

**ČESKÉ VYSOKÉ
UČENÍ TECHNICKÉ
V PRAZE**

**FAKULTA
BIOMEDICÍNSKÉHO
INŽENÝRSTVÍ**



**BAKALÁŘSKÁ
PRÁCE**

2018



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Laboratorní morfologické vyšetření tkáně tlustého střeva

Morphological laboratory examination of colon tissue

Bakalářská práce

Studijní program: (B5345) Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: (5345R020) Zdravotní laborant

Vedoucí práce: MUDr. Radek Matlach

Aneta Landecká

Kladno, květen 2018

Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Akademický rok: 2017/2018

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

Student: **Aneta Landecká**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Laboratorní morfologické vyšetření tkáně tlustého střeva**
Téma anglicky: Morphological Laboratory Examination of Colon Tissue

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

Předmětem bakalářské práce bude morfologický popis zdravé tkáně tlustého střeva oproti tkáni s patologickými změnami způsobenými karcinomem tlustého střeva. Dále se v teoretické části bude student zabývat obecnou anatomíí, fyziologií a histologií tlustého střeva. A problematice vzniku a průběhu onemocnění.

Vzhledem k tomu, že onemocnění tlustého střeva jsou v populaci velmi často se vyskytující, má jeho vyšetření velký diagnostický význam.

Praktická část bakalářské práce se bude věnovat zpracování vzorku při odběru a přípravě preparátů, porovnání krájení různé tloušťky řezů materiálem a jeho následné barvení a popis preparátů.

Seznam odborné literatury:

- [1] ČIHÁK, Radomír, Anatomie 2, ed. 3., Grada, 2013, ISBN 978-80-247-4788-0
- [2] JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY, Základy histologie, Jinočany: H & H, 1997, ISBN 80-85787-37-7
- [3] VACEK, Zdeněk, Histologie a histologická technika, Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1996, ISBN 80-7013-201-9

Zadání platné do: 13.09.2019
Vedoucí: MUDr. Radek Matlach
Konzultant: Vedoucí laborantka Viera Šefčovičová

.....
vedoucí katedry / pracoviště

.....
děkan

V Kladně dne 25.10.2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Laboratorní morfologické vyšetření tkáně tlustého střeva 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).

V Kladně dne 10.05.2018

.....
podpis

Poděkování

Děkuji Patologicko - anatomickému oddělení Oblastní nemocnice Kladno a.s. za poskytnutí prostor a materiálu ke zpracování praktické části této práce. Dále vrchní laborantce Vieře Šefčovičové za její rady při zhotovování preparátů a MUDr. Lucii Bartoňové za pomoc při mikroskopickém pozorování preparátů. Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu práce MUDr. Matlachovi za jeho kritické ale věcné rady a připomínky.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se věnuje tématu kolorektálního karcinomu, který je velice častým onemocněním v populaci v České republice.

Teoretická část se věnuje anatomii, histologii a fyziologii tlustého střeva. Dále seznamuje čtenáře se vznikem kolorektálního karcinomu, prekanceróz a popisu základního preventivního vyšetření.

V následující části práce hovoříme o metodice postupu zhotovení mikroskopických preparátů. A to od excidování reprezentativních vzorků až po konečné barvicí techniky a mikroskopii.

V praktické části nalezneme srovnání zhotovených preparátů ze zdravé tkáně tlustého střeva a z tkáně tlustého střeva, která je postižena adenokarcinomem. Struktury tkáně jsou zviditelněny různými barvicími technikami a v různé tloušťce řezů. A následně fotograficky zdokumentovány s popisem viditelných struktur.

Klíčová slova

histologie, kolorektální karcinom, morfologie, zhoubné nádorové bujení, tlusté střevo

Abstract

This thesis is dedicated to the topic of colorectal cancer, which is a very common disease in the population in the Czech Republic.

The theoretical part is dedicated to the anatomy, histology and physiology of the colon. Also acquaints the reader with the emergence of colorectal cancer, precancerous lesions and a description of the basic preventive examinations.

In the following part of the work we are talking about the methodology of the procedure making microscopic preparations. From the excitation of representative samples up to the final coloring techniques and microscopy.

In the practical part we can find the comparison made preparations from the healthy tissue of the colon and the tissues of the colon that is affected by adenocarcinoma. The structures of tissue are visualised in different colouring techniques and in various thickness of the slices. And then photographically documented with descriptions visible structures.

Keywords

cancer, colon, colorectal carcinoma, histology, morphology

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav	10
2.1	Tkáň	10
2.2	Obecná stavba stěny tlustého střeva	11
2.3	Anatomie tlustého střeva.....	12
2.4	Histologie tlustého střeva.....	16
2.5	Fyziologie tlustého střeva	19
2.6	Nádory.....	20
2.6.1	Metastazování.....	25
2.7	Kolorektální karcinom	26
2.7.1	Maligní zvrát adenomu	27
2.7.2	Familiární formy kolorektálního karcinomu.....	28
2.8	Screening.....	29
3	Cíl práce	32
4	Metodika	33
4.1	Odběr materiálu.....	33
4.2	Fixace.....	34
4.3	Odvodnění a prosycení parafinem.....	34
4.4	Zalévání parafinových bločků a krájení tenkých řezů	35
4.5	Barvení histologických preparátů.....	37
4.5.1	Hematoxylin – eosin - HE.....	37
4.5.2	Kombinovaná metoda alcianové modři a PAS (průkaz kyselých a neutrálních mukopolysacharidů) - Kombi	39
4.5.3	Modrý Massonův trichrom (kombinace barvení Weigertovým hematoxylinem, kyselým fuchsinem a anilínovou modří) - MM.....	40
4.6	Montování preparátů.....	41
5	Výsledky	42
5.1	Preparáty normální tkáně tlustého střeva.....	42
5.2	Preparáty tkáně tlustého střeva s adenokarcinomem	50
6	Diskuze	59
7	Závěr	62
8	Seznam použitých zkratk.....	63
9	Seznam použité literatury.....	65
10	Seznam použitých obrázků.....	67
11	Seznam použitých tabulek	67

1 ÚVOD

Kolorektální karcinom patří mezi nejčastější maligní onemocnění v zemích Evropské unie a Česká republika zaujímá přední příčky ve statistikách incidence a mortality tohoto onemocnění. „*V České republice na zhoubné diagnózy (C00 – C97) umírá přibližně čtvrtina populace (27% mužů a 23% žen v roce 2013). Ročně je odhaleno 41 000 nových nádorů u mužů a 36 000 u žen. Z tohoto počtu připadá 11% na kolorektální karcinom (diagnózy C18 – C21)*“ [1]. Roční incidence v Evropě přesahuje 400 000 nových případů a zhruba 200 000 osob na onemocnění zemře [2].

Nádory tlustého střeva a konečníku patří mezi nejlépe preventabilní díky cíleným preventivním vyšetřením v populaci. Screeningový program je určený pro asymptomatické osoby s průměrným rizikem nad 50 let věku. Do 35. roku věku se kolorektální karcinom vyskytuje vzácně. Nejvyšší počty nádorů jsou pak ve věkové skupině 65-79 let. Nejčastěji je novotvar lokalizován distálně od lineární flexury [1]. Většinu nádorů tlustého střeva tvoří adenokarcinomy.

Tlusté střevo je nedílnou a nenahraditelnou součástí lidského trávicího traktu. Probíhá v něm zahušťování tráveniny a vyměšování, vstřebávání vitamínů, minerálů a především vody. Neméně důležitou složkou jsou symbiotické bakterie tzv. střevní mikroflóra ve střevním obsahu.

Morfologické změny způsobené nádorovým onemocněním je možné pozorovat skrze vzorky tkáně pomocí barvicích metod a mikroskopie a na základě těchto vyšetření indikovat pacientovi vhodnou léčbu. Nádorové onemocnění je důležité zachytit, co nejdříve. K tomu dopomáhají preventivní screeningová vyšetření pro skupiny obyvatel nad 50 let věku. A další kolonoskopická vyšetření. Pozorování těchto morfologických změn pomocí zhotovených mikroskopických preparátů a jejich porovnání se zdravou tkání je předmětem praktické části práce. Teoretická část má seznámit čtenáře s histologií, anatomií a fyziologií tlustého střeva. A s informacemi o vzniku nádorového onemocnění.

2 SOUČASNÝ STAV

2.1 Tkáň

Tkáň je soubor stejnotvarých buněk stejného původu a jejich derivátů, které slouží jedné hlavní funkci. Základní rozdělení tkání je na epitely, pojiva, svalovou tkáň a nervovou tkáň. Jednotlivé tkáně tvoří orgány, které společně vytváří orgánovou soustavu [3]. Tkáně tvoří základní složku lidského těla a diferencují se ze zárodečných listů v průběhu embryonálního vývoje [4].

Epitelová tkáň je pevně složená z pevně spojených a těsně k sobě přilehlých buněk. Většinou kryje volné povrchy nebo vystýlá dutiny v organismu. Buňky epitelu nasedají na tenkou bazální membránu. Bazální membránu tvoří dvě vrstvy: lamina basalis, která je semipermeabilní a vrstva retikulárních vláken s glykoproteiny. Epitely můžeme dělit podle tvaru (jednovrstevný plochý, jednovrstevný krychlový, jednovrstevný cylindrický, víceřadý cylindrický, trámčitý, retikulární, mnohovrstevný dlaždicový, vícevrstevný cylindrický, přechodný). Podle funkce na krycí (kůže), řasinkový, žláznový, resorpční (střevo), respirační, svalový, smyslový [3]. Epitelová tkáň vznikla ze všech zárodečných listů [5].

Pojivová tkáň se skládá z buněk a mezibuněčné hmoty. Je mezenchymového původu [5]. Mezenchym se derivuje z mezodermy a vyplňuje štěrbiny mezi zárodečnými listy [4]. Mezibuněčná hmota je složena z amorfni hmoty a vláknité složky. Pojivovou tkáň dělíme dále na vazivo, které je složeno z fixních buněk a bloudivých buněk. Mezibuněčná hmota vaziva obsahuje amorfni i vláknitou složku. Chrupavka, jako další pojivová tkáň je pevná a tuhá. Buňky – chondrocyty jsou uloženy v mezibuněčné hmotě. Na povrchu chrupavek je vazivová vrstva perichondria. Druhy chrupavek jsou elastická, hyalinní, vazivová a buněčná. Nejtvrďší pojivová tkáň je kost, která je specializovaná pro podpůrnou a ochrannou funkci. Mezibuněčná hmota kosti obsahuje minerální složku [3].

Svalová tkáň je specializovaná na pohyb. Skládá se z dlouhých smrštení schopných elementů. Svalovou tkáň dělíme na hladkou a příčně pruhovanou. Hladké svalstvo zachovává i v klidu určitý tonus a je ovládáno autonomními nervy. Hladká svalovina má mezenchymový původ [5]. Příčně pruhovaná svalovina je složena ze svalových vláken. Zvláštním případem je svalstvo příčně pruhované srdeční [3]. Svalovina srdeční a příčně pruhovaná kosterní vznikla z mezodermy [5].

Nervová tkáň tvoří CNS a periferní nervy. Její původ je ektodermový [5]. Je specializována svou dráždivostí a schopností přenášet vzruchy. Funkční jednotkou je nervová buňka - neuron, kterou vyživují a podporují neuroglie. Nervová tkáň přijímá podněty z vnějšího i vnitřního prostředí pomocí receptorů. Vzruch putuje po nervovém vlákne k výkonným orgánům – efektorům [3].

2.2 Obecná stavba stěny tlustého střeva

Stěna trávicí trubice má čtyři vrstvy charakteristické stavby. Z vnitřní strany to je sliznice, podslizniční vazivo, svalovina a povrchová vnější vrstva (tunica adventitia, v dutině pobřišnicové nahrazená lesklou pobřišnicovou výstelkou – tunica serosa) [6].

Sliznice – tunica mucosa vystýlá celou trávicí trubicí jako měkká, růžová až červená vrstva, jež může vytvářet řasy – plicae, nebo menší papily, v tenkém střevě klky. Je obvykle pokrytá hlenem – mucus. Na povrchu sliznice je epitel, pod nímž se nachází slizniční vazivo – lamina propria mucosae [6]. Toto slizniční vazivo je složeno z řídkého kolagenního vaziva s občasnými svalovými buňkami [7]. Na rozhraní lamina propria mucosae a další vrstvy, tj. podslizničního vaziva, je v některých úsecích vytvořena vrstvička hladké svaloviny – lamina muscularis mucosae. Lamina propria a lamina muscularis mucosae zajišťují pohyblivost sliznice vůči dalším vrstvám [6]. Lamina muscularis mucosae je tvořena hladkými svalovými buňkami ve dvou vrstvách [7].

V lamina propria je na mnoha místech tzv. lymfatická tkáň, která je tvořena prostornou sítí retikulárního vaziva (buněk a vláken), v jejichž okách jsou nahromaděny lymfocyty. Tato tkáň patří do systému obrany organismu [6].

Slizniční vazivo obsahuje lymfatické uzlíky – folliculi lymphatici solitari. Nahromadění lymfatické tkáně nacházíme především v apendixu. Lamina muscularis mucosae je v tlustém střevu dobře vytvořena a obsahuje cirkulární i podélné snopce [6].

Podslizniční vazivo – tela (tunica) submucosa bývá poněkud řidší vrstva kolagenního vaziva s bohatými sítěmi cév krevních i mízních, které odtud pronikají do jemnějších sítí slizničního vaziva. Je zde též nervová pletěň – plexus submucosus (Meissneri). Zasahují do něho shluky lymfocytů ze sliznice [6].

Svalová vrstva – tunica muscularis je na začátku trávicí trubice (dutina ústní, hltan, část jícnu) z příčně pruhované svaloviny, dále pak ze svaloviny hladké. Na samém konci při análním otvoru opět přistupuje příčně pruhovaná svalovina. Svalovina je většinou rozdělena na dvě vrstvy: vnitřní, napříč cirkulárně obtáčeující a zevní podélnou

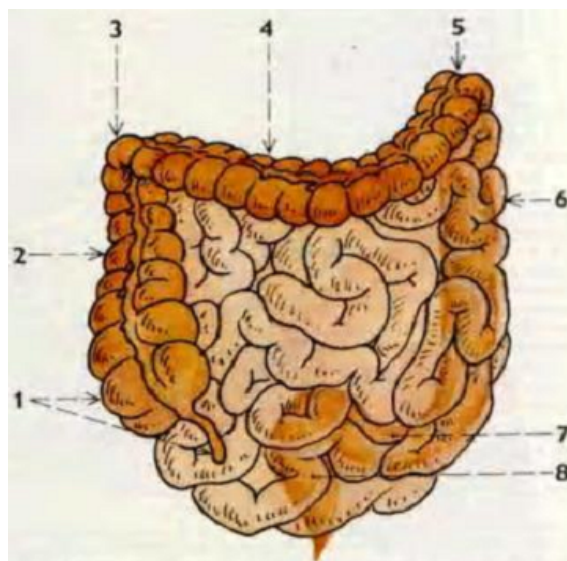
longitudinální vrstvu. V tenké vrstvě mezi cirkulární a podélnou svalovinou je typická nervová pletěň, plexus myentericus (Auerbachi), jejíž složky ovlivňují hybnost střeva [6].

Povrchová vnější vrstva je v oddílech trávicí trubice uložených mimo pobřišnicovou dutinu tvořena vazivem – tunica adventitia. V pobřišnicové dutině je na místě adventitia pokryv coelomového plochého jednovrstevného epitelu (mesothelu), označovaný jako tunica serosa, přičemž vazivo mezi svalovinou a mesothelem se označuje jako subserosní vazivo – tela subserosa [6].

2.3 Anatomie tlustého střeva

Tlusté střevo je poslední část trávicí trubice, která přijímá z tenkého střeva kašovitý až tekutý obsah (chymus), z něhož byly v tenkém střevě vstřebány živiny. V tlustém střevu je z tohoto obsahu postupně vstřebávána voda a elektrolyty, a obsah je formován ve stolici. Na dekompozici střevního obsahu se účastní kvasné s hnilobné procesy, působené mikroorganismy. Mikroorganismy jsou stálou součástí střevního obsahu [6].

Tlusté střevo je úsek dlouhý 1,3 - 1,7 m, široký od 4 cm do cca 7,5 cm, ve kterém za sebou následují (obr. 1): slepé střevo – intestinum caecum je nejširší část, uložená v pravé jámě kyčelní, s ileocaekálním vyústěním na levém boku slepého střeva; appendix vermiformis – červovitý výběžek, slepě zakončená součást slepého střeva připojená na dolní konec caeka; tračník – colon, který se dále dělí na tračník vzestupný – colon ascendens, tračník příčný – colon transversum, tračník sestupný – colon descendens,



Obrázek 1: Tlusté střevo a jeho poloha vůči kličkám jejunoileu (schéma) [6]

1 – caecum s apendixem, 2 – colon ascendens, 3 – flexura coli dextra, 4 – colon transversum, 5 – flexura coli sinistra, 6 – colon descendens, 7 – colon sigmoideum, 8 - rectum

esovitá klička – colon sigmoideum úsek esovitě zakřivený, tračník je ukončen konečníkem – rectum, poslední úsek tlustého střeva uložen v malé pánvi, který vyúsťuje navenek otvorem anu [6]. Celý tračník obestupují kličky tenkého střeva [8].

Mezi úseky tračníku jsou typická ohbí. Pravé ohbí – flexura hepatica se nachází pod játry, mezi vzestupným a příčným tračníkem. Levé ohbí – flexura coli sinistra je pod slezinou, mezi příčným tračníkem a sestupným tračníkem, uložené výše než ohbí pravé [6].

Tlusté střevo je charakteristické svým větším průsvitem, naředlou tmavší barvou, utvářením povrchu a charakterem sliznice. Taenie coli jsou tři bělavé podélné pruhy široké 8 – 10 mm na povrchu tlustého střeva, jsou to zhuštění podélné svaloviny jdoucí souvisle podél celého střeva. Označují se podle polohy na příčném tračníku jako: taenia mesocolica – vzadu, v místě, kde je střevo připojeno na pobřišnicový závěs, taenia omentalis – vpředu nahoře, v místě, kde colon přechází a s ním srůstá velká předstěra – omentum majus, taenia libera – vpředu dole, volně přístupná. Všechny tři taenie se sbíhají na apendixu a tvoří souvislou podélnou vrstvu svaloviny. Na přechodu esovité kličky a konečníku se taenie naopak rozšiřují v souvislý plášť podélné svaloviny konečníku. Tah taenií nakrčí střevo, takže vznikají zevně vyklenutá místa – haustra, a mezi nimi patrné poloměsíčitě řasy – plicae semilunares. Vlivem tahu taenií se stále mění místo i velikost jednotlivých hauster a jejich okamžitý vzhled se označuje jako haustrace [6].

Appendices epiploicae – jsou výběžky serosního (pobřišnicového) povlaku tlustého střeva. Jsou často delší a stopkaté, vyplněné tukovým vazivem, a vyskytují se hlavně v blízkosti taenií. Vytvářejí se již ve fetálním období, kdy však neobsahují tuk [6].

Slepé střevo (caecum) je první část tlustého střeva a vytváří vak v pravé jámě kyčelní, kaudálně od ileocaekálního vústění. Ileum ústí z mediální strany. Slepé střevo je 6-8 cm dlouhé s průměrem 6-7,5 cm. Slepé střevo není svým slepým koncem dozadu přirostlé ani nemá typický peritoneální závěs střeva. Mimo tento úsek je slepé střevo přirostlé k nástěnnému peritoneu jen malou částí svého obvodu. Valva ileocaecalis je vústění ilea do slepého střeva, na slizniční straně upravené jako chlopeň s vlastním příčným ústím, které je lemované vystouplou řasou – labium superius et labium inferius. Chlopeň dovoluje průtok pouze jedním směrem a brání tak refluxu obsahu zpět do ilea [6].

Na slepé střevo navazuje červovitý výběžek – appendix vermiformis, který je slepě zakončen, dlouhý 5-10 cm o průměru tužky. Ústí apendixu do slepého střeva – ostium appendicis vermiformis je kruhové s nekonstantní slizniční řasou. Appendix se

může nacházet v různých polohách vůči slepému střevu [6]. Stálou polohu zaujímá pouze začátek apendixu [8].

Sliznice a podslizniční vazivo apendixu jsou prostoupeny lymfatickou tkání se zárodečnými centry. V Lieberkühnových kryptách se vyskytují Panethovy buňky [6].

