UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A LÉKAŘSKÝCH VĚD

Studijní program: ZDRAVOTNICKÁ BIOANALYTIKA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ ENDOSKOPICKÝCH LÉZÍ GASTOINTESTINÁLNÍHO TRAKTU

MONIKA TŮMOVÁ

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, CSc. za vedení a pomoc při zpracování bakalářské práce. Další poděkování patří MUDr. Janě Maluškové, RNDr. Aleně Lodererové za odborné konzultace, připomínky a cenné rady. Další velké poděkování též patří mé rodině, která mě podporovala ve studiu.

Čestné prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorských dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Autor	Tůmová Monika
Název práce	Histologické zpracování endoskopických lézí gastrointestinálního traktu
Typ práce	Bakalářská práce
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.
Vysoká škola	Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Studijní program – obor	Zdravotnická bioanalytika – zdravotní laborant
Pracoviště	Pracoviště klinické a transplantační patologie, IKEM
Rok obhájení	2018

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je stručné seznámení s komplexním zpracováním vzorků získaných při endoskopických vyšetřeních gastrointestinálního traktu se zvláštním zaměřením na zpracování endoskopických resekátů získaných při endoskopické resekci či endoskopické submukózní disekci.

Práce obsahuje stručné seznámení se základní histologickou stavbou gastrointestinálního traktu. Popis jednotlivých endoskopických léčebných metod jako je endoskopická mukózní resekce, endoskopická submukózní disekce a radiofrekvenční ablace.

Přehled kompletního histologického zpracování pomocí histochemických barvení hematoxylin – eosin, PAS reakce se Schiffovým činidlem a alciánovou modří se Schiffovým činidlem. Pro komplexní vyhodnocení endoskopických vzorků a jejich následného hodnocení je též důležitý imunohistochemický průkaz antigenů. Tato práce popisuje základní používané antigeny typu CD 31, podoplanin (D2-40), aktin (SMA) a p53.

V závěru práce je diskutována důležitost správné techniky odběru a precizního histologického zpracování endoskopických vzorků pro stanovení přesné diagnózy, jejíž znalost je důležitá pro volbu následné léčby pacienta.

Klíčová slova: endoskopická resekce, léze gastrointestinálního traktu, hematoxylin-eosin, PAS reakce, alciánová modř, imunohistochemický průkaz

Abstract

The aim of this bachelor thesis is a brief introduction to the complex processing of the tissue samples obtained by endoscopic biopsy of the gastrointestinal tract with a special focus on the treatment of endoscopic specimens obtained by endoscopic resection or endoscopic submucosal dissection.

My work consists of a brief introduction to the gastrointestinal tract histology and description of therapeutic endoscopic methods such as endoscopic mucosal resection, endoscopic submucosal dissection, and radiofrequency ablation.

Additionally, an overview of the most important histochemical staining methods (hematoxylin - eosin, PAS reaction with Schiff 's reagent, and alcian blue with Schiff' s reagent), as well as immunohistochemical detection of antigens in the tissue samples is included. This work is focused on the widely used antigens CD31, podoplanin (D2-40), smooth muscle actin (SMA), and p53.

At the end of the thesis, I discuss the importance of correct sampling techniques and accurate histological processing of endoscopic specimens for determining a proper diagnosis, an essential prerequisite for selecting of an appropriate therapeutic method.

Keywords: endoscopic resection, gastrointestinal tract lesion, hematoxylin-eosin, PAS reaction, alcian blue, immunohistochemical detection

Obsah

1. ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE – CÍL PRÁCE ..... - 7 -

2. ÚVOD ..... - 8 -

3. TEORETICKÁ ČÁST ..... - 9 -

3.1. HISTOLOGIE GASTROINTESTINÁLNÍHO TRAKTU ..... - 9 -
3.2. OBECNÁ HISTOLOGICKÁ STAVBA TRÁVICÍ TRUBICE ..... - 9 -
3.3. HISTOLOGICKÁ STAVBA JÍCNU ..... - 12 -
4.1. KOLONOSKOPIE ..... - 13 -
4.2. GASTROSKOPIE ..... - 13 -
4.3. INDIKACE K PROVEDENÍ KOLONOSKOPIE A GASTROSKOPIE ..... - 13 -
4.3.1. Vzorky z gastrointestinálního traktu ..... - 14 -

5. METODY ENDOSKOPICKÉ LÉČBY ..... - 15 -

5.1. ENDOSKOPICKÁ MUKÓZNÍ RESEKCE (EMR) ..... - 15 -
5.2. ENDOSKOPICKÁ SUBMUKÓZNÍ DISEKCE (ESD) ..... - 16 -
5.3. RADIOFREKVENČNÍ ABLACE (RFA) ..... - 17 -

6. LÉZE GIT S MOŽNOSTÍ ENDOSKOPICKÉ LÉČBY ..... - 18 -

6.1. BARRETTŮV JÍCEN ..... - 18 -
6.1.1. Barrettův jícen bez dysplazie ..... - 18 -
6.1.2. Barrettův jícen s nízkým stupněm dysplazie ..... - 19 -
6.1.3. Barrettův jícen s vysokým stupněm dysplazie ..... - 19 -
6.2. ČASNÝ ADENOKARCINOM JÍCNU V TERÉNU BARRETTOVA JÍCNU I BEZ BARRETTOVA JÍCNU ..... - 20 -
6.3. DLAŽDICOBUNĚČNÉ NEOPLAZIE JÍCNU ..... - 20 -
6.3.1. Dlaždicobuněčné neoplazie s nízkým stupněm dysplazie ..... - 20 -
6.3.2. Dlaždicobuněčné neoplazie s vysokým stupněm dysplazie ..... - 20 -
6.3.3. Časný dlaždicobuněčný karcinom ..... - 21 -
6.4. MEZENCHYMOVÉ NÁDORY JÍCNU ..... - 21 -
6.5. LÉZE ŽALUDKU ..... - 21 -
6.6. LÉZE TLUSTÉHO STŘEVA ..... - 21 -

7. PRAKTICKÁ ČÁST ..... - 22 -

7.1. HISTOLOGICKÉ ZPRACOVÁNÍ TKÁNÍ ..... - 22 -
7.2. ODBĚR MATERIÁLU ..... - 22 -
7.3. ZPRACOVÁNÍ A PŘIKROJENÍ VZORKŮ Z ENDOSKOPICKÉ RESEKCE ..... - 24 -
7.4. FIXACE TKÁNĚ ..... - 25 -
7.5. PŘEVEDENÍ TKÁNĚ DO PARAFÍNU ..... - 25 -
7.5.1. Odvodnění ..... - 26 -
7.5.2. Prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafín ..... - 26 -
7.5.3. Prosycení tkáně parafínem ..... - 26 -
7.5.4. Zalití tkáně do parafínu ..... - 29 -

