní žlázy;
- mléčná žláza;
- chlupové folikuly s chlupy;
- nehty.

3.1 Epidermis

Pokožka má ektodermový původ a je tvořena vícevrstevným dlaždicovým rohovějícím epitelem. Buňky epidermis jsou uspořádány do pěti vrstev, které zahrnují stratum basale (nejhlubší část epidermis), stratum spinosum, stratum granulosum, stratum lucidum, stratum corneum. Stratum disjunctum (nejvrchnější část epidermis) se nachází na povrchu stratum corneum. Pokožka sestává z několika typů buněk jako jsou keratinocyty, melanocyty, dendritické (Langerhansovy) buňky a Merkelovy buňky [1; 2].

3.1.1 Stratum basale

Stratum basale je nejhlubší vrstvou epidermis a je tvořeno kubickými někdy až cylindrickými keratinocyty, které mají vysoký mitotický index, a to zapříčiňuje neustálou obnovu pokožky. Tyto buňky pokožky jsou připojeny ke zvlněné bazální membráně (bazální lamina) hemidesmozomy, což znemožňuje odtrhnout epidermis od dermis. Zvlněnost membrány ještě více upevňuje spojení se škárou a napomáhá difúzi živin do pokožky. V této vrstvě se nachází i melanocyty, Merkelovy buňky a Langerhansovy buňky [1; 2].

Melanocyty (pigmentové buňky) jsou buňky původem z neurální lišty, kdy druhotně migrují do stratum basale, kde jsou k bazální lamině připojeny hemidesmozomy. Mají nepravidelný tvar s mnoha dlouhými výběžky, některé sahají až do stratum spinosum. Na 1 mm² kůže se nachází 1000-1500 pigmentových buněk, čemuž odpovídá 1 melanocyt na průměrně 10 keratinocytů. Tento počet se ovšem liší na různých částech lidského těla [3; 4].

Melanocyty ve své cytoplazmě obsahují granula melanosomy, vznikající odštěpením z Golgiho aparátu, které syntetizují melanin. Tento černohnědý kožní pigment vzniká oxidací tyrosinu, za pomoci enzymů tyrozinázy a fenolázy, na 3,4-dihydroxyfenylalanin (DOPA). DOPA se dalšími procesy mění

v melanin, který postupně melanozomy vyplňuje. Jakmile se tato granula zcela zaplní, putují do dlouhých výběžků pigmentových buněk, kde jsou injikovány keratinocytům. V cytoplazmě keratinocytů jsou melanozomy shromažďovány nad jádrem a tvoří jakýsi štít, který chrání jejich DNA před škodlivými účinky UV záření. Díky tomuto ději je zde větší koncentrace melaninu než v melanocytech, kde melanin vzniká. Ve vyšších vrstvách pokožky se již melanin nenachází, neboť je časem postupně odbouráván v buňkách ve stratum spinosum [3; 4; 5].

Melanin způsobuje různé zbarvení kůže. Ovšem stupeň intenzity pigmentace není odrazem počtu melaninových granul, ale rychlostí jejich tvorby v melanocytech, jejich přenosem do keratinocytů a jejich tamní degradací [3; 4].

Dalším typem buněk, které se ve stratum basale nachází, jsou Merkelovy buňky. Tvarem jsou podobné melanocytům. Jejich původ je nejasný, jde ale nejspíše o buňky neuroektodermového původu. Jelikož to jsou mechanoreceptory pro jemný dotek, tak se jich hodně nachází na chodidlech, dlaních a nejvíc na bříškách prstů. Merkelova hmatová tělíska mají v cytoplazmě neurosekreční granula a pod jejich basí se nachází volná nervová zakončení se synapsí, čímž vzniká funkční spojení s nervovými vlákny. Merkelovy buňky jsou vázány na sousední keratinocyty pomocí desmozomů [2; 3; 4].

3.1.2 Stratum spinosum

Tato část tvoří většinu epidermis a sestává se z několika vrstev kubických keratinocytů s ostnatými výběžky (spiny). Těmito „ostny“ se buňky mezi sebou propojují. Pod světelným mikroskopem jsou v těchto místech spojení patrná malá ztlustění, Bizzozzerovy uzly. V cytoplazmě buněk je vyvinuto mnoho tonofilament a tonofibril, které udržují jejich tvar, tedy pevnost pokožky. Keratinocyty mají mezi sebou rozšířené mezibuněčné prostory, které umožňují

živinám lépe difundovat do svrchnějších vrstev pokožky. Ve stratum spinosum se keratinocyty též mitoticky dělí, a to dokonce více než ve stratum basale. Proto se tyto dvě oblasti společně označují jako stratum germinativum Malpighi [2; 3; 4].

Langerhansovy buňky nebo také dendritické buňky jsou typem buněk imunitního systému, které se nachází ve stratum basale a stratum spinosum. Tyto buňky jsou mezenchymálního původu a jsou odvozeny z kmenových buněk kostní dřeně a řadí se k buňkám monocytomakrofágového systému. Vyznačují se hvězdicovitým tvarem, kdy pomocí větvených výběžků zachytávají antigeny. Poté se s těmito antigeny přesunou do nejbližší lymfatické uzliny, zde je exprimují T-lymfocytům a tím nastartují imunitní kožní reakci [2; 3; 4].

3.1.3 Stratum granulosum

Část pokožky tvořena třemi až pěti vrstvami zplošťujících se keratinocytů. Ty jsou mezi sebou propojeny desmozomy a v cytoplazmě mají dva typy cytoplazmatických granul: keratohyalinová a lamelární [3; 4].

V této vrstvě začíná proces rohovění kůže neboli keratinizace. Je to děj, kdy se cytoplazma buněk plní zrny (granuly) keratohyalinu, který se pojí s tonofilamenty a takto vyplní celý keratinocyt. S tímto procesem se spojuje postupný zánik organel (=odumírání buněk) a zmenšení mezibuněčných prostor. Granula keratohyalinu vznikají syntetickou činností volných ribozomů, jsou vysoce basofilní, nemají membránu a jsou tvořena proteiny obsahující vysoký podíl histidinu a cysteinu. Dalšími důležitými složkami granul jsou filagrin a trichohyalin, látky shlukující cytokeratinová filamenta do tonofibril a složitých agregátů budoucího výsledného keratinu. Pro svoji velikost, která činí 2-3 μm , jsou tyto zrna velmi dobře vidět ve světelném mikroskopu [3; 4].

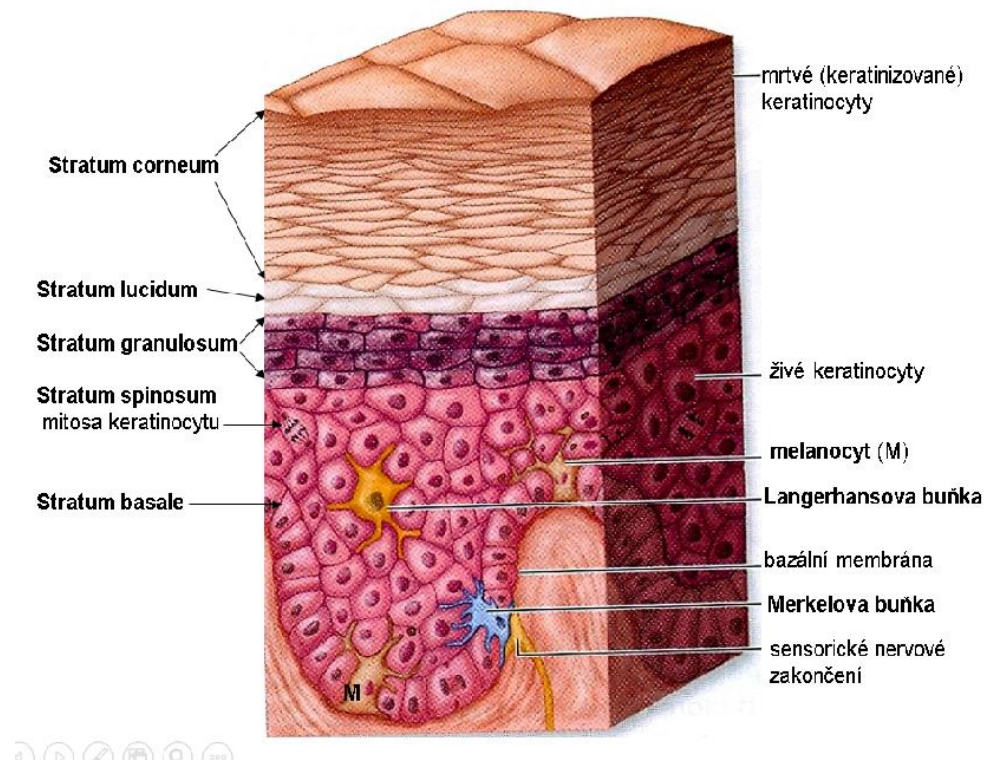
Lamelární granula (Odlandova tělíska) jsou o poznání menší, mají 0,1-0,3 μm a lze je pozorovat v elektronovém mikroskopu. Na rozdíl od keratohyalinních granul jsou tyto ohraničeny membránou a obsahují glykolipid acetylglukosylceramid, který zde tvoří s dalšími lipidy lamely. Odlandova tělíska jsou exocytózou přenesena do mezibuněčného prostoru, kde se jejich obsah vylíje. Zde pak glykolipidy vyplňují prostor a fungují zde jako tzv. tmelová substance (lipidová obálka). Další takovou bariéru tvoří zonulae occludentes, jedná se o nejtěsnější spojení buněk a nachází se v horních vrstvách stratum granulosum. Tyto mechanismy pak zabraňují ztrátám vody z organismu a vniku cizorodých látek dovnitř [3; 4].

3.1.4 Stratum lucidum

Stratum lucidum můžeme nalézt většinou jen u tlustého typu kůže, tedy na chodidlech a dlaních. Tvoří ji pouze 1-2 vrstvy již mrtvých keratinocytů, které se více a více oplošťují. Cytoplazma těchto buněk už neobsahuje téměř žádné organely a je díky proteinu eleidinu, který se zde přeměnil z keratohyalinu, eosinofilní. Keratinocyty jsou stále navzájem spojeny pomocí desmozomů [3].

3.1.5 Stratum corneum

Složena se z 15-30 vrstev oploštěných a zrohovělých (=keratinizovaných) šupinek (dřívější keratinocyty) bez jakýchkoli organel. Počet vrstev se liší podle toho, kde je pokožka situována. Buňky obsahují svazky tonofilament, eleidin a fibrilární a amorfní proteiny, které dohromady tvoří keratin. Desmozomy mezi buňkami zanikají, díky působení proteolytických enzymů kalikreinů, což má za následek jejich odlupování. Nejsvrchnější vrstva, kde se šupinky pokožky odlupují, se nazývá stratum disjunctum [3; 4].



Obrázek 1: Epidermis, převzato a upraveno [8]

3.2 Dermis

Škára je tvořena silnou vrstvou vaziva a je mezodermálního původu. Dermis je rozdělena do dvou odlišných částí: horní stratum papillare a spodní stratum reticulare [4; 6].

3.2.1 Stratum papillare

Stratum papillare je tenká vrstva, která se nachází těsně pod dermo-epidermálním rozhraním. K bazální lamině je upevněna pomocí kotvících fibril, které jsou tvořeny kolagenem typu VII. Papilární dermis je složena z řídkého vaziva, elastických vláken, tenkých vláken kolagenu (typ I a III), fibroblastů, a i buněk imunitního systému. Tvoří dermální papily, které zvětšují plochu styku s pokožkou a zlepšují její výživu. Tyto papily obsahují kapiláry a volná nervová

zakončení, díky kterým cítíme bolest a nacházejí se zde i Meissnerova hmatová tělíska [6; 7; 8].

3.2.2 Stratum reticulare

Hlubší vrstva škály tvořena hustým neuspořádaným vazivem, silnými kolagenními vlákny (typ I) a elastickými vlákny. Díky těmto složkám je kůže pružná, odolná proti roztržení a je reversibilně tažná. Do stratum reticulare jsou zasazeny kožní adnexa a nacházejí se zde smyslová tělíska jako jsou Ruffiniho či Krauseho tělíska a hladké svalstvo Musculi arrectores pilorum [6; 7].

3.3 Hypodermis

Podkožní vazivo je nejhlubší vrstvou kůže a je tvořeno tukovou tkání; ta je nejhojněji zastoupena, hustým kolagenním vazivem nebo řídkým kolagenním vazivem. Hlavními buňkami hypodermis jsou adipocyty uspořádané do lalůček oddělených septy pojivové tkáně (=retinacula cutis), které zakotvují kůži do hlouběji uložených struktur (např. ke svalové fascii, periostu). Tato septa také obsahují nervy a krevní a lymfatické cévy, které tvoří anastomózy. Plouščka této vrstvy se liší podle tělní krajiny, kde se nachází, podle pohlaví, a také poukazuje na nutriční stav jedince. Hypodermis slouží jako zásobárna energie, tepelná izolace (termoregulace) nebo jako tlakový polštář na místech, která jsou více mechanicky namáhána. Na hranici s dermis se nachází Vater-Paciniho tělíska, která detekují vibrace a jsou složitými receptory hmatu a tlaku [5; 7; 9].

3.4 Kožní adnexa

Kožní adnexa neboli přídatné kožní orgány jsou deriváty epidermis, mezi které patří kožní žlázy, mléčná žláza, chlupy a nehty [10].

3.4.1 Kožní žlázy

V kůži můžeme najít několik typů exokrinních žláz: mazové, potní a aromatické [10].

Mazové žlázy (glandulae sebaceae) se vyskytují téměř po celém těle, kromě dlaní a chodidel, v přítomnosti chlupů či vlasů. Existují i mazové žlázy, které nejsou při vlasovém folikulu a ty se nachází např.: na rtech, čele, prsní bradavce, v očních víčkách nebo zevních pohlavních orgánech. Jsou to jednoduché rozvětvené alveolární žlázy s holokrinní sekrecí, jejichž růst a stimulace je ovlivněna androgeny. Sekreční část, tedy alveoly, tvoří vícevrstevný epitel. V periférii alveol se nachází mitoticky aktivní buňky, které nasedají na basální membránu žlázy a zde se postupně diferencují a posouvají se víc ke středu. Tyto buňky se plní lipidovými kapénkami a jejich organely i s jádrem zanikají. Nejzralejší buňky podléhají apoptóze a mění se v maz. U každé mazové žlázy se nachází vzpřimovač chlupu (musculus arrector pilli), hladká svalovina, která svým stahem vypudí sekret ze žlázy. Maz je tvořen cholesterolem a jeho estery a triacylglyceroly (TAG). Zajišťuje nesmáčivost kůže, má antibakteriální a protiplísňové účinky a chrání pokožku před chemickými a fyzikálními vlivy [4; 7; 8].

Dále se téměř po celém těle nerovnoměrně rozprostírají potní žlázy (glandulae sudoriferae eccrinae), které regulují tělesnou teplotu a jejich produkt pot má antibakteriální účinky. Žlázy se skládají ze stočené sekreční části a z tubulární části vývodné. Sekreční část je vystlána jednovrstevným cylindrickým epitelem. Buňky, které produkují pot se dělí na dva typy, a to na světlé a tmavé. Světlé buňky mají v cytoplazmě v blízkosti jádra glykogen a vylučují Na^+ a Cl^- ionty a vodu, tak vzniká izotonický primární pot. Tmavé buňky mají hojný počet ribozomů a drsného endoplazmatického retikula se sekrečními granuly, která tvoří proteinovou složku potu. Proximální část tubulárního vývodu

vstřebává zpět pouze ionty a upravuje pot primární na sekundární, který je hypotonický a kyselý. Tubulární část je vystlána dvojvrstevným kubickým epitelem, jehož bazální buňky mají tmavou bazofilní cytoplazmu s výrazně oválnými jádry. Vývodná část nemá při průchodu epidermis epitelovou výstelku a je tedy tvořena buňkami pokožky [7; 10].

Aromatické žlázy (*glandula sudoriferae apocrinae*) neboli apokrinní se nachází v blízkosti chlupů a na těle je najdeme jen na některých místech jako je okolí prsních bradavek, perigenitální a perianální oblast, podpaží, nosní předsíň, zvukovod a oční víčka. Na rozdíl od ekrinních žláz počíná jejich aktivita až v období dospívání, kdy jsou regulovány pohlavními hormony. Aromatické žlázy se také skládají z části sekreční a z části vývodné, která ústí do chlupového folikulu. Sekreční část je stočená do klubka a je mnohem větší než u potních žláz. Je tvořena jednovrstevným kubickým až cylindrickým epitelem, který obsahuje světlé a tmavé buňky. Vývodná část je tubulární a je vystlána dvojvrstevným kubickým epitelem, jehož bazální buňky mají výrazné oválné jádro. Vývod ústí do chlupového folikulu ústím mazové žlázy [7; 10].