Svalovina má typický souvislý plášť podélných snopců, odkud se na slepé střevo rozbíhají tři taenie. Na některých místech apendixu se může svalovina přerušovat a submucosa se přímo stýká se subserosním vazivem. Serosa povléká celý apendix [6].

Vzestupný tračník (colon ascendens) pokračuje z caeca a po pravé straně břišní dutiny míří kraniálně pod játra. Je dlouhý 12-16 cm a užší než caecum. Následuje pravé (jaterní) ohbí – flexura coli dextra, které naléhá na játra a pravou ledvinu. Protože je část střeva poměrně krátká, zadní část srůstá se zadní stěnou břišní a chybí zde mesocolon, v místě srůstu mizí i nástěnné peritoneum. Na přední straně může být flexura dextra coli spojena druhotnými řasami peritonea s játry a žlučníkem [6].

Příčný tračník (colon transversum) je dlouhý 50-60 cm, visí kaudálně prohnutý v girlandu různého tvaru. Kraniálně se stýká s játry a žlučníkem, kaudálně se žaludkem a zčásti dorsálně s kličkami tenkého střeva, duodenem a pankreatem. Místem přechodu příčného a sestupného tračníku je levé (slezinné) ohbí – flexura coli sinistra. Ohbí je uloženo pod slezinou, výše než pravé ohbí, naléhá na dolní polovinu ledviny. Na zadní stěnu břišní je tračník připojen pomocí závěsu – mesocolon transversum [6].

Tračník sestupný (colon descendens) je užší než tračník příčný (cca 4 cm) a postupně se zužuje. Sestupuje kaudálně při levém okraji břišní dutiny v délce 22-30 cm do levé jámy kyčelní, kde plynule přechází v colon sigmoideum. Nemá mesocolon, a je širokým pruhem srostlý se zadní stěnou tělní, peritoneum přechází na bocích colon descendens v serosní povlak colon, a ve srůstu za colon descendens nástěnné peritoneum není [6].

Kaudálně od colon descendens plynule přechází esovitá klička (colon sigmoideum), pak zahýbá vzhůru a mediálně přes okraj malé pánve. Druhým ohbím zatáčí klička kaudálně a přechází pak v rectum před křížovou kostí, v úrovni hranice obratlů S₁ a S₂. Délka esovité kličky je 30-40 cm, je to nejužší oddíl tlustého střeva s průměrem cca 3,7 cm. Mesocolon je dobře vytvořený závěs [6].

Konečník (rectum) je poslední úsek střeva, uložený v malé pánvi, dlouhý 12-16 cm, široký 4 cm. Naplněné rectum je trojitě bočně zakřivené, a dvojitě esovitě zakřivené předozadně. Předozadní zakřivení je dvojitě: flexura sacralis jde v kraniálních třech čtvrtinách až čtyřech pětinach délky rekta rovnoběžně se zakřivením křížové kosti a

kostrče; flexura perinealis na začátku poslední pětiny až čtvrtiny délky ohýbá rectum při hrotu kostrče a pod ním dozadu k análnímu otvoru. Rectum má dvě hlavní části: ampulla recti – kraniální část délky 10-12 cm a canalis analis – délky 2,5-3,8 cm se liší podélnou orientací slizničních řas [6].

Sliznice recta má barvu a vzhled jako v colon. V ampulla recti jsou příčné poloměsíčné řasy vystávající uprostřed délky ampulla recti od bočních stěn (obvykle tři). Kohlrauschova řasa (prostřední řasa) začíná od pravé stěny, ve výši 6,5 – 7 cm od řitního otvoru, v tomto místě je typická vkleslina podmiňující zakřivení recta. V canalis analis je sliznice bledší, prosvítají skrze ni žíly a nese podélné řasy – columnae anales, rozložené v počtu 6 - 10 po celém obvodu kanálu [6].

Zona haemorrhoidalis je pás sliznice ve výši columnae et sinus anales, podložený cévní pletení – plexus venosus rectalis a zesílenou cirkulární hladkou svalovinou, která vytváří vnitřní svěrač řitní. Za normálních okolností se tato zóna málo uplatňuje, vystupuje však za patologických okolností při přeplnění žil což přispívá k těsnosti uzávěru análního otvoru [6].

Epitel sliznice rekta je v ampule cylindrický jednovrstevný se schopností vstřebávat. Lieberkühnovy krypty jsou četné s množstvím pohárkových buněk. Slizniční žlázy – glandulae anales se nachází v místě sinus anales, skládají se z šesti tubulů, které se mohou větvit a zasahovat hluboko do stěny vnitřního svěrače. Tyto žlázy ústí do análních krypt a secernují hlen. V průběhu análního kanálu se postupně mění epitel sliznice na vícevrstevný s polygonálními hlubšími buňkami, mizí Lieberkühnovy krypty a cylindrický epitel zřetelnou hranicí přechází v epitel mnohvrstevný dlaždicový. Pecten analis je 15 mm široký světlejší pás sliznice s typickým mnohvrstevným dlaždicovým epitelem. Na tento pás navazuje začátek rohovějícího kožního epitelu řitního otvoru. Podslizniční vazivo je vysoké a řídké [6].

Svalovina rekta je charakteristická tím, že zevní podélná vrstva je souvislá jako plášť rekta, do něhož se rozšířily a zesílily všechny tři taenie. Cirkulární vrstva hladké svaloviny je zesílena v horních třech čtvrtinách análního kanálu, kde vytváří vnitřní svěrač řitní. Ke svalovině se pod diaphragma pelvis přikládá svěrač z příčné svaloviny [6].

Peritoneum obaluje rektum na přechodu z esovité kličky zcela, někdy vytváří i krátké mesorectum, postupně se rektum zanořuje pod peritoneum malé pánve. Od tohoto zanoření je povrch rekta pokryt vazivovou adventicií – fascia recti, která pokračuje ze subserosního vaziva zevně přechází v řídkší vazivo zvané paraproctium [6].

Řitním otvorem, je ukončen anální kanál na zevní straně, kde je lemován kůží, která je více pigmentovaná, činností svěřacích svalů stažená a složená v několik radiálních řas, které se vyrovnávají v průběhu defekace při průchodu obsahu rekta. Crena ani je vkleslina v místě řitního otvoru, převýšená a zakrytá okraji hýždí, vyvýšeným gluteálním svalstvem a tukovou vrstvou. V mediální rovině se spojuje stěna análního otvoru s kostrčí tuhou vazivovou destičkou – ligamentum anococcygeum. Na toto ligamentum se upínají složky svalstva dna pánevního a zevního řitního svěrače [6].

Mechanismus análního uzávěru je působen jednak svěrači a jednak svalovinou dna pánevního. M. sphincter ani internus je zesílená hladká cirkulární svalovina análního kanálu ve formě prstence vysokého asi 2-2,5 cm. M. sphincter ani externus je svěrač z příčné svaloviny, zvenčí obemykající vnitřní svěrač ze svaloviny hladké. Skládá se ze tří částí: pars profunda – hluboká složka svalu uložená nejkraniálněji. Mediální svalová vlákna jsou cirkulární, laterální vlákna tvoří dopředu otevřenou vidlici. Spolu s m. puborectalis tvoří funkční složky označovanou jako m. compressor recti; pars superficialis – má vlákna uspořádaná především kruhově, zakotvená na tuhé vazivo před stěnou rekta. Svým smrštěním zužuje anální kanál; pars subcutanea – je podkožní prstenec svalových vláken, fixovaný pruhy vaziva a hladké svaloviny ke kůži okolo análního otvoru, kterou svým smrštěním vtahuje a zřasuje, je funkční složkou tzv. m. corrugator ani [6].

2.4 Histologie tlustého střeva

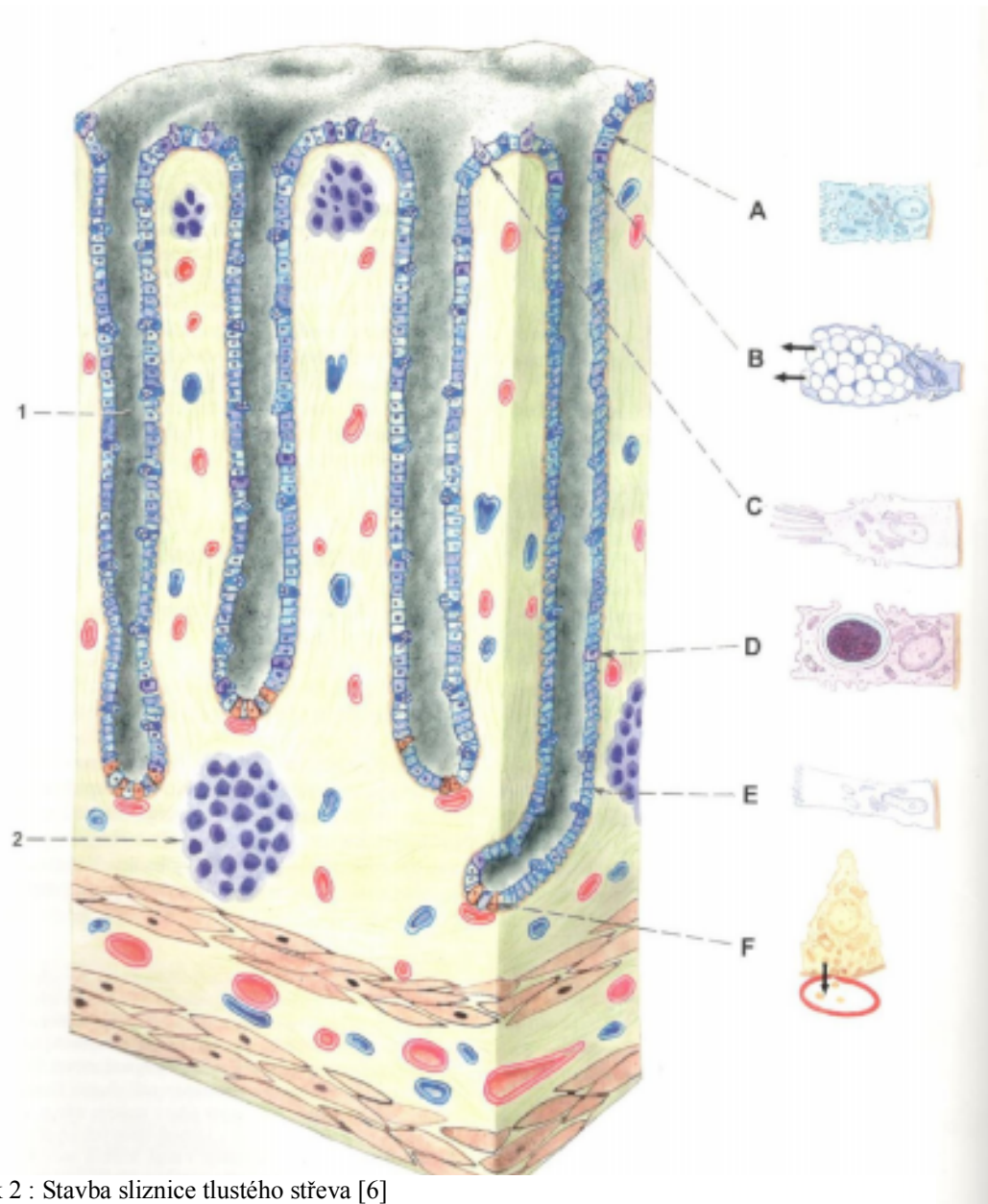
Sliznice je v celém tlustém střevě jednotná, výjimku tvoří jen anální kanál. Na povrchu jsou četné krypty. Krypty jsou hlubší a hustě rozmístěné. V lamina propria se vyskytují četné buňky imunitního systému a solitární lymfatické folikuly [9]. Na sliznici se nenachází žádné klky a je kryta jednovrstevným cylindrickým epitelem [6]. Krypty jsou dlouhé s velkým množstvím pohárkových buněk a malým počtem enteroendokrinních buněk [10].

Ve sliznici se nachází enterocyty, které mají nízké a řídké mikroklky. Při jejich luminálním povrchu se v nich vyskytují granula. Tyto granula jsou hlenová nebo s obsahem protilátky typu IgA. M-buňky (membránové buňky) jsou nahromaděny v blízkosti lymfatických uzlíků, nejvíce se vyskytují v oblasti apendixu. Chomáčkové buňky jsou roztroušené mezi enterocyty a jejich chomáčky, které jsou vyšší, než enterocyty vystupují nad povrch [6]. Nalezneme zde i velké množství pohárkových buněk a buněk endokrinních. Pohárkové buňky tvoří mucin, který tak vytváří hlenový povlak na ochranu epitelové vrstvy střeva. Sliznice je kryta jednovrstevným cylindrickým epitelem,

který je tvořen vysokými buňkami s krátkými mikrokly (kolonocyty). Kolonocyty převážně vstřebávají vodu, ale mají schopnost vodu i vylučovat. V kryptách se nachází kmenové buňky. Mitóza jejich dceřiných buněk probíhá v dolní polovině krypt [9].

„Epitelové buňky tlustého střeva jsou nahrazeny asi za 6 dní proliferací a diferenciací v dolní třetině krypt“ [10].

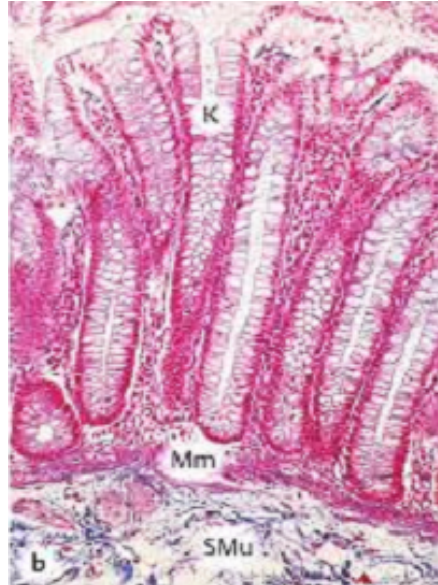
Svalovina tračníku je tvořena vrstvou stejnoměrně silných cirkulárních vláken a vrstvou s podélnými vlákny, která tvoří makroskopicky patrné taenie [9].



Obrázek 2 : Stavba sliznice tlustého střeva [6]

1 – Lieberkühnova krypta; 2 – lymfatický uzlík; A – enterocyt; B – pohárková buňka; C – chomáčková buňka; D – M-buňka; E – nediferencovaná kmenová buňka; F – endokrinní buňka

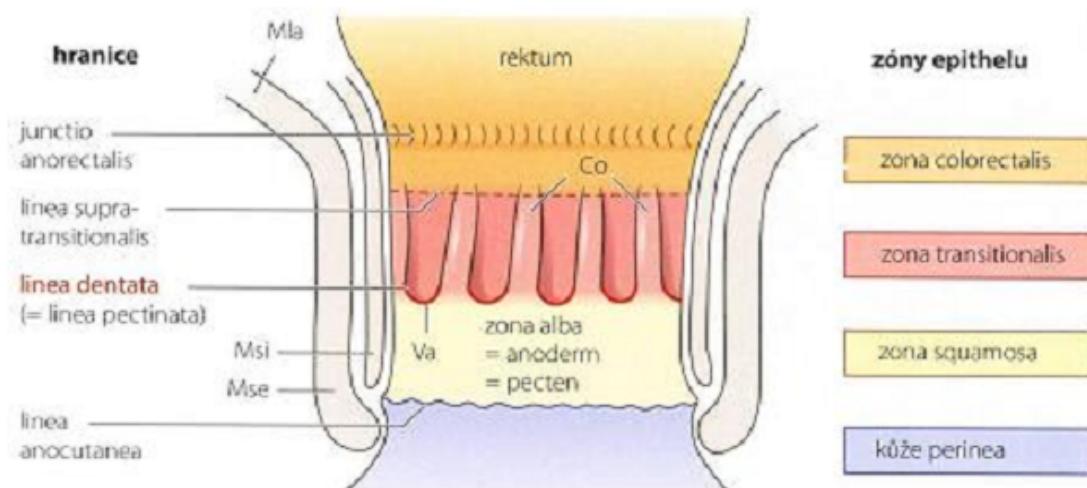
Ve stěně apendixu jsou četné lymfatické folikuly. Tyto folikuly vznikají v lamina propria, ale často jsou objemné a vnikají až do submukosy. Svalová vrstva je často nerozeznatelná. Nad lymfatickými uzlinami se epitel vyklenuje a mizí z něj typické krypty, nachází se zde M-buňky [9].



Obrázek 3: Sliznice tračníku s kryptami (K) [9]

Mm – lamina muscularis mucosae; SMu - submukosa

Oblasti análního kanálu můžeme rozlišit na základě epitelu (obr. 4). Anální kanál začíná v juctio anorectalis. Důležitou hranicí je linea dentata, kterou tvoří valvulae anales. Za nimi se nachází kapsevité útvary (sinus anales), kam ústí vývody slizničních análních žláz. Zona colorectalis je typická kolorektální sliznice s kryptami. Zona transitionalis nad linea dentata je mozaika mnohvrstevného epitelu a jednovrstevného cylindrického epitelu společně s kolorektální sliznicí s kryptami. Tvoří přechodní zónu. Zona squamosa je pod linea dentata a je jednoduše pokryta mnohvrstevným nerohovějícím dlaždicovým epitelem, který je pevně spojený vazivem s vnitřním svěračem. Tato oblast má mimořádně četnou sensitivní inervaci. Poslední úsek tvoří perianální kůže. Silně pigmentovaná epidermis s ekrinními a apokrinními žlázami, více zevně s vlasovými folikuly [9].



Obrázek 4: Oblasti epitelu análního kanálu [9]

Co – linea dentata, Va – valvulae anales, Msi – vnitřní svěrač, Mse – vnější svěrač

2.5 Fyziologie tlustého střeva

„Gastrointestinální trakt (GIT) zabezpečuje fyzikální (mechanickou) a chemickou přípravu potravy ke vstřebání“ [11]. Funkce tlustého střeva je rezervoárová (skladování stolice do doby vyprázdnění) a regulace objemu a elektrolytového složení obsahu. K hlavní úkolům GIT patří mechanická a chemická úprava potravy (trávení), selektivní přenos látek skrze stěnu GIT (vstřebávání), ochrana sebe sama i vnitřního prostředí těla díky slizniční bariéře. Základním předpokladem této ochrany je neporušená sliznice. Gastrointestinální trakt tvoří největší plochu, kde je organismus vystaven látkám ze zevního prostředí. Téměř 25% lymfatické tkáně se nachází ve střevech, v podobě Peyerových plaků, lymfocytů, mízních uzlin a plazmatických buněk [11]. Lymfatická tkáň střeva se souhrnně nazývá GALT (gut-associated lymphoid tissue). Pro činnost GALT je důležitá přítomnost M-buněk na povrchu sliznice. Jejich úkolem je transport makromolekul k imunokompetentním buňkám lymfatické tkáně. Imunitní systém GIT zastává i funkci imunitní tolerance k jednotlivým složkám potravy a přirozeným symbiotickým bakteriím. Ve střevech se nachází i složky nespecifické imunity jako jsou fagocyty, přítomnost lysozomů ve slinách a produkce hlenu [12].

Symbiotické bakterie tlustého střeva jsou převážně anaerobní a můžeme je rozdělit do dvou skupin na kvasné a hnilobné. Činností některých kmenů vznikají vitamíny (B₁, B₂, B₁₂, K). Kvasné bakterie zpracovávají vlákninu za vzniku plynů (CO₂, H₂, metan) a mastných kyselin (kys. octová, propionová, máselná). Hnilobné bakterie produkují toxické látky (amoniak, indol, merkaptany, skatol), které resorbují do krve a u zdravého jedince jsou vychytávány a detoxikovány pomocí hepatocytů [12].

Hybnost (motilita) je řízena skrze nervové plexy ve stěně střeva, které interagují s vnitřně sekretorickými buňkami GIT a je ovlivněna i autonomním nervovým systémem. Motilitu zvyšuje parasimpatikus, opačný účinek má sympatikus. Hlavním míchacím pohybem tlustého střeva je haustrace. Haustra vznikají jako dočasné výdutě pomocí vlivu taení a cirkulární svaloviny. Tvorbou nových a relaxací hauster se střevní obsah posunuje dál [11].