8. KRÁJENÍ ..... - 30 -

9. METODICKÁ ČÁST ..... - 31 -

9.1. BARVENÍ HISTOLOGICKÝCH PREPARÁTŮ ..... - 31 -
9.2. DEPARAFINACE A ZAVODNĚNÍ HISTOLOGICKÝCH ŘEZŮ ..... - 31 -
9.3. VLASTNÍ BARVENÍ ..... - 32 -
9.3.1. Hematoxylin – eosin ..... - 32 -
9.3.1.1. Pracovní postup barvení hematoxylin – eosin ..... - 32 -
9.3.1.2. Příprava roztoků pro barvení hematoxylin – eosin ..... - 33 -
9.3.1.3. Výsledky barvení ..... - 34 -
9.3.2. PAS reakce se Schiffovým činidlem ..... - 34 -
9.3.2.1. Pracovní postup metody PAS reakce ..... - 34 -
9.3.2.2. Příprava roztoků k metodě PAS reakce ..... - 35 -
9.3.2.3. Výsledky barvení PAS reakce ..... - 35 -
9.3.3. Alciánová modř se Schiffovým činidlem – ALP ..... - 36 -
9.3.3.1. Pracovní postup metody ALP ..... - 36 -
9.3.3.2. Příprava roztoků k metodě ALP ..... - 36 -
9.3.3.3. Výsledky barvení ALP ..... - 37 -
9.4. ODVODŇOVÁNÍ OBARVENÝCH HISTOLOGICKÝCH PREPARÁTŮ ..... - 37 -
9.5. MONTOVÁNÍ ..... - 38 -

10. IMUNOHISTOCHEMICKÉ METODY ..... - 39 -

10.1. DEFINICE ANTIGENŮ POUŽÍVANÝCH K DIAGNOSTICE GIT LÉZÍ ..... - 39 -
10.1.1. CD 31 (PECAM – 1 Platelet endothelial cell adhesion molecule) ..... - 40 -
10.1.2. Aktin (SMA) ..... - 40 -
10.1.3. Podoplanin (D2-40) ..... - 40 -
10.1.4. p53 ..... - 40 -

11. HODNOCENÍ HISTOLOGICKÝCH PREPARÁTŮ ..... - 43 -

11.1. HODNOCENÍ TYPU LÉZE ..... - 43 -
11.2. HODNOCENÍ STUPNĚ DIFERENCIACE LÉZE ..... - 44 -
11.3. HODNOCENÍ HLOUBKY INVAZE ..... - 44 -
11.3.1. Hodnocení hloubky invaze u adenokarcinomu jícnu v terénu Barrettova jícnu ..... - 44 -
11.3.2. Hodnocení hloubky invaze u dlaždicového karcinomu jícnu ..... - 45 -
11.4. HODNOCENÍ INVAZE DO KREVNÍCH A LYMFATICKÝCH CÉV ..... - 45 -
11.5. DISOCIACE NÁDOROVÝCH BUNĚK ..... - 46 -
11.6. HODNOCENÍ RESEKČNÍCH OKRAJŮ ..... - 46 -
11.7. STATISTIKA PROVEDENÝCH ENDOSKOPICKÝCH RESEKCÍ A DIAGNOSTIKOVANÝCH PATOLOGICKÝCH ZMĚN V GASTROINTESTINÁLNÍM TRAKTU V IKEM PRAHA ..... - 47 -

12. DISKUSE ..... - 49 -

13. ZÁVĚR ..... - 50 -

14. SEZNAM ZKRATEK ..... - 51 -

15. SEZNAM LITERATURY A ZDROJŮ ..... - 52 -

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1	*Chemikálie v lázních autotechnikonu s dobou působení (v minutách) při rychlém zpracování malých tkáňových vzorků na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM, Praha*
Tabulka 2	*Chemikálie v lázních autotechnikonu s dobou působení (v minutách) při standartním zpracování přes noc na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM, Praha*
Tabulka 3	*Deparafinační a zavodňovací řada histologických preparátů*
Tabulka 4	*Pracovní postup barvení hematoxylin-eosin používaný na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM, Praha*
Tabulka 5	*Pracovní postup barvení PAS reakce se Schiffovým činidlem používaný na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM, Praha*
Tabulka 6	*Pracovní postup barvení ALP používaný na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM, Praha*
Tabulka 7	*Odvodňovací řada po vlastním obarvení histologických preparátů*
Tabulka 8	*Statistika počtu pacientů a odebraných vzorků v IKEM v letech 2013 – 2017 pomocí endoskopické resekce (ER) nebo endoskopické submukózní disekce (ESD)*
Tabulka 9	*Diagnostikované patologické změny jícnu v IKEM v letech 2013 – 2017 ve vzorcích z endoskopické resekce (ER) nebo endoskopické submukózní disekce (ESD)*
Tabulka 10	*Diagnostikované patologické změny žaludku a tlustého střeva v IKEM v letech 2013 – 2017 ve vzorcích z endoskopické resekce (ER)*
Tabulka 11	*Seznam zkratek*

SEZNAM SCHÉMAT

Schéma 1	*Obecné znázornění histologického zpracování*
Schéma 2	*Obecné schéma převedení tkáně do parafínu*
Schéma 3	*Obecné schéma znázornění procesu barvení*

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	*Endoskopický resekát jícnu připevněný na korkovou destičku*
Obrázek 2	*Přikrojený endoskopický vzorek (1 – 2 mm silné řezy)*
Obrázek 3	*Zalití tkáně do parafínu*
Obrázek 4	*Hematoxylin – eosin, zvětšení 400x*
Obrázek 5	*PAS reakce se Schiffovým činidlem, zvětšení 400x*
Obrázek 6	*Alciánová modř se Schiffovým činidlem, zvětšení 400x*
Obrázek 7	*Pozitivní průkaz antigenu CD 31 (hnědě), zvětšení 200x*
Obrázek 8	*Pozitivní průkaz antigenu aktin – SMA (hnědě), zvětšení 200x*
Obrázek 9	*Pozitivní průkaz antigenu D2-40 (hnědě), zvětšení 200x*
Obrázek 10	*Pozitivní průkaz antigenu p53 (hnědě), zvětšení 400x*

1. Zadání bakalářské práce – cíl práce

V této práci bylo jednoduše a přitom přehledně zpracovat informace o histologickém zpracování, včetně laboratorních postupů odebraných gastrointestinálních vzorků pomocí endoskopických metod, které jsou pro pacienta méně invazivní.

Použité materiály k praktické části byly použity z Pracoviště klinické a transplantační patologie Institutu klinické a experimentální medicíny.