3.4.2 Mléčná žláza (*glandulae mammae*)

Mléčná žláza je ektodermového původu a vzniká přeměnou aromatické žlázy v oblasti mléčné lišty, kde ve spojení s tukovou tkání tvoří prso (*mamma*). Každá mléčná žláza se skládá z 15-25 tuboalveolárních laloků (*lobi*), které jsou od sebe odděleny tukovou tkání a hustým kolagenním vazivem. Každý lalok je samostatnou žlázou s vlastním vývodem, mlékovodem (*ductus lactiferus*), který je tvořen vícevrstevným kubickým až cylindrickým epitelem a vyúsťuje na prsní bradavce (*papilla mammae*). Ještě před vyústěním se ale mlékovod rozšiřuje v *sinus lactiferi* a poté zase zužuje do samostatných vývodných otvůrků (*pori lactiferi*). *Lobi* se skládají z menších lalůčků (*lobuli*) a ty jsou tvořeny z alveol, které během laktace vytvářejí mléko. Tyto alveoly jsou tvořeny jednovrstevným

kubickým až cylindrickým epitelem. Histologická stavba mléčné žlázy se ovšem liší podle pohlaví, věku a fyziologického stavu [7; 8; 10].

3.4.3 Chlupy (pili)

Chlupy se vyskytují téměř po celém těle, kromě dlaní, chodidel, malých stydkých pysků, penisu a rtů. Lze je dělit do dvou skupin, a to na velusové chlupy; což jsou jemné krátké a bezbarvé chloupky, které můžeme najít např.: u dětí, a terminální chlupy, které jsou naopak dlouhé silné a pigmentované a jsou to např.: vlasy, obočí, pubické ochlupení nebo mužské vousy. Jedná se o vlákna ze zrohovatělých keratinocytů. Součástí chlupu je chlupový stvol (scapus pili), kořen (radix) a chlupová cibulka (bulbus pili), chlupová papila (papilla dermalis pili), chlupový folikul (folliculus pili), vzpřimovač chlupu a mazová žláza [7; 10].

Obnažená a celá zrohovatělá část chlupu, která vyčnívá nad pokožku, se nazývá stvol. Kořen chlupu je zanořený do pokožky a jeho buňky nejsou všechny zrohovatělé. Chlup vyrůstá díky chlupové papile, která má soudkový tvar a vylučuje růstové faktory pro tvorbu chlupu a jeho folikulu. Obsahuje také kapilární kličku, nervová zakončení a kolagenní vazivo. Chlup počíná chlupovou cibulkou, která má vysokou mitotickou aktivitu, ta je střídavá, a proto chlupy i vlasy rostou diskontinuálně. Mitoticky aktivní buňky mají mezi sebou na basální membráně matrix i melanocyty. Chlupy jsou v pokožce usazeny do chlupového folikulu, který se skládá ze tří vrstev: vnitřní epitelové pochvy, zevní epitelové pochvy a vazivové pochvy [7; 10].

3.4.4 Nehty (unguis)

Nehty jsou tvořeny zrohovatělými buňkami epidermis a nachází se na každém distálním článku prstů. Jsou složeny z nehtové matrix, nehtového kořenu (radix unguis), ploténky (lamina unguis), nehtového lůžka (lectulus) a nehtových valů

(vallum unguis). Nehtové lůžko je oblast mezi nehtovou ploténkou a posledním článkem prstu. Je složena z dermální a epidermální části, kdy je dermální část pevně připojena k periostu kosti. Epidermální část je složena ze stratum basale a stratum spinosum. Nehtová matrix se vyznačuje vysokou mitotickou aktivitou keratinocytů a umožňuje jeho růst. Matrix se nachází pod nehtovým kořenem; který z ní vyrůstá, ale dosahuje také pod jeho průhlednou část, kde tvoří bílý poloměsíčitý útvar, který můžeme vidět téměř na každém nehtu [7; 10; 11].

3.5 Vybrané patologické stavy

Jedná se o nádory epidermis – bazaliomy a spinaliomy. Nádory ostatních vrstev jsou vzácné. Celosvětově se jejich výskyt zvyšuje a těmito karcinomy trpí více lidé se světlou kůží. Nízký počet zhoubných novotvarů kůže u populace s tmavší pletí je primárně výsledkem ochrany poskytované melaninem, který filtruje více UV záření než u populace se světlou kůží [12; 13].

3.5.1 Bazocelulární karcinom

Bazaliom (BCC) je vůbec nejčastěji se vyskytující zhoubný karcinom keratinocytů, který se tvoří ve stratum basale. Je zhruba desetkrát častější než spaliom (SCC). Jedná se o nádor z buněk o vysoké mitotické aktivitě. Incidence tohoto onemocnění stále roste, v Evropě a USA je poměr nakažených 200:100 000 obyvatel, v Austrálii je ale desetkrát vyšší. Nejčastěji postihuje lidi mezi 60. až 80. rokem života. Jeho nebezpečí tkví v jeho pozvolném a nenápadném růstu, kdy se v jeden moment zdánlivě zahojí a pacient to dál neřeší. Problémem je, že se zatím bazaliom lokálně infiltruje a může napadat zdravé tkáně jako jsou například oči, v nejhorších případech může prorůst hlouběji do kůže přes svaly až ke kosti. V některých případech BCC obsahují i pigment melanin, který je barví do hněda až černa, a tím je možná jeho záměna

za melanom. Nejčastěji se bazocelulární karcinom nachází na místech, kam nejvíc dopadá sluneční záření, a to je hlava, krk, trup a paže [12; 13; 14].

Z histologického hlediska mají bazaloidní buňky mizivý podíl cytoplazmy oproti hyperchromatickým protáhlým jádrům a tvoří typické periferní palisádování. Nejběžnějším histologickým typem je nodulární BCC s pevnými, dobře ohraničenými, nepravidelnými, lobulovanými nádorovými hnízdy různých velikostí obklopenými hustým stromatem s četnými fibroblasty a mucinózním materiálem, většinou kyselinou hyaluronovou [14].

Důvodů proč bazaliomy vznikají je několik. Jsou jak vnitřní faktory (genetické faktory, imunosuprese), tak vnější faktory (ionizující záření, UV záření, chemické kancerogeny). Jednou z hlavních příčin vzniku je dlouhodobé vystavování kůže slunečnímu záření, konkrétně jeho UVB složce, která narušuje DNA keratinocytů. Imunosupresí rozumíme poškozenou reakci T buněk například u pacientů, kteří prodělali transplantaci solidních orgánů. Po genetické stránce je to možná změna regulace dráhy genu sonic hedgehog [14].

BCC se rozdělují z patologického hlediska do několika klinických skupin a to na:

- nodulární bazaliom;
- sklerotizující bazaliom;
- superficiální bazaliom;
- mikronodulární bazaliom;
- bazoskvamózní karcinom;
- pigmentovaný bazaliom;
- fibroepiteliom (Pinkusův tumor).

Nodulární bazaliom je nejčastější a projevuje se jako růžový nebo perleťově bílý uzel, který je nepravidelný, někdy s centrální krustou nebo ulcerací. Jsou pro něj typické teleangiektázie, což jsou rozšířené drobné kapiláry, které vidíme jako červené nitky. Nachází se typicky na hlavě a krku. Rozlišujeme dva subtypy nodulárních bazaliomů a to BCC cystický a BCC s pigmentem [12; 13; 14].

Druhým nejčastěji se vyskytujícím typem bazaliomu je superficiální. Vyskytuje se hlavně na trupu jako červenohnědá šupinatá ploška s náznakem perliček po jeho obvodu. Tento karcinom je typický u arsenové intoxikace a imunosuprese [12; 13; 14].

Sklerotizující BCC se často vyskytuje v nazální rýze nebo v blízkosti ucha, kde tvoří tuhé hladké a žlutobělavé ložisko připomínající jizvu. Nemá přesné ohraničení, a proto se těžko diagnostikuje [12; 13; 14].

Bazoskvamózní (metatypický) karcinom je velice agresivní a rychle rostoucí typ bazaliomu, který má z histologického hlediska i rysy spinaliomu. Léze se projevuje jako rychle rostoucí uzlík, který může ulcerovat. Tento typ je málo častý, avšak jeho schopnost metastazovat je vyšší než u některých typů spinaliomu [12; 13; 14].

Pokud je postiženému méně jak 35 let, může se jednat o syndrom nevoidního bazaliomu neboli Gorlinův syndrom. Toto autosomálně dominantně dědičné onemocnění je spojeno s mutací tzv. patched genu (PTCH), který je součástí signální dráhy sonic hedgehog a je spojený s familiárním výskytem bazaliomů. Pacient má již v dětství mnohočetné bazaliomy, epidermoidní cysty, poruchy skeletu nebo hrozí také výskyt benigních fibromů ovarií [14; 15].

Bazaliomy téměř nemetastazují, pouze v některých ojedinělých případech, kdy daný pacient zanedbá léčbu a nechá tumor vyrůst do velkých rozměrů. Proto

je prognóza tohoto onemocnění ve většině případech příznivá a neohrožuje pacienta na životě [14].

3.5.2 Spinoceleulární karcinom

Spinaliom (SCC) je po bazaliomu druhý nejčastější maligní kožní nádor. Incidence je též na vzestupu, poměr nemocných v Německu je 30:100 000 obyvatel. V Austrálii je výskyt spinaliomu několikrát vyšší než v Evropě. Jde o destruktivní tumor, který je schopný infiltrovat do sliznic, a poté pomocí lymfatických cest metastazovat. Z počátku tvoří nenápadnou papulu, která postupem času roste a tvoří šupinaté léze, které jsou tuhé a ulcerují. Spinoceleulární karcinom postihuje jak samotnou kůži, tak místa přechodu kůže na sliznici, tedy například spodní ret, špička jazyka a výjimkou nejsou ani genitálie. Z obecnějších míst to jsou opět ta, která jsou nejvíce vystavovaná slunci jako hlava, krk, hrud', předloktí nebo hřbety rukou [16; 17].

Histologicky je to dlaždicobuněčný karcinom, pocházející z keratinocytů ze stratum spinosum, který infiltruje dermis. To je taky jedním z nejdůležitějších prognostických parametrů, jak hluboko do kůže tumor zasahuje. Typickým znakem spinaliomů jsou nepravidelně dozrávající keratinocyty a do dermis zasahující pruhy atypického epitelu [16; 17].

Příčin vzniku SCC je spousta, některé jsou stejné jako u bazaliomů. Tedy dlouhodobé vystavování kůže UVB složce UV záření, která je nejvíce kancerogenní. Je také známo, že pacienti s imunosupresí, po transplantaci solidních orgánů, jsou až třicetkrát náchylnější k propuknutí spinoceleulárního karcinomu a z genetických faktorů je to např. xeroderma pigmentosum, která má ke vzniku tumoru vrozené predispozice. Případy spinaliomů na glans penis nebo vulvě, jsou spojovány, v dnešní době se stále častější infekcí, a to lidskými

papillomaviry (HPV) 16 a 18. U tohoto druhu karcinomu je dobré zmínit stav nazývaný aktinická keratóza, ze které se SCC může také vyvíjet [16; 17].

Varianty spinocelulárního karcinomu:

- keratoakantom;
- verukózní karcinom;
- adenoskvamózní karcinom;
- akantolitycký spinaliom;
- vřetenobuněčný spinaliom.

Keratoakantom je rychle rostoucí tuhá papula, která má centrální vpáčení a je vyplněna keratinem. Vzniká z vlasového folikulu a je možný spontánní regrese. Některé případy, okolo 2 %, začnou opětovně růst, tím jsou už diagnostikovány jako spinaliomy [16; 17].

Verukózní karcinomy je skupina spinaliomů spojena s infekcí HPV 6 a 11. Můžou se vyskytovat na genitáliích, plosce nohy nebo v dutině ústní. Metastazují jen vzácně a jejich mitotická aktivita je nízká, proto jsou charakterizovány pomalým růstem [16; 17].

Vřetenobuněčný spinaliom je vzácná a špatně diferenciovaná varianta tohoto karcinomu. Často je nerozeznatelný od klasického spinaliomu. Skládá se převážně z vřetenovitých nádorových buněk. Tento typ SCC často ulceruje a krvácí a je rychle rostoucí [16; 17].

Prognóza spinaliomů se liší případ od případu, závisí na tom, do jaké hloubky zasahují. Pokud jsou v hloubce menší jak 2 mm, tak nikdy nemetastazují, pokud jsou v rozmezí 2-6 mm metastazují cca ve 4 % případů. V hloubce větší jak 6 mm už metastazuje 20 % případů. Případy na genitáliích nebo na jazyku mají ještě horší prognózu než případy předešlé [16; 17].

3.5.3 Diagnostika

Diagnostika bazaliomů, jelikož jich je více typů, je důležitým krokem pro budoucí úspěšnou léčbu. Velice významným pomocníkem v kožních ambulancích je vyšetření lékařským digitálním nebo ručním dermatoskopem, díky kterému dokáže lékař diagnostikovat typ bazaliomu nebo vyloučit jiné tumory či kožní onemocnění. Například pigmentový BCC lze zaměnit s melanomem, nodulární BCC se lehce zamění za adnexální tumory nebo Pinkusův tumor lze zaměnit s neškodnými fibromy. Další možnou záměnou může být sklerotizující bazaliom za obyčejnou jizvu. Problém může nastat také ve chvíli, kdy se bazaliom v průběhu růstu zdánlivě zahojí, pacienti se tím obvykle přestanou zabývat a tím se zdržuje diagnostikování nádoru. Další možností diagnostiky je invazivní biopsie. Ve většině případů je BCC snadno určen navzdory mnoha variantám a nevyžaduje potvrzení imunohistochemickým barvením. Postižení s bazocelulárním karcinomem mají až 30% riziko rozvoje dalšího bazaliomu [18].

U spinaliomů je správná diagnostika také důležitým krokem pro správnou léčbu. Klinický rozdíl SCC od aktinické keratózy, povrchového bazocelulárního karcinomu, akantomu, bradavic nebo ekzému může být obtížný. V případě diagnostických obtíží lze potvrdit diagnózu histopatologickým vyšetřením. Ačkoli standardem diagnostiky SCC je invazivní biopsie s následným histopatologickým hodnocením, neinvazivní a minimálně invazivní diagnostické nástroje získaly zvýšenou pozornost. Pacienti s imunosupresí nebo spinaliomy většími než 5 mm by měli být po prodělání prvního SCC sledování po dobu tří let, vzniká totiž riziko rozvoje dalšího tumoru [19].

Nutno podotknout, že histologické vyšetření a zhodnocení kožních excizí karcinomů má nezastupitelnou roli v jejich diagnostice.

4 METODIKA

Správné zpracování biologického materiálu v histologické laboratoři je důležité pro vyhodnocení výsledného preparátu. Toto zpracování se skládá z:

- příjmu materiálu;
- fixace;
- zalévání vzorku;
- krájení vzorku;
- barvení histologických řezů;
- montování preparátů.

Všechny tyto kroky jsou v souladu se standardními operačními postupy (SOP) a je nutné dodržovat zásady bezpečnosti a ochrany zdraví při práci (BOZP).

4.1 Příjem materiálu

Příjem materiálu je úplně první krok, který se v histologické laboratoři děje. Laborant při příjmu biologického materiálu musí zkontrolovat, zdali se shoduje jméno pacienta, jeho rodné číslo a číslo zdravotní pojišťovny na štítku odběrové nádoby s údaji na žádance. Pokud je vše správně, materiál lze přijmout. Pokud ale chybí například podpis lékaře, který odvedl zákrok, nebo razítko z oddělení na žádance, kde byl materiál odebrán, nebo nesouhlasí údaje ze štítku odběrové nádoby s průvodním listem, musí laborant materiál vrátit a požádat o opravu chyb, aby v budoucnu nedošlo k záměně vzorků. Pokud je nalezena jakákoli chyba hned anebo později při kontrolování žádanek v systému, je nutné ji ihned vyřešit a poté zapsat do „knihy neshod“.

Důležitá je i kontrola samostatné nádobky s materiálem, kde musí být dostatečný objem fixační tekutiny. Další aspektem je přiměřená velikost nádoby na materiál, aby nebyl nijak deformován.

Potom co laborant správně přijme materiál, orazítkuje žádanku razítkem s datem daného dne a příjmovým razítkem, kam zapíše čas příjmu a svoji parafu. Také žádanku orazítkuje identifikačním laboratorním číslem (bioptickým), pod kterým bude evidován materiál v laboratorním informačním systému (LIS), pod kterým bude materiál procházet všemi kroky v laboratoři a pod kterým bude jak v parafínovém bločku, tak v nádobě, ve které přišel, nadále archivován. Každý biologický materiál a jeho žádanku je nutné uschovat. Vzorky se archivují po dobu 2 měsíců od uzavření diagnózy a průvodní listy po dobu 10 let. Dále se žádanka orazítkuje barvou, kterou bude mít histologická kazeta, do které se příslušný přikrojený materiál v dalších krocích vloží. Barvu kazet volí laborant tak, aby byla zajištěna lepší přehlednost vzorků při jejich dalším zpracování [20].