Tlusté střevo denně přijme asi 1,5 l tekutého obsahu. Tento obsah je koncentrován a pomocí symbiotických mikroorganismů přeměněn na stolici s obsahem vody pouze 60-120 ml. 10-20% stolice tvoří anorganické látky, 30% mrtvé bakterie, 10-20% tuky z bakterií a oloupané epitelie a 2-3% bílkoviny [11].

2.6 Nádory

Nádor lze definovat jako de novo vytvořenou tkáň, jejíž růst přesahuje anatomické a funkční potřeby tkáně normální a pokračuje i poté, co příčiny vyvolávající nádorové bujení přestaly působit. Nádorová tkáň postrádá diferencované mikroskopické i makroskopické uspořádání tkáně normální a nepodílí se na fyziologické funkci buněk [13]. Nádorový růst není v koordinaci s růstem okolní tkáně a rovnovážným stavem organismu [14].

Nádor je nezvratná změna tkáně ve smyslu jejího místně neregulovaného růstu o autonomní povaze. Nevratnost je míněna tak, že nádor se již nemůže přeměnit v normální tkáň. Autonomita znamená, že nádor roste bez ohledu na nositele. A až na výjimky vychází nádorové bujení z buněk vlastního těla [15].

Každý nádor má dvě základní složky: nádorový parenchym a stroma nádoru. Stroma je tvořeno většinou z normální mezenchymové tkáně a obsahuje cévní komponenty. Často obsahuje lymfocytární a makrofagickou složku. Jeho funkce je především výživa parenchymu a tvorba kostry pro parenchymální buňky. Dále má transportní funkci pro humorální mezibuněčné signály a podílí se na proliferaci parenchymu. Základem pro růst stromatu a následného parenchymu je angiogeneze, na které se podílí endotelové mitogeny TAF a VEGF. Stromální cévy jsou vstupem do oběhu pro lymfatické i hematogenní metastazování. Neovaskularizace zajišťuje nutriční a kyslíkové zásobení nádorové tkáně a nově vytvořené endotelie secernují růstově aktivní polypeptidy (PDGF, GM-CSF) a tím pomáhají stimulaci růstu okolní nádorové tkáně [14]. Nádor je schopen produkovat angiogenní faktory jako odpověď buněk na tkáňovou hypoxii [16].

Parenchym je vlastní, trvale genotypově transformovaná složka nádoru. Vzhledem k parenchymu můžeme rozlišit několik typů nádorů. Nádory homologní mají parenchym podobný normální tkáni v místě vzniku a obsahují jednotlivé, převážně zralé buňky. Nádory heterogenní jsou odlišné od tkáně v místě vzniku. Parenchym připomínající embryonální tkáň označujeme jako nádorovou anaplazii [14].

V nádorové tkáni můžeme pozorovat morfologické odlišnosti v samotném nádoru, označené jako nádorová atypie. Atypie rozdělujeme na tkáňové a buněčné. Tkáňová atypie se vyznačuje ztrátou pravidelného vrstevnatého nebo žlázoového uspořádání a ztrátou koheze mezi buňkami. Často je dobře patrná v epiteliálních nádorech. Buněčnou atypie můžeme pozorovat v jádru buněk i v cytoplazmě [14].

Podle povahy růstu rozdělujeme nádory na benigní a maligní. Benigní nádory jsou tvořeny diferencovanými buňkami. Diferenciace buněk je uniformně sfázovaná, což znamená, že se u benigních nádorů nevyskytují buňky nediferencované nebo několik stádií různě diferencovaných buněk současně. Strukturně tkáň benigních nádorů vždy vybočuje z normálu a není schopná napodobit mikroanatomické uspořádání normální tkáně. Charakteristická je také nízká nebo nulová mitotická aktivita [13]. Mají většinou organoidní stavbu a jsou homologické [14]. Růst benigních nádorů je obvykle pomalý po dobu měsíců až let. Avšak i zhoubné nádory nemusí vždy růst v rychlejším tempu, stejně tak za určitých okolností mohou benigní nádory vyrůstat velmi rychle. Nádory rostou expanzivně a bývají dobře ohraničené. Hranici může tvořit kontaktní zóna nádorové a nenádorové tkáně nebo vazivové pouzdro. Pouzdro je většinou tvořeno z vazivové tkáně vzniklé z okolní tkáně v sousedství nádoru. Benigní nádory zpravidla do okolní tkáně neprorůstají a jinak ji neničí, pouze na ní působí tlakovou atrofii [13].

Maligní nádory jsou charakteristické širokým spektrem diferenciace buněk. Vyskytují se zde buňky zcela nediferencované i buňky cytologicky a funkčně zralé. Většina maligních nádorů zaujímá stupeň diferenciace buněk zhruba ve střední úrovni mezi stavem téměř nediferencovaným (anaplazie) a stavem diferencovaným zcela. Nediferencované buňky se podobají progenitorovým buňkám orgánů a jejich morfologickým znakem je posun poměru velikosti/objemu jádra a cytoplazmy ve prospěch jádra. V maligních nádorech nalézáme zřetelnou mitotickou aktivitu, která značí růstový potenciál. Termín diferenciace se dnes používá spíše ve smyslu sklonu k vyššímu stupni buněčných atypií. Rychlost růstu maligních nádorů často souvisí s úrovní diferenciace, kdy nízké diferencované nádory zpravidla vyrůstají rychleji. Nádory nebývají ohraničené a opouzdřené, prorůstají do okolní tkáně – invalidují a destruuji ji.

Také mohou v místě primárního vzniku penetrovat do okolních orgánů [13]. Jsou v nich přítomny proteázy a enzymy štěpící kolagen na povrchu buněk, což vede k destrukci bazálních membrán a okolních tkání. Kvůli tomu má maligní nádor invazivní růst [14].

Potencionálně maligní nádory (semimaligní) tvoří nejednotnou skupinu, u kterých nelze podle současných metod vyšetření jednoznačně říci, zda jejich chování bude mít benigní nebo maligní průběh [13].

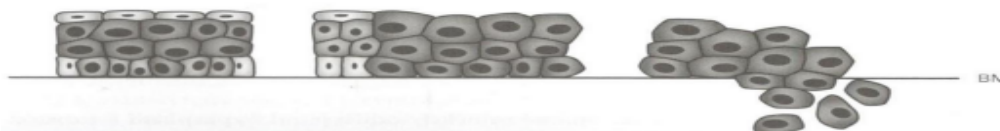
V histologické klasifikaci přihlížíme k původu nádoru ze základních tkání a podle toho můžeme jednotlivé nádory rozdělit na epitelové, mezenchymové, neuroektodermové a smíšené. Pomocí dalších vyšetření jako je použití imunohistologických metod zjistíme přesnou typizaci nádorů pomocí stanovení antigenních vlastností nádoru. Nutným doplněním imunohistologického vyšetření je pak barvení konkrétních vzorků tkáně a její mikroskopické vyšetření [17].

Na vzniku nádorů se podílejí genetické a regulační mechanismy, na jejichž základě nastává funkční změna dělení a přirozeného zániku buněk. Genetické změny mohou vzniknout jako sporadické mutace nebo jako mutace v zárodečné linii, kde základ nádorové transformace pochází z vrozené mutace klíčových genů, které ovlivňují chod buněk. Sporadické mutace ovlivňují pouze buňky, ze kterých nádor vzniká. Zárodečné mutace jsou přeneseny od rodičů nebo mohou započít jako nové v zárodečných buňkách po oplodnění. A postihují všechny buňky těla potencionálně nemocného s nádorovým onemocněním. Hlavní vlastností nádorových buněk je schopnost pokračovat v replikaci nezávisle na regulačních vlivech, které kontrolují přirozený růst a obnovu buněk – autonomie [13].

Nádory dělíme podle druhu tkáně, z které vznikají na mezenchymové, epitelové neuroektodermové a smíšené (ostatní) nádory. Názvosloví mezenchymových benigních nádorů tvoříme výchozí tkání a koncovkou -om. Fibrom – nádor vazivové tkáně, lipom – nádor tukové tkáně, chondrom – nádor z chrupavky, angiom – nádor z cév. Maligní mezenchymové nádory označujeme jako sarkomy, osteosarkom, liposarkom. Tyto maligní nádory často postihují děti. A do této skupiny můžeme zařadit nádorové onemocnění krvetvorné a lymfatické tkáně (leukemie a lymfomy). Epitelové nádory rozdělujeme podle epitelu jejich vzniku na nádory vycházející ze žlázového epitelu a nádory vycházející z povrchového epitelu. Benigní nádory z povrchového epitelu nazýváme papilomy, které mají papilární nebo bradavičnatý vzhled. Ze žlázového epitelu jsou benigní povahy adenomy. Maligní epitelové nádory jsou karcinomy, z povrchového epitelu převážně se vyskytující v kůži (dlaždicový spinocelulární karcinom, basocelulární

karcinom). Ze žláзовého epitelu vznikají adenokarcinomy, které dělíme dále podle toho, který typ žláz připomínají (tubulární, solidní, trabekulární atd.). Karcinom in situ je maligní nádor, který ale neproniká přes bazální membránu a je omezen pouze na epitel. Neuroektodermové nádory mohou vycházet z gangliových buněk i z podpůrných elementů nervové tkáně. Nejčastější benigní variantou nádorů jsou pigmentové névy, jejich maligní varianta je melanom. Časté maligní neuroektodermové nádory jsou neuroblastomy, vyskytující se u dětí. Z glií CNS vychází gliomy (benigní) a glioblastomy (maligní). Mezi ostatní (smíšené) nádory řadíme teratomy a choriosarkom. Teratomy vycházejí ze všech zárodečných listů a nachází se v nich tkáně epitelové i mezenchymové. Ve vyzrálých teratomech běžně nalézáme vlasy, zuby i tkáně různých orgánů. V nezralých teratomech, které jsou maligní nalézáme tkáně, které jsou nezralé a připomínají tkáně embryonální. V extrémní nezralosti nazýváme takové nádory jako embryomy. Zvláštním typem maligního nádoru je choriokarcinom, který vychází z tkáně plodu (placenty) a vyskytuje se pouze u těhotných žen [18] [19].

Vzniku karcinomu předchází tzv. prekanceróza. Prekanceróza je růstový neklid a bujení tkáně. Jedná se o dysplazie epitelu, které se mohou zvrhnout ve zhoubné bujení (obr. 5) [18].



Obrázek 5: Dysplazie, karcinom in situ, karcinom invazivní [18]

BM – bazální membrána

Prekancerózní změnu tkáně označujeme jako standardní morfologickou alteraci tkáně, ve které vzniká nádorový proces statisticky častěji, než ve zdravé tkáni [14]. Stacionární prekanceróza představuje malé riziko maligního zvratu. Výrazně vyšší riziko maligního zvratu je progredientní prekanceróza, u které jsou mikroskopicky patrné tkáňové atypie, zvýšená proliferace a cytologické atypie. Nejvyšší riziko zvratu v progresivně rostoucí maligní nádor představuje karcinom in situ. Karcinom in situ je epitelový ohraničený nádor, který nepřesahuje bazální membránu a nemá žádné metastázy. Mikroskopicky jsou ale patrné tkáňové i cytologické změny zcela shodné s rozvinutým maligním nádorem ale chybí invaze do okolních struktur. Karcinomu in situ předchází dysplazie. V dysplazii nacházíme různě velké buňky odlišného tvaru, jádra jsou bazofilnější a nukleoplazmový poměr je ve prospěch jádra [14].

Postup vzniku maligních nádorů lze rozdělit do několika fází [14]:

I. Indukční fáze

- a. Etapa iniciace – trvalá a ireverzibilní změna genotypu buňky indukovaná řadou onkogenních faktorů (iniciátorů). Somatická mutace vzniklá v buňce bude předána všem dalším buňkám od ní odvozených [16].
- b. Etapa latence – časový úsek, ve kterém může pokračovat působení iniciátoru.
- c. Etapa promoce – vyžaduje dlouhý účinek promotoru (karcinogenní látka, hormonální dráždění, onkogenní virus, působení růstových faktorů atd.)

II. Fáze blastoma in situ – postupná selekce atypických buněk s již plnou genotypickou charakteristikou maligního nádoru ale s neúplně funkčním maligním fenotypem bez schopnosti invazivního růstu a metastatické diseminace.

III. Fáze progresu nádoru

- a. Etapa invaze – lokální infiltrativní nebo destruktivní růst.
- b. Etapa diseminace – metastatický rozsev.

Kolorektální karcinom vzniká z epitelu sliznice střevní stěny. V 95% ze žláznatého epitelu. Benigní epitelové nádory označujeme jako adenomy. Vyskytují se buď ve formě polypů, která jsou se sliznicí propojeny tenkou stopkou nebo jako ploché (přisedlé) léze. Adenomy nezasahují do submukózy a od normální sliznice se liší různým stupněm dysplazie. Maligní epitelový nádor penetrující přes lamina muscularis mucosae do submukózy označujeme jako karcinom [20].

KRK v podobě adenokarcinomu vzniká v 95% ze žláznatého epitelu sliznice. Podle histologického hlediska můžeme rozlišit několik typů adenokarcinomů. Tubulární adenokarcinom má tubulární nebo tubulovilózní granulární strukturu [20]. Vyskytuje se zde redukce pohárkových buněk a variabilita ve velikosti i uložení buněčných jader. Podle stupně dysplazie můžeme pozorovat protažení jader, jejich nepravidelnosti a hyperchromní vzhled [21]. Mucinózní karcinom je tvořen z více než 50% hlenem, který se secernuje do lumina žláz, které jsou časem destruovány a hlen proudí do stromatu, kde v hlenu plavou nádorové buňky. Karcinom z prstenčitých buněk se vyznačuje buňkami v podobě pečetních prstenů. Uvnitř buňky se nachází vakuola mucinu, která vytlačuje jádro na periferii. Tento typ karcinomu se vyskytuje vzácně. Žláznatý i dlaždicový

komponenta nacházíme u adenoskvamózního karcinomu. Medulární karcinom obsahuje solidní ložiska větších nádorových buněk s nápadnými jádry a prominujícími jádérky. Ve stromatu se může nacházet lymfoidní infiltrát. Absenci všech žlázových struktur nacházíme u nediferencovaných karcinomů [20].

2.6.1 Metastazování

Metastázy jsou vzdálená dceřiná ložiska nádorů a svědčí o pokročilém rozsahu nádorového onemocnění. Jsou znakem maligní povahy nádoru. Není však podmínkou, že všechny maligní nádory metastázuji. Pravděpodobnější metastatický rozsev je u méně diferencovaných nádorů [13].

Maligní nádory mohou metastázovat třemi způsoby, které se mohou u jednotlivých onemocnění kombinovat.

- Porogenní šíření: diseminace nádoru ležícího v blízkosti nebo prorůstajícího na serosní povrchy např. do dutiny břišní, hrudní atd. Metastázy často indukují exsudaci tekutiny do postižené dutiny. Tímto způsobem metastázuji zejména nádory trávicího traktu, dále pak nádory ovarií a plic.
- Šíření lymfatickou cestou: první postižená lymfatická uzlina se nazývá sentinelová z níž mohou být směrem spádu infiltrovány i další lymfatické uzliny.
- Šíření krevní cestou: častěji nádory proniknou do žilního řečiště, tímto typem metastáz jsou nejčastěji postiženy plíce a játra [13].

Vývoj metastáz se obvykle odehrává ve 3 fázích. V první fázi se uvolní nádorové buňky z primárního nádoru. V druhé fázi nastává transport nádorových buněk na nové místo. Transport probíhá pomocí výše zmíněných způsobů šíření. Třetí fáze je nidace uvolněných buněk na novém místě. Je to nejpodstatnější fáze pro metastázy, kdy je její úspěšnost závislá na nádorových buňkách i buňkách hostitelských. U kolorektálního karcinomu se v této fázi uplatňuje adherentní molekula CD44. Tuto molekulu mají na svém povrchu leukocyty a zprostředkovává jejich adhezi na endotel. Při onemocnění KRK mohou mít nádorové buňky na svém povrchu vysokou koncentraci této molekuly vzniklou při maligní transformaci. To podmiňuje vysoký metastatický potenciál. Při metastazování krevním řečištěm se uplatňuje tromboxan uvolněný z krevních destiček. Tromboxan způsobuje trvalou adhezi nádorového mikroembolu k endotelu a při rozpadu destiček uvolněný růstový faktor PDGF pozitivně ovlivňuje proliferaci nádorových buněk [14].

Určit rozsah onemocnění je podstatným faktorem, který označuje prognózu onemocnění ale i výběr vhodných léčebných metod. Toto určení se nazývá staging. Klasifikační systém používaný v České republice je klasifikace TNM (tumor-noduli-metastases). Systém je založen na stanovení ukazatelů v následující tabulce [22].

Tabulka 1 Klasifikační systém TNM

T (tumor)	Rozsah primárního nádoru	T1 – T4
N (noduli)	Stav regionálních mízních uzlin	N1 – N3
M (metastases)	Přítomnost/nepřítomnost vzdálených metastáz	M0 – M1

Mimo stagingu se v morfoloické diagnostice nádorových onemocnění užívá typing, což je histogenetické zhodnocení původu nádoru, a grading, který určuje stupeň malignity [14].

2.7 Kolorektální karcinom

V České republice je typický věk pacienta s kolorektálním karcinomem 61 až 77 let, ale 21% všech nemocných je mladších 60 let. Z toho vyplývají lékařské, etické i společenské důsledky, jelikož onemocnění postihuje i mnoho osob v produktivním věku [23].

Největší rizikové faktory vzniku kolorektálního karcinomu jsou strava s vysokým obsahem živočišných tuků a červeného masa, nízký obsah vlákniny, nadváha, konzumace alkoholu, nedostatečný příjem protektivních látek jako je vitamin C a kyselina listová [24].

Vznik KRK je nejčastější ve sporadické formě (asi 70% případů) bez dalších případů onemocnění v rodině. Vzniká jako důsledek kombinace faktorů vnějšího prostředí, nevhodného stravování, stárnutí organismu a kumulace somatických mutací v buňce. Tyto buňky mohou být změněny defekty tumorsupresorových genů (APC¹, DCC²), antionkogenů p53 a zvýšenou expresí protoonkogenů Ki-ras³ [2] [22]. Tento protoonkogen se podílí na vzniku dysplazií. Protoonkogeny mohou být aktivovány a vznikají onkogeny, které narušují normální buněčný cyklus a diferenciaci. Ztráta heterozygita tumorsupresorových genů se podílí na přeměně adenomu v maligní karcinom [20]. K podpoře karcinogeneze mohou vést také integrace onkogenů s růstovými faktory, u kterých dojde k nepřiměřené a aberantní expresi a tím stimulují buněčnou proliferaci [25]. Většina sporadických karcinomů vzniká z počátečních

adenomatózních polypů, které jsou významná prekanceróza. Vysoce rizikový faktor vzniku sporadického karcinomu tlustého střeva je polyp větší než 1 cm, vícečetný výskyt polypů, vilózní struktura a těžký stupeň cytologických a strukturálních atypií [24]. Část karcinomů vychází z dysplastických změn ve sliznici, které jsou ovlivněny jiným onemocněním jako je ulcerózní kolitida nebo Crohnova choroba [25]. Riziko onemocnění stoupá s věkem, kde 50let představuje hranici, kdy incidence narůstá velmi strmě. Vyšší výskyt KRK můžeme pozorovat u diabetiků a pacientů s metabolickým syndromem [2]. 20-25% onemocnění KRK se vyskytuje jako familiární forma onemocnění [24].

Adenom nebo dysplazie sliznice se může vyvinout z tzv. field defect oblasti sliznice, kde se vyskytují aberantní krypty. Tato oblast představuje iniciální prekancerózní změnu, charakteristickou proliferací a odlišnou diferenciací epitelu krypt. Počet abnormálních krypt může kolísat od jednotek až do stovek a určuje velikost ložiska [25]. „Podle vzhledu epitelu se histologicky rozlišují tři typy ložisek aberantních krypt (typický, hyperplastický a mikroadenomy)“ [25]. Adenomy rozlišujeme tubulární, vilózní a smíšené. Tubulární adenom je většinou malý, stopkatý s nízkým stupněm dysplazie. Asi 75% nádorové tkáně tvoří tubulární struktura. Sliznice adenomu je tmavě červená a povrch je hladký nebo jemně granulovaný. Velikostně se tubulární adenomy nachází pod 1 cm. Vilózní adenom je na povrchu sytě červený a často nerovný až kvěťákovitý. Vilózní adenomy bývají častěji přisedlé oproti stopkatým tubulárním. Vilózní komponenta tvoří více než 50% nádoru. Ve smíšených tubulovilózních adenomech jsou komponenta zastoupena přibližně ve stejném poměru. Riziko maligního zvratu adenomu je větší u široce přisedlých vilózních adenomů větších než 4 cm s těžkou dysplazií [25].