2. Úvod

Cílem této bakalářské práce je představení komplexního zpracování gastrointestinálních lézí od způsobu odběru až po stanovení diagnózy.

Histologické zpracování biologického materiálu je nedílnou a podstatnou součástí k vytvoření definitivní diagnózy z odebraného vzorku. Jedná se o proces, který se skládá z několika na sebe navazujících kroků. Cílem celého zpracování je vytvoření histologických preparátů, které jsou trvalé a umožňují následné mikroskopické hodnocení tkání patologem.

V úvodu této práce je popsána celková histologická stavba gastrointestinálního traktu, dále jsou popsány způsoby odběru vzorků z GIT a možnosti léčby pomocí endoskopických resekcí.

V závěru bakalářské práce jsou popsány způsoby histologického zpracování včetně imunohistochemických metod a způsob hodnocení hotových histologických preparátů patologem.

3. Teoretická část

3.1. Histologie gastrointestinálního traktu

Hlavní funkcí gastrointestinálního traktu je z přijaté potravy získat důležité a nezbytné živiny pro zajištění metabolických a energetických potřeb organismu. Osou gastrointestinálního systému je trávicí trubice (canalis alimentarius). Jednotlivé části GIT jsou dutina ústní, hltan, jícen, žaludek, tenké střevo a tlusté střevo s konečníkem.

Mechanické zpracování přijaté potravy zajišťuje dutina ústní, jazyk a zuby. Spolu se žvýkacími svaly a svaly jednotlivých částí trávicí trubice se trávenina dostává dál do gastrointestinálního traktu. Důležitou součástí celého systému jsou trávicí enzymy, které jsou součástí sekretů velkých žláz, jako například velké slinné žlázy, játra a slinivka břišní.

3.2. Obecná histologická stavba trávicí trubice

Stěna trávicí trubice je tvořena čtyřmi vrstvami: *tunica mucosa* (sliznice), *tela submucosa* (podslizniční vazivo), *tunica muscularis externa* (svalová vrstva) a *tunica serosa* (serózní blána), eventuálně *tunica adventitia*.

Tunica mucosa

Tunica mucosa se skládá ze tří podvrstev:

Lamina epithelialis mucosae

Povrch sliznice kryje vrstva epitelu, který se mění v gastrointestinálním traktu v závislosti na funkci daného úseku trávicí trubice. V dutině ústní, hltanu, jícnu a konečné análnícásti nacházíme odolný vícevrstevný dlaždicový epitel, který chrání hlouběji uložené vrstvy před mechanickým, termickým a chemickým drážděním.

Ostatní části GIT jsou vystlány jednovrstevným cylindrickým epitelem. V žaludku epitel dále plní funkci sekreční a ve střevě absorpční.

Lamina propria mucosae

Slizniční epitel naléhá na lamina propria mucosae (vazivová vrstva). Vazivová vrstva je tvořena řídkým kolagenním vazivem, cévami a nervy sliznice. Místy můžeme nalézt i buňky hladké svaloviny. Přísun kyslíku a živin pro tkáň lamina propria mucosae i vrstvu epitelu zabezpečují kapilární sítě.

Pod epitelem je zóna, kde se vyskytují makrofágy, lymfocyty a plazmatické buňky, které produkují protilátky. Tato zóna je jakousi ochranou před invazí bakterií, které jsou v některých částech trávicí trubice v hojném počtu.

Lamina muscularis mucosae

Lamina muscularis mucosae je tenká vrstva hladké svaloviny, která je mezi lamina propria mucosae a tela submucosa. Hladké svalové buňky jsou uspořádané do dvou vrstev. Ve vnější vrstvě jsou buňky longitudinálně a ve vnitřní spíše cirkulárně. Buňky hladké svaloviny lamina muscularis mucosae umožňují pohyb sliznice nezávisle na ostatních vrstvách trávicí trubice.

Tela submucosa

Tela submucosa (podslizniční vazivo) je tvořena řídkým kolagenním vazivem, které obsahuje větší krevní a lymfatické cévy a nervové pleteně (plexus submucosus Meissneri). Plexus submucosus tvoří vegetativní a senzitivní nervová vlákna a drobná vegetativní ganglia.

Tunica muscularis externa

Na začátku trávicí trubice, včetně horní třetiny jícnu, je příčně pruhovaná svalová tkáň, která je v distálním úseku nahrazena hladkou svalovinou.

Tunica muscularis externa je tvořena dvěma vrstvami hladké svaloviny, vnitřní vrstva je orientována cirkulárně a vnější longitudinálně.

Mezi oběma svalovými vrstvami se vyskytují elementy řídkého kolagenního vaziva, krevní a lymfatické cévy. Nervový plexus (plexus myenterieus Auerbachi) vyvolává a koordinuje kontrakce zevní svalové vrstvy.

Hlavní úlohou tunica muscularis externa je vznik peristaltických vln, které posouvají tráveninu trávicím traktem aborálním směrem.

Tunica serosa

Tunica serosa je tvořena řídkým kolagenním vazivem, které je bohaté na krevní a lymfatické cévy. Ze zevní strany je kryta jednovrstevným epitelem (mesotel), který kryje orgány uložené v peritoneální dutině.

Tunica adventitia

Vazivo obklopující orgány uložené mimo peritoneální dutinu, složené z řídkého kolagenního vaziva, které plynule přechází do okolního vaziva.

3.3. Histologická stavba jícnu

Jícen (oesophagus) je část svalové trubice, která slouží k transportu potravy z hltanu do žaludku. Sliznice v klidovém stavu je složena v podélné řasy, které se při posuvu sousta vyhlazují a dovolují rozšíření lumina jícnu.

Stavba stěny jícnu uplatňuje obecný princip stavby trávicí trubice.

Tunica mucosa

Tunica mucosa se skládá z lamina epithelialis, lamina propria mucosae a lamina muscularis mucosae. Sliznice jícnu je kryta vícevrstevným dlaždicovým epitelem nerohovějícím, který nasedá na nízké papily tunica propria mucosae.

V počátečním a konečném úseku jícnu jsou uložené rozvětvené tubulózní žlázky mucinózního charakteru. Kolem jejich vývodů bývá infiltrace lymfocytů a drobných lymfatických uzlíků.

Lamina muscularis mucosae

Vrstvička, která odděluje sliznici od submukózy. V proximální části je tvořena tenkou vrstvou hladkých svalových buněk a v distální části je silnější vrstva svalových buněk uspořádána longitudiálně.

Tela submucosa

Submukózu (podslizniční vazivo) jícnu tvoří řídké kolagenní vazivo. Na některých místech jsou vyvinuty drobné mucinózní žlázky.