Žádanka se poté zapíše v počítači do LIS, kde je pacient již zadán z dřívějších případů anebo ho laborant nově zapíše. Pokud je pacient již zadán tak se kontroluje, zdali se údaje ze systému shodují s údaji na žádance. Těmi jsou: jméno a příjmení, rodné číslo, bydliště, číslo pojišťovny, číselná diagnóza; která je pouze orientační, jaká tkáň byla odebrána, počet nádob, ve kterých materiál přišel, datum a čas odběru materiálu a fixační roztok, ve kterém se materiál nachází. Díky modernizaci laboratoře a snížení chybovosti laborant nechá vytisknout štítky s čárovým kódem, který má v sobě vepsané to bioptické číslo, které bylo na počátku natištěno na průvodní list. Laborant jedním štítkem polepí žádanku a druhým nádobu s materiálem.

Před samotným přikrajováním je nutno připravit barevné kazety, do kterých se bude přikrojený materiál vkládat. K tomu opět díky modernizaci laboratoře nově napomáhá přístroj, který po načtení čárového kódu na nádobce s materiálem, vytiskne zvolený počet histologických kazet dané barvy. V této chvíli je vše připraveno k tomu, aby mohlo být provedeno přikrojení dodaného

biologického materiálu. S každým materiálem se musí zacházet jako s potenciálně infekčním.

Po přikrojení a makroskopickém popisu tkáně laborant nebo patolog vloží přikrojené části tkáně do připravených kazet vhodné barvy a dá je znovu do fixační tekutiny do doby, než se budou všechny vzorky vkládat do tkáňového automatu.

4.2 Fixace

Fixace je dalším důležitým krokem při zpracovávání biologického materiálu v histologické laboratoři. Jde o rychlou a šetrnou denaturaci bílkovin nacházejících se v buňkách tkání, která zabraňuje autolýze vlastními enzymy. Fixace musí být provedena bezprostředně po odebrání materiálu, aby nedošlo k jeho znehodnocení. Fixační prostředky musí dobře pronikat do celé tkáně. S tím souvisí další podmínka, kterou musí fixativum splňovat a tím je zachování struktury biologického materiálu. Dále by fixační metoda neměla změnit barvitelnost tkáně. Možnosti fixace tkáně [20]:

- fyzikální metody;
- chemické metody.

4.2.1 Fyzikální metody fixace

Metody na fyzikální bázi se v histologické laboratoři dnes využívají jen málokdy. Nejčastěji se využívají zmrazovací metody (freezing methods), kdy se kousek tkáně vloží do vakua a šokově se zmrazí při velice nízké teplotě, okolo $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Přístroj, ve kterém je možno vytvořit vakuum, a tak nízkou teplotu, se nazývá kryostat. Z názvu je patrné, že zmrzlou tkáň v tomto zařízení lze i krájet. Tato metoda se využívá v některých případech při histologickém

průkazu citlivých látek např. enzymů, nebo se využívá při peroperační biopsii z nativního materiálu.

Nejméně časté jsou pak využívané fixační metody s vysokými teplotami, např.: varem, kdy vysoká teplota vede k hrubému porušení tkáně.

4.2.2 Chemické metody fixace

Nejvyužívanější metody fixace v histologii jsou chemické. V praxi to znamená, použití organických i anorganických sloučenin (= fixačních tekutin), kdy se do nich odebraný materiál ponoří a fixuje se.

Nejvyužívanějším fixátorem je pufrovaný formol (formalín). Jedná se o 40% roztok formaldehydu ve vodě, což je 100% formol. Ten je dále nutno naředit na formol 10%. Správné skladování je důležitou součástí jeho používání. Formol totiž na světle oxiduje v methanol a kyselinu mravenčí, které formol znehodnocují. Proto se tento roztok uchovává v lahvích z tmavého skla, do kterých je ještě vmíchán uhličitán vápenatý, který na sebe, popřípadě váže vzniklou kyselinu mravenčí. Takto vytvořený formol se nazývá neutrální formol. Ovšem v histologické laboratoři se nejčastěji pracuje s certifikovaným pufrovaným formalínem, který je do laboratoří dodáván připravený k okamžitému použití. Tkáň je v něm nutné fixovat minimálně 24 hodin.

Formalín je bezbarvý, toxický a vytváří velice štiplavý zápach. Při práci s formolem je nutno používat rukavice kvůli riziku podráždění pokožky a manipulace s ním by měla být prováděna v digestoři, jelikož jeho výpary dráždí sliznice.

Jako další fixační tekutina může být použita tzv. Bouinova tekutina, roztok žluté barvy obsahující kyselinu pikrovou, formol a ledovou kyselinu octovou. Je to rychlý fixátor, který v biologickém materiálu dobře zachovává polysacharidy.

Je však nevhodný pro silně prokrvenou tkáň, krev v důsledku fixace hemolyzuje a tkáň se stává velice tvrdou. Materiál fixován Bouinovou tekutinou nesmí být pak proplachován vodou, dojde totiž k nevratnému poškození, musí se proplachovat v 80% ethanolu.

Dále se jako fixátory používají sloučeniny těžkých kovů jako například chlorid rtuťnatý (součást Zenkerovy tekutiny), dichroman draselný (také součást Zenkerovy tekutiny) nebo pro elektronovou mikroskopii oxid osmičelý a manganistan draselný.

4.3 Zalévání do bločků

Dalším krokem ve zpracování materiálu v histologické laboratoři je zalévání tkáně do bločků. Po přikrojení tkáně laborant vloží přikrojené a již fixované kousky tkáně histologických kazet a poté do tkáňového automatu, ve kterém jsou kazety přes noc. Zde se dějí 3 fáze: Odvodnění, projasnění intermediem a prosycení parafínem. V případě nezpracování celého vzorku se zbylý biologický materiál po přikrojení uschová v původní nádobě v dobře odvětrané místnosti.

Zalévací media se dělí do dvou skupin, a to na:

- ve vodě rozpustné;
- ve vodě nerozpustné.

Ve vodě rozpustná media jsou například želatina, některé typy pryskyřic nebo ve vodě rozpustné vosky. Výhoda těchto medií je, že není potřeba tkáň

odvodňovat. Například při zalévání do 10-20% želatiny se toto zalévací medium nechá jen zchladnout, a nakonec se bločky ponoří do formolu, aby ztuhly.

Nejvíce používaná media ve vodě nerozpustná jsou celoidin a parafín. Celoidin je nitrocelulóza a je vhodný pro zalévání tuhých nebo tvrdých tkání jako jsou například zuby, kosti nebo šlachy. Výhodou je, že celoidin je k vzorkům šetrný a pracuje se s ním při pokojové teplotě, avšak v praxi se používá minimálně kvůli zdlouhavému zalévacímu procesu.

4.3.1 Zalévání do parafínových bločků

Parafín je nejčastěji používané zalévací medium v histologických laboratořích. Jedná se o směs alifatických uhlovodíků, která se získává z vroucích frakcí při destilaci ropy. Pro zalévání v histologických laboratořích se tzv. zkvalitňuje, což znamená že se do něj přidává včelí vosk a dále se z něho odstraňují mechanické nečistoty a plynné příměsi. Bod tání parafínu je mezi 56-58 °C, ovšem pro jeho dokonalé rozpuštění se doporučuje teplota 60 °C. Je to levné medium, které ale není vhodné pro zalévání všech druhů tkání. Parafín je například nevhodný pro zalévání tvrdých tkání jako jsou chrupavky, kosti nebo zuby. Dále je nevhodný pro tkáně, ve kterých je třeba později prokazovat lipidy, neboť ethanol používaný při tomto typu zalévání lipidy extrahuje, tudíž se nemůžou ani obarvit a ani stanovit. Samotnému zalévání předchází 3 fáze.

1. fáze je odvodňování biologického materiálu. Dospělý člověk je ze 60% tvořen vodou, která je však nemísitelná s parafínem. Proto je potřeba vodu odstranit, tedy tkáň odvodnit. Jakýkoli náznak vody v materiálu způsobí jeho špatné prosycení parafínem a následně jeho špatné krájení na mikrotomu. Odvodnění se provádí vzestupnou řadou alkoholů, kdy při fixaci formolem se nejčastěji začíná se 70% ethanolem. S takto nižší koncentrací se začíná proto, aby nedošlo ke smrštění materiálu, tedy poruše fyziologické struktury. Dále

histologická kazeta se vzorkem pokračuje do ethanolu o koncentraci 80 % a dál o koncentraci 96 %. Doba pobytu kazet v ethanolu se odvíjí od jeho koncentrace. V 70% a 80% koncentraci se ponechávají mezi 2-4 hodinami. V ethanolu o koncentraci 96 % se materiál nechává 4-6 hodin. Po delší době odvodňování by tkáň ztvrdla a nešla by krájet.

2. fáze je projasnění tkáně intermediem, což znamená kompletní odstranění ethanolu ze vzorku. Musí se použít látka, která je mísitelná s alkoholem a zároveň se v ní rozpouští parafín. Tyto látky mají vysoký index lomu a jejich působením se tkáň projasní, tedy zprůsvitní. Jedná se například o látky s nízkým bodem varu: toluen, benzen (ten je kancerogenní) a xylen nebo látky s vysokým bodem varu: methylbenzoát, methylsalicylát nebo cedrový olej. Ty s vysokým bodem varu jsou pro zalévání do parafínu lepší, ale nepoužívají se, neboť prosycování těmito látkami trvá až 26 hodin. Proto se v laboratořích používá nejvíce benzen nebo xylen, ve kterých prosycování trvá tři krát 15 minut.

3. fáze je prosycení biologického materiálu zkvalitněným parafínem. V některých laboratořích se kazety vkládají do lázně parafin/intermedium, to však ale není nutnost. Dále se pak do třech lázní s parafínem o teplotě 56-58 °C vkládají histologické kazety, do první lázně na 2-4 hodiny, do druhé na 4-6 hodin a v poslední lázni jsou až 8 hodin.



Obrázek 2: Tkáňový automat Leica TP 1020 (vlastní foto)

4. fáze je samotné zalití tkáně do parafínu. Též se zde používá zkvalitněný a přefiltrovaný parafín. V dnešní době se pro zalévání vzorků používá zalévací linka, která parafín rozehřeje na potřebnou teplotu, a jejíž součástí je i mrazicí ploténka, na které zalité bločky tuhnou. Během zalévání si laborant bere z termostatu jednu kazetu, kterou dále otevře a vzorek zaleje. Nebere si jich víc, mohlo by dojít k záměně vzorků. Zalévá se do plastových nebo kovových komůrek, které mají různé velikosti a laborant je volí podle velikosti přikrojeného vzorku. Tyto komůrky jsou také v termostatu, aby byly dostatečně přehřáté. Do komůrky laborant aplikuje malé množství parafínu pomocí trysky zalévací linky, poté do ní nahřátou pinzetou přenese vzorek, který v komůrce správně orientuje. Forma se vzorkem se přenese na malou mrznoucí plochu, kde laborant pečlivě přitlačí celý vzorek na dno komůrky, musí přitlačit všechny místa stejně silně, aby nedošlo nerovnoměrnému zalití. To je dále problém při krájení řezů. Po důkladném přitlačení a zalití tkáně dá laborant na hladinu parafínu

histologickou kazetu, ve které předtím vzorek byl. Komůrka je pak přenesena na velkou mrznoucí plochu, kde je šokově zmrazena. Po úplném ztuhnutí parafínu je kovová nebo plastová komůrka odstraněna a parafínový bloček je připraven ke krájení. Je možné dát takto připravené bloky do mrazáku, aby parafín zůstal nadále kompletně tuhý.



Obrázek 3: Zalévací linka Medite TES Valida (vlastní foto)

4.4 Krájení vzorků

Po ztuhnutí parafínu se zhotovené bločky krájí pomocí speciálního přístroje mikrotomu. Existují dva typy mikrotomů, sáňkový a rotační. Sáňkový mikrotom je uzpůsoben tak, že laborant pohybuje nožem (žiletkou) proti parafínovému bločku, který je pevně usazen v tzv. neapolské svorce a pomocí makrometrického a mikrometrického šroubu je pohybem bločku zvolena potřebná tloušťka řezu. Rotační mikrotom pracuje na opačném principu. Mikrotomový nůž je pevně fixován, laborant jej posouvá makrometrickým a mikrometrickým šroubem. Parafínový bloček je proti němu po kruhové trajektorii vystavován a krájen.

Tento pohyb je poháněn ručním otáčením setrvačnickového kola. Výhodou tohoto mikrotomu je, že dokáže krájet v sérii a tvoří se tak souvislá linka řezů. Tloušťka řezů se volí pomocí mikrometrického šroubu a neměla by překračovat hodnotu 8 μm .

Po krájení se tenké řezy přenesou na hladinu teplé destilované vody, která je vyhřátá pomocí vodní lázně. Řezy se zde napnou a vyhladí. Poté laborant vezme podložní sklíčko, které je již z výroby potřené adhezivní vrstvou, ta může být tvořena želatinou nebo směsí bílků s glycerinem. Takto potažená skla se lehce obarví, a proto jsou nevhodná pro imunohistochemické metody. Pro tyto případy se používají skla s 3-aminopropyltriethoxysilanem nebo s poly-L-lysinem, tedy skla silanizovaná.

4.4.1 Krájení parafínových bločků

Parafínové bločky se dají krájet jak sáňkovým, tak i rotačním mikrotomem. Laborant si vyndá příslušný parafínový bloček z mrazáku a upevní si ho v neapolské svorce. Nastaví si úhel sklonu mikrotomového nože, neboť musí být menší než 10° . V případě krájení sáňkovým mikrotomem, si laborant odemkne nůž a opatrně začne, zároveň za posouvání makrometrického šroubu, skrajovat svrchní vrstvu parafínu, než se dostane k zalité tkáni. Pokud je vzorek správně přitlačen z procesu zalévání, laborant se po pár skrojeních dostane k celé ploše materiálu. Pokud ale vzorek správně přitlačen není může si pomoci tím, že si posuvnými šrouby nahne plochu skrajování tak aby se materiál skrojil správně. Laborant dále skrajuje materiál ale již za pomoci mikrometrického šroubu, tím si plochu tzv. uhladí a dalším zakrojením vznikají oficiální řezy. Ty se poté přenesou na předehřátou hladinu destilované vody, která má teplotu přibližně 40°C , kde se napnou a narovnájí. Laborant vezme příslušné podložní sklíčko, které se vloží pod jistým úhlem pod řez a pomocí histologické jehly ten řez ke sklíčku nasměruje. Sklíčko se pomalu vytahuje z vody a řez se na něj

rovnoměrně upíná. Přebytečnou vodu necháme okapat na buničinu a pro dokonalé osušení řezů se skla dávají do sušárny.



Obrázek 4: Rotační mikrotom Leica Histocore autocut (vlastní foto)

4.5 Barvení histologických řezů

Histologické řezy jsou po ukrojení bělavé, jelikož mají všechny struktury stejný index lomu a pod mikroskopem jsou těžce rozeznatelné. Proto je nutné barvení. Vybranými barvivy odlišíme jednotlivé struktury tkání a buněk v histologickém řezu. Nejčastěji se barviva dělí na kyselá (aniontová) a zásaditá (kationtová), dále také na eosinofilní, bazofilní a neutrofilní. Kyselá barviva jsou například: Eosin, Kyselý fuchsin, Oranž G, Anilínová modř. Zásaditá barviva jsou například: Hematoxylin, Basický fuchsin, Methylenová modř, Thionin. Řezy

se nejčastěji barví kombinací obojího, čímž vznikla i nejzákladnější barvicí metoda Hematoxylin-Eosin nebo další jako Azan nebo Weigert-van Gieson.

V dnešní době histologické laboratoře vlastní barvicí automaty, které barví v jednom sledu větší množství skel a laborantům usnadňují práci.

4.5.1 Barvení metodou Hematoxylin-Eosin (HE)

Toto základní barvení je každodenní rutina histologické laboratoře. Ačkoli jsou k dispozici barvicí automaty, laborant by měl toto základní barvení umět barvit i ručně. Metoda se skládá z několika fází, které je třeba dodržovat:

- deparafinace řezů;
- barvení řezů;
- odvodnění;
- projasnění.