Velké množství pacientů s menšími polypy nemá žádné klinické příznaky a onemocnění je nalezeno náhodně buď při preventivním screeningu nebo jako nález při nespecifických gastrointestinálních obtížích. Nenápadné příznaky už mohou být způsobeny již přítomným karcinomem. Nejčastějším příznakem jsou nespecifické bolesti břicha, krvácení a změny defekačních zvyklostí. Krvácení je obvykle intermitentní a v malém množství. U juvenilní polypózy se často objevuje krvácení rektu. Vilózní polypy může provázet průjem [25].

2.7.1 Maligní zvrát adenomu

Nejprve dochází k růstu nádoru přes bazální membránu žláz do přilehlého stromatu nebo do muscularis mucosae. Tato fáze se označuje jako neinvazivní nebo intramukózní karcinom. Invazivní karcinom prorůstá do submukózy, kde může pronikat do lymfatických cév a krve a díky tomu metastázovat [25]. Průnik nádorových buněk přes

bazální membránu je umožněn díky proteolytickým enzymům, které naruší její integritu a následuje k jejímu disrupci [20]. Stadium (stage) malignizace adenomu rozlišujeme ve čtyřech stádiích podle Haggitova systému viz tabulka 2.

Tabulka 2 Stadium malignizovaného adenomu [25]

1. stadium	Karcinom prorůstá do m. mucosae a do submukózy hlavy adenomu
2. stadium	Karcinom infiltruje hlavu a stopku adenomu
3. stadium	Karcinom infiltruje celou stopku adenomu
4. stadium	Karcinom infiltruje submukózu střevní stěny pod stopkou, ale nezasahuje do muscularis propria

Maligní buňky se na začátku onemocnění nachází pouze ve sliznici. Průnikem přes muscularis mucosae střevní stěny vzniká invazivní karcinom. Tento proces je obvykle pomalý a může se odehrávat v řádu několika let, což dává prostor pro včasný záchyt onemocnění a jeho léčbu. Proces může být usnadněn a urychlen, pokud genom konkrétního jedince obsahuje už zděděnou nebo nově vzniklou mutaci alel důležitých genů [2].

Při maligních procesech nastává v buňkách změna v interakci s mezibuněčnou hmotou, její enzymatické rozrušování a dochází ke změnám ve schopnosti rozlišování okolních buněk. To je způsobeno změněnou genetickou informací v buňce, která je předávána dceřiným buňkám. Tato genetická nestabilita může být způsobena například mutací genu p53. Při rychlém nádorovém růstu může dojít k hypoxii nádorové tkáně, způsobenou nedostatečně rychlou angiogenezí a tkáň pak není zásobena kyslíkem ani živinami. Hypoxie způsobí zvýšenou expresi genu p53. Ztrátová mutace tohoto genu působí tak, že je buňka odolná vůči hypoxii a je v této podobě předávána dalším dceřiným buňkám. Tímto způsobem dochází k selekci nádorových buněk s růstovou výhodou v hypoxickém prostředí nádoru [16].

2.7.2 Familiární formy kolorektálního karcinomu

Familiární formu onemocnění můžeme rozdělit do dvou základních skupin onemocnění, polypózní syndromy a nepolypózní syndromy. Mezi polypózní syndromy patří familiární adenomatózní polypóza (FAP), Peutzův-Jeghersův syndrom (PJS), juvenilní polypóza (JPS), PTEN-hamartomatózní tumorový syndrom (PHTS) a smíšený polypózní syndrom (HMPS). Dědičný nepolypózní syndrom je hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC) častěji označován jako Lynchův syndrom [24].

Příčinou FAP jsou zárodečné autozomálně dominantní mutace v genu APC. Tento gen kóduje multidoménový protein, který je součástí signalizační dráhy a má významnou funkci při udržení stability cytoskeletu, v buněčné adhezi a v regulaci buněčného cyklu. Narušení signalizační dráhy tohoto proteinu je hlavní důvod k iniciaci kolorektální karcinogeneze. Tyto mutace jsou často nalézány také u sporadicky se vyskytujícího karcinomu. Onemocnění FAP se projevuje rozvojem stovek až tisíců prekancerózních adenomatózních střevních polypů, které se začínají objevovat už během puberty. U 95% jedinců jsou polypy zcela rozvinuté kolem 35. roku věku a riziko maligního zvratu je velice vysoké. Mezi jednotlivými rodinami jsou variabilní další příznaky, které mohou zahrnovat polypy žaludku, duodena, zubní abnormality, nádory měkkých tkání, osteomy a další [24].

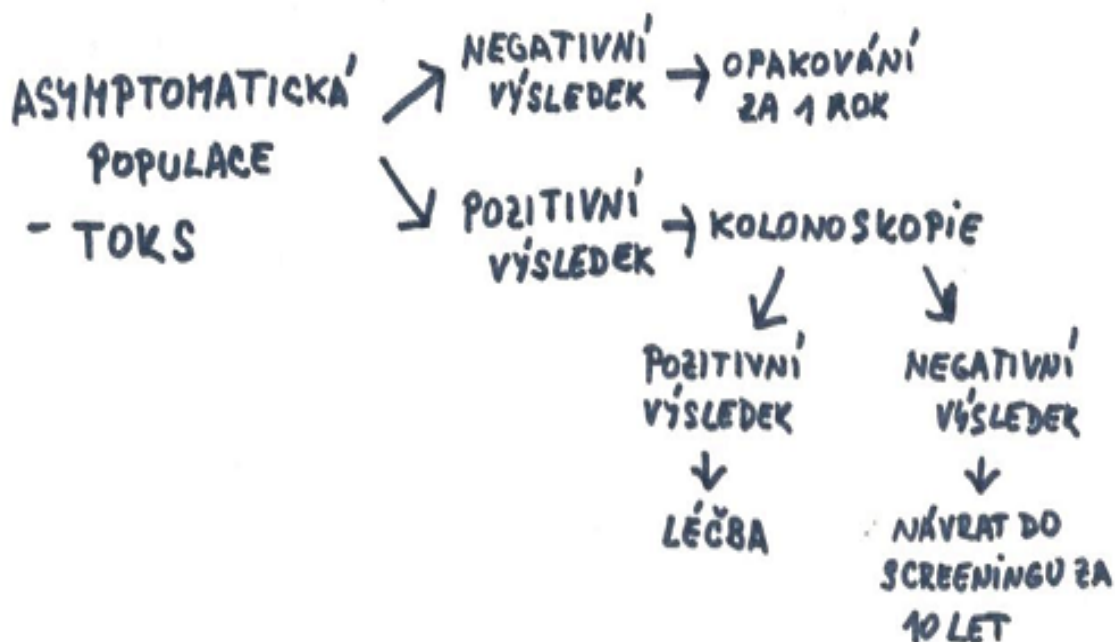
Juvenilní polypóza se projevuje autozomálně dominantní dědičností a tvoří predispozici ke vzniku hamartomatózních polypů v gastrointestinálním traktu. Převážně v žaludku, tenkém střevě a kolorektu. Polypy se začínají vyskytovat okolo 20. roku života. Většina těchto polypů jsou benigní polypy ale mají významné riziko maligního zvratu. Geny zodpovědné za toto onemocnění jsou gen MADH4 a gen BMPR1A. Formou juvenilní polypózy je PTHS. Ale v případě tohoto onemocnění je odpovědným genem gen PTEN, který kóduje lipidovou fosfatázu, inhibitor dráhy PI3K/Akt. Tato fosfatáza je nezbytná pro zástavu buněčného cyklu ve fázi G1 a apoptózu [24].

Nejčastější formou dědičného kolorektálního karcinomu je Lynchův syndrom. U této diagnózy se nachází adenomatózní polypy jako u FAP, ale ne v tak vysokém počtu. Příčinou je autozomálně dědičná mutace v některém z mismatch reparačních genů. Tyto geny kódují proteiny opravující chybné párování bází v řetězci DNA. Defekt v tomto systému genů vede k hromadění somatických mutací v buňce a následkem toho nastává maligní zvrát. Kritéria pro určení Lynchova syndromu jsou alespoň tři příbuzní s nádorem kolorekta (jeden příbuzný je prvního stupně dalších dvou členů) a je vyloučena FAP, postižení alespoň dvou generací, vznik nádoru před 50. rokem věku minimálně u jednoho z nemocných [24]. Syndrom zvyšuje riziko vzniku dalších karcinomů v žaludku, v ovariích nebo v urogenitálním systému [2].

2.8 Screening

Screening je určen především pro populaci zdravých asymptomatických osob. Je nutné zajistit vysokou citlivost vyšetření [23]. Základem screeningového programu v ČR je test na okultní krvácení ve stolici (TOKS).

TOKS slouží k vyhledávání jedinců k diagnostickému programu v nízkorizikové asymptomatické populaci. Fyziologicky dochází ke ztrátám krve stolicí v objemu 0,5 – 2,5 ml za den, to znamená asi 0,3 – 1,3 mg hemoglobinu na 1 g stolice. Rozlišujeme dva typy testů na okultní krvácení ve stolici. Starší a v současnosti méně používaný guajakový test a imunochemické testy. Pozitiva guajakových testů spočívají ve finančních nákladech, jednoduchosti a proveditelnosti přímo v ordinaci lékaře. Nevýhodou je způsob odběru vzorků, při kterém je nutné přímo manipulovat se stolicí a nemožnost automatizovaného odečtu. Princip testu spočívá v reakci guajakové pryskyřice s peroxidázovou aktivitou hemoglobinu. Vzorky velikosti čochky se odebírají ze dvou různých míst ve třech po sobě následujících stolicích. Vzorky nanese do testovacích políček, tak aby byla zcela vyplněná a odečítáme barevnou reakcí. Falešně pozitivní výsledky může způsobit konzumace potravin s obsahem krve (jelita, černá polévka), tepelně neopracované maso, určité druhy zeleniny (brokolice, květák) a nadměrné užívání vitamínu C [1].



Obrázek 6: Schéma screeningového programu KRC (50-54 let) [23] (upraveno)

Výhody imunochemických testů jsou především hygienický odběr malého množství z několika míst jedné stolice a vyšší senzitivita. Vzorky se odebírají tyčinkou ze 3 až 6 míst na stolici a po odběru se tyčinka vkládá do odběrové lahvičky. Hemoglobin se ve stolici stanovuje na principu reakce s protilátkou. Reakce se vyhodnocuje buď jako barevná reakce nebo při fotometrickém stanovení změnou turbidity [1].



Obrázek 7: Schéma screeningového programu KRK (nad 55 let) [23] (upraveno)

3 CÍL PRÁCE

V teoretické části této bakalářské práce je čtenář seznámen s problematikou onemocnění kolorektálním karcinomem, které patří k nejčastějším maligním onemocněním v České republice. Rakovině tlustého střeva předchází prekancerózy. Rozlišujeme sporadický a familiární výskyt tohoto onemocnění.

K určení správné diagnózy, a především vhodného způsobu léčby je velmi důležité histologické vyšetření vzorku tkáně. Abychom mohli rozlišit nádorovou tkáň od tkáně zdravé je nutné zhotovit histologický preparát. Tento proces se skládá z několika jednotlivých kroků: odběr vyšetřované tkáně, fixace odebrané tkáně a její odvodnění, zalévání do parafínu, krájení tenkých řezů pomocí mikrotomu, barvení pomocí různých barvicích technik. Odlišných barvicích technik se využívá, protože každá struktura a buňka má jinou schopnost vázat barvivo, a při použití několika barvicích metod můžeme zviditelnit rozdílné struktury.

Hlavním cílem práce je zhotovit preparáty tkáně tlustého střeva s postižením kolorektálním karcinomem a preparáty zdravé tkáně, jejichž struktura je zviditelněná několika barvicími technikami. A následně porovnat morfologické změny ve tkáni střeva postižené karcinomem oproti tkáni zdravé.

4 METODIKA

4.1 Odběr materiálu

Odběr materiálu k histologickému vyšetření můžeme získat z živého organismu (biopsie) nebo při pitvě zemřelého (nekropsie). Bioptický materiál je možné obrát několika způsoby podle typu požadovaného vyšetření a druhu materiálu. Nejčastěji se materiál odebírá pomocí excize, kdy se za diagnostickým účelem vyřízne část tkáně k vyšetření. Další možností odběru biologického materiálu je kyretáž, nebo punkce [17]. Bioptický materiál musí být ihned po odběru řádně zfixován a označen. Označení musí obsahovat jméno a příjmení pacienta a rodné číslo. Společně s odeslaným materiálem musí být do laboratoře dodána histologická průvodka. Na průvodce musí být uvedeno jméno a příjmení pacienta s rodným číslem, klinická diagnóza, druh fixační tekutiny a datum odběru materiálu, podpis a razítko lékaře, který odběr provedl a požadované vyšetření. Excize reprezentativních vzorků k vyšetření se ukládají do barevných kazetek, které jsou číselně označené bioptickým číslem shodným s číslem průvodky, která byla společně s materiálem dodána do laboratoře. Bioptický materiál použitý ke zhotovení preparátů v praktické části této bakalářské práce byl odebrán jako excize z resekatu části tlustého střeva, pověřeným lékařem v ON Kladno.

Resekát tlustého střeva se obvykle do laboratoře k histologickému vyšetření dostává jako rozstřížený v linii oproti úponu mezokolonu. Při klinické diagnóze KRK vyhledáváme v resekatu lymfatické uzliny, pokud jsou k dispozici. Samotný tumor prokrájíme přes všechny vrstvy. Excidujeme reprezentativní vzorky tak, aby obsahovaly nádorovou tkáň, přechodnou zónu mezi nádorem a okolím i místa bez regresivních změn. Dále odebereme excize viditelných nebo hmatatelných tkáňových abnormalit na povrchu i v hloubce materiálu. Materiál excidujeme ostrým nožem, břitvou nebo žiletkou. Nejlépe krájením jedním tahem, aby nedocházelo k poškození tkáně na řezu. Excize reprezentativních vzorků provádí patolog za asistence laborantky. V průběhu excidování vzorků lékař diktuje k zapsání makropopis materiálu. Délku, šířku a výšku resekatu, případně tloušťku stěny, uzly, myomy a další nálezy, nález na řezné ploše, lokalizaci a vztah k okolí u patologických útvarů. Makropopis poskytuje informace o vyšetřovaném materiálu i po časovém odstupu, je vodítkem pro orientaci vzorků a slouží jako zpětná kontrola při případné záměně materiálu [26].

4.2 Fixace

Fixace je rychlé a šetrné vysrážení bílkovin protoplazmy buněk a tkání fixačními prostředky, které by mělo zabránit samovolné autolýze tkáně. Tkáň odebraná pro účely histologického vyšetření je nutné fixovat ihned nebo v co nejmenším možném časovém intervalu po odběru. Ideální fixační prostředek by měl uchovat tkáň v nezměněném stavu. Fixační prostředek musí být schopen pronikat do tkáně rychle a rovnoměrně [17].

Fixační prostředky rozdělujeme do dvou základních skupin, na chemické a fyzikální. Fyzikální fixační prostředky využívají buď suchého tepla nebo vystavení tkáně nízké teplotě. Fixace teplem se používá téměř výhradně v mikrobiologii k fixaci nátěrů. Fixace mrazem se používá především při peroperačních vyšetřeních. Pomocí kryostatu se dodaná tkáň v laboratoři rychle zmrazí a rovnou se z takto zmraženého kousku tkáně krájí tenké řezy k vyšetření patologem. Výsledky vyšetření jsou na operační sál doručeny během 20 až 30 minut a mohou ovlivnit pokračování operačního výkonu. Nejvyužívanější formou fixace je chemická fixace. Tkáňová excize se vloží do dostatečně velké nádoby s dostatečným množstvím fixační tekutiny tak, aby tekutina měla přístup k fixované tkáni ze všech stran. Nejvíce používaná fixační tekutina je formol (formalín). Výchozí látkou pro přípravu formolu je aldehyd kyseliny mravenčí (formaldehyd). Formol je dodáván do laboratoře již připraven v koncentraci 10% a 40%. Kapalina je bezbarvá s dráždivým zápachem, který silně dráždí sliznici [17]. Další fixační tekutina použitá při fixaci vzorků je Lillieho ethanol-formol-kyselina octová (AAF). AAF je připravováno přímo v laboratoři z 500 ml formolu, 250 ml kyseliny octové a 4250 ml 96% ethanolu [27].

4.3 Odvodnění a prosycení parafinem

Fixovanou tkáň není možné krájet na tenké řezy jen samostatně zalitou v parafínovém bločku. Je nutné tkáň odvodnit a prosytit parafinem. Odvodnění tkáně docílíme použitím několika lázní 96% ethanolu. Ethanol je ale nutné z tkáně po odvodnění odstranit, protože parafín je v ethanolu nerozpustný a nebylo by možné vzorky parafinem prosytit. K odstranění ethanolu používáme tzv. intermedia, což je látka dobře rozpouštějící parafín a zároveň se dobře mísí s ethanolem [17] [28] [27].

Odvodnění, prosycení intermediem a prosycení parafinem je v laboratoři prováděno pomocí lineárního tkáňového automatu Bamed TPC 15 duo. Jako intermedium je používán xylen.



Obrázek 8: Tkáňový automat Bamed TPC 15 duo [30]

4.4 Zalévání parafinových bločků a krájení tenkých řezů

Ke zhotovení tenkých řezů na mikrotomu je nutné tkáň zalít do parafinových bločků. Teplota parafínu při zalévání se pohybuje okolo $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ [28]. Zalévání parafinových bločků se provádí pomocí zalévací linky značky Medite (obr.9). Vlevo je chladicí plocha, kde parafinové bločky tuhnou, v prostřední části se nachází zásobník rozpuštěného parafínu, pinzeta a malá chladicí ploška, která slouží k přichycení tkáně při zalévání a vpravo je uzavíratelná vyhřívaná komora na fixované excize uložené v označených kazetkách.



Obrázek 9: Zalévací linka (Aneta Landecká, 2018)

Fixovanou tkáň zaléváme do dostatečného množství parafínu a do přiměřeně velkých kovových kazetek tak, aby kolem každého okraje tkáně byl parafínový lem a tkáň se tak mohla snadno krájet na tenké řezy. Bločky necháváme dostatečně zchladnout na chladicí desce zalévací linky a do doby krájení tenkých řezů je uchováváme v mrazáku.

Tenké řezy krájíme pomocí sáňkového nebo rotačního mikrotomu. Bloček zasadíme do svorky na sáňkách (u sáňkového mikrotomu) a dbáme na to, aby byl bloček ve svorce pevně uchycen. Mikrotomový nůž zasadíme tak, aby bylo jeho ostří rovnoběžné s přední hranou bločku a jeho sklon k rovině řezu menší než 10° . Horní plochu bločku zkrájíme tak, aby vznikla rovná plocha na řezu s celou plochou zalité tkáně [17]. Na mikrometrickém šroubu nastavíme požadovanou tloušťku řezu. Pro snadný a správný odečet jsou nejvhodnější, co nejtenčí řezy, obvykle 3 – 6 μm . A pomocí páčky na automatický posun postupně krájíme tenké řezy [28].

Tenké řezy je třeba napnout, a to pomocí nádoby s teplou destilovanou vodou. Voda by měla mít teplotu 37 – 40°C. Ukrojený tenký řez přeneseme pomocí štětce na vodní hladinu, kde se řez napne a plave na hladině. V blízkosti řezu ponoříme do vody podložní sklíčko a řez na něj přichytíme a vytáhneme z vody. Vodu lehce sklepneme a sklíčko uložíme do termostatu [17].



Obrázek 10: Sáňkový mikrotom [31]

4.5 Barvení histologických preparátů

Barviva rozdělujeme na dvě základní kategorie, a to na barviva zásaditá (bazická) a kyselá. Charakteristické pro barviva zásaditá je, že barví buněčná jádra oproti tomu barviva kyselá barví dobře cytoplasmu buněk. Nejpoužívanějším kyselým barvivem je eosin, ze zásaditých pak hematoxylin. Spojení těchto dvou barviv tvoří nejzákladnější barvicí techniku – hematoxylin-eosin (HE). Základní barvení pak doplňujeme podle potřeb každého vyšetření speciálními barvicími metodami pro zviditelnění charakteristických struktur [17].