Tunica muscularis externa

V proximální části jícnu se vyskytuje příčně pruhovaná svalovina, ve střední a dolní části na ní navazuje svalovina hladká.

Distální úsek jícnu je uložený v dutině břišní, je tedy kryt serózou. V hrudním a krčním úseku je jícen kryt adventicií, která obsahuje cévy a přechází do vaziva mediastina. *[1, 2]* 4.

4. Endoskopické metody vyšetření gastrointestinálního traktu

Endoskopické vyšetřovací metody jsou standartními metodami v oblasti trávicí trubice, které nám umožňují pomocí kamery barevné a přímé zobrazení nitra orgánů. Slouží k rozpoznání patologických změn, například změny na sliznici trávicí trubice (polypy, karcinomy, jiné léze). Při endoskopii můžeme odebírat podezřelé vzorky a následně odeslat k histologickému zpracování. *[3]*

4.1. Kolonoskopie

Poprvé byla celková kolonoskopie popsána v roce 1971. Tato metoda se používá pro vyšetření dolní části trávicí trubice a pomocí endoskopu je schopná zobrazit celou délku tlustého střeva a terminální část tenkého střeva. *[3, 4]*

4.2. Gastroskopie

Gastroskopie slouží k vyšetření horní části gastrointestinálního traktu, kam patří jícen, žaludek a orální část duodena.

Tato vyšetřovací metoda se stala nejhodnotnějším diagnostickým způsobem pro zobrazení celé žaludeční sliznice. *[3, 5]*

4.3. Indikace k provedení kolonoskopie a gastroskopie

Obecně můžeme říct, že indikace k provedení kolonoskopie nebo gastroskopie je jakékoliv podezření na onemocnění a patologické stavy spojené s gastointestinálním traktem.

Před provedením kolonoskopie nebo gastroskopie musí lékař přihlížet k celkovému stavu a průběhu léčby každého pacienta.

Nejčastější indikací pro gastroskopii je epigastrická bolest, krvácení do trávicí trubice, gastroezofageální reflux, infekce *Helicobacter pylori* nebo diagnostika Barrettova jícnu a sledování malignity. *[3]*

Pro provedení kolonoskopie jsou nejčastějšími indikacemi například: pozitivní test na okultní krvácení, chronické průjmy nejasného původu, prokázání Crohnovy choroby nebo ulcerózní kolitidy.

4.3.1. Vzorky z gastrointestinálního traktu

Endoskopické biopsie odebrané při kolonoskopických nebo gastroskopických metodách jsou vloženy do pufrovaného 4% formaldehydu a odeslány na oddělení patologie pro následné histologické vyšetření.

Biopsie, které jsou odebrány při endoskopii, jsou získávány z jícnu, žaludku, duodena (dvanáctník) nebo tlustého střeva a konečníku. Vzorky jsou malé (o průměru 2-5 mm) a je důležité je správně naorientovat při zalévání do parafínu. *[6]*

5. Metody endoskopické léčby

Mezi metody endoskopické léčby patří endoskopická mukózní resekce (EMR), endoskopická submukózní disekce (ESD) a radiofrekvenční ablace (RFA). Endoskopické resekce se nejčastěji používají k endoskopické léčbě neoplázií u pacientů s Barrettovým jícnem. *[7]*

5.1. Endoskopická mukózní resekce (EMR)

Endoskopická resekce byla poprvé popsána v roce 1974 jako metoda, která má odstranit lézi po submukózní injekci tekutiny. Tato technika byla odvozena od polypektomie (odběr polypu), kde bylo vyšší riziko perforace a krvácení. Od roku 1992 byla EMR vyvinuta k léčbě časné rakoviny žaludku. *[8]*

EMR je endoskopická, diagnostická i léčebná metoda, která představuje odstranění sliznice a submukózy. Používá se při časných neopláziích u pacientů s Barrettovým jícnem. Hlavní výhodou je malé riziko vážných komplikací a miniinvazivní zásah pro pacienta. Další velkou výhodou je možnost histopatologického zhodnocení vzorku a tudíž určení stagingu u pacientů s karcinomem.

<u>K endoskopické resekci se obvykle využívají dvě hlavní techniky:</u>

I. EMRC – endoskopická mukózní resekce pomocí „ capu “.
   Principem techniky je podpich léze roztokem, kdy následně dojde k oddělení sliznice a submukózy od muscularis propria.

II. EMRL – endoskopická mukózní resekce pomocí ligačního kroužku
   U této metody se aplikuje speciální gumička na bazi odebírané tkáně, čímž se vytvoří pseudopolyp a následně se snese a bez podpichu se resekuje.

Velikost odstraněné části tkáně může být až 2 cm. Vzorky musí být po resekci napnuty na korkovou destičku a připevněny pomocí špendlíků, resekční plochou dolů. Fixované vzorky jsou následně odeslány k histologickému zpracování. *[9, 10]*

5.2. Endoskopická submukózní disekce (ESD)

ESD technika vznikla v asijských zemích, zejména v Japonsku a Koreji, z důvodu vysokého výskytu rakoviny žaludku. Tyto země zavedly protokoly pro screening rakoviny žaludku pro běžnou populaci a techniky zdokonalily a aplikovaly na různé části gastrointestinálního traktu, jako je například jícen. *[11]*

Endoskopická submukózní disekce je metoda, kdy se odstraňuje léze vcelku, pomocí speciálních nožů. Vycvičený endoskopista provede cirkulární řez do úrovně submukózy až k jejímu úplnému odstranění.

ESD v jícnu je velmi náročná a riziková, provádí se v celkové anestezii, ale záleží na velikosti léze, náročnosti výkonu a toleranci pacienta.

Velkou výhodou techniky ESD je odběr tkáně v jednom bloku pro lepší histopatologický staging. Naopak nevýhodou prováděné techniky v jícnu je náročnost a riziko perforace oproti endoskopické mukózní resekci.

„ Vzhledem k tomu, že ER je technicky jednodušší a praktičtější a její výsledky jsou excelentní, považujeme ER za metodu volby léčby neoplázií v terénu Barrettova jícnu. ESD preferujeme u agresivnějších dlaždicobuněčných neoplázií, kde přesnější staging může být důležitější.“ *[9, 10]*

5.3. Radiofrekvenční ablace (RFA)

Radiofrekvenční ablace je nový a účinný způsob ablační léčby v gastrointestinálním traktu, jako například při léčbě Barrettova jícnu. Využívá se ve více medicínských odvětvích, jako radiofrekvenční energie v chirurgii, např.: koagulace tkání, RFA hepatocelulárního karcinomu nebo v plastické chirurgii či dermatologii.