1. fáze je deparafinace řezů, neboť barviva založená na vodné bázi by do vzorku nepronikla. Odparafinování počíná dvěma lázněmi v xylenu po dobu 5 minut. Xylen je ale také s vodou nemísitelný, tudíž se musí řezy vložit do sestupné řady alkoholů. Nejprve do 100% alkoholu na cca 5 minut a poté do 96% alkoholu také na cca 5 minut. Posledním krokem této fáze je zavodnění vzorku, kdy se řezy ponoří do vody.

2. fáze je vlastní barvení řezů. To začíná vložením deparafinovaných řezů na 5-10 minut do Hematoxylinu. Tato pěti minutová mezera se odvíjí od stáří roztoku, totiž jak dlouho je nalit v kyvetě, ale také od tloušťky a typu tkáně. Po tomto kroku následuje oplach vodou, tím se řez diferencuje. Dále se přenesou řezy do destilované vody. Pokračuje se vložením skel na 2-5 minut do Eosinu, kdy se poté opět opláchnou v destilované vodě.

3. fáze je odvodnění. Zde je to stejné jako při 1. fázi zalévání. Odvodňuje se vzestupnou řadou alkoholů.

4. fáze je projasnění v lázních xylenu.

4.6 Montování histologických řezů

Po obarvení řezů se musí podložní sklo zamontovat krycím sklem, aby se řez nepoškodil. Děje se tak pomocí montovacích medií, které musí mít stejný nebo velice podobný index lomu jako sklo, to má index lomu cca 1,5. Je tomu tak z důvodu, aby nedocházelo k optickým efektům, které by komplikovaly mikroskopování. Montovací media se dělí na ve vodě rozpustná a nerozpustná. Nejčastěji používaným montovacím médiem je kanadský balzám nebo solakryl, což jsou ve vodě nerozpustná media. Pasteurovou pipetou je kápnuta kapka solakrylu na řez a krycí sklíčko je přiloženo. Laborant opatrně sklíčko přimáčkne tak, aby pod ním nezůstaly bublinky, které by dále komplikovaly mikroskopování. Vytlačené množství solakrylu mimo krycí sklíčko se očistí hadříkem namočeným v xylenu. Laborant musí být velice opatrný, aby s krycím sklíčkem nepohnul a nepoškodil tak řez pod ním. Medium se nechá zaschnout a tím je preparát hotov k mikroskopování.

4.7 Imunohistochemie

Imunohistochemie patří do skupiny afinitní histochemie, při které se využívá principu reakce antigen-protilátka pro identifikaci antigenů ve tkáni. Tato reakce je specifická a pevná.

4.7.1 Fixace

V případě přikrojené tkáně na imunohistochemické vyšetření nesmí přesáhnout doba fixace 24 hodin. Fixační tekutina musí být vůči tkáni inertní

a nesmí měnit její strukturu. Nejčastěji se také používá formalín, kde je důležité brát v potaz jeho pH. Formalín nepufrovaný, který má pH 4 fixuje delší dobu než pufrovaný formalín, který má pH v rozmezí 4,5 – 5,5. Pufrovaný formalín, ačkoli se využívá nejčastěji, má i svá negativa. Někdy například může při fixaci pufrovaným formolem dojít ke ztrátě některých epitopů antigenu. Dalšími fixačními tekutinami mohou být Bouinův roztok, ethanol nebo aceton.

4.7.2 Zalévání

Stejně jako u základního zpracování materiálu, se nejčastěji tkáň pro imunohistochemii zalévá do parafínu. V tomto případě si ale musí dávat laborant pozor na teplotu parafínu, ta nesmí přesáhnout teplotu 60 °C. Při této teplotě jsou některé antigeny vysoce citlivé a mohly by se poškodit. Vhodnější je teplotu udržovat na 58 °C.

4.7.3 Krájení a napínání řezů

Řezy pro imunohistochemické vyšetření by měly být ještě tenčí než řezy pro klasické barvení. Tloušťka řezu by pro tuto metodu měla být v rozmezí 3-5 µm. Takto tenké řezy jsou pak přeneseny na podložní sklíčka, která na sobě musí mít přilnavou adhezivní vrstvu, která tam velice tenké řezy udrží i v dalších krocích. Poté co laborant natáhne řezy na sklíčka, dá je na 30 minut do termostatu, aby řezy správně přilnuly ke sklu a rovnoměrně se natáhly.

4.7.4 Imunohistochemická detekce

V této fázi je důležité demaskovat epitopy antigenů. Kdyby tomu tak nebylo, reakce by nemusela vůbec proběhnout, vedla by k falešné negativitě anebo by byly výsledky zkreslené. K tomuto demaskování se používají proteolytické enzymy. Nejvíce používanou proteázou je trypsin nebo pepsin. Tkáňové řezy díky enzymům ztrácí přilnavost k podložnímu sklíčku, a proto je

důležité, aby měla tato skla přilnavou adhezivní vrstvu, která řezy udrží. Enzymy jsou citlivé na teplotu, nejlépe pracují při teplotě 37 °C.

V imunohistochemii jsou využívány dvě metody, přímá a nepřímá. Při přímé reakci nasedá označená primární protilátka markerem na hledaný antigen. Nevýhodou této metody je malá citlivost, a proto se více používá nepřímá reakce, která se skládá z více molekul, proto je její citlivost vyšší. Primární protilátka, která nasedá na hledaný antigen je označena sekundární protilátkou s biotinem. Na sekundární protilátku s biotinem je pak navázán marker, který zesiluje reakci. Dále je k tomuto markeru přidán substrát (chromogen), který se po enzymatické přeměně změní na barvený produkt, který je detekován.

V imunohistochemii se využívají dva typy protilátek, monoklonální a polyklonální. Monoklonální vznikají z hybridomů a polyklonální vznikají po imunizaci organismu. Tyto protilátky se musí označit markery, které napomáhají vizualizovat průběh reakce. Jako markery se používají fluorochromy, avidin-biotinový komplex a nejvíce využívanými „značkami“ jsou enzymy peroxidáza a alkalická fosfatáza. Jelikož se tyto enzymy nachází i ve zkoumané tkáni, u peroxidázy vzniká občasný problém, a to že může vytvářet falešnou pozitivitu. Proto je nutné ji blokovat inkubací na 20-30 minut ve vodném peroxidu vodíku. V případě alkalické fosfatázy se používá na blokaci lavamizol.

Celý proces je důležitý provádět správně, krok za krokem přesně podle pokynů metodiky nebo pokynů od výrobce v příbalovém letáčku. Po dokončení metody lze skla s tkáňovými řezy zamontovat stejným způsobem jako se montují řezy barvené například Hematoxilnem-Eosinem a dále je pozorovat v mikroskopu.

5 VÝSLEDKY

Preparáty byly vyfoceny pomocí mikroskopu Olympus BX 43, který má v sobě zabudovanou digitální full HD kameru Moticam 1080.

5.1 Příjem a přikrajování kožních excizí

Bazaliomy a spinaliomy přichází k vyšetření na Patologicko-anatomické oddělení Oblastní nemocnice Kladno ve formě kožních excizí. Kožní excize posílají dermatologové v plastových, velikostně odpovídajících zkumavkách. Při příjmu materiálu je důležité zkontrolovat žádanku spolu se zkumavkou, aby nedošlo k záměně materiálu. Po zkontrolování a zapsání žádanky do UNIS STEINER (LIS) jsou zkumavky přeneseny do digestoře, kde se vzorky přikrojí. Pomocí přístroje a systému Perseus se vytisknou kódy na histologické kazety příslušné barvy.

Vzorky jiných kožních excizí se rozkrojí podélně na dvě poloviny, bazocelulární a spinocelulární karcinomy jsou většinou větších rozměrů, a proto se po změření a makroskopickém popisu krájí napříč na více plátků.

5.2 Fixace, zalévání a krájení materiálu

Po přikrojení se materiál v histologických kazetách vloží do nádob s koncentrovaným pufovaným formalíнем HistoFOR BFS-L 10, kde se excize fixují 5-7 hodin. Na Patologicko-anatomickém pracovišti Oblastní Nemocnice Kladno se všechny vzorky zalévají stejným způsobem, a to do parafínu. To se provádí tak, že ve 14 hodin se kazety přesunou do speciálních košů a ty se přenesou do tkáňového automatu Leica TP 1020. Zde se navolí program Standard 1 (viz. Tabulka 1), který pracuje přes noc.

Tabulka 1: Konfigurace roztoků ve tkáňovém automatu Leica TP 1020

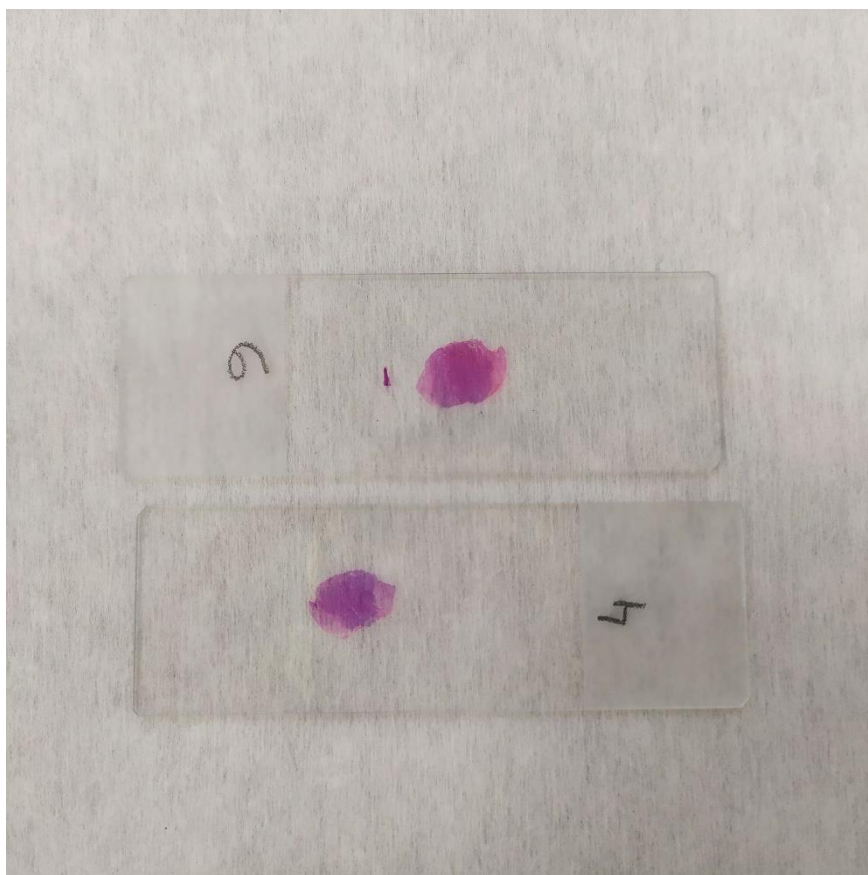
1	2	3	4	5
AAF	AAF	96% Ethanol	96% Ethanol	96% Ethanol
10	9	8	7	6
Xylen	Xylen	96% Ethanol	96% Ethanol	96% Ethanol
11	12	13	14	15
Xylen	Zkvalitněný parafín	Zkvalitněný parafín	Zkvalitněný parafín	Zkvalitněný parafín

Druhý den ráno se histologické kazety vyndají a odnesou k zalévací lince Medite TES Valida (viz. Obrázek č.3), kde se zalijí do kovové formičky za vzniku parafínového bločku.



Obrázek 5: Parafínový bloček s kožní excízi (vlastní foto)

Po zalití a ztuhnutí bločků se vzorky krájí na sáňkovém mikrotomu Leica SM2010R nebo rotačním mikrotomu Leica Histocore Autocut. Ukrojené řezy na podložních sklech jsou přeneseny ve stojáncích do barvicího automatu Tissue-Tek Prisma, kde jsou nabarveny metodou Hematoxylin-Eosin. Po obarvení celý stojánek s řezy pokračuje z barvicího automatu do k němu propojeného montovacího automatu Tissue-Tek Film. Zde se skla zamontují speciální montovací páskou Tissue-Tek Coverslipping Film, která nahrazuje krycí sklíčka.

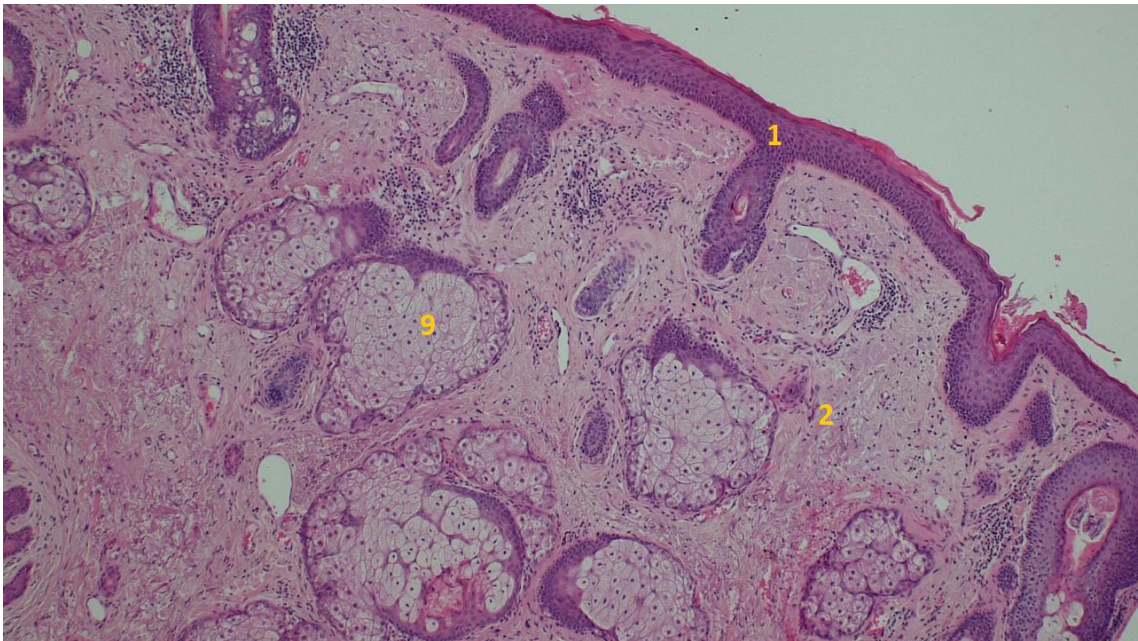


Obrázek 6: Hotové histologické preparáty (vlastní foto)

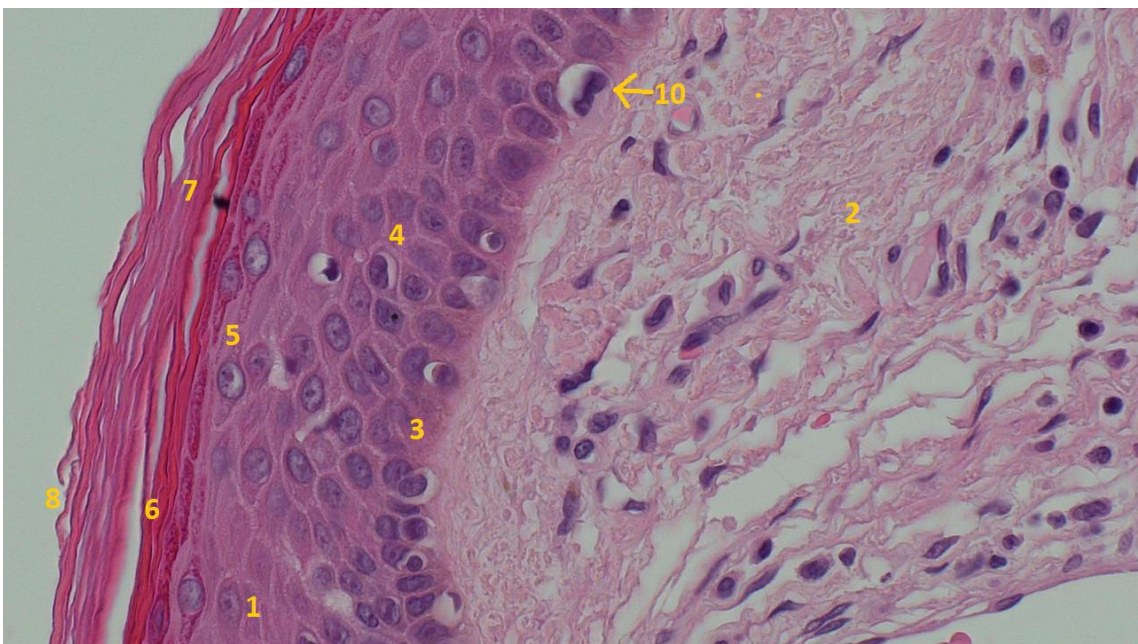
5.3 Barvení Hematoxylin-Eosin a imunohistochemický průkaz

Při využití tohoto základního barvení se Hematoxylinem obarví struktury bazofilní, tedy jádra a granula, na fialovo. Eosinem se pak obarví struktury acidofilní jako jsou cytoplazma, kolagenní vlákna, svalová vlákna, atd..., ty pod mikroskopem vidíme jako růžové.