4.5.1 Hematoxylin – eosin - HE

Před samotným procesem barvení je nutné naředit pracovní roztok eosinu. Pracovní roztok naředíme z 200 ml destilované vody, 70 ml 2% eosinu a 1 ml 99% kyseliny octové. 2% roztok eosinu je do laboratoře dodáván připraven z ústavní lékárny ON Kladno, stejně jako roztok Mayerova hematoxylinu. Připravené fixované řezy tkáně nakrájené pomocí mikrotomu na tenké řezy a natažené na podložní sklíčko můžeme obarvit.

Řezy nejprve inkubujeme v termostatu 1 hodinu při 60°C. Následně je nutné řezy odparafinovat v xylenu 20 minut. Odparafinované řezy opláchneme řadou 96% ethanolů a následně opláchneme v destilované vodě. Řezy naložíme do lázně Mayerova hematoxylinu na 5 minut a poté několik minut diferencujeme pod mírným proudem tekoucí vody. Znovu řezy propláchneme v destilované vodě a naložíme do lázně eosinu na 2 minuty. Následuje opět proplach v destilované vodě a takto obarvené řezy odvodníme pomocí řady ethanolů a projasníme v xylenu [27].

- Deparafinace v xylenu.....20 minut
- Proplach v řadě ethanolů
- Oplach v destilované vodě
- Lázeň Mayerova hematoxylinu.....5 minut
- Diferenciace pod tekoucí vodou
- Oplach v destilované vodě
- Lázeň eosinu.....2 minuty
- Oplach v destilované vodě
- Odvodnění řadou 96% ethanolů
- Projasnění v xylenu

Výsledky barvení: jádra – modrá, cytoplasma – červená



Obrázek 11: Deparafinace tenkých řezů v lázni xyleny (Aneta Landecká, 2018)



Obrázek 12: Barvicí roztok Mayerova hematoxylinu a pracovní roztok eosinu (Aneta Landecká, 2018)

4.5.2 Kombinovaná metoda alciánové modři a PAS (průkaz kyselých a neutrálních mukopolysacharidů) - Kombi

Před procesem barvení si naředíme 3% kyselinu octovou (97 ml destilované vody a 3 ml 99% kyseliny octové) a 1% kyselinu jodistou (100 ml destilované vody a 1 g koncentrované kyseliny jodisté). Dále budeme používat Schiffovo reagens, alciánovou modř a Mayerův hematoxylin. Všechny tyto roztoky jsou do laboratoře dodávány připraveny v ústavní lékárně ON Kladno.

Fixované tenké řezy na podložních sklíčkách inkubujeme v termostatu 1 hodinu při 60°C a následně je deparafinujeme v xylenu po dobu 20 minut. Poté řezy propláchneme v řadě ethanolů a v destilované vodě. Opláchneme v 3% kyselině octové a ihned naložíme do lázně s alciánovou modří na 30 minut. Následně řezy opláchneme v destilované vodě a naložíme do 1% kyseliny jodisté na 10 minut. Opět oplachujeme v destilované vodě a naložíme do lázně Schiffova reagens na 30 minut. Řezy diferencujeme pod mírným proudem tekoucí vody a dobarvíme v lázni s Mayerovým hematoxylinem po dobu 5 minut. Opět diferencujeme pod tekoucí vodou, odvodníme řadou ethanolů a projasníme v xylenu [27].

- Deparafinace v xylenu.....20 minut
- Proplach řadou 96% ethanolů
- Oplach v destilované vodě
- Oplach v 3% kyselině octové
- Lázeň alciánové modři.....30 minut
- Oplach v destilované vodě
- Lázeň 1% kyseliny jodisté.....10 minut
- Oplach v destilované vodě
- Lázeň Schiffova reagens.....30 minut
- Diferenciace pod tekoucí vodou
- Lázeň Mayerova hematoxylinu...5 minut
- Diferenciace pod tekoucí vodou
- Odvodnění řadou 96% ethanolů
- Projasnění v xylenu

Výsledky barvení: jádra – modře, neutrální mukopolysacharidy – červenofialově, kyselé mukopolysacharidy – modrozeleně

4.5.3 Modrý Massonův trichrom (kombinace barvení Weigertovým hematoxylinem, kyselým fuchsinem a anilínovou modří) - MM

Před procesem barvení si naředíme roztok 1% kyseliny fosfowolframové (1 g kyseliny fosfowolframové a 100 ml destilované vody), 1% kyseliny octové (1 ml koncentrované kyseliny octové a 99 ml destilované vody), pracovní roztok anilínové modří (1 díl anilínové modří a 3 díly destilované vody) a Weigertův železitý hematoxylin (roztok A a B v poměru 1:1). Anilínová modř a roztoky A a B Weigertova železitého hematoxylinu jsou do laboratoře dodávány připraveny z ústavní lékárny ON Kladno.

Řezy fixované tkáně inkubujeme v termostatu při 60°C 1 hodinu. Deparafinuje je v xylenu 20 minut a propláchneme řadou ethanolů a opláchneme v destilované vodě. Řezy naložíme do lázně Weigertova železitého hematoxylinu na 10 minut a následně diferencujeme pod mírným proudem tekoucí vody 5 minut. Poté řezy naložíme do Massonova fuchsinu na 5 minut a krátce opláchneme v destilované vodě. Řezy diferencujeme v 1% kyselině jodisté 5 minut a krátce opláchneme v destilované vodě. Následně je naložíme do lázně pracovního roztoku anilínové modří na 5 minut a opláchneme v destilované vodě. Řezy diferencujeme v 1% kyselině octové krátkým oplachem a opláchneme v destilované vodě. Odvodníme řadou ethanolů a projasníme v xylenu [27].

- Deparafinace v xylenu.....20 minut
- Proplach řadou 96% ethanolů
- Oplach v destilované vodě
- Lázeň Weigertova železitého hematoxylinu.....10 minut
- Diferenciace pod tekoucí vodou.....5 minut
- Oplach v destilované vodě
- Lázeň Massonova fuchsinu.....5 minut
- Oplach v destilované vodě
- Diferenciace v 1% kyselině fosfowolframové.....5minut
- Oplach v destilované vodě
- Lázeň anilínové modří.....5 minut
- Oplach v destilované vodě
- Odvodnění řadou 96% ethanolů
- Projasnění v xylenu

Výsledek barvení: jádra – modročerně, svalovina a erytrocyty – červeně, kolagenní vlákna - modře

4.6 Montování preparátů

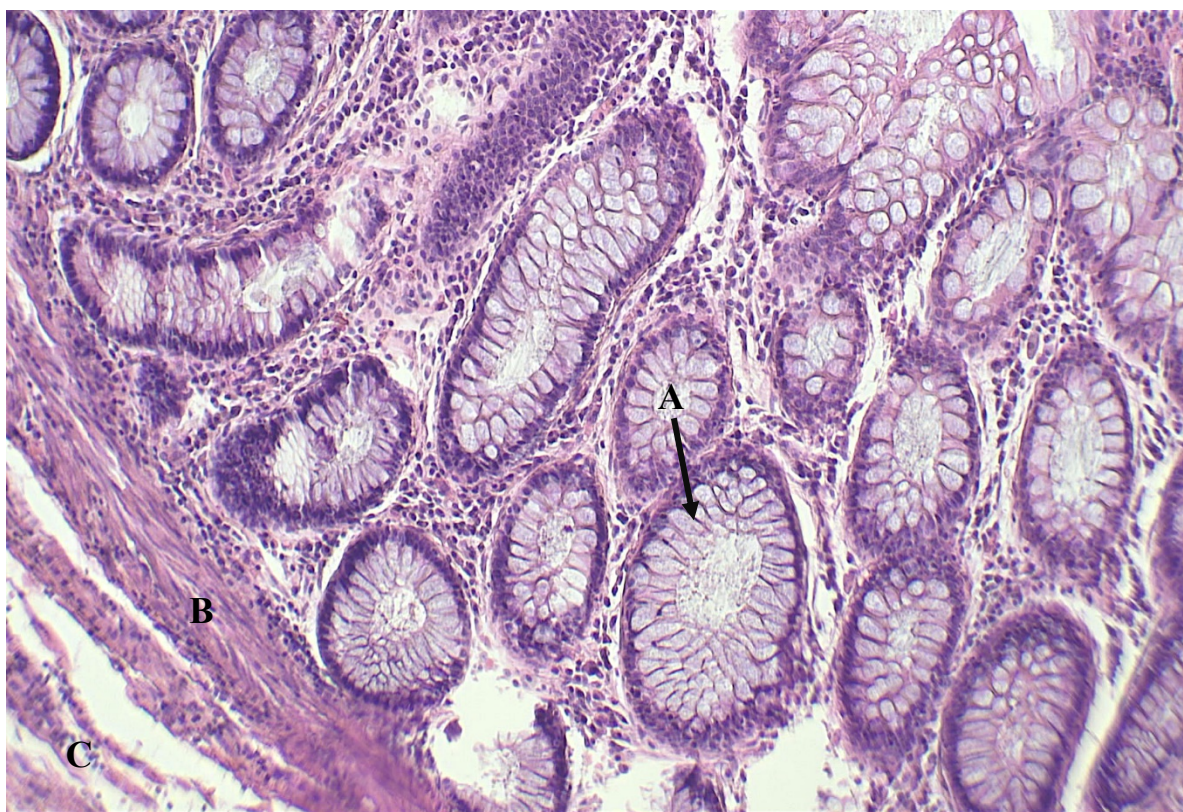
Obarvené řezy montujeme mezi podložní a krycí sklíčko do uzavíracího média. Uzavírací medium musí být látka, která je dokonale průhledná s vysokým indexem lomu a nesmí poškozovat zbarvení tkáně. Montujeme odvodněné a projasněné řezy. Sklíčko s řezem vyjmeme z lázně xylenu, lehce osušíme a řez zakápneme montovacím médiem. Přiložíme krycí sklíčko a lehce přitlačíme pinzetou, aby se medium rozlilo po celé ploše řezu a zbavili jsme se případných bublin. Montovací média můžeme rozdělit do dvou skupin, montovací média nemísitelná s vodou. Takové médium je kanadský balzám, hustý cedrový olej a různé syntetické pryskyřice. Montovací média mísitelná s vodou jsou glycerin, glycerinová želatina a sirup z arabské gumy (Apáthyho sirup). V těchto médiích řezy před montováním neodvodňujeme. Montovací média mísitelná s vodou používáme v případě, kdy tkáň nesmí přijít do kontaktu s koncentrovaným ethanolem a xylenem, na příklad při průkazu lipidů [17]. K montování preparátů k účelům této práce byl jako médium použit solakryl BMX. Solakryl je roztoková akrylátová pryskyřice [29].

5 VÝSLEDKY

Všechny preparáty jsou reálné případy z období listopadu 2017 až ledna 2018 a byly zhotoveny metodami uvedenými výše. Preparáty jsem zhotovila samostatně, pouze za dozoru vrchní laborantky Viery Šefčovičové na patologicko – anatomickém oddělení ON Kladno. Fotografie preparátů jsem vyhotovila pomocí fotoaparátu Bio View BioVID HD 1080+ připevněném na mikroskopu BMS EduLed flarq bino v laboratoři K-307 v budově FBMI za pomoci MUDr. Daniely Obitkové. Uvedená zvětšení jsou odečtena z objektivu a okuláru na uvedeném mikroskopu. Preparáty byly odborně prohlédnuty MUDr. Lucií Bartoňovou a uvedené diagnózy jsou její odborné závěry, které jsou s jejím svolením použity. Histologický popis jednotlivých preparátů vychází z obecných učebnic histologie a z histologického atlasu (zdroje [9] a [32]) a byly konzultovány s MUDr. Lucií Bartoňovou, MUDr. Danielou Obitkovou a MUDr. Radkem Matlachem.

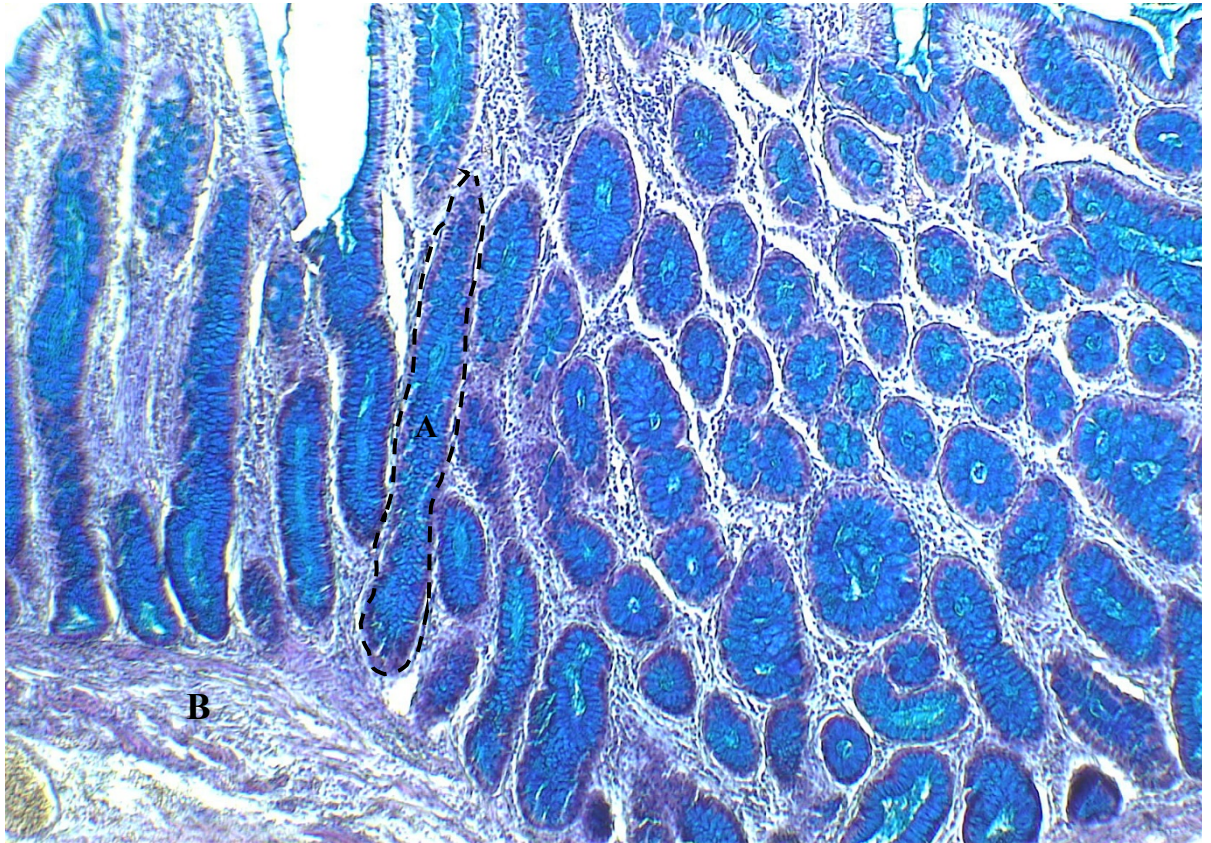
5.1 Preparáty normální tkáně tlustého střeva

Preparáty jsou zhotovené při tloušťce řezů 5-8 μm .



Obrázek 13: Sliznice tlustého střeva, průřez Lieberkühnovými kryptami, zvětšení 200x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018)

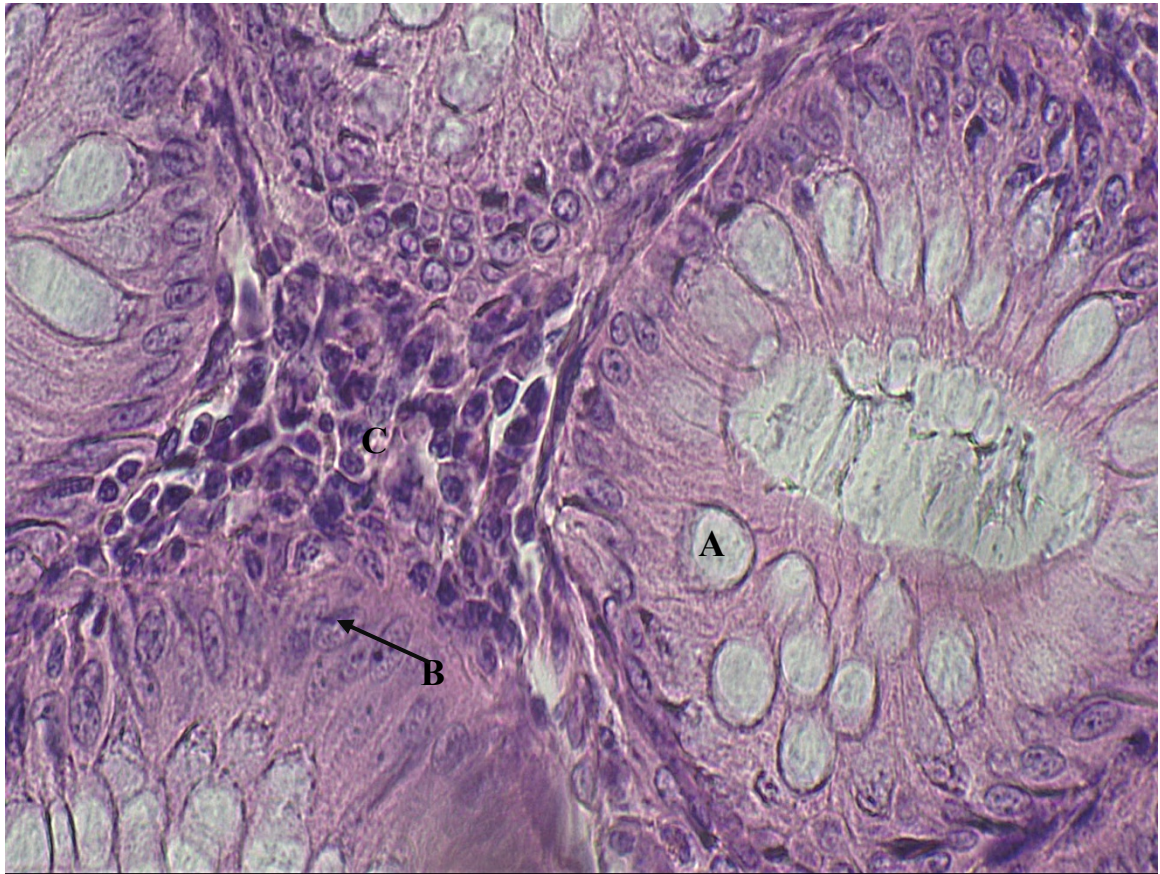
- A – pohárková buňka
- B – muscularis mucosae
- C – submucosa



Obrázek 14: Sliznice tlustého střeva, průřez Lieberkühnovými kryptami, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)

A – Lieberkühnova krypta s modře zbarvenými pohárkovými buňkami, které produkují hlen (mucin)