RFA je jednoznačně doporučována u pacientů s Barretovým jícnem s nízkým i vysokým stupněm dysplázie nebo u pacientů s časným adenokarcinomem léčeným ER nebo s dlaždicobuněčnými neopláziemi jícnu.

Principem RFA je použití radiofrekvenční energie, která má frekvence v rozmezí 100kHz a 100 MHz. Tvoří se vysokofrekvenční elektromagnetická energie, která při průchodu nabitých částic v živém organismu má převážně tepelné účinky. Dochází k rychlé změně polarity elektrod přístroje, který vyvolává pohyb nabitých částic ke kladnému nebo zápornému pólu, a následně vzniká třecí teplo.

Množství vzniklého tepla závisí na několika faktorech jako například: odpor ošetřované tkáně, množství proudu radiofrekvenční energie a charakter elektrod.

V medicíně se můžeme setkat s různými typy elektrod k ablační léčbě Barrettova jícnu. Používá se systém HALO ^{360}, HALO ^{90} nebo HALO ^{90} Ultra. Každá tato elektroda má své specifické vlastnosti a množství energie podle toho k jakému typu ablace má být použita.
Tato ablační energie proniká do hloubky, kdy dochází k destrukci epitelu, lamina propria a lamina muscularis mucosae. Podstatné je, že tepelný účinek, se již nedostává do submukózy.

Po první dávce ablační energie se ze sliznice odstraňuje nekrotická tkáň a poté se ablace může opakovat až 16 krát. Po výkonu jsou pacienti po 24 – 48 hodinách propuštěni domů, další radiofrekvenční ablace je doporučována až za 4-6 týdnů.

Kombinace endoskopické resekce a radiofrekvenční ablace je považována za zlatý standard při léčbě časných neoplázií Barrettova jícnu. Tímto způsobem léčby dochází k eradikaci neoplazie u 90% pacientů a je téměř nulové procento recidivy. *[7, 9, 12]*

6. Léze GIT s možností endoskopické léčby

S rozvojem endoskopických metod se rozšiřuje i spektrum patologických lézí GIT, které mohou být léčeny endoskopickou cestou. Dříve byla u těchto lézí metodou první volby chirurgická léčba. Patří sem zejména časné karcinomy jícnu, intramurální tumory jícnu vycházející se stromálních buněk (mezenchymové nádory) a změny sliznice jícnu asociované s Barrettovým jícnem.

6.1. Barrettův jícen

Barrettův jícen (BJ) je definován jako náhrada dlaždicového epitelu jícnu epitelem cylindrickým s intestinální metaplazií (tzn. s přítomností zralých pohárkových buněk) v segmentu sliznice jícnu, která je vidět endoskopicky a začíná v oblasti gastroezofageální junkce. Pro stanovení diagnózy Barrettova jícnu není dostačující pouhá přítomnost sliznice kardiálního typu.

V terénu Barrettova jícnu mohou vznikat další léze, k jejichž léčbě lze využít endoskopické metody. Jsou to zejména low-grade a high-grade dysplazie a časný adenokarcinom.

6.1.1. Barrettův jícen bez dysplazie

Barrettův jícen, kdy nebyla histologicky prokázána dysplazie, není ve většině případů indikován k endoskopické léčbě. Výjimkou jsou pacienti, u kterých byla zastižena endoskopicky viditelná léze, která je indikací k endoskopické resekci. V individuálních případech (např. u pacientů s kancerofobií nebo s pozitivní rodinnou anamnézou adenokarcinomu jícnu) lze využít metodu radiofrekvenční ablace, která ale v těchto případech není hrazena ze zdravotního pojištění.

Pacienti s Barrettovým jícnem bez dysplazie se endoskopicky sledují, a to v intervalech, které se řídí rozsahem postižení. U pacientů s Barrettovým jícnem do 3 cm to je každých 3-5 let, nad 3 cm každé 2-3 roky. Tyto intervaly platí, pokud není histologicky prokázána dysplazie.

Pro odběr biopsií při standartních endoskopických kontrolách je využíván tzv. Seattle protokol, kdy se nejprve odebírají biopsie ze všech viditelných lézí. Pak následuje odběr náhodných čtyřkvadrantových biopsií na každé 2 cm délky segmentu Barrettova jícnu.

6.1.2. Barrettův jícen s nízkým stupněm dysplazie

Potvrzená low-grade dysplazie (LGD) znamená vyšší riziko vzniku pokročilejší neoplazie (high-grade dysplazie nebo karcinomu). Low-grade dysplazie musí být diagnostikována alespoň ve dvou po sobě jdoucích endoskopických vyšetřeních a musí být potvrzena patologem centra, které je technicky a personálně vybavené k léčbě časných neoplazií jícnu se snadno dostupným multidisciplinárním týmem. Takto potvrzená low-grade dysplazie v terénu Barrettova jícnu je indikací k radiofrekvenční ablaci.

Endoskopická resekce se indikuje pouze v případech endoskopicky viditelných lézí, ev. u pacientů s krátkým segmentem Barrettova jícnu. Výhodou je zde možnost histologické diagnostiky.

Pokud radiofrekvenční ablace nebo endoskopická resekce není možná (preference pacienta, rizikoví pacienti s varixy jícnu či závažnými komorbiditami), je alternativou intenzivní endoskopické sledování každých 6 měsíců.

6.1.3. Barrettův jícen s vysokým stupněm dysplazie

Pacienti s high-grade dysplazií (HGD) mají vysoké riziko vzniku adenokarcinomu (10-18% ročně), proto jsou jednoznačně indikováni k léčbě. U viditelných lézí je metodou první volby endoskopická resekce nebo endoskopická submukózní disekce. V některých případech se tyto metody mohou kombinovat s radiofrekvenční ablací.

Dříve byly pacienti s high-grade dysplazií indikováni vždy k chirurgické léčbě (ezofagektomii). Nyní je chirurgická léčba indikována u těchto pacientů individuálně, např. u nespolupracujících pacientů, nebo v případě, kde selhala endoskopická léčba.

6.2. Časný adenokarcinom jícnu v terénu Barrettova jícnu i bez Barrettova jícnu

Diagnóza časného adenokarcinomu jícnu je jednoznačnou indikací k endoskopické léčbě, a to buď k endoskopické resekci, nebo k endoskopické submukózní disekci. Radiofrekvenční ablace je v tomto případě kontraindikována. Léze s karcinomem odstraněná ER nebo ESD musí být histologicky vyšetřena a stanoven staging na základě přesně stanovených kritérií. Podle definitivního histologického nálezu je pak stanoven další postup.

Pokud není indikace k následné chirurgické léčbě, pokračuje se v ER/ESD nebo následuje radiofrekvenční ablace, ev. kombinace obou technik, aby bylo dosaženo kompletní eradikace sliznice Barrettova jícnu.