5.3.1 Zdravá kůže – barvení Hematoxylin-Eosin

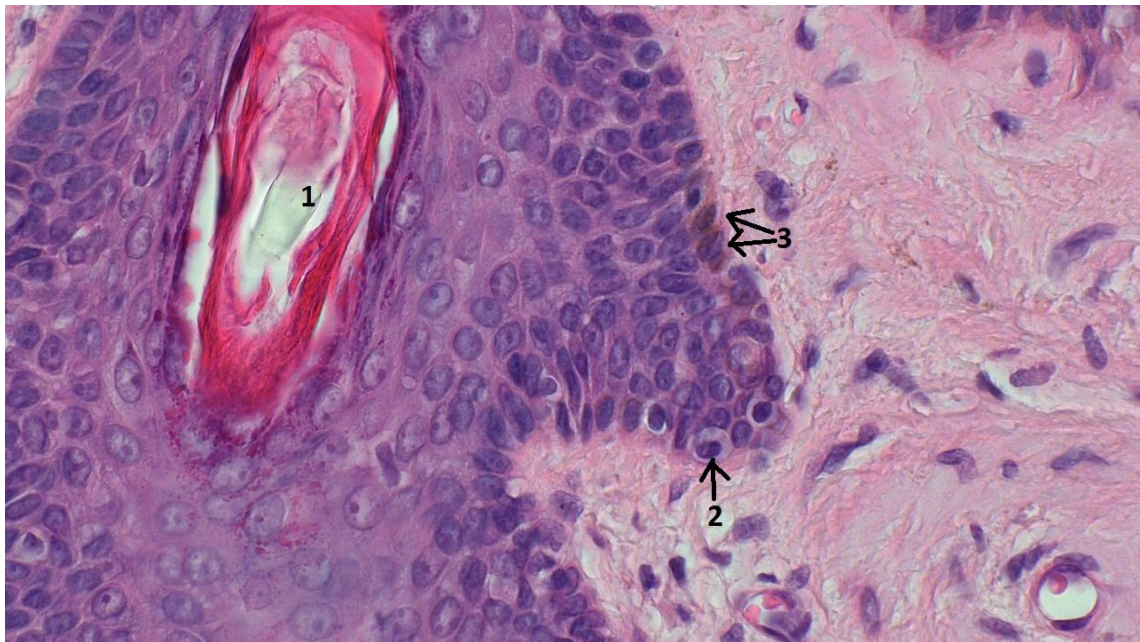


Obrázek 7: Histologická stavba kůže, zvětšeno 50x (vlastní foto)



Obrázek 8: Pokožka a podkoží, zvětšeno 400x (vlastní foto)

- | | |
|------------------------|------------------------|
| 1 – Epidermis | 6 – Stratum lucidum |
| 2 – Dermis | 7 – Stratum corneum |
| 3 – Stratum basale | 8 – Stratum disjunctum |
| 4 – Stratum spinosum | 9 – Mazová žláza |
| 5 – Stratum granulosum | 10 - Melanocyt |



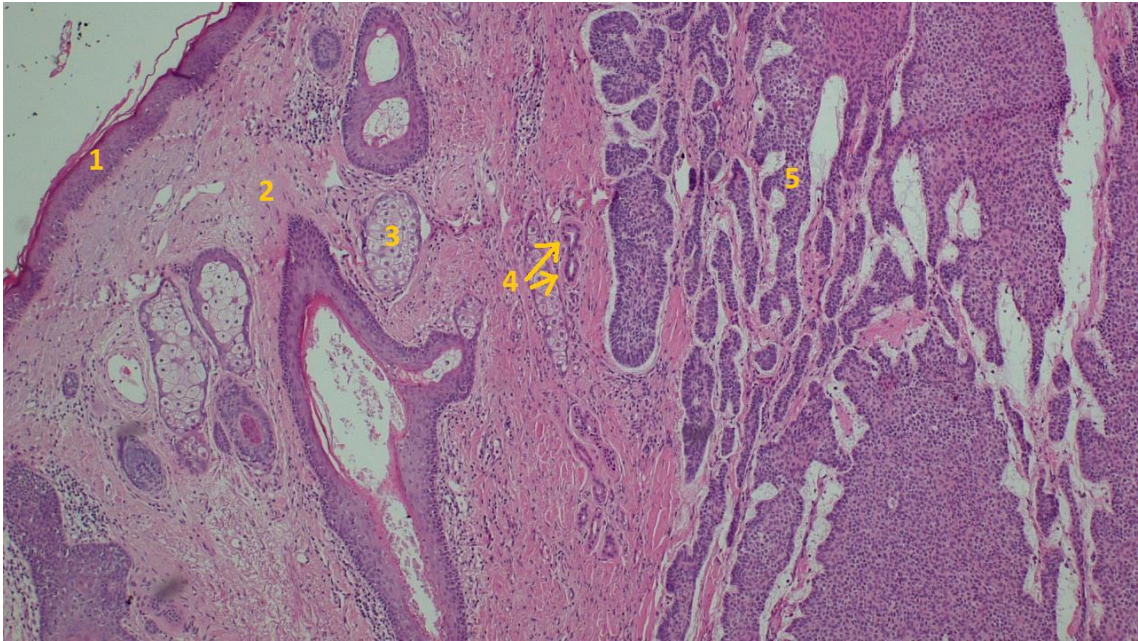
Obrázek 9: kůže, zvětšeno 400x (vlastní foto)

1 – Chlup

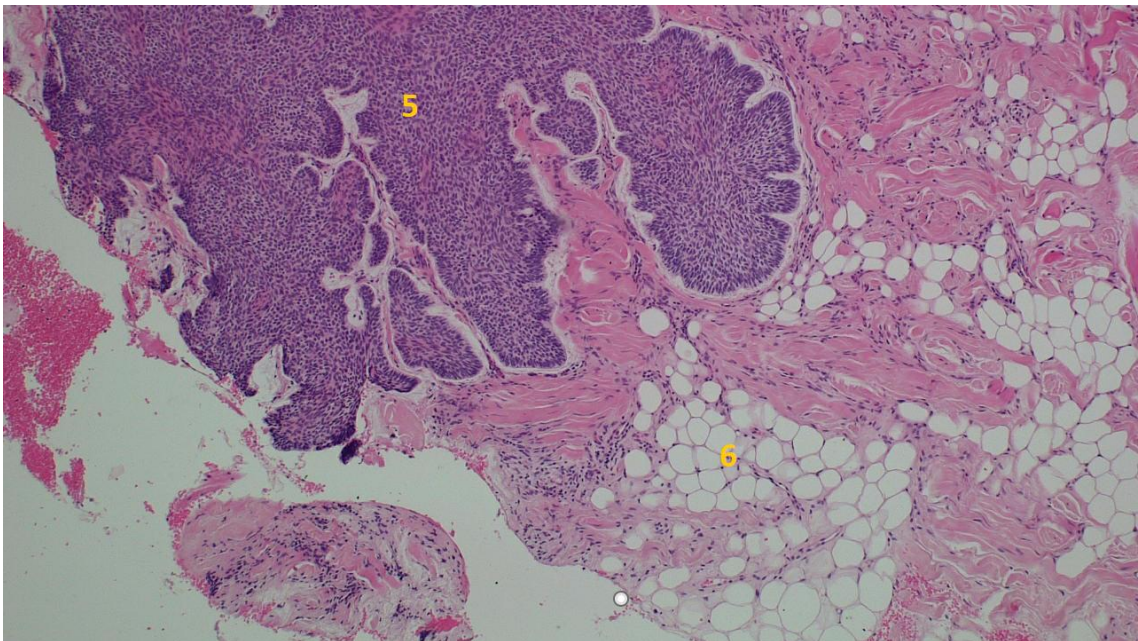
2 – Melanocyt

3 – Buňky stratum basale s melaninovými granuly

5.3.2 Bazaliom – barvení Hematoxylin-Eosin



Obrázek 10: Kůže s patologickými změnami, zvětšeno 50x (vlastní foto)



Obrázek 11: Bazocelulární ložiska dosahující na spodinu excize, zvětšeno 50x (vlastní foto)

1 – Epidermis

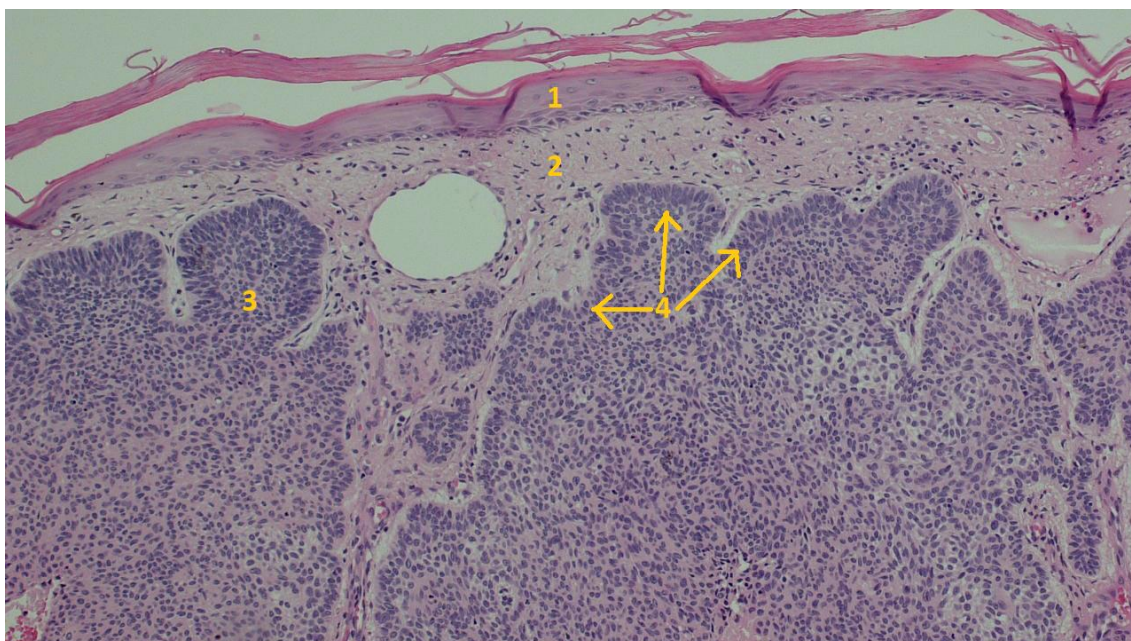
2 – Dermis

3 – Mazová žláza

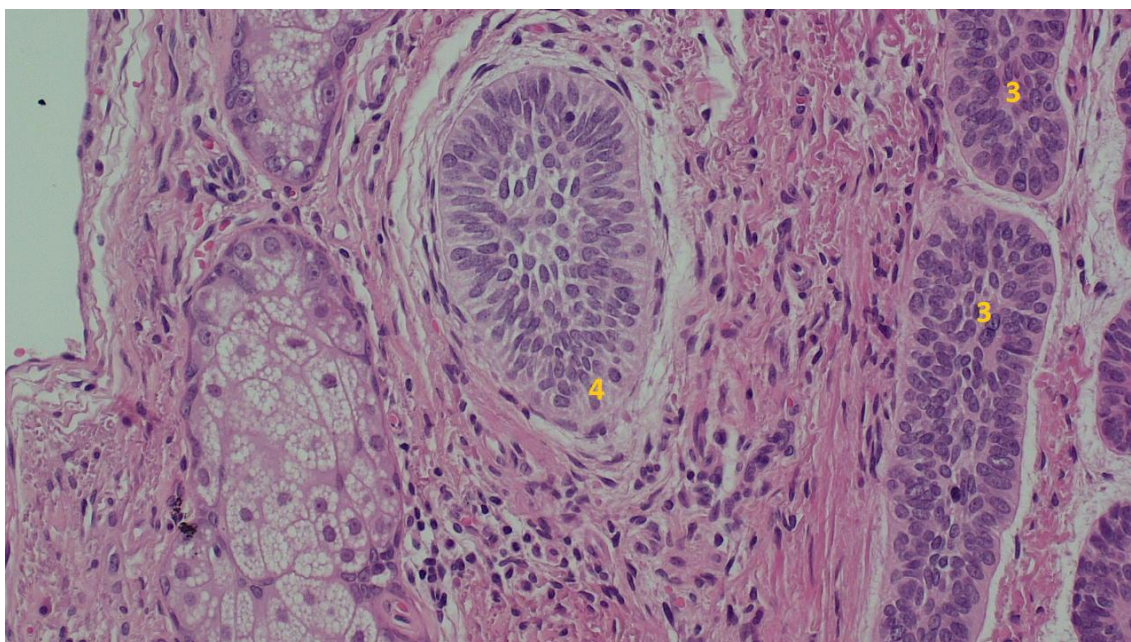
4 – Vývody potních žláz

5 – Bazocelulární karcinom

6 – Tukové buňky v hypodermis



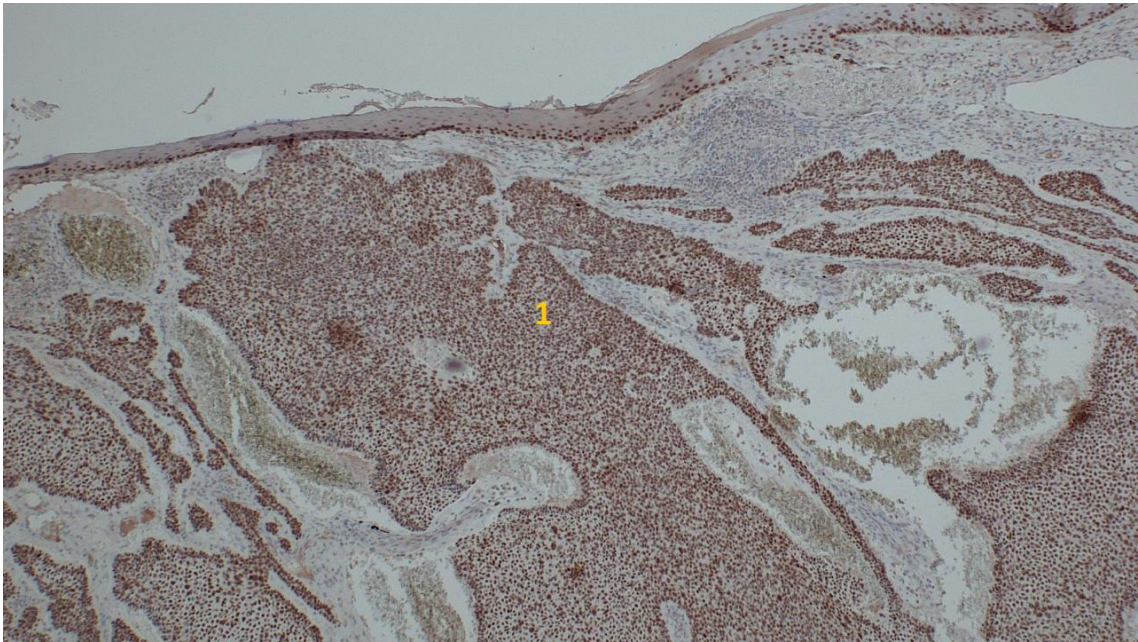
Obrázek 13: Bazocelulární ložiska v dermis, zvětšeno 100x (vlastní foto)



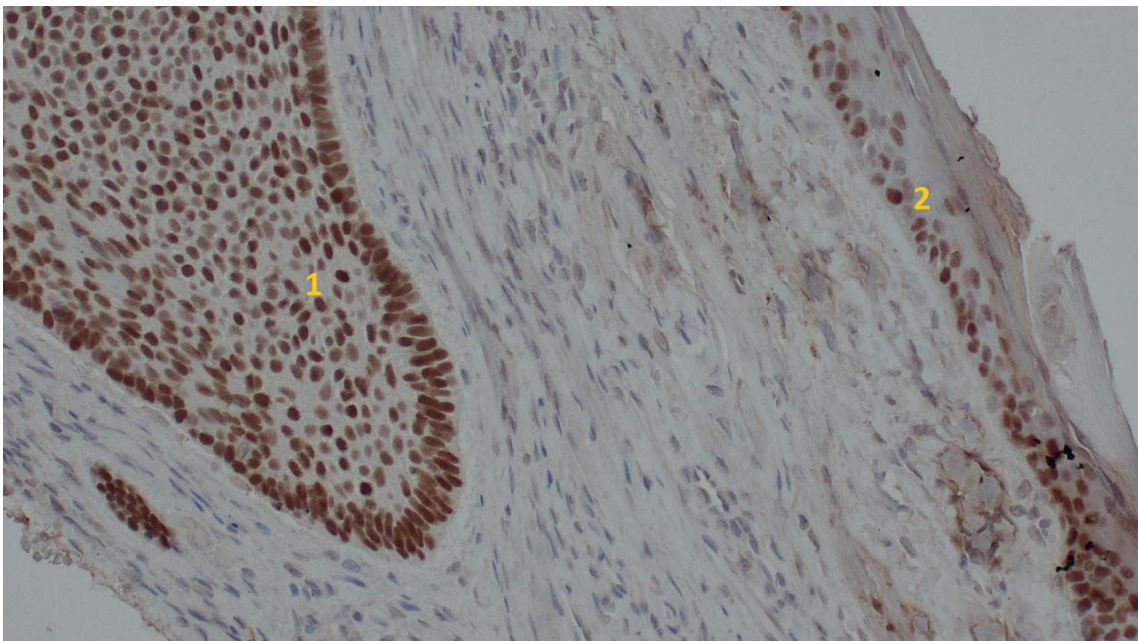
Obrázek 12: Nodulární bazocelulární karcinom, zvětšeno 400x (vlastní foto)