B – muscularis mucosae

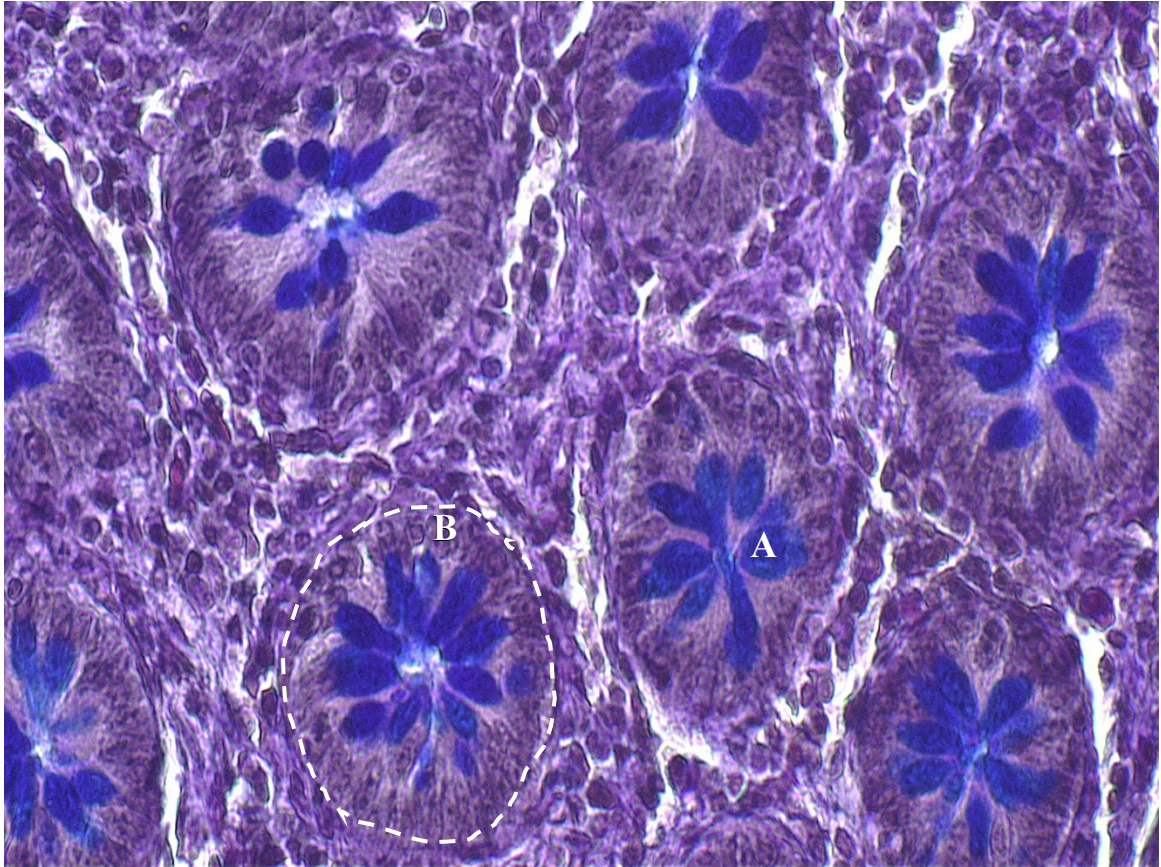


Obrázek 15: Průřez Liebrkühnovými kryptami, zvětšení 400x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018)

A – pohárkové buňky

B – epitelová buňka (jednovrstevný cylindrický epitel)

C – nahromadění eozinofilů v důsledku zánětu



Obrázek 16: Průřez Lieberkühnovými kryptami, zvětšení 400x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)

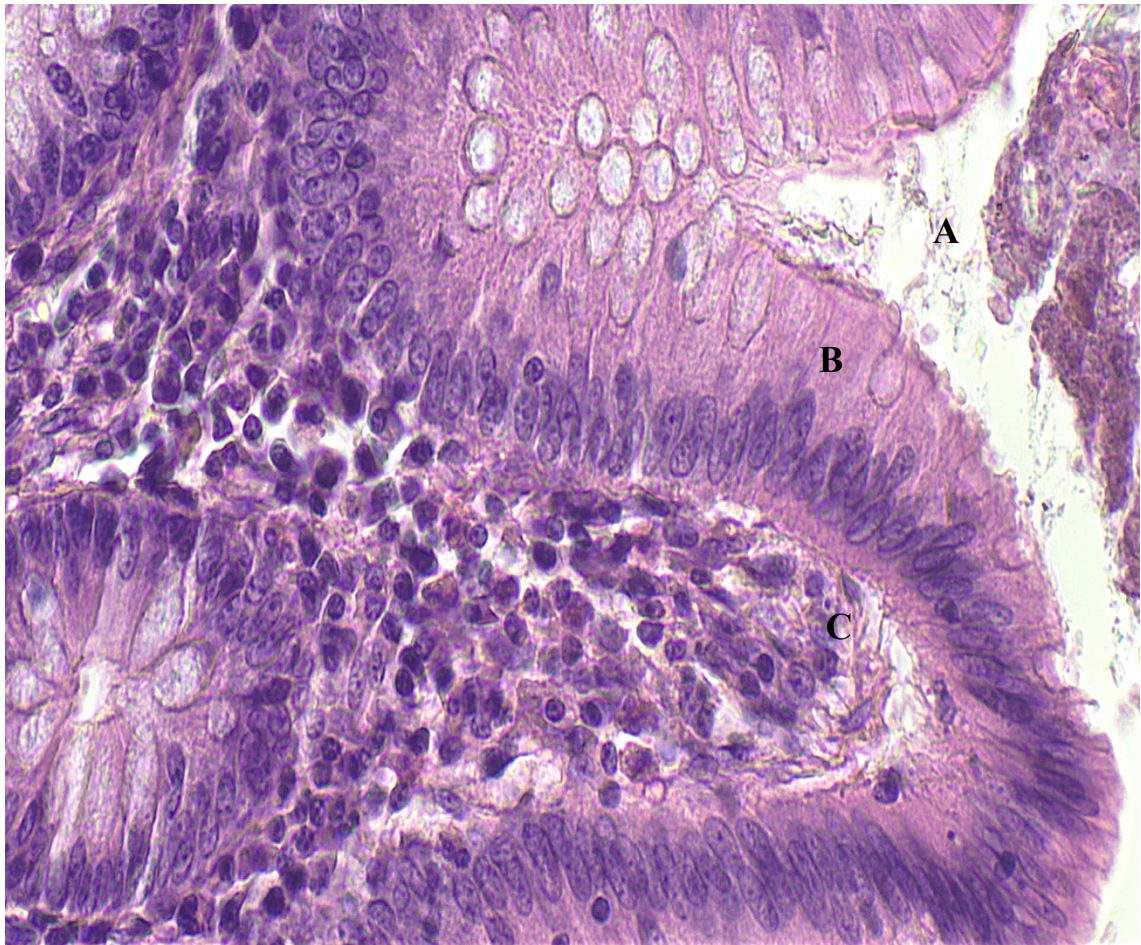
A – modře zbarvené pohárkové buňky produkující hlen (mucin)

B – Lieberkühnova krypta na šikmém řezu



Obrázek 17: Sliznice tlustého střeva, zvětšení 100x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018)

- A – sliznice s Lieberkühnovými kryptami
- B – muscularis mucosae
- C – uzlík lymfatické tkáně
- D – submukosa
- E – přeplněná céva

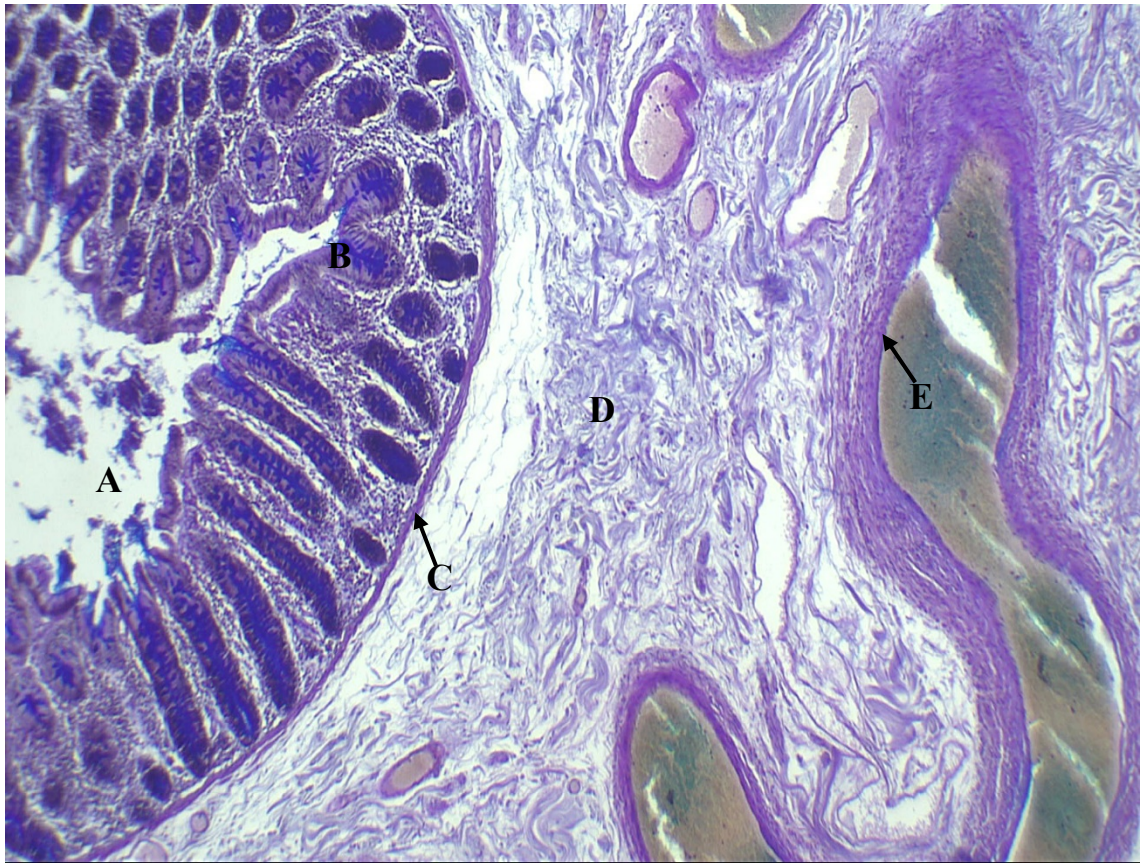


Obrázek 18: Sliznice tlustého střeva zvětšení 400x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018)

A – lumen

B – jednovrstevný cylindrický epitel

C – lamina propria



Obrázek 19: Sliznice tlustého střeva, zvětšení 200x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)

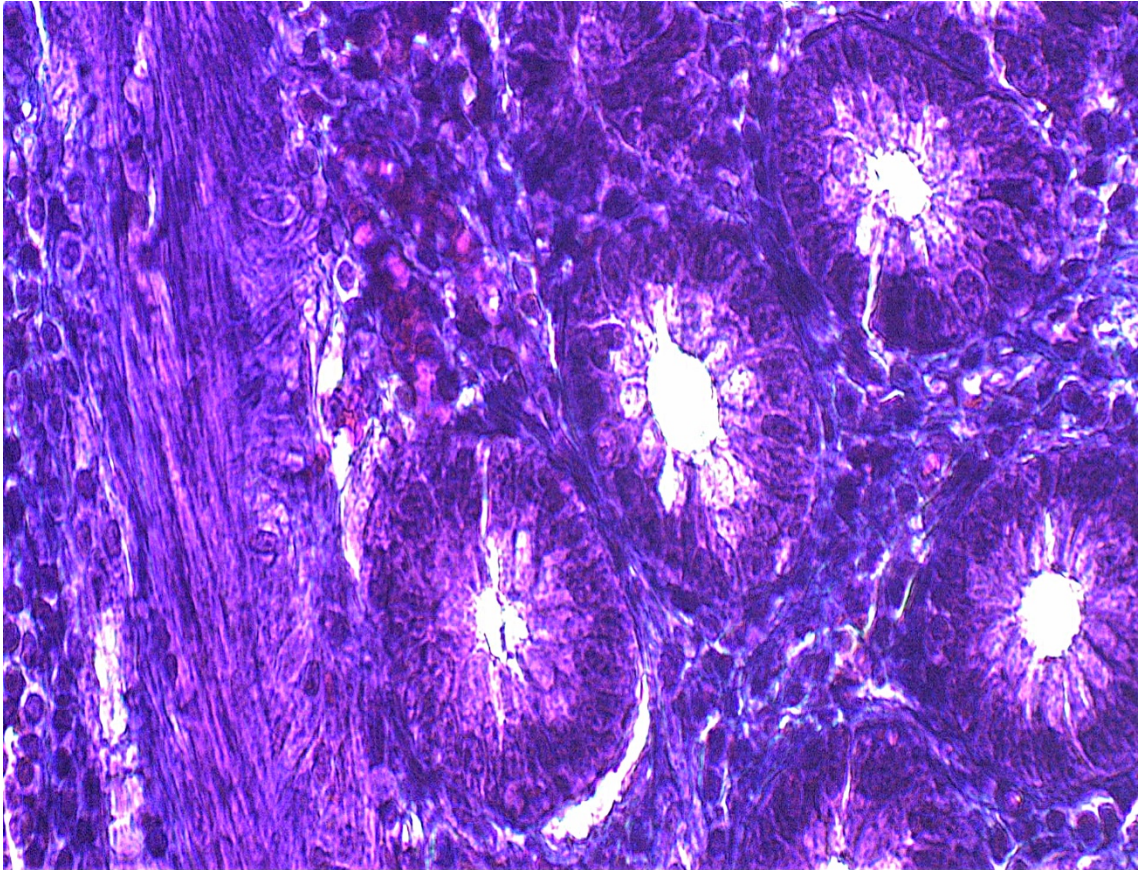
A – lumen

B – sliznice s Lieberkühnovými kryptami, pohárkové buňky jsou zbarveny modře

C – muscularis mucosae

D – submukoza

E – přeplněná céva s okolní svalovinou

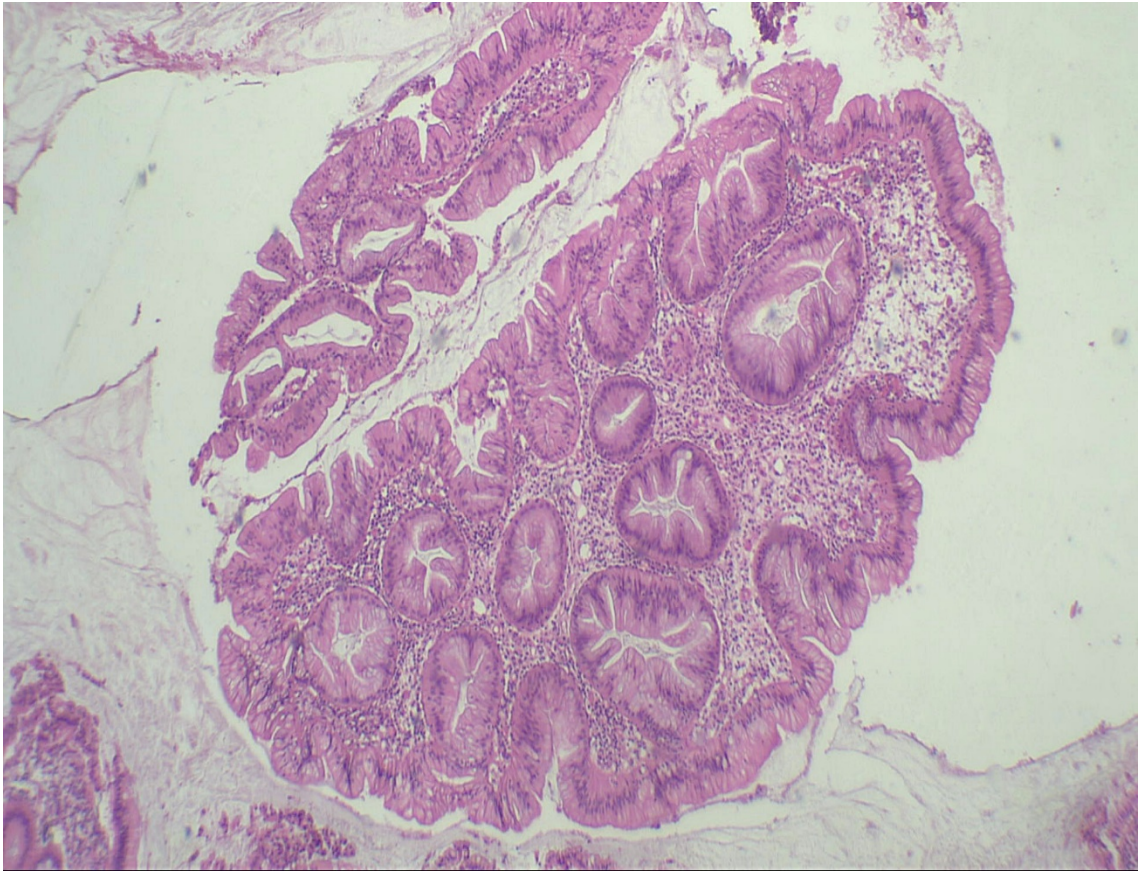


Obrázek 20: Sliznice tlustého střeva s Lieberkühnovými kryptami, zvětšení 400x, barvení MM (Aneta Landecká, 2018)

Barvení metodou Masonův modrý trichrom není vhodné pro zviditelnění struktur tkáně tlustého střeva. Tato metoda je vhodnější při barvení kolagenního vaziva.

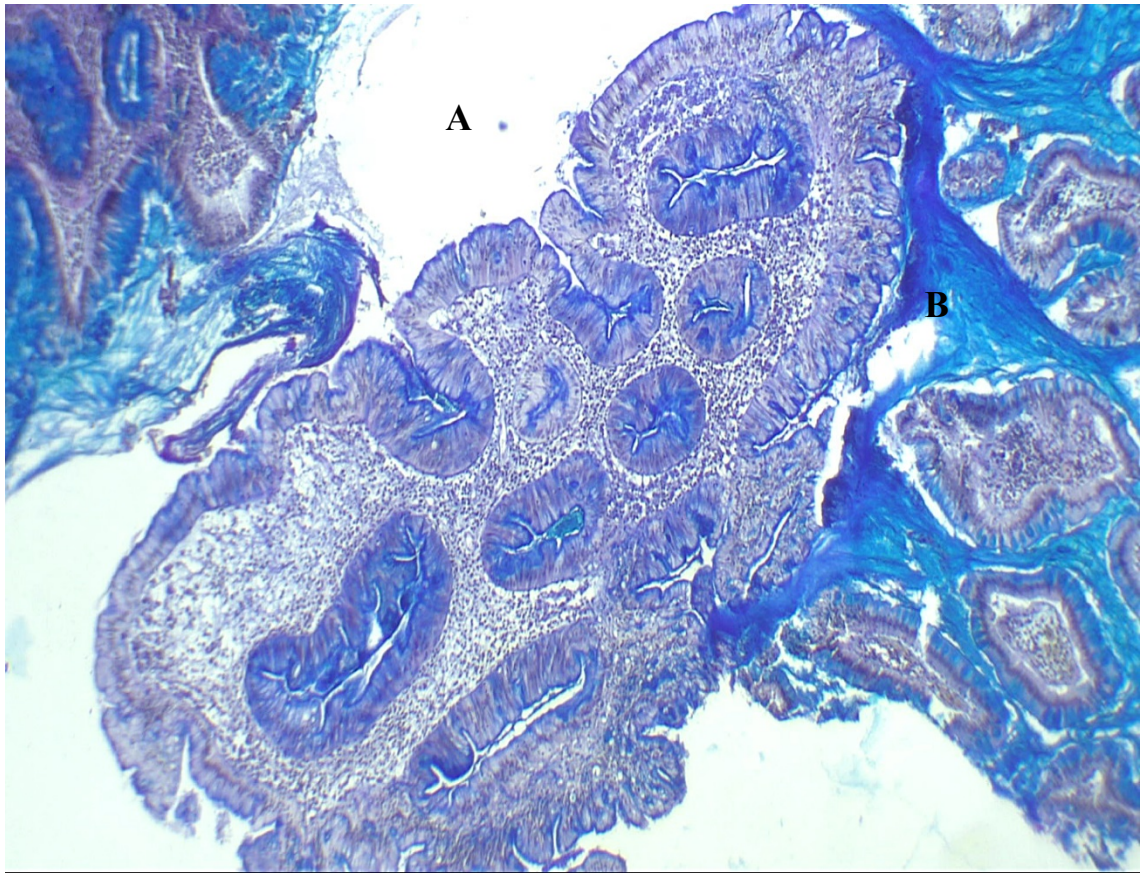
5.2 Preparáty tkáně tlustého střeva s adenokarcinomem

Preparáty jsou zhotovené při tloušťce 3 – 5 μm z resekátu rektosigmoidea pacienta postiženého adenokarcinomem rekta.



Obrázek 21: Adenokarcinom, zvětšení 100x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018)

Část tkáně adenokarcinomu v lumen střeva. Adenokarcinom je tubulární a vysoce diferencovaný téměř k nerozeznání od normální sliznice střeva.



Obrázek 22: Adenokarcinom, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)

Část tkáně vysoce diferencovaného adenokarcinomu. Modře je zbarvený hlen (mucin) a hlenotvorné pohárkové buňky, které jsou částečně zachovány i ve tkáni adenokarcinomu ale růst buněk tvořící kryty je viditelně deformovaný.