6.3. Dlaždicobuněčné neoplazie jícnu

Dlaždicobuněčné neoplazie jícnu jsou méně časté než léze spojené s Barrettovým jícnem. Oproti adenokarcinomu a jeho prekurzorům mají ale agresivnější chování, a proto se liší i doporučení pro jejich terapii.

6.3.1. Dlaždicobuněčné neoplazie s nízkým stupněm dysplazie

V léčbě lézí s low-grade dysplazií se preferuje využití endoskopické resekce a endoskopické submukózní disekce, které umožňují následné histologické hodnocení. Tyto metody lze kombinovat s radiofrekvenční ablací.

6.3.2. Dlaždicobuněčné neoplazie s vysokým stupněm dysplazie

V léčbě lézí s high-grade dysplazií platí obdobná kritéria jako u lézí s low-grade dysplazií. Preferuje se endoskopická resekce a endoskopická submukózní disekce, které lze kombinovat s radiofrekvenční ablací.

6.3.3. Časný dlaždicobuněčný karcinom

Pro léčbu časného dlaždicobuněčného karcinomu jícnu je jednoznačně indikována endoskopická resekce nebo endoskopická submukózní disekce. Radiofrekvenční ablace je v tomto případě kontraindikována. U histologicky nepříznivých nádorů je indikována následná chirurgická léčba.

6.4. Mezenchymové nádory jícnu

Endoskopické metody lze využít i k odstranění dalších lézí jícnu. Sem patří především leiomyomy, gastrointestinální stromální tumory a nádory z granulárních buněk. Zde se techniky endoskopické léčby modifikují podle lokality a velikosti léze.

6.5. Léze žaludku

Pro léze žaludku platí obdobná pravidla jako pro léze jícnu. Endoskopickou resekci a endoskopickou submukózní disekci lze použít k léčbě všech endoskopicky viditelných lézí sliznice žaludku, kam patří polypy, adenomy s LGD i HGD a časné adenokarcinomy žaludku. Následný postup se pak odvíjí od definitivní diagnózy stanovené po histologickém zpracování endoskopicky získaného materiálu.

6.6. Léze tlustého střeva

Stejně jako v žaludku lze endoskopické metody využít v tlustém střevě k léčbě polypů, adenomů s low-grade i high- grade dysplazií a k léčbě časných adenokarcinomů. V tlustém střevě je kromě endoskopické resekce a endoskopické submukózní disekce využívána i technika full thickness resekce. *[10]*

7. PRAKTICKÁ ČÁST

7.1. Histologické zpracování tkání

Histologické zpracování biologického materiálu je nedílnou a podstatnou součástí procesu vedoucího k vytvoření definitivní diagnózy z odebraného vzorku. Jedná se o proces, který se skládá z několika na sebe navazujících kroků. Cílem celého zpracování je vytvoření histologických preparátů, které jsou trvalé a umožňují následné mikroskopické hodnocení tkání patologem.

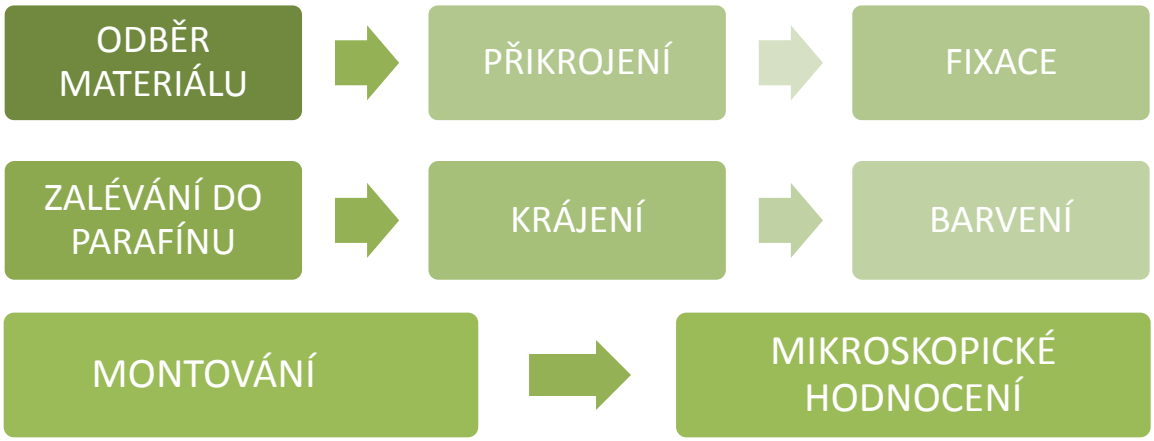


Schéma 1 - *Obecné znázornění histologického zpracování*

7.2. Odběr materiálu

Odběr materiálu k histologickému zpracování můžeme dělit na dvě základní skupiny:

1.) **NEKROPSIE** – odběr vzorků tkání z mrtvého organismu, např.: při pitvě nebo z experimentálního zvířete.

2.) **BIOPSIE** – odběr vzorků tkání ze živého organismu za účelem stanovit definitivní diagnózu. *[13]*

Dále biopsie můžeme dělit podle způsobu odběru:

A. **Peroperační biopsie –** chirurg během operace odebere tkáň k rychlému zpracování (do 20 minut od přijetí vzorku), aby se mohl rozhodnout, jak dále při operaci postupovat.

B. **Kyretáž –** odběr malých vzorku seškrábnutím pomocí speciální lžičky, tzv. kyrety.

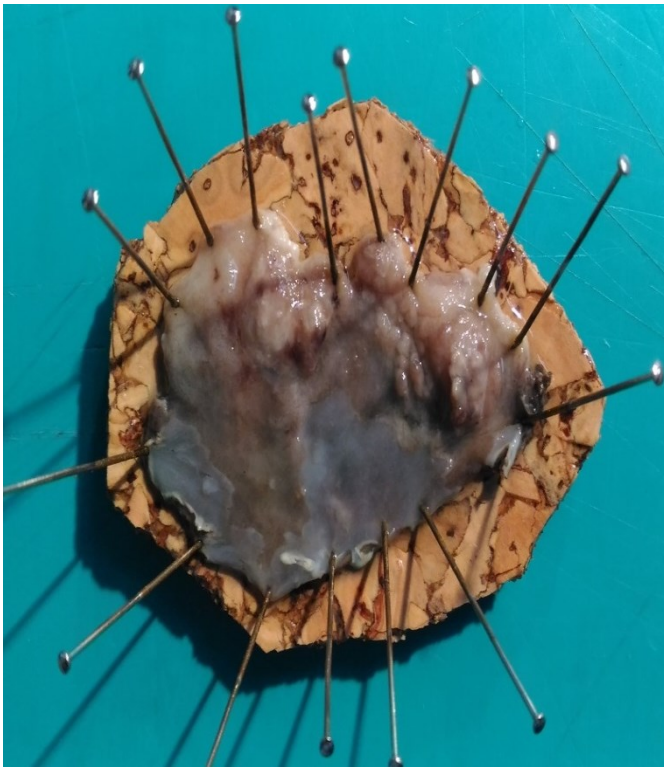
C. **Probatorní excize –** odběr malého kousku tkáně pomocí kleští nebo skalpelu, např. endoskopické vzorky.