- 1 – Epidermis
- 2 – Dermis
- 3 – Bazocelulární ložiska
- 4 – Typické palisádování buněk s podlouhlými jádry v bazocelulárním karcinomu

5.3.3 Bazaliom – imunohistochemická detekce protilátkami p63, CK5/6 a Bcl-2

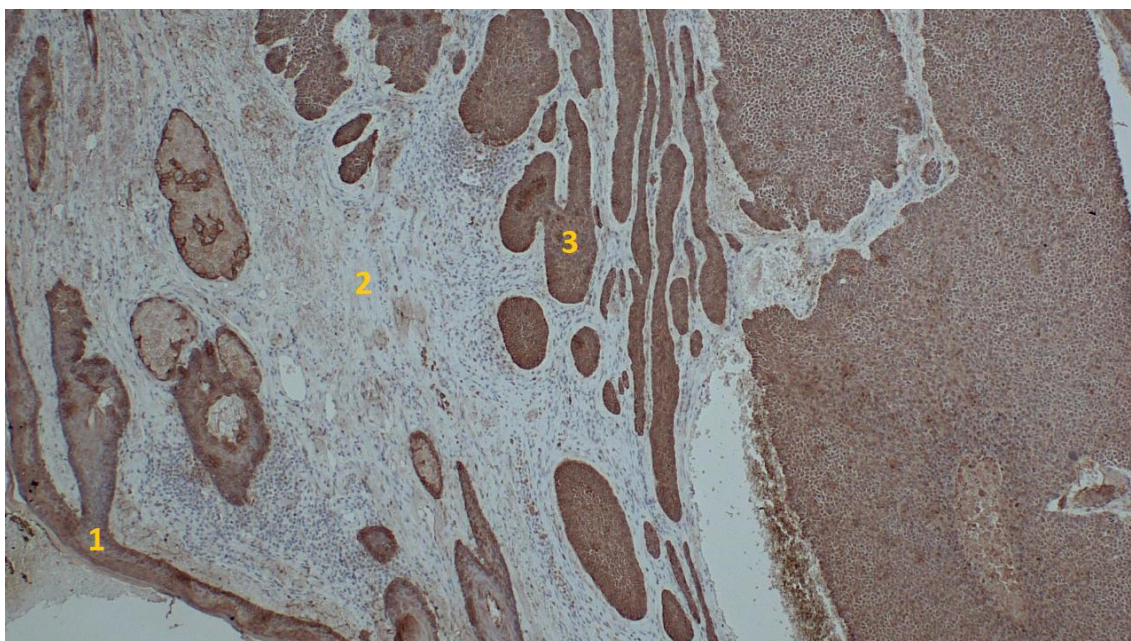


Obrázek 14: Imunohistochemický průkaz jader bazálních buněk v epidermis i bazaliomu protilátkou anti-p63, zvětšeno 50x (vlastní foto)

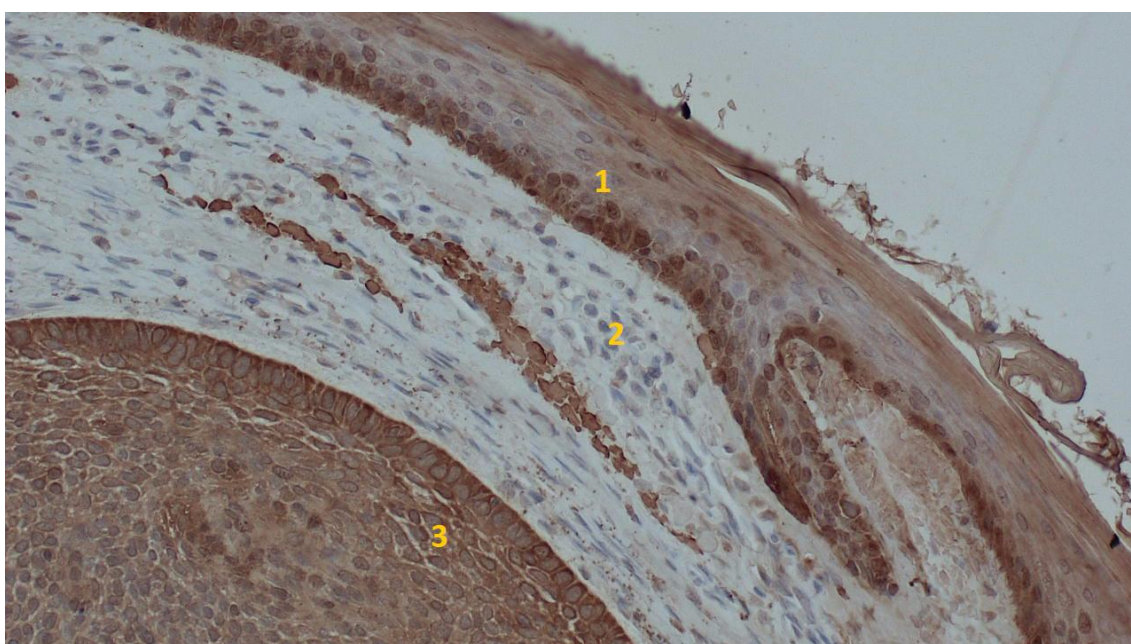


Obrázek 15: Imunohistochemický průkaz jader bazálních buněk v epidermis i bazaliomu protilátkou anti-p63, zvětšeno 400x (vlastní foto)

- 1 – Prokázání bazálních buněk v dermis pomocí protilátky anti-p63
- 2 – Fyziologické prokázání stratum basale v epidermis pomocí protilátky anti-p63

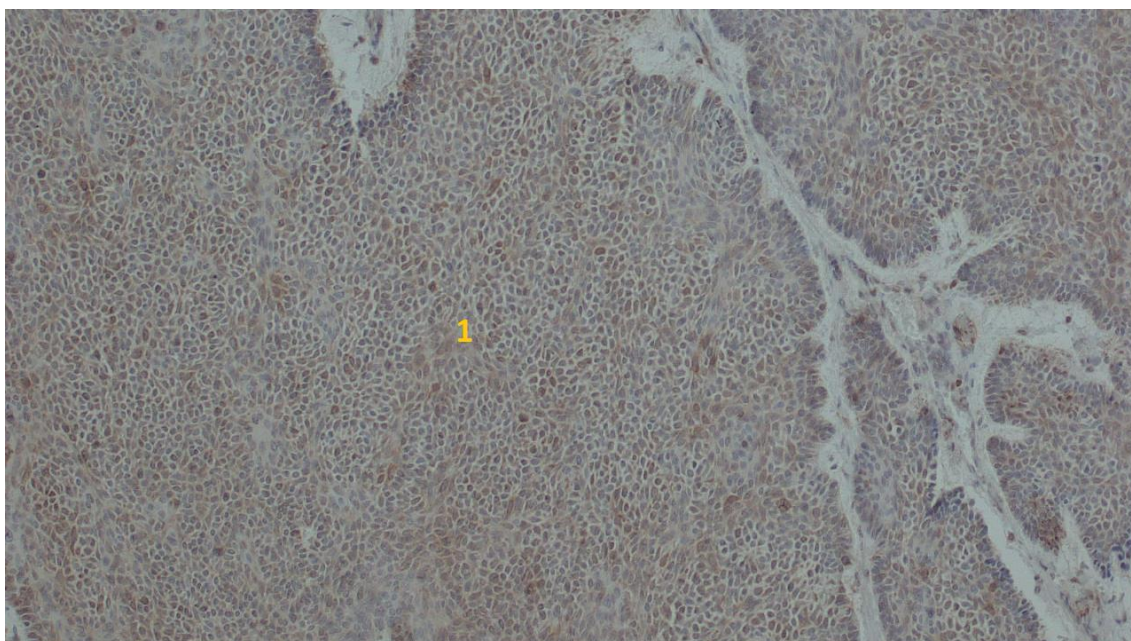


Obrázek 16: Imunohistochemický průkaz cytokeratinu v buňkách epidermis i bazaliomu protilátkou anti-CK5/6, zvětšeno 50x (vlastní foto)

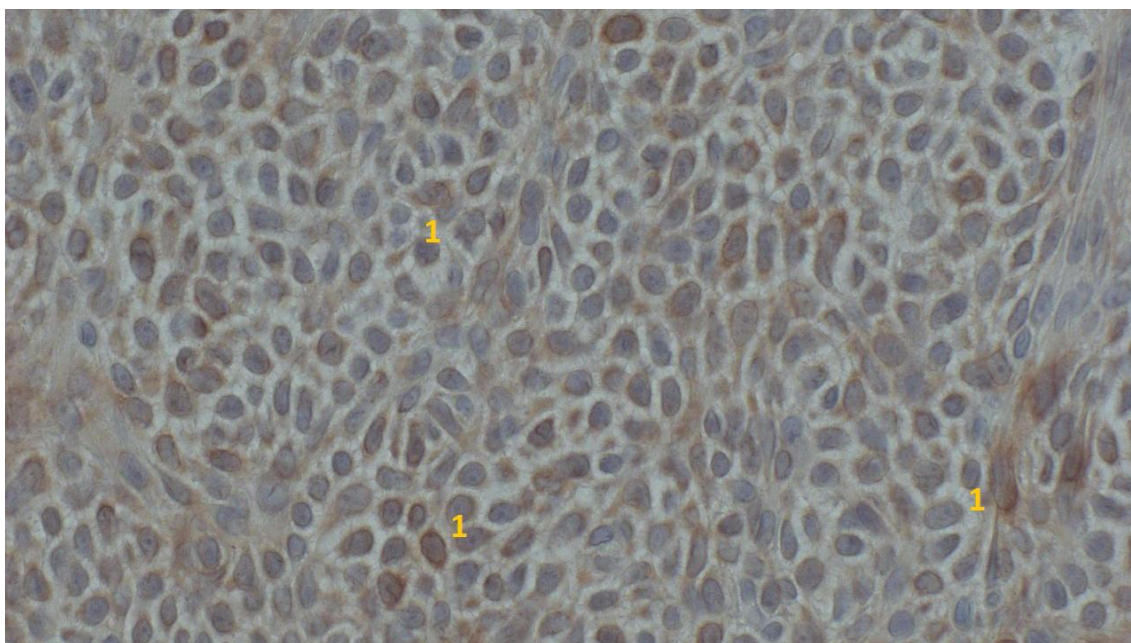


Obrázek 17: Imunohistochemický průkaz cytokeratinu v buňkách epidermis i bazaliomu protilátkou anti-CK5/6, zvětšeno 400x (vlastní foto)

- 1 – Fyziologické prokázání cytokeratinu v epidermis protilátkou anti-CK5/6
- 2 – Fyziologicky negativní dermis na cytokeratin
- 3 – Prokázání cytokeratinu protilátkou anti-CK5/6 v dermis, bazaliom



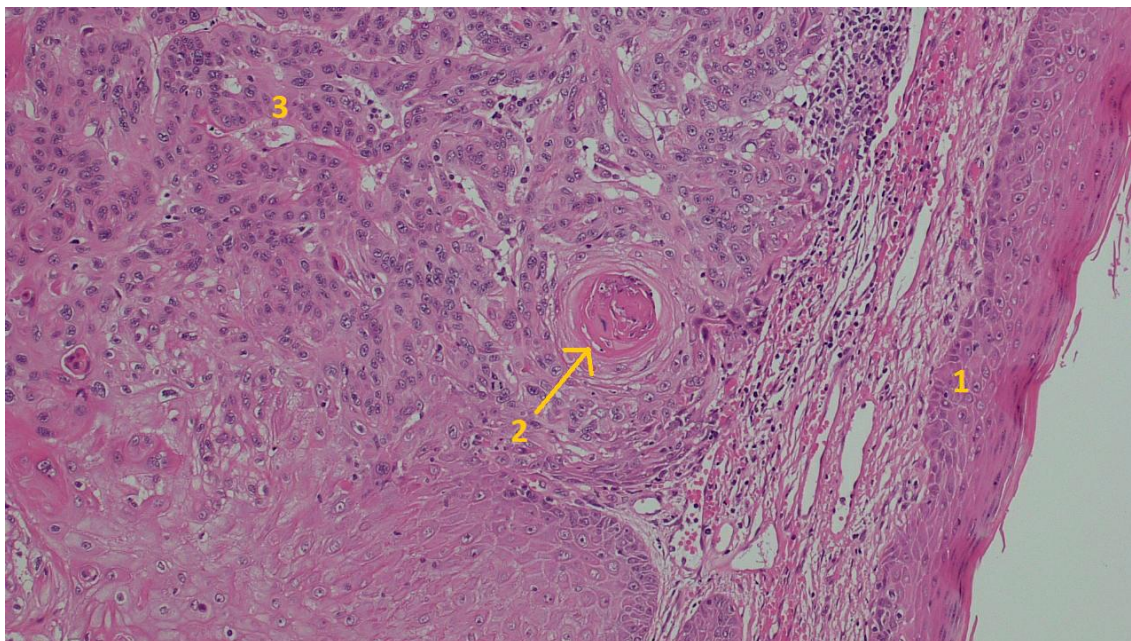
Obrázek 18: Imunohistochemický průkaz onkoproteinů v bazaliomu pomocí protilátky anti-Bcl-2, zvětšeno 200x (vlastní foto)



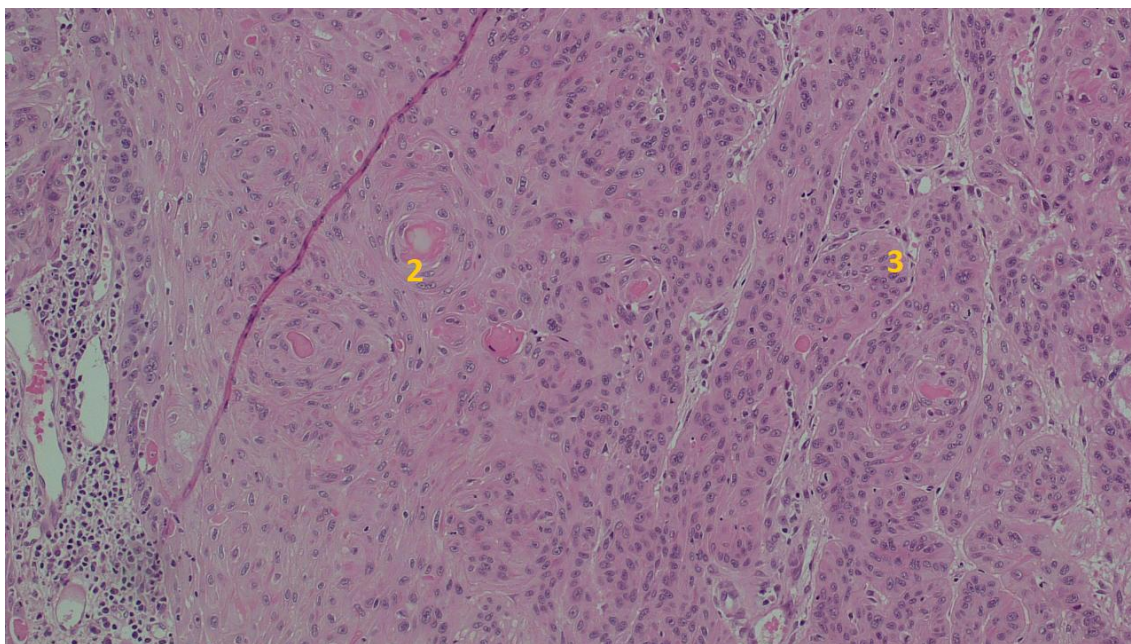
Obrázek 19: Imunohistochemický průkaz onkoproteinů v bazaliomu pomocí protilátky anti-Bcl-2, zvětšeno 400x (vlastní foto)