A – lumen střeva

B – hlen (mucin)



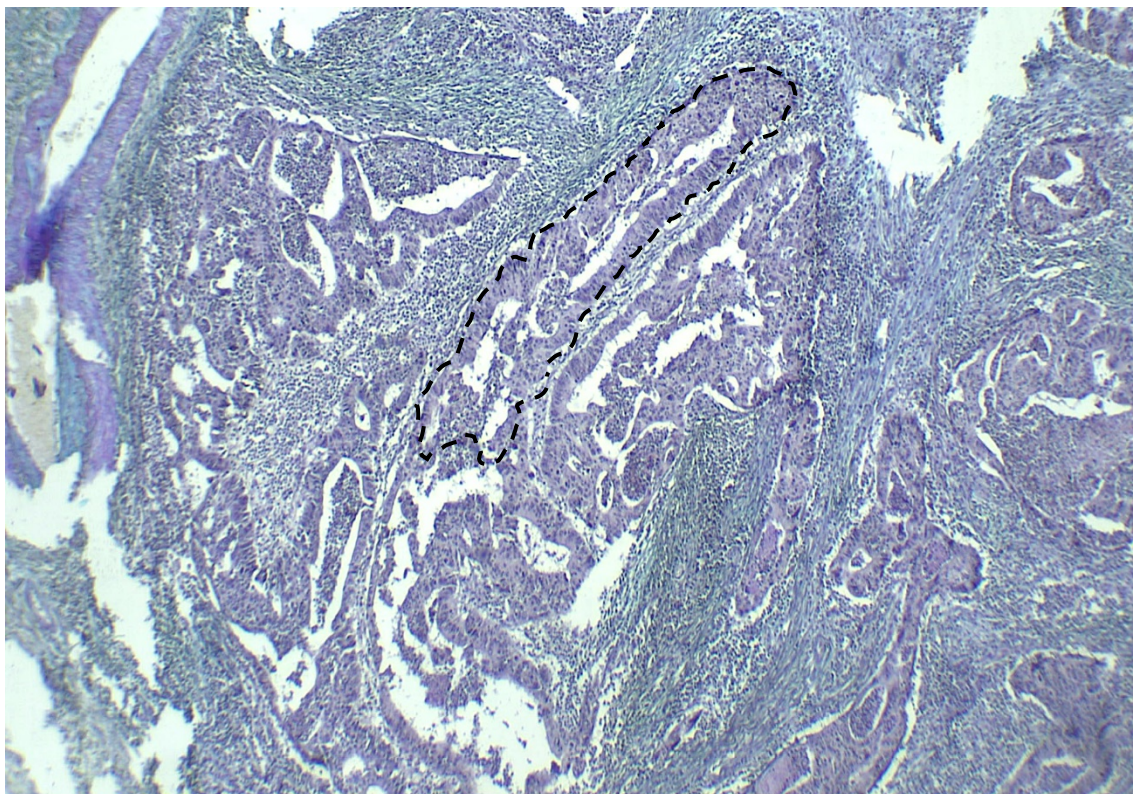
Obrázek 23: Adenokarcinom, zvětšení 200x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018)

A – pohárkové buňky

B – zánětlivá složka obsažená ve sliznici jako reakce na karcinom

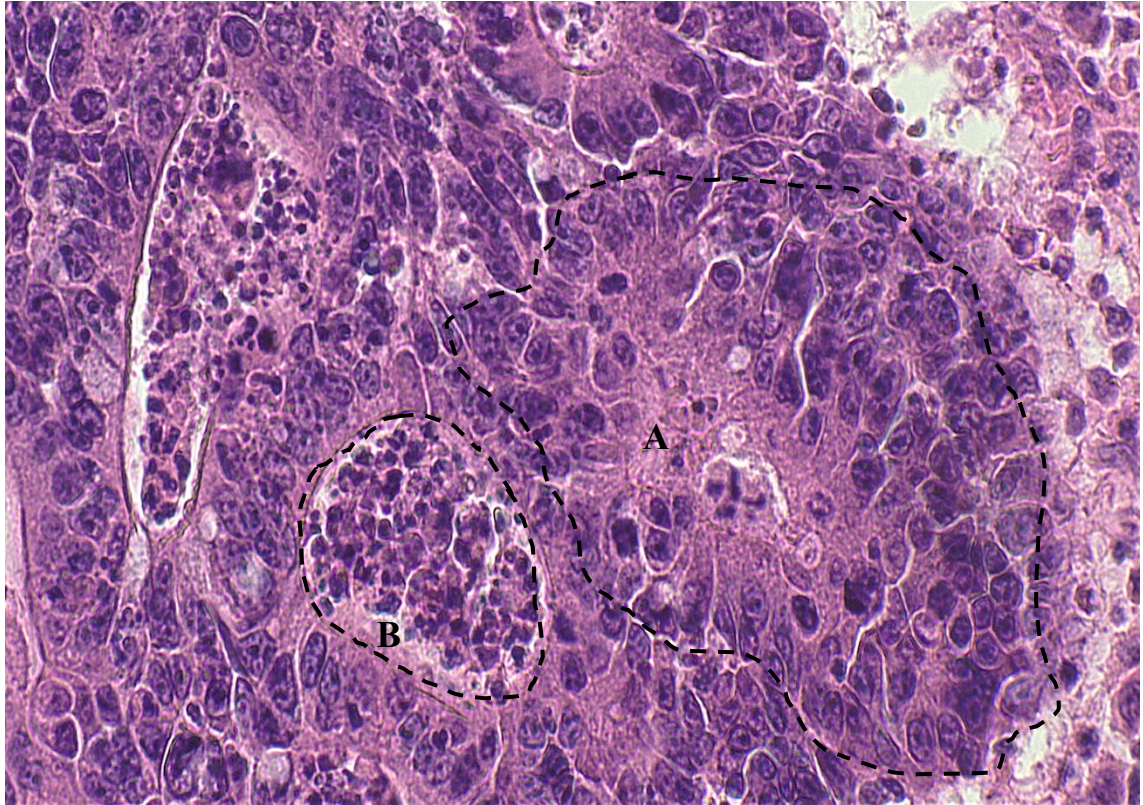
C – jednovrstevný cylindrický epitel

D – submucosa



Obrázek 24: Adenokarcinom, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)

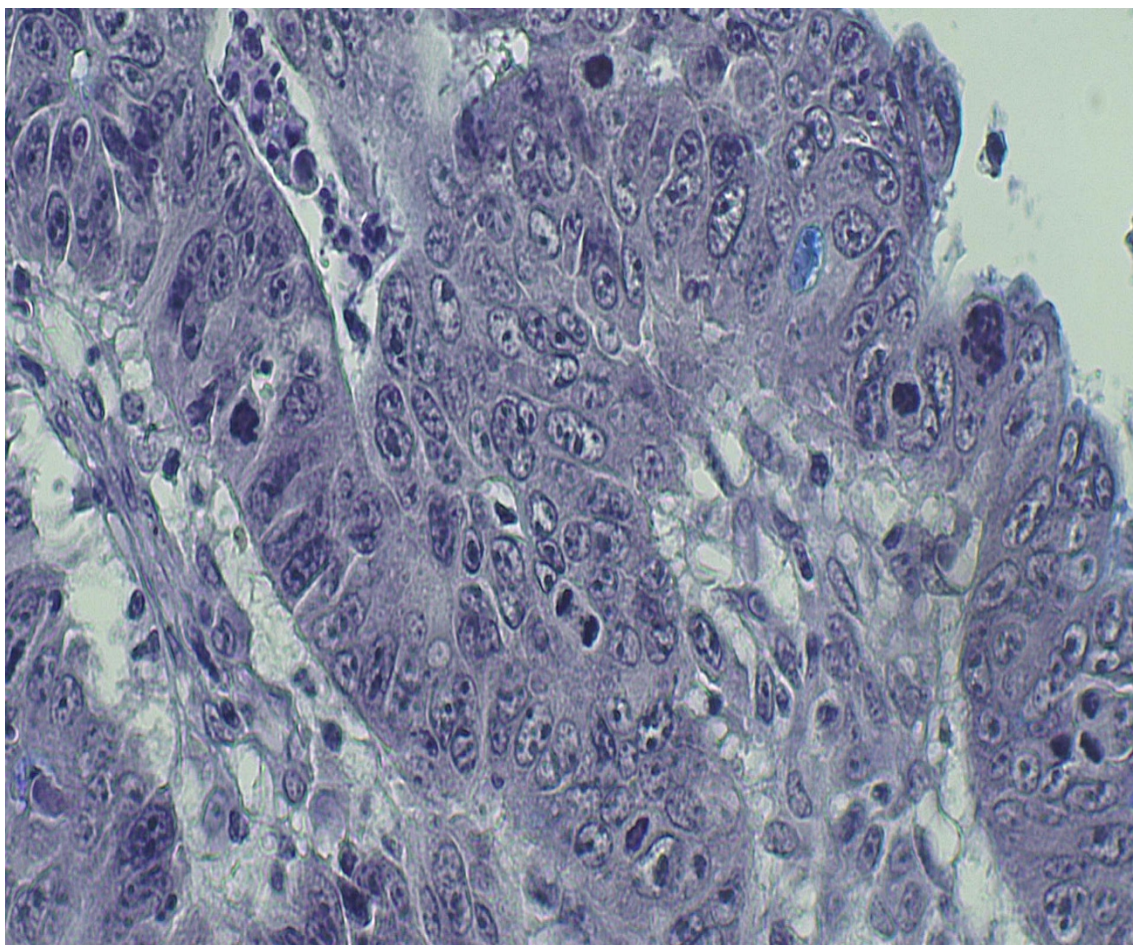
Neuspořádaný růst buněk v adenokarcinomu, které v normální tkáni vytváří Lieberkühnovy krypty. Na tomto snímku je vidět zdeformovaný tvar krypt a ztráta produkce mucinu. Okolí je zaplněno opět zánětlivou složkou.



Obrázek 25: Adenokarcinom, zvětšení 400x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018)

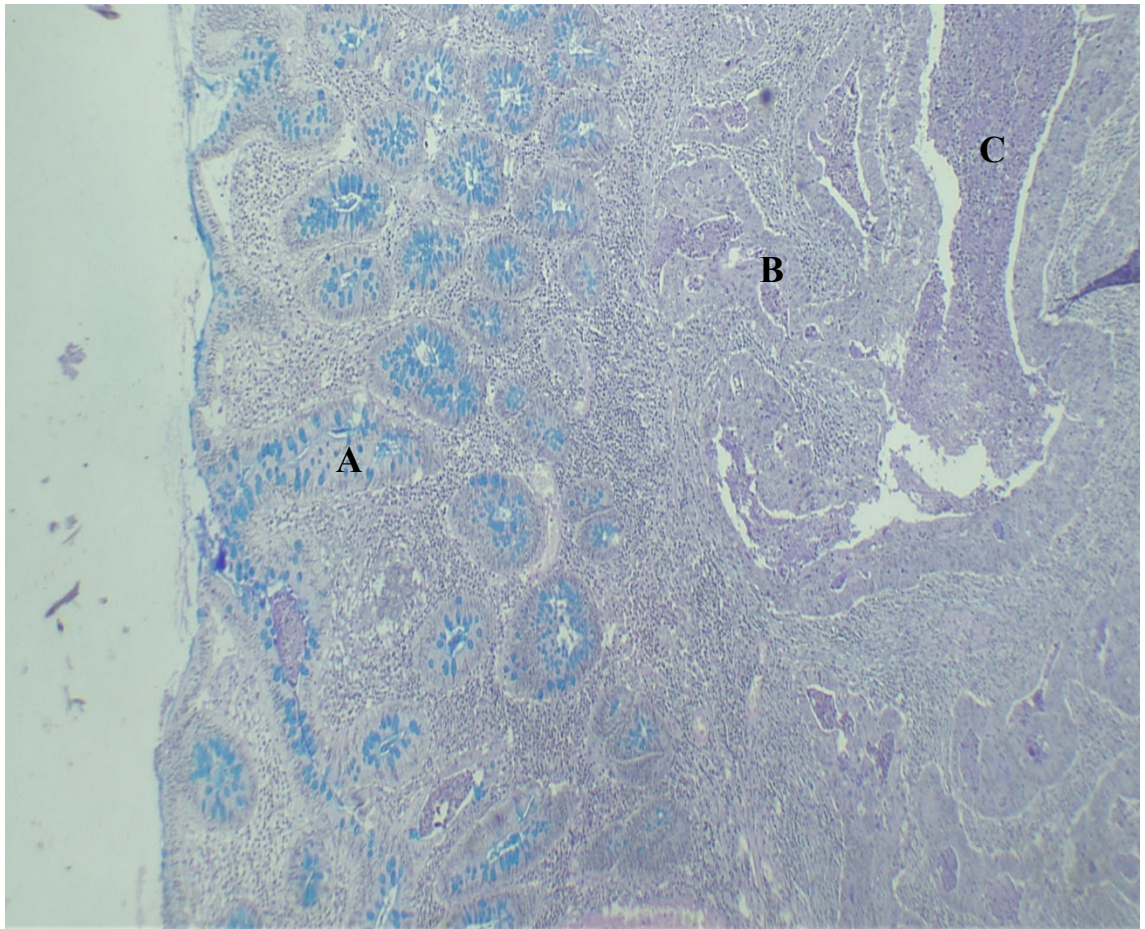
A – deformovaná Lieberkühnova krypta bez pohárkových buněk

B – lumen krypty vyplněno zánětlivou složkou



Obrázek 26: Adenokarcinom, zvětšení 400x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)

Zdeformované krypty ve tkáni postižené adenokarcinomem. Pohárkové buňky neprodukují hlen (mucin) a nejsou modře zviditelněné. V epitelových buňkách se nachází zmnožená jádérka nebo velké množství chromatinu.

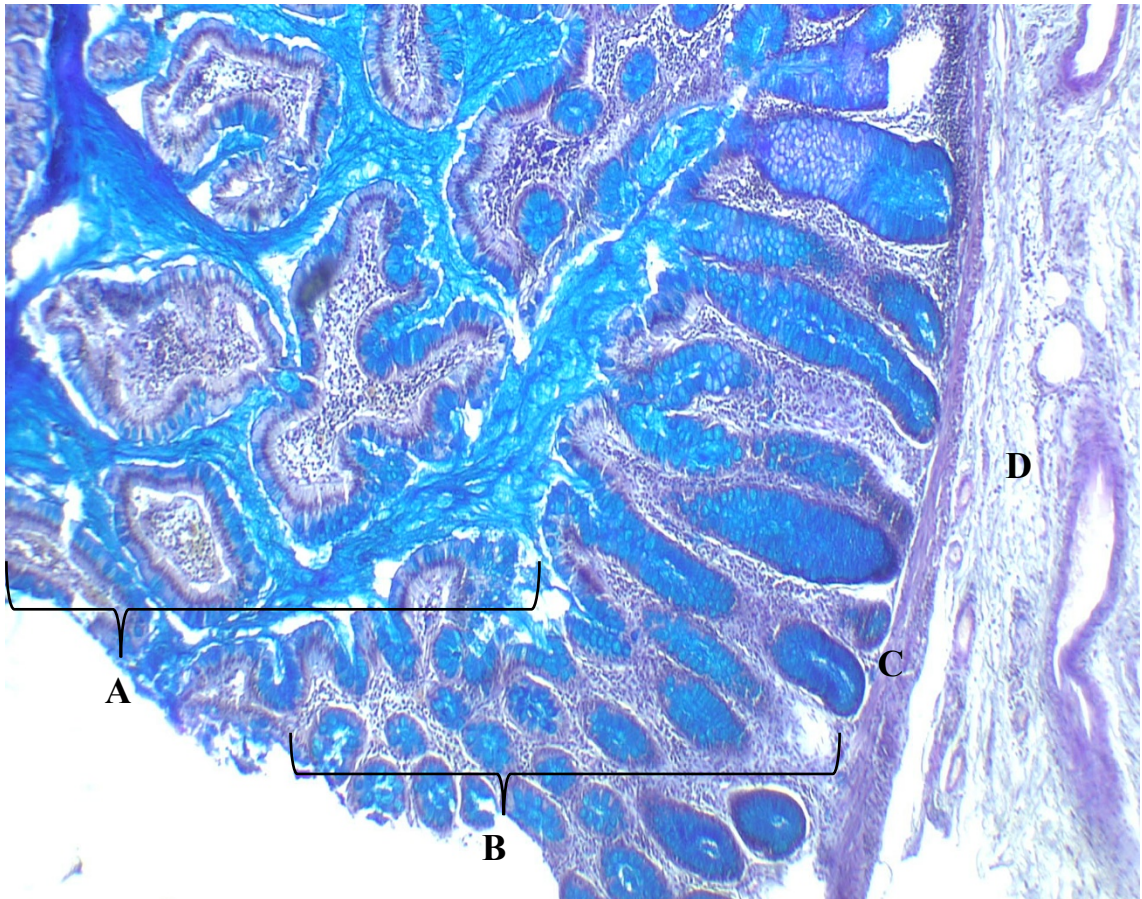


Obrázek 27: Adenokarcinom se zachovanou hlenotvorbou, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)

A – Lieberkühnovy krypty ve sliznici tkáně adenokarcinomu s pohárkovými buňkami, které mají minimálně zachovanou hlenotvorbu (modré zbarvení)

B – deformované Lieberkühnovy krypty, jejichž pohárkové buňky ztratily funkci produkce mucinu

C – lymfatický uzlík



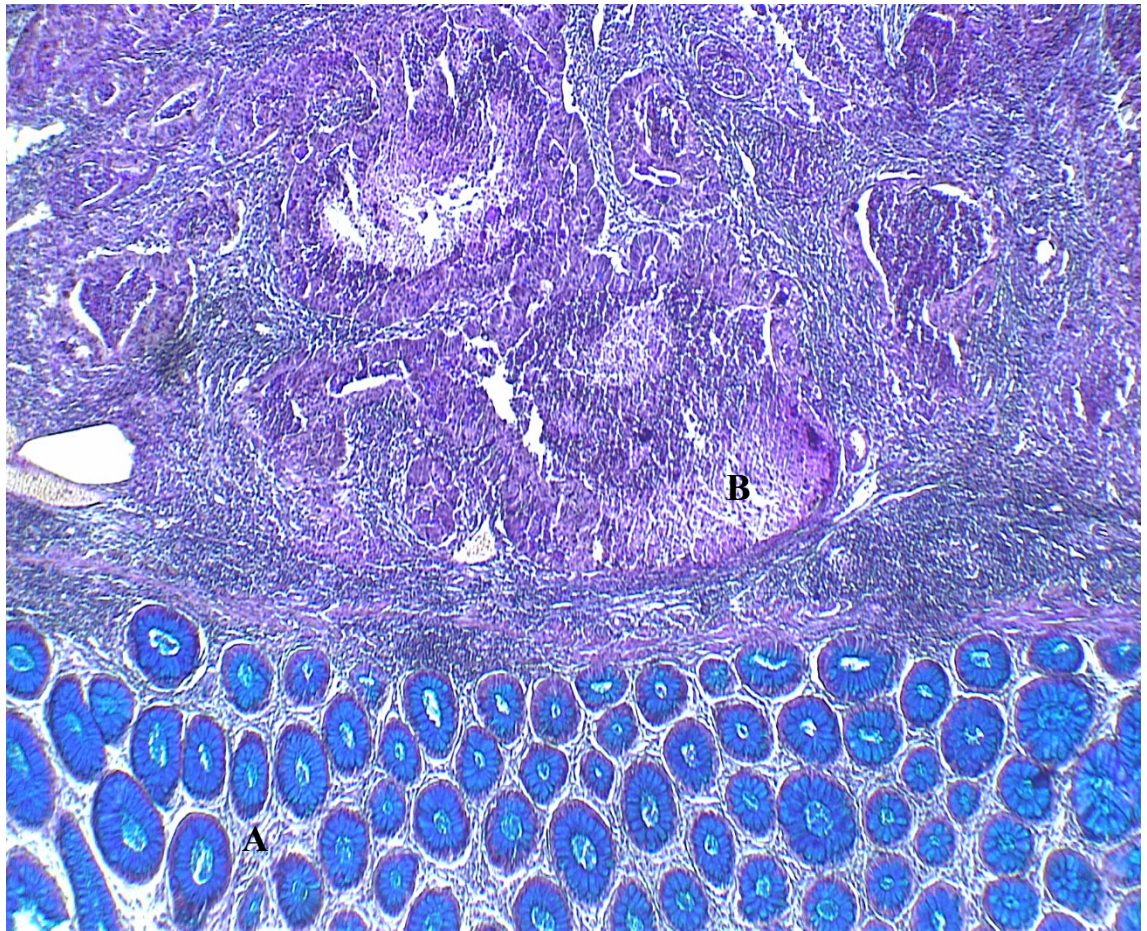
Obrázek 28: Část přechodu adenokarcinomu a normální tkáně, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)

A – Adenokarcinom se deformovanými Lieberkühnovými kryptami, které mají zachovanou hlenotvorbu v pohárkových buňkách. Krypty jsou vyplněny zánětlivou složkou.