D. **Probatorní punkce** – odběr se provádí pod ultrazvukem nebo rentgenem pomocí punkční jehly, kterou se odebere váleček tkáně cca 1mm silný a 8 – 40 mm dlouhý.

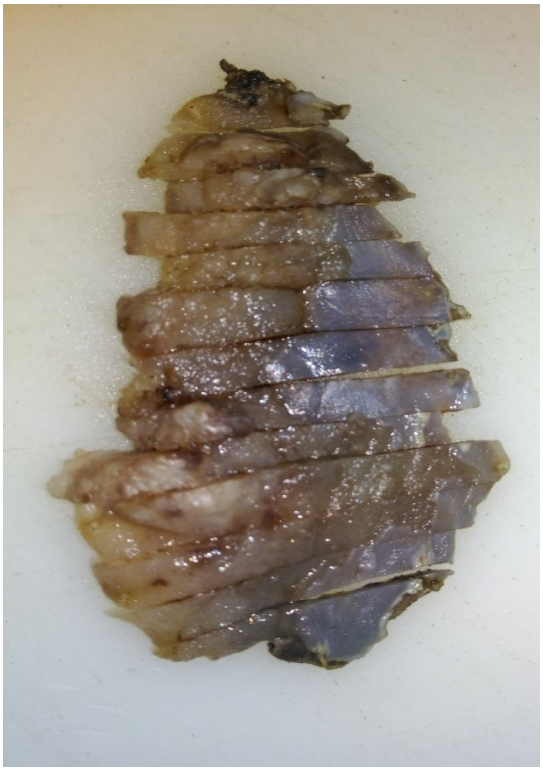
E. **Explantované orgány** – získané z chirurgických operací (např. transplantace). Patolog z orgánů odebírá malé vzorky (cca 1x1 cm) náhodně nebo při podezřelé makroskopické přestavbě tkáně. *[14]*

7.3. Zpracování a přikrojení vzorků z endoskopické resekce

Bioptické vzorky z endoskopické resekce zasílá lékař (endoskopista) na oddělení patologie fixované v 10% roztoku formaldehydu napnuté na korkové destičce připevněné pomocí špendlíků. Připevnění na destičku je důležité zejména pro správnou orientaci resekční plochy. Standartní zpracování endoskopických vzorků spočívá v popisu tkáně a rozdělení na 1 – 2 mm silné řezy. V každém proužku tkáně je zachycena resekční plocha a sliznice vzorku. *[10]*



Obrázek 1 - *Endoskopický resekát jícnu připevněný na korkovou destičku*
foto: Tůmová Monika



Obrázek 2 - *Přikrojený endoskopický vzorek (1 – 2 mm silné řezy)*
foto: Tůmová Monika

7.4. Fixace tkáně

Proces fixace je důležitou a nedílnou součástí zpracování a vytvoření trvalého histologického preparátu. Při fixaci je tkáň vystavena rychlému, ale šetrnému vysrážení (denaturování) bílkovin, které má ochránit tkáň samovolnému rozkladu (autolýze) vzorku.

Ideální fixace, která by zachovala strukturu buněk jako je v živém organismu, neexistuje. Tkáň je vystavována i několik hodin fixačním tekutinám (až 48 hodin), než se tkáň převede do parafínu. Z toho vyplývá, že vždy nějakým způsobem buňky budou změněné.

Fixace tkání záleží na mnoha faktorech, jako je: pH fixační tekutiny, teplota, velikost vzorku, povaha biologického materiálu (viskozita).

Nejčastější fixační tekutina, která se používá v praxi, je 35% - 40% formaldehyd (aldehyd kyseliny mravenčí), který patří mezi fixativa aldehydová. Principem tedy je, že aldehydy reagují s bazickými aminokyselinovými zbytky proteinů tkání a dochází ke změně izoelektrického bodu (hodnota pH, při které amfolyt má nulový náboj a nepohybuje se v elektrickém poli). Jedná se o bezbarvou, silně zapáchající kapalinu, která se v laboratoři používá ve dvou koncentracích (4% formol a 10% formol). *[11, 14]*

7.5. Převedení tkáně do parafínu

Tkáňový vzorek se po procesu fixace musí následně odvodnit a prosytit speciálním histologickým parafínem rozehřátým na 55°C – 58°C. Tento proces se opět skládá z několika kroků, které na sebe navazují.

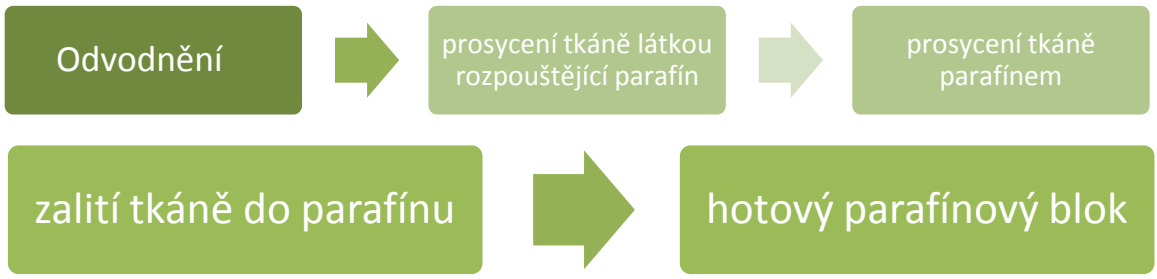


Schéma 2 - *Obecné schéma převedení tkáně do parafínu*

7.5.1. Odvodnění

Během fáze odvodnění se z tkáně odstraňuje fixační tekutina a zbývající voda obsažená v tkáni. Existuje mnoho odvodňovacích činidel, ale nejčastěji se používá etanol, který tkáň zpevní.

Etanol je čirá, bezbarvá, hořlavá kapalina. Díky své hydrofobitě je mísitelná s vodou a organickými sloučeninami.

K odvodnění tkáně se používá vzestupná řada koncentrací etanolu. Obvykle se začíná s odvodněním v 70% etanolu, aby si tkáň zachovala svou strukturu a nesmrštila se. Dále se tkáň přenáší do dvou lázní 96% etanolu.