1 – Průkaz onkoproteinů Bcl-2 (hnědé zbarvení) na povrchu buněk bazocelulárního karcinomu

5.3.4 Spinaliom – barvení Hematoxylin-Eosin



Obrázek 20: Lokálně rohovějící spinocelulární karcinom, zvětšeno 50x (vlastní foto)



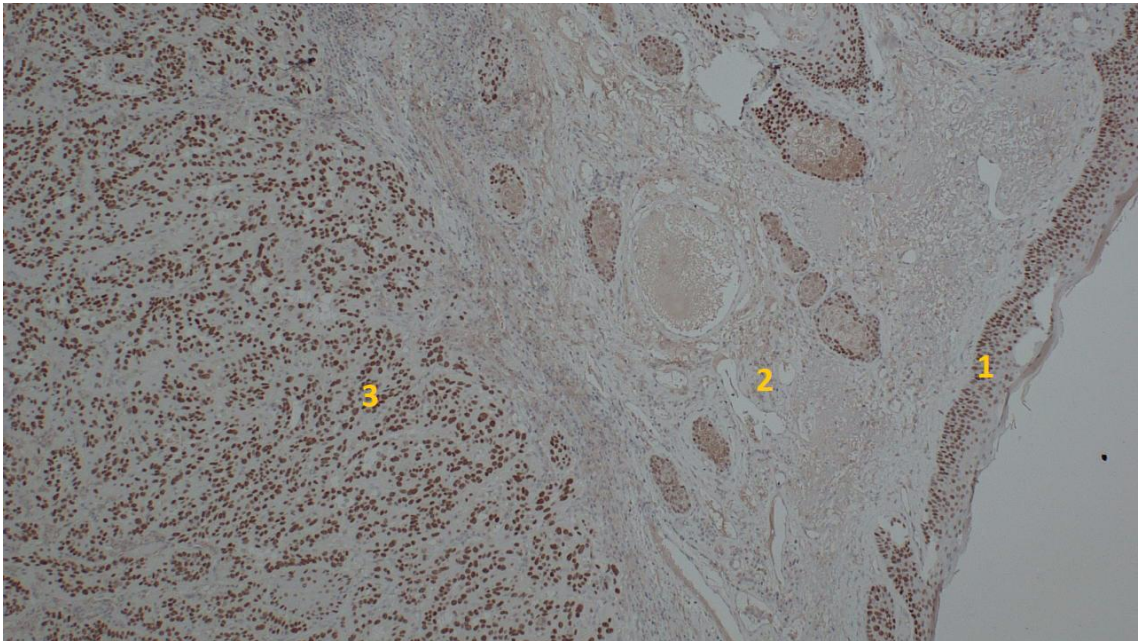
Obrázek 21: Lokálně rohovějící spinocelulární karcinom, zvětšeno 100x (vlastní foto)

1 – Epidermis

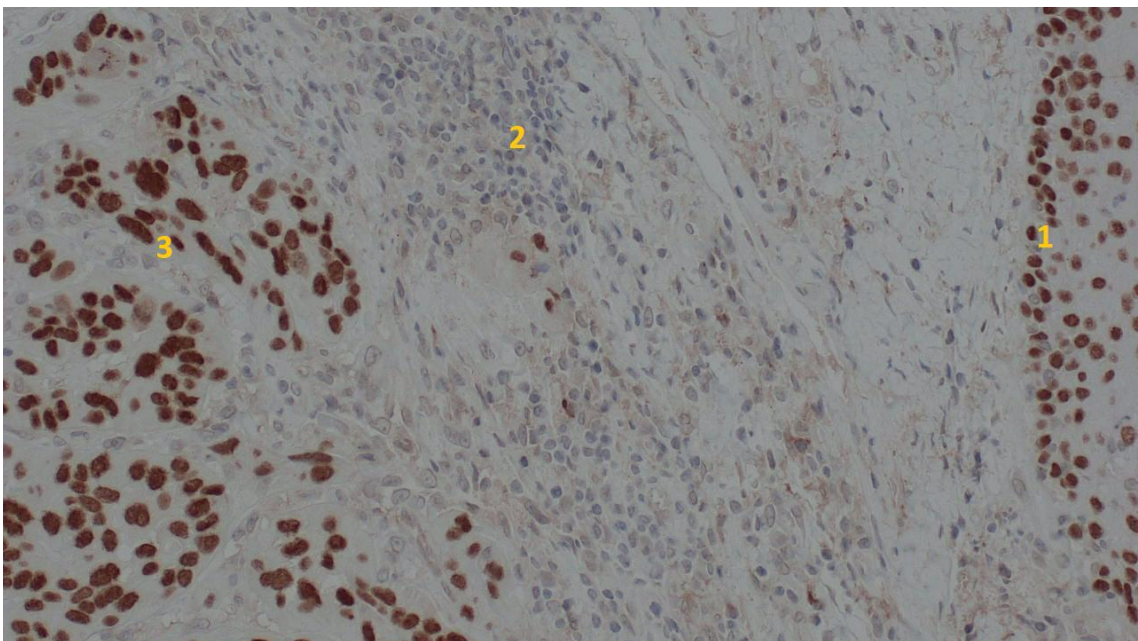
2 – Výrazná keratinizace, tzv. keratinové perly

3 – Ložiska spinaliomu

5.3.5 Spinaliom – imunohistochemická detekce protilátkami p63, CK5/6 a Bcl-2

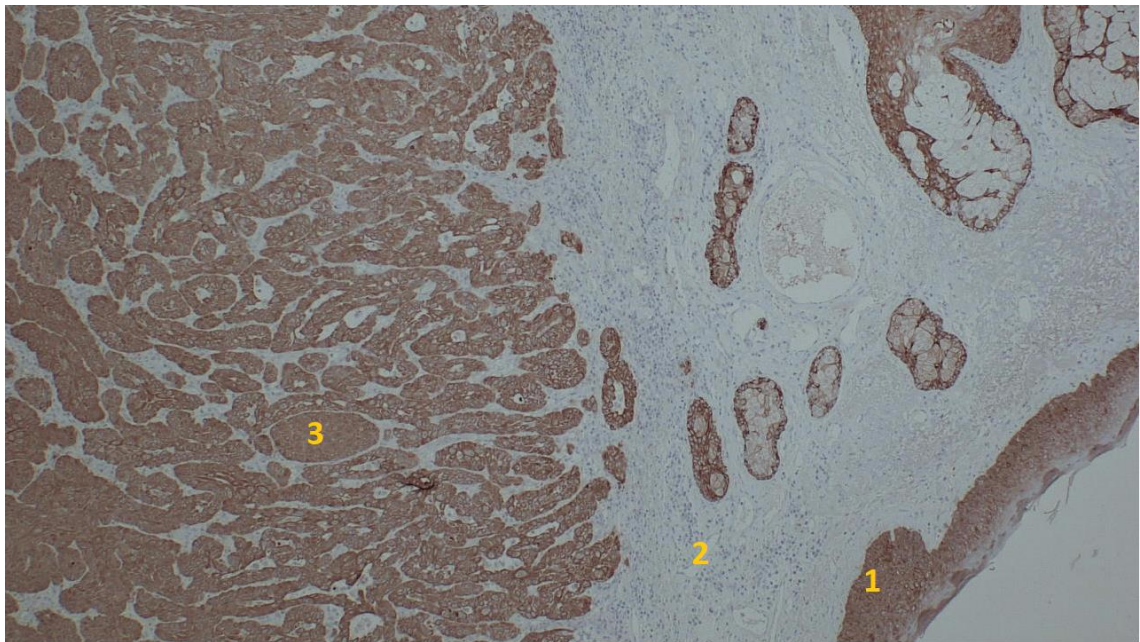


Obrázek 22: Imunohistochemický průkaz jader buněk v epidermis i spinaliomu protilátkou anti-p63, zvětšeno 50x (vlastní foto)

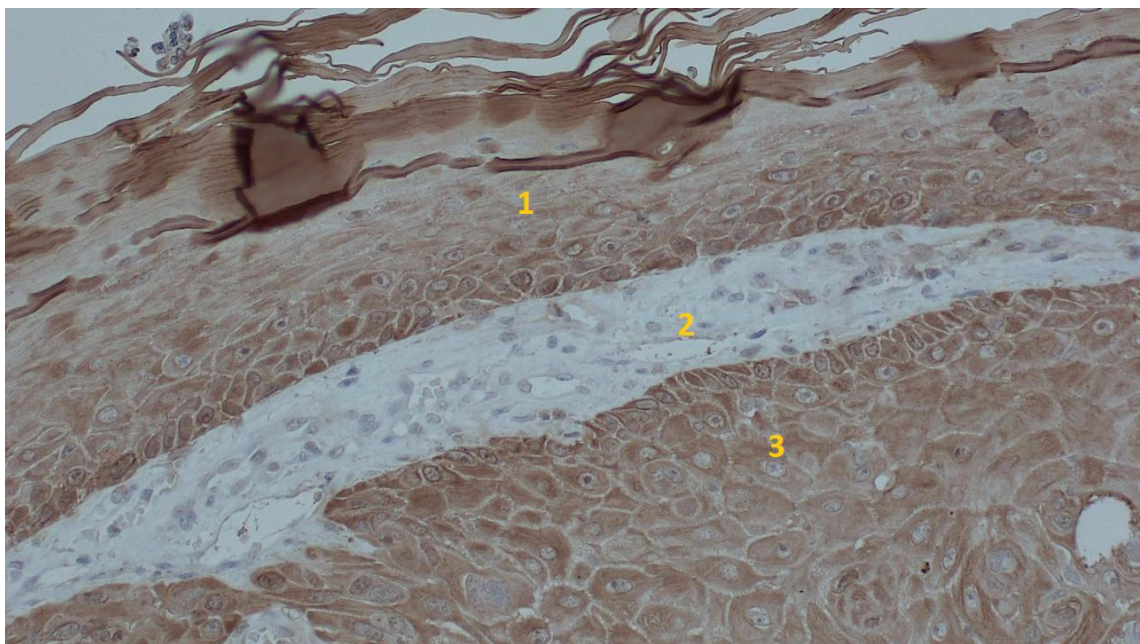


Obrázek 23: Imunohistochemický průkaz jader buněk v epidermis i spinaliomu protilátkou anti-p63, zvětšeno 200x (vlastní foto)

- 1 – Fyziologické prokázání stratum basale v epidermis protilátkou anti-p63
- 2 – Fyziologicky negativní dermis
- 3 – Prokázání buněk z epidermis v dermis protilátkou anti-p63, spinaliom

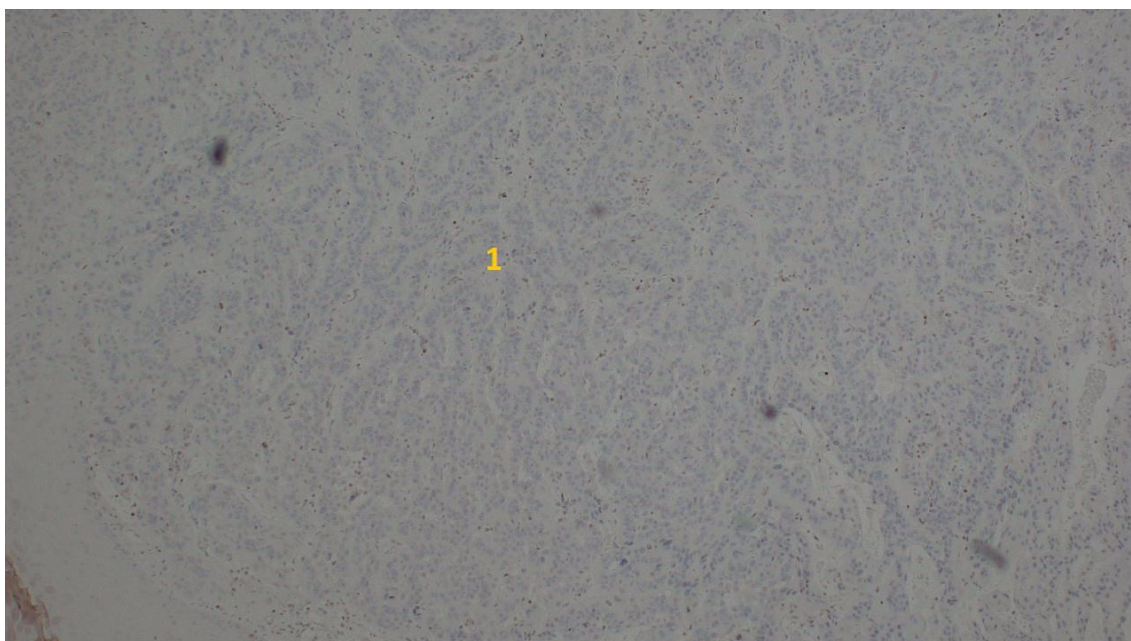


Obrázek 24: Imunohistochemický průkaz cytokeratinu v buňkách epidermis i spinaliomu protilátkou anti-CK5/6, zvětšeno 50x (vlastní foto)

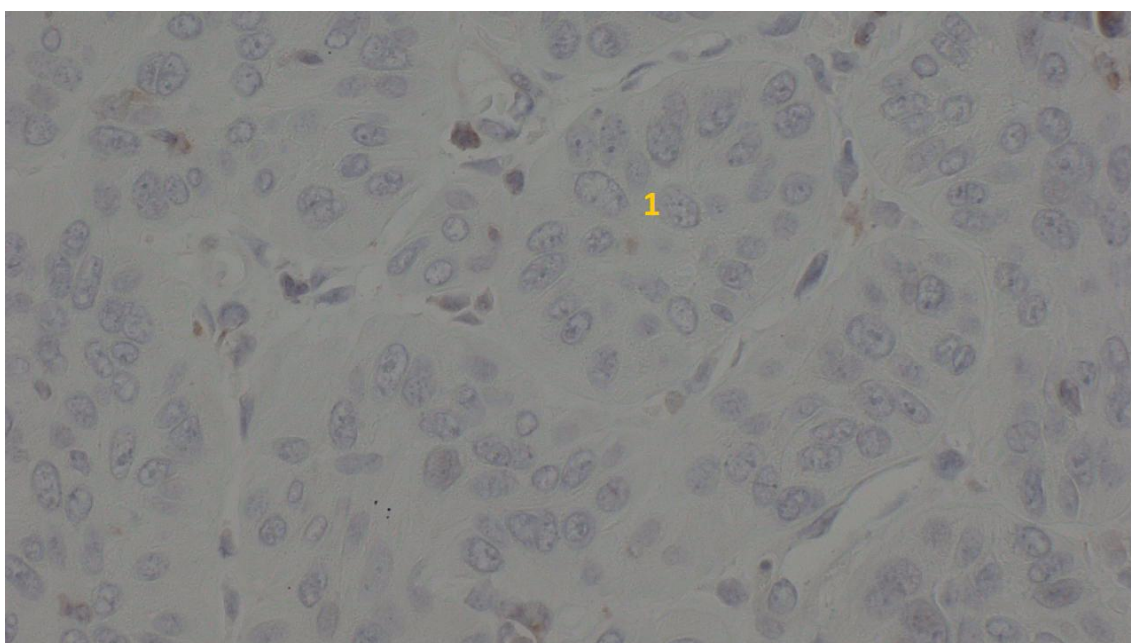


Obrázek 25: Imunohistochemický průkaz cytokeratinu v buňkách epidermis i spinaliomu protilátkou anti-CK5/6, zvětšeno 200x (vlastní foto)

- 1 – Fyziologické prokázání cytokeratinu v epidermis protilátkou anti-CK5/6
- 2 – Fyziologicky negativní dermis na cytokeratin
- 3 – Prokázání cytokeratinu protilátkou anti-CK5/6 v dermis, spinaliom



Obrázek 26: Negativní imunohistochemické prokázání antigenu Bcl-2, zvětšeno 50x
(vlastní foto)



Obrázek 27: Negativní imunohistochemické prokázání antigenu Bcl-2, zvětšeno 400x
(vlastní foto)

1 – Buňky spinaliomu negativní na antigen Bcl-2

6 DISKUZE

V rámci plnění cílů této bakalářské práce, byly vybrány dva nejčastější epidermální karcinomy. Jedná se o bazaliom a spinaliom. Úmrtnost je velice nízká, avšak v roce 2017 byl v České republice zaznamenán velký nárůst pacientů s diagnostikovaným bazocelulárním, či spinocelulárním karcinomem a od té doby incidence stále každoročně roste [21].