B – Normální sliznice přecházející v adenokarcinom. Pohárkové buňky u hranice adenokarcinomu produkují nadbytek hlenu (mucinu).

C – muscularis mucosae

D – submucosa



Obrázek 29: Hranice přechodu normální sliznice a adenokarcinomu, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)

A – normální sliznice

B – adenokarcinom

6 DISKUZE

Zhotovení a mikroskopie histologických preparátů je v současnosti hlavním úkolem oddělení patologické anatomie. Příprava preparátů je uskutečňována pomocí moderních metod v kombinaci s manuální zručností laborantky. Proti zhotovování preparátů v minulosti nebo v méně vybavených laboratořích je práce usnadněna použitím tkáňových automatů, které samy díky programu zajistí odvodnění tkáně, její prosycení intermediem a parafinem. Před nástupem těchto automatů trval ruční proces odvodnění, prosycení intermediem a prosycení parafinem několik hodin. Standardně se v literatuře uvádí, že odvodnění tkáně se provádí pomocí vzestupné řady alkoholů. V laboratoři PAO a při zhotovení preparátů pro účely této bakalářské práce byly použity 3 lázně 96% ethanolu. Tento postup je v laboratoři zvolen jen kvůli úspoře času a nenáročnosti provedení, protože nemusíme ředit různou koncentrací alkoholů, ale používá se přímo alkohol v podobě, v jaké byl dodán od dodavatele [27].

Zalévání parafinových bločků je stejně tak zjednodušeno pomocí zalévacích linek s chladicí plochou, kde mohou bloky ztuhnout za několik minut a jsou připraveny ke krájení tenkých řezů na mikrotomu. Kvalitní ukrojení tenkých řezů je hlavním předpokladem ke zhotovení preparátu. Řezy by měly být, co možná nejtenčí. Standardně krájíme řezy silné 3-5 μm tak, abychom skrojili jednu vrstvu buněk. Protože pokud jsou řezy příliš silné obsahují více vrstev buněk, které se mohou překrývat a je náročnější z těchto řezů určit histologickou diagnózu. Preparáty ze zdravé tkáně tlustého střeva jsou zhotoveny v tloušťce řezů 5 – 8 μm a na obrázku 16 můžeme pozorovat tmavší zbarvení a překrývající se buňky, jejichž struktura není tak dobře zřetelná. Na rozdíl od preparátů z tkáně postižené adenokarcinomem, kde jsou buňky zcela jasně zřetelné v jedné vrstvě jako je vidět na obrázku 26. Při krájení tenkých řezů můžeme čelit různým potížím způsobeným jak zacházením s mikrotomem nebo krájenou tkání. Pokud krájíme příliš silné řezy tak se na žiletce tkáň s parafinem roluje do ruliček, které již nelze napnout. V odborné literatuře se uvádí, že stejný problém nastává v případě nízké teploty v místnosti. Ale při zhotovování preparátů jsem se setkala spíše s opačným případem, kdy teplota v místnosti, respektive teplota parafinového bločku byla vysoká a řezy se na žiletce rolovaly. Pro odstranění této závady bylo možné použít kryospej k rychlejšímu ochlazení bloků nebo uložit bloky ještě na několik dalších minut do mrazničky. V případě příliš nízké teploty parafinových bloků jsem se při krájení tenkých řezů setkala spíše s případem, že se řezy při skrajování drolily a parafin byl vlivem chladu příliš tvrdý. Tuto závadu je možné snadno odstranit tím, že počkáme několik minut s blokem při pokojové

teplotě nebo na blok při skrajování řezů nadýcháme, a tak jeho teplotu zvýšíme. Naopak příliš tenké řezy se mohou snadno trhat při přesunu na vodní hladinu. Řezy se také mohou stlačovat ve varhánky v důsledku špatného sklonu žiletky v úchytu mikrotomu nebo v případě, že je žiletka již otupená. Při krájení tvrdých tkání může nastat situace, kdy žiletka poskakuje po krájeném bloku a tvoří na něm i řezech rýhování. Tvrdé tkáně můžeme ponořit do odvápnovacího roztoku ke změkčení. Při krájení parafinových bloků se vzorky tkáně je důležité také dbát na to, aby tkáň nebyla zcela vykrájena. Bloky i preparáty se archivují po dobu 10ti let [27]. Hlavním důvodem archivace je možnost skrojení dalších preparátů v případě nejasné diagnózy nebo při jejím špatném stanovení.

Další nedílnou součástí histologické laboratoře je barvicí automat, který je schopen obarvit až několik desítek preparátů ve stejnou dobu. Při barvení preparátů pro účely této bakalářské práce barvicí automat použit nebyl, ale v běžném provozu by ruční barvení preparátů prodloužilo jejich zhotovení až dvojnásobně. Obarvené preparáty je nutné zamontovat krycím sklíčkem. Při ručním montování preparátů se používá uzavírací médium, v případě zpracování preparátů této bakalářské práce byl použit Solakryl. Toto montovací médium je ideální kompromis mezi cenou a snadným použitím. Solakryl má vysoký index lomu, jeho použití je snadné, dobře a rychle tuhne na vzduchu. Montování preparátů je proces, který je v laboratořích při zpracování velkého množství vzorků taktéž automatizovaný. Montovací automat je standardně připojen u barvicího automatu a již dobarvené a projasněné preparáty se automaticky posunují k montování. Překrytí preparátů v automatu probíhá pomocí speciálně vytvořené pásky s již naneseným médiem.

Základním barvením histologických preparátů je metoda Hematoxylin – eosin (HE). Jádra jsou zbarvena modře, svalovina červeně, kolagenní vazivo a cytoplasma odstíny růžové. Metoda HE se používá jako základní barvení všech preparátů, protože je schopná dostatečně zviditelnit požadované struktury a je i cenově přijatelná. Cena 1 litru eosinu je cca 1200 Kč a 1 litru Mayerova hematoxylinu cca 2500 Kč. Oproti tomu je například cena alciánové modři 8200 Kč za 1 litr velice vysoká. Z tohoto důvodu řadíme ostatní barvení (Kombi, MM atd.) mezi tzv. speciální. Tyto speciální barvení používáme jen u vybraných preparátů, pokud patolog nemůže dobře a kvalitně stanovit diagnózu pouze z preparátů barvených metodou HE. V běžném provozu histologické laboratoře Oblastní nemocnice Kladno je speciální barvení používáno na pokyn patologa. Barvení Kombi je možné barvit pomocí barvicího automatu, ostatní speciální barvení se připravují ručně a jsou závislá na zručnosti laborantky.

V této bakalářské práci bylo mimo speciálního barvení Kombi, použito i barvení Massonovým modrým trichromem (MM) jako ukázka toho, že je důležité zvolit vhodné barvení preparátů podle barvené struktury. Modrý trichrom barví jádra modročerně a vazivo modře. Díky dobrým vlastnostem k barvení vaziva se hodí především k barvení preparátů vazivových a svalových tkání na příklad cévy nebo šlachy.

Dalším použitým speciálním barvením je metoda Kombi, která kombinuje barvení alciánovou modří a PAS reakci. Jádra a kyselé mukopolysacharidy jsou zbarvené modře až modrozeleně, díky tomu můžeme v mikroskopickém pozorování preparátů vidět pohárkové buňky, které jsou produkcí mucinu modře zbarveny a v základním barvení HE vypadají pouze jako prázdné prostory.

7 ZÁVĚR

Pacientů postižených kolorektálním karcinomem stále přibývá i v populaci pacientů v produktivním věku. Jedná se o závažné onemocnění, které se často vyskytuje nejen v České republice ale i ve světě. Z tohoto důvodu se klade velký důraz na prevenci a časnou diagnostiku kolorektálního karcinomu. Každý praktický lékař v Evropě v průměru zachytí 1 až 2 pacienty za rok s nově zjištěným KRK. Vyšší výskyt pozorujeme u mužů než žen hlavně od poloviny 90. let. Z hlediska stagingu neubývá karcinomů diagnostikovaných ve 3. a 4. stádiu. I přes již několik let trvající preventivní programy se nezměnilo rozložení stádií KRK, ač je časně (stádium 0 – 1) diagnostikováno 60% nálezů. V současnosti žije v České republice asi 55 000 lidí s onemocněním kolorektálního karcinomu. Z těchto důvodů je velice potřebná včasná a přesná diagnostika, které je v neposlední řadě součástí mikroskopické vyšetření preparátů zhotovených z bioptických vzorků [1].

V teoretické části bakalářské práce byl čtenář seznámen s anatomií, fyziologií a histologií tlustého střeva, problematikou onemocnění kolorektálním karcinomem, jeho vznikem a rozdělením karcinomů ve sporadické a familiární formě a seznámen se základním screeningovým programem v České republice.

Cílem praktické části bakalářské práce bylo zhotovení histologických preparátů ze zdravé tkáně tlustého střeva a z tkáně postižené kolorektálním karcinomem. Mikroskopické struktury byly zviditelněny pomocí několika barvicích technik i v odlišné tloušťce řezů. Preparáty byly fotograficky zdokumentovány.

Cíle určené v této práci se podařilo splnit. Pozorování mikroskopických preparátů vedlo k důkladnému prostudování struktur zdravé tkáně i patologických struktur vznikajících v důsledku onemocnění kolorektálním karcinomem. Ruční zpracování všech preparátů vedlo k získání praktických zkušeností v profesi zdravotní laborant. Zhotovené preparáty mohou sloužit k názorné ukázce a porovnání zdravé tkáně tlustého střeva a tkáně postižené adenokarcinomem.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

%	procenta
°C	stupně Celsia
µm	mikrometr
APC	adenomatous polyposis coli, gen určující stejnojmenný protein
BMPR1A	bone morphogenetic protein receptor type 1A
CD44	transmembránový glykoprotein fyziologicky přítomný na leukocytech, který zajišťuje jejich adhezi k endoteliím; uplatňuje se také při hematogenním metastazování karcinomu
cm	centimetr
CNS	centrální nervová soustava
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DCC	deleted in colorectal carcinoma; gen určující stejnojmenný protein
FAP	familiární adenomatózní polypóza
g	gram
G1	období buněčného cyklu navazující na mitózu
GALT	Gut-associated lymphoid tissue; nakupení lymfatické tkáně ve sliznici střeva
GIT	gastrointestinální trakt
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor; faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů
HE	Hematoxylin-eosin
HMPS	smíšený polypózní syndrom
HNPCC	hereditární nepolypózní kolorektální karcinom
IgA	imunoglobulin A
JPS	juvenilní polypóza
Ki-ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene, gen určující stejnojmenný protein; prediktor chabé odpovědi na léčbu
Kombi	Kombinovaná metoda alciánové modři a PAS
KRK	kolorektální karcinom
l	litr

m	metr
M	metastases; metastázy
MM	Massonův modrý trichrom
MADH4	mothers against decapentapletic homolog 4
mg	miligram
ml	mililitr
N	noduli; uzliny
ON Kladno	Oblastní nemocnice Kladno
PAO	Patologicko – anatomické oddělení
PAS	peroxid acid Schiff
PDGF	platelet derived growth factor; dimerický glykoproteinový růstový faktor
PHTS	PTEN-hamartomatózní tumorový syndrom
PI3K/Akt	intracelulární signalizační dráha důležitá pro buněčný cyklus
PJS	Pentzův-Jeghersův syndrom
PTEN	phosphatase and tensin homolog
T	tumor; nádor
TAF	tumor angiogenesis factor; faktor stimulující angiogenezi
TNM	tumor-noduli-metastases
TOKS	test okultního krvácení ve stolici
VEGF	vaskulární růstový endotelový faktor

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SEIFERT, Bohumil, Norbert KRÁL, Ondřej MÁJEK a Štěpán SUCHÁNEK. *Screening kolorektálního karcinomu: revue littéraire mensuelle*. 2., rozšířené vydání. Praha: Maxdorf, 2015. Jessenius. ISBN 978-80-7345-444-9.
- [2] SUCHÁNEK, Štěpán, Jaroslava BARKMANOVÁ a Přemysl FRIČ. *Rakovina tlustého střeva a konečníku: prevence zabírá*. 1. vyd. Praha: Mladá fronta, 2011. Lékař a pacient. ISBN 978-80-204-2474-7.
- [3] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. 2., upr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2001. ISBN 80-716-9970-5.
- [4] ČECH, Svatopluk a Drahomír HORKÝ. *Histologie a mikroskopická anatomie pro bakaláře*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2004, 138 s. ISBN 978-802-1035-133.
- [5] TICHÝ, František. *Histologie: cytologie a obecná histologie*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2000, 165 s. ISBN 80-851-1486-0.
- [6] ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Praha: Grada, 2013, 497 s. ISBN 978-80-247-4788-0.
- [7] KONRÁDOVÁ, Václava. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany, 2000, 291 s. ISBN 80-860-2280-3.
- [8] DYLEVSKÝ, Ivan. *Funkční anatomie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009, 544 s. ISBN 978-80-247-3240-4.
- [9] LÜLLMANN-RAUCH, Renate. *Histologie*. 1. české vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3729-4.
- [10] CARNEIRO, José a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Vyd. v ČR 1. Jinočany, 1997, 502 s. ISBN 80-857-8737-7.
- [11] ROKYTA, Richard a Jana SLAVÍKOVÁ. *Fyziologie a patologická fyziologie: pro klinickou praxi*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, 2015. ISBN 978-80-247-4867-2.
- [12] ŠVÍGLEROVÁ, Jitka a Jana SLAVÍKOVÁ. *Fyziologie gastrointestinálního traktu*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2008, 110 s. ISBN 978-80-246-1526-4.
- [13] POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Obecná patologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-773-8.
- [14] REJTHAR, Aleš a Bořivoj VOJTĚŠEK. *Obecná patologie nádorového růstu*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002, 208 s. ISBN 80-247-0238-X.
- [15] MAČÁK, Jiří, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie*. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3530-6.
- [16] NEČAS, Emanuel. *Obecná patologická fyziologie*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2000, 377 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0051-X.

- [17] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Vyd. 1. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, 185 s. ISBN 80-701-3202-7.
- [18] BÁRTOVÁ, Jarmila. *Přehled patologie*. Vydání první. V Praze: Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, 2015, 191 s. ISBN 978-80-246-2745-8.
- [19] MIŘEJOVSKÝ, Pavel a Blahoslav BEDNÁŘ. *Obecná patologie*. 2. přeprac. vyd. Praha: Karolinum, 1997, 83 s. ISBN 80-718-4468-3.
- [20] HOLUBEC, Luboš. *Kolorektální karcinom: současné možnosti diagnostiky a léčby*. 1. vyd. Praha: Grada, 2004, 194 s. ISBN 80-247-0636-9.
- [21] FEIT, Josef. *Atlases* [online]. Brno: muni, 2016 [cit. 2018-02-03]. Dostupné z: https://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+pgit+colon.html#polypcolon+adenopol+adenopoltubul
- [22] KLENER, Pavel. *Základy klinické onkologie*. 1. vyd. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-716-5.
- [23] DUŠEK, Ladislav. *Epidemiologie, prevence a léčba kolorektálního karcinomu dle dostupných českých a mezinárodních dat*. Vyd.1. Praha: Fakultní nemocnice v Motole, 2012, 199 s. ISBN 978-80-87347-07-2.
- [24] VYZULA, Rostislav a Jan ŽALOUDEK. *Rakovina tlustého střeva a konečníku: vybrané kapitoly*. Praha: Maxdorf, 2007, 287 s. Jessenius. ISBN 978-80-7345-140-0.
- [25] JABLONSKÁ, Markéta. *Kolorektální karcinom: časná diagnóza a prevence*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000, 455 s. ISBN 80-716-9777-X.
- [26] HORVÁTH, Alex. *Práca s bioptickým materiálom. Martin*. 1. Liptovský Mikuláš: Osveta, 1988, 227 s. Edícia pre stredných zdravotníckych pracovníkov. ISBN .
- [27] SEKANINOVÁ, Aneta, Dis. *Laboratorní příručka oddělení patologické anatomie*. Kladno, 2017.
- [28] MAŇÁKOVÁ, Eva. *Metody v histologii*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2001, 54 s. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0230-X.
- [29] *Solakryl* [online]. Kolín: Lučební závody Draslavka a. s., 2017 [cit. 2018-02-08]. Dostupné z: <http://www.solakryl.cz/solakryl-bmx>
- [30] *Bamed s. r. o.* [online]. Litvínovice: Bamed s. r. o., 2005-2018 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z: <http://www.bamed.cz/pristroje.php?zaznam=227>
- [31] *Leica biosystems* [online]. Nussloch: Leica Biosystems, 2018 [cit. 2018-03-06]. Dostupné z: <https://www.leicabiosystems.com/histology-equipment/sliding-and-vibrating-blade-microtomes/products/leica-sm2010-r/>
- [32] MARTÍNEK, Jindřich a Zdeněk VACEK. *Histologický atlas*. Praha: Grada, 2009, 134 s. ISBN 978-80-247-2393-8.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Tlusté střevo a jeho poloha vůči kličkám jejunioilea (schéma) [6].....	12
Obrázek 2 : Stavba sliznice tlustého střeva [6]	17
Obrázek 3: Sliznice tračníku s kryptami (K) [9]	18
Obrázek 4: Oblasti epitelu análního kanálu [9].....	19
Obrázek 5: Dysplazie, karcinom in situ, karcinom invazivní [18].....	23
Obrázek 6: Schéma screeningového programu KRK (50-54 let) [23] (upraveno)	30
Obrázek 7: Schéma screeningového programu KRK (nad 55 let) [23] (upraveno).....	31
Obrázek 8: Tkáňový automat Bamed TPC 15 duo [30]	35
Obrázek 9: Zalévací linka (Aneta Landecká, 2018).....	35
Obrázek 10: Sáňkový mikrotom [31]	36
Obrázek 11: Deparafinace tenkých řezů v lázni xylenu (Aneta Landecká, 2018).....	38
Obrázek 12: Barvicí roztok Mayerova hematoxylinu a pracovní roztok eosinu (Aneta Landecká, 2018).....	38
Obrázek 13: Sliznice tlustého střeva, průřez Lieberkühnovými kryptami, zvětšení 200x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018).....	42
Obrázek 14: Sliznice tlustého střeva, průřez Lieberkühnovými kryptami, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)	43
Obrázek 15: Průřez Liebrkühnovými kryptami, zvětšení 400x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018).....	44
Obrázek 16: Průřez Lieberkühnovými kryptami, zvětšení 400x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018).....	45
Obrázek 17: Sliznice tlustého střeva, zvětšení 100x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018)	46
Obrázek 18: Sliznice tlustého střeva zvětšení 400x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018)	47
Obrázek 19: Sliznice tlustého střeva, zvětšení 200x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018).....	48
Obrázek 20: Sliznice tlustého střeva s Lieberkühnovými kryptami, zvětšení 400x, barvení MM (Aneta Landecká, 2018).....	49
Obrázek 21: Adenokarcinom, zvětšení 100x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018).....	50
Obrázek 22: Adenokarcinom, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018) 51	

Obrázek 23: Adenokarcinom, zvětšení 200x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018).....	52
Obrázek 24: Adenokarcinom, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)	53
Obrázek 25: Adenokarcinom, zvětšení 400x, barvení HE (Aneta Landecká, 2018).....	54
Obrázek 26: Adenokarcinom, zvětšení 400x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)	55
Obrázek 27: Adenokarcinom se zachovanou hlenotvorbou, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018).....	56
Obrázek 28: Část přechodu adenokarcinomu a normální tkáně, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018).....	57
Obrázek 29: Hranice přechodu normální sliznice a adenokarcinomu, zvětšení 100x, barvení Kombi (Aneta Landecká, 2018)	58

SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 Klasifikační systém TNM.....	26
Tabulka 2 Stadium malignizovaného adenomu [25].....	28