Biologický materiál ve formě kožních excizí jsem zpracovala podle standardních operačních postupů. Tkáně byly fixovány formalínem HistoFOR BFS-L 10, odvodněny lázněmi 96% alkoholu, projasněny xylenem, zality do zkvalitněného parafínu a ukrojeny na rotačním mikrotomu. Na Patologicko-anatomickém oddělení Oblastní nemocnice Kladno se vzestupná odvodňovací řada alkoholů nepoužívá, neboť je tento proces zdlouhavý a zastaralý. V případě tří lázní 96% alkoholu se tkáň nijak nepoškozuje, odvodnění je provedeno rychleji a materiál je i tak vhodně připraven k následujícím krokům. Pro obarvení tkání bylo použito základní barvení Hematoxylin-Eosin. Je to jednoduchá a přehledná barvicí metoda, která je v histologické laboratoři používána na denní bázi. Existuje více druhů Hematoxylinu i Eosinu a pro účely zpracování bakalářské práce byl použit barvicí automat, ve kterém je Eosin rozpustný ve vodě a Mayerův Hematoxylin. Některé laboratoře používají spíše Harrisův Hematoxylin, ale ten je více progresivní, tmavší a v některých případech trochu obarvuje jiné buněčné orgány než jádro a okolní podložní sklo. Pokud by kožní excize přišla jako peroperační biopsie, tak by byl pro obarvení řezu použit Harrisův Hematoxylin, protože barví tkáň o dost rychleji než Hematoxylin Mayerův [22].

Imunohistochemický průkaz antigenů v mé práci zobrazuje doplňkové diagnostické vyšetření. V obou případech nádorů byly použity protilátky na antigeny p63, CK5/6 a Bcl-2. Protilátka anti-p63 se používá na průkaz jader

bazálních buněk hlavně dlaždicového a přechodného epitelu. V druhém případě protilátka anti-CK5/6 prokazuje cytokeratiny v cytoplazmě epiteliálních buněk. Ten se ve většině případů používá spíše na spinaliomy. Anti-Bcl-2 je naopak specifickou protilátkou na bazocelulární karcinomy. Průkaz tohoto antigenu vyšel pozitivně. Tento onkoprotein se ve spinocelulárním karcinomu nenachází, a to bylo dokázáno obrázkem číslo 26 a 27. Je také důležité podotknout, že existují další antigeny, které tyto karcinomy exprimují. Pro bazaliomy jsou to například CK AE1/AE3, BerEP4, CAM5,2 a další. U spinaliomů se dají prokázat další antigeny jako EMA, MNF116, CK AE1/AE3, 34beta E12, atd [23; 24].

Z histologického hlediska, který je v této práci hlavní náplní, se výrazně oba karcinomy liší od zdravé tkáně. Tato odlišnost je v případě preparátu bazaliomu jasná, k určení diagnózy by tedy stačilo základní barvení Hematoxylin-Eosin. Na fotografiích tohoto novotvaru byly dobře vidět nádorové čepy (viz. Obr. 10-13), které jsou tvořeny periferním palisádováním cylindrických buněk, obsahující protáhlá jádra. Tyto podlouhlé cylindrické buňky pochází ze stratum basale z epidermis a viditelně se liší od ostatní tkáně v dermis, kam prorůstají. Z fyzického vzhladu excize a poté i histologického odečtu se jedná o nodulární bazocelulární karcinom, který dosahuje spodiny odběru. U spinocelulárního karcinomu do dermis infiltrují keratinocyty z epidermis, z čehož vyplývá, že pro tento nádor je typická keratinizace. Na fotografiích spinaliomu lze vidět výraznou keratinizaci ve formě keratinových perel. Také je možné vidět atypické keratinocyty s velkými jádry, které se v dermis nemají vůbec nacházet. Zde se jedná o endofyticky rostoucí fokálně rohovějící spinocelulární karcinom, který také dosahuje na spodinu excize. Pro porovnání výsledků jsem použila Histopatologický atlas, kde se mé popisující informace a obrázky o nádorech shodují a tím jsem si ověřila moji správnost určení nádorů. Výsledky jsem konzultovala i s primářkou Patologicko-anatomického oddělení Oblastní nemocnice Kladno [25].

Imunohistochemické vyšetření použije lékař patolog pouze tehdy, kdy je karcinom špatně diferencovaný nebo v některých případech úplně nediferencovaný. To znamená, že buňky nádoru jsou špatně rozeznatelné, nedá se poznat z jakých buněk nádor vzniká a lékař si není jistý, zda se jedná právě o ten určitý karcinom. V případě metastázy jednoho nebo druhého karcinomu se dá za pomoci této metody také zjistit odkud buňky pochází a jaký antigen na svém povrchu mají. Důležité je, že v této problematice imunohistochemie základní barvení Hematoxylin-Eosin nenahradí. Ačkoli je to metoda velice specifická, v případě BCC a SCC to je ve valné většině pouze pomocné a doplňující vyšetření.

7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce s názvem Histologická stavba kůže, porovnání fyziologické tkáně s vybranými patologickými stavy se zabývala dvěma nejčastěji se vyskytujícími nemelanomovými karcinomy a to bazaliomem a spinaliomem ve srovnání se zdravou kůží z pohledu histologického.

V teoretické části byly popsány základní informace o zdravé kůži. Dále histologická stavba jejích tří základních vrstev, epidermis, dermis a hypodermis a popis buněk a struktur, ze kterých se skládají. V dalších podkapitolách byly popsány kožní adnexa jako jsou žlázy, ať už mazové či potní, nehty nebo chlupy. Popsány byly podrobně oba karcinomy, jejich vzhled, epidemiologie, patogenese, histologie a jejich typy.

V praktické části bylo cílem popsat průchod materiálu histologickou laboratoří, tedy jeho příjem, přikrojení, zalévání, krájení na mikrotomu a barvení. Barvení bylo zaměřeno na základní barvicí metodu Hematoxylin-Eosin, která se využívá nejvíce. Část metodiky byla věnována i imunohistochemii.

Do kapitoly výsledků byly vloženy obrázky histologických preparátů, které byly pořízeny pomocí mikroskopu se zabudovanou kamerou, a kde jsou popsány viditelné struktury.

Tato práce by mohla čtenářům nastínit, jak je důležité vzorky tumorů správně zpracovat a diagnostikovat. Ačkoli nejsou prognózy těchto nádorů tolik nepříznivé, mohou pacientům ublížit. Také by mohla tato bakalářská práce posloužit jako studijní materiál.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAF	Alkohol-formol-kyselina octová
BCC	Bazocelulární karcinom
Bcl-2	Onkoprotein, blokátor apoptózy
BOZP	Bezpečnost a ochrana zdraví při práci
CK 5/6	Cytokeratiny 5 a 6
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DOPA	3,4-dihydroxyfenylalanin
HE	Hematoxylin-Eosin
HPV	Lidský papilomavirus
LIS	Laboratorní informační systém
p63	Jaderný protein
SCC	Spinocelulární karcinom
SOP	Standardní operační postupy
TAG	Triacylglyceroly
UV	Ultrafialové záření

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] YOUSEF, Hani, Mandy ALHAJJ a Sandeep SHARMA. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. Ncbi.nlm.nih.gov [online]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2020 [cit. 2020-12-15]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- [3] Epidermis. BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. Memorix histologie. 2. vydání. Praha: Triton, 2017, s. 464-465. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [4] VAJNER, Luděk, Jiří UHLÍK a Václava KONRÁDOVÁ. Kožní systém. Lékařská histologie II.: mikroskopická anatomie [online]. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2012, s. 142-150 [cit. 2020-11-29]. ISBN 978-80-246-2165-4. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=uVtQDwAAQBAJ&pg=PA2&dq=histologie+konr%C3%A1dov%C3%A1&hl=cs&sa=X&ved=2ahUKEwiCvvGk0s_tAhWGM-wKHYQFB_oQ6AEwAXoECAQQAg#v=onepage&q=histologie%20konr%C3%A1dov%C3%A1&f=false
- [5] KHAVKIN, Jeannie a David ELLIS. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. Facial Plastic Surgery Clinics of North America [online].

2011, 19(2), 229-234 [cit. 2020-12-08]. ISSN 10647406. Dostupné z:
doi:10.1016/j.fsc.2011.04.003

- [6] Dermis. BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. Memorix histologie. 2. vydání. Praha: Triton, 2017, s. 466. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [7] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. Histologie. 3. vydání. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
- [8] Skin. MESCHER, Anthony. Junqueira's Basic Histology: Text and atlas [online]. 14. Bloomington: Mc Graw Hill Education, 2016, s. 371-391 [cit. 2020-12-15]. ISBN 978-0-07-184270-9. Dostupné z:
file:///C:/Users/Karol%C3%ADna/Downloads/Junqueira%E2%80%99s%20Basic%20Histology%20Text%20and%20Atlas%20(%20PDFDrive%20).pdf
- [9] Hypodermis. BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. Memorix histologie. 2. vydání. Praha: Triton, 2017, s. 467. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [10] Kožní adnexa. BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. Memorix histologie. 2. vydání. Praha: Triton, 2017, s. 468-473. ISBN 978-80-7553-249-7.
- [11] RÖCKEN, Martin, Martin SCHALLER, Elke SATTLER a Walter BURGDORF. Kapesní atlas dermatologie. 1. Praha: Grada, 2018. ISBN 978-80-271-0106-1.
- [12] KRAJSOVÁ, Ivana. Kožní nádory. Česko-slovenská dermatologie [online]. Praha, 2019, 94(5), 217-219 [cit. 2020-11-17]. ISSN 1805-448X.

Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2019-5-9/kozni-nadory-119277>

- [13] SMOLÁROVÁ, Markéta. Zhodnocení výskytu dermatoskopických struktur bazaliomu s možnou predikcí histopatologického typu. Československá dermatologie [online]. Praha, 2018, 93(3), 111-115 [cit. 2020-11-17]. ISSN 1805-448X. Dostupné z: <https://www.prolekare.cz/casopisy/cesko-slovenska-dermatologie/2018-3-22/zhodnoceni-vyskytu-dermatoskopicky-struktur-bazaliomu-s-moznou-predikci-histopatologickeho-typu-106509/download?hl=cs>
- [14] Bazaliom. RÖCKEN, Martin, Martin SCHALLER, Elke SATTLER a Walter BURGDORF. Kapesní atlas dermatologie. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018, s. 216-219. ISBN 978-80-271-0106-1.
- [15] KRUTÍLKOVÁ, Věra. Gorlinův-Goltzův syndrom (syndrom basocelulárního névu): kasuistiky. Linkos.cz [online]. Praha, 2004 [cit. 2021-02-06]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/lekar-a-multidisciplinari-tym/kongresy/po-kongresu/databaze-tuzemskych-onkologickych-konferencnich-abstrakt/gorlinuv-goltzuv-syndrom-syndrom-basocelularniho-nevu-kasuistiky/>
- [16] Spinocelulární karcinom. RÖCKEN, Martin, Martin SCHALLER, Elke SATTLER a Walter BURGDORF. Kapesní atlas dermatologie. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018, s. 222-224. ISBN 978-80-271-0106-1.
- [17] DIVIŠOVÁ, Barbora. Nejčastější maligní epitelové kožní nádory. Onkologie [online]. Solen, s.r.o., 2010, 4(4), 230-232 [cit. 2021-02-08]. ISSN

1803-5345. Dostupné z:

<https://www.onkologiecs.cz/pdfs/xon/2010/04/04.pdf>

- [18] Bazaliom - diferenciální diagnóza. RÖCKEN, Martin, Martin SCHALLER, Elke SATTLER a Walter BURGDORF. Kapesní atlas dermatologie. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018, s. 218. ISBN 978-80-271-0106-1.
- [19] Spinocelulární karcinom - diferenciální diagnóza. RÖCKEN, Martin, Martin SCHALLER, Elke SATTLER a Walter BURGDORF. Kapesní atlas dermatologie. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2018, s. 222. ISBN 978-80-271-0106-1.
- [20] SEKANINOVÁ, Aneta, DiS. Laboratorní příručka oddělení patologické anatomie. Kladno, 2019.
- [21] Linkos: Česká republika a rakovina v číslech [online]. Praha: ČSL JEP, 2020 [cit. 2021-04-29]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/narodni-onkologicky-program/co-musite-vedet/ceska-republika-a-rakovina-v-cislech/>
- [22] KAPLAN-WILLIAMS, Strephon. The difference between Harris and Mayer's hematoxylin. Strephonsays [online]. USA: CLOUDFLARENET - Cloudflare, Inc., 2007 [cit. 2021-05-01]. Dostupné z: <https://cs.strephonsays.com/harris-and-mayers-haematoxylin-15059>
- [23] KALMYKOVA, Antonina a Phillip MCKEE. Skin nonmelanocytic tumor: Basal cell carcinoma. Pathology Outlines [online]. Michigan: PathologyOutlines.com, Inc., 2001 [cit. 2021-04-29]. Dostupné z:

<https://www.pathologyoutlines.com/topic/skintumornonmelanocyticbcc.html>

- [24] SHAOFENG, Yan. Skin nonmelanocytic tumor: Squamous cell carcinoma. Pathology Outlines [online]. Michigan: PathologyOutlines.com, Inc., 2001 [cit. 2021-04-29]. Dostupné z:
<https://www.pathologyoutlines.com/topic/skintumornonmelanocyticbcc.html>
- [25] BRYCHTOVÁ, Svetlana a Alice HLOBILKOVÁ. Histopatologický atlas. 1. vydání. Praha: Grada, 2008. ISBN 978-80-247-1650-3.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Epidermis, převzato a upraveno [8].....	17
Obrázek 2: Tkáňový automat Leica TP 1020 (vlastní foto)	35
Obrázek 3: Zalévací linka Medite TES Valida (vlastní foto).....	36
Obrázek 4: Rotační mikrotom Leica Histocore autocut (vlastní foto)	38
Obrázek 5: Parafínový bloček s kožní excizí (vlastní foto).....	44
Obrázek 6: Hotové histologické preparáty (vlastní foto)	45
Obrázek 7: Histologická stavba kůže, zvětšeno 50x (vlastní foto)	46
Obrázek 8: Pokožka a podkoží, zvětšeno 400x (vlastní foto).....	46
Obrázek 9: kůže, zvětšeno 400x (vlastní foto).....	47
Obrázek 10: Kůže s patologickými změnami, zvětšeno 50x (vlastní foto)	48
Obrázek 11: Bazocelulární ložiska dosahující na spodinu excize, zvětšeno 50x (vlastní foto).....	48
Obrázek 12: Bazocelulární ložiska v dermis, zvětšeno 100x (vlastní foto)	49
Obrázek 13: Nodulární bazocelulární karcinom, zvětšeno 400x (vlastní foto).....	49
Obrázek 14: Imunohistochemický průkaz jader bazálních buněk v epidermis i bazaliomu protilátkou anti-p63, zvětšeno 50x (vlastní foto)	50
Obrázek 15: Imunohistochemický průkaz jader bazálních buněk v epidermis i bazaliomu protilátkou anti-p63, zvětšeno 400x (vlastní foto)	50
Obrázek 16: Imunohistochemický průkaz cytokeratinu v buňkách epidermis i bazaliomu protilátkou anti-CK5/6, zvětšeno 50x (vlastní foto)	51
Obrázek 17: Imunohistochemický průkaz cytokeratinu v buňkách epidermis i bazaliomu protilátkou anti-CK5/6, zvětšeno 400x (vlastní foto).....	51
Obrázek 18: Imunohistochemický průkaz onkoproteinu v bazaliomu pomocí protilátky anti-Bcl-2, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	52
Obrázek 19: Imunohistochemický průkaz onkoproteinu v bazaliomu pomocí protilátky anti-Bcl-2, zvětšeno 400x (vlastní foto).....	52
Obrázek 20: Lokálně rohovějící spinocelulární karcinom, zvětšeno 50x (vlastní foto).....	53

Obrázek 21: Lokálně rohovějící spinocelulární karcinom, zvětšeno 100x (vlastní foto).....	53
Obrázek 22: Imunohistochemický průkaz jader buněk v epidermis i spinaliomu protilátkou anti-p63, zvětšeno 50x (vlastní foto).....	54
Obrázek 23: Imunohistochemický průkaz jader buněk v epidermis i spinaliomu protilátkou anti-p63, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	54
Obrázek 24: Imunohistochemický průkaz cytokeratinu v buňkách epidermis i spinaliomu protilátkou anti-CK5/6, zvětšeno 50x (vlastní foto).....	55
Obrázek 25: Imunohistochemický průkaz cytokeratinu v buňkách epidermis i spinaliomu protilátkou anti-CK5/6, zvětšeno 200x (vlastní foto).....	55
Obrázek 26: Negativní imunohistochemické prokázání antigenu Bcl-2, zvětšeno 50x (vlastní foto)	56
Obrázek 27: Negativní imunohistochemické prokázání antigenu Bcl-2, zvětšeno 400x (vlastní foto)	56

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1: Konfigurace roztoků ve tkáňovém automatu Leica TP 1020..... 44