Následnou odvodňovací tekutinou je propan-2-ol (isopropylalkohol, $CH_3CHOHCH_3$), která je mísitelná s vodou a etanolem. Používá se jako mezikrok mezi etanolem a xylenem.

7.5.2. Prosycení tkáně látkou rozpouštějící parafín

Po fázi odvodnění etanolem a izopropylalkoholem se vzorek tkáně musí prosytit látkou, která je mísitelná s etanolem a zároveň rozpouští parafín. Nejčastěji se v laboratoři používá xylen. Xylen je směs tří izomerů aromatického uhlovodíku. Je to čirá, bezbarvá, hořlavá kapalina.

7.5.3. Prosycení tkáně parafínem

Tkáň po prosycení xylenem je přenesena do lázně tekutého parafínu (56 – 58 °C). Parafín je směs uhlovodíků vznikající při zpracování ropy. V praxi se používají speciální komerčně dodávané parafíny s různými vlastnostmi a body tání (40 – 70 °C).

V minulosti se do parafínu přidávali různé přísady (včelí vosk) pro zkvalitnění a změkčení parafínu. Dnes už tomu tak není. Konzistence a kvalita komerčně vyráběného neupraveného parafínu se v posledních letech zlepšila a v rutinní histologii se zkvalitňování parafínu nepoužívá.

Doba odvodňování a prosycování xylenem a parafínem je závislá na několika faktorech: na velikosti vzorku, čistotě použitých chemikálií, vakuu a teplotě.

Důležitým faktorem je velikost vzorku. Podle velikosti volíme dobu vystavení tkáně chemikáliím a parafínu. Ideální velikost je 1 x 1 x 0,5 cm, aby došlo k dokonalému prosycení tkáňového bločku.

V dnešní moderní histologické laboratoři se používá automatizovaný přístroj, který se nazývá autotechnikon. Autotechnikon obsahuje lázně s chemikáliemi, které jsou automaticky promíchávané a zajištěné vakuovým systémem. Na autotechnikonu můžeme spustit různé přednastavené délky procesů, které volíme podle velikosti vzorku. *[6, 14]*

CHEMIKÁLIE V LÁZNÍCH AUTOTECHNIKONU	DOBA PŮSOBENÍ (MINUTY)
10 % formol	10
70 % etanol	10
96 % etanol	10
isopropylalkohol	10
isopropylalkohol	8
xylen	10
xylen	8
parafín - čistý	10
parafín - čistý	8

Tabulka 1 - *Chemikálie v lázních autotechnikonu s dobou působení (v minutách) při rychlém zpracování malých tkáňových vzorků na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM, Praha*

CHEMIKÁLIE V LÁZNÍCH AUTOTECHNIKONU	DOBA PŮSOBENÍ (MINUTY)
10 % formol	60
70 % etanol	60
96 % etanol	60
96 % etanol	120
isopropylalkohol	60
isopropylalkohol	60
xylen	60
xylen	60
xylen	60
parafín - čistý	60
parafín - čistý	120
parafín - čistý	120

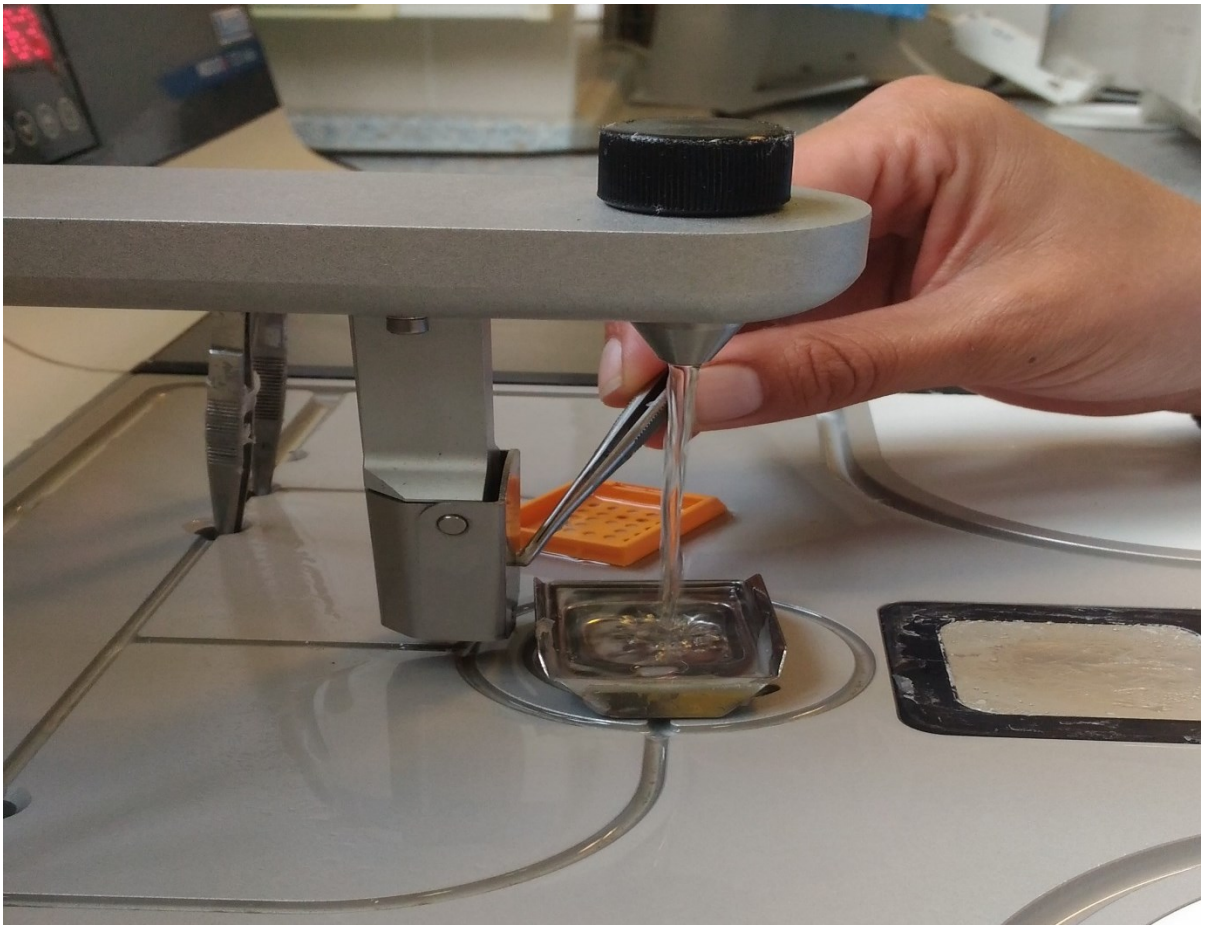
Tabulka 2 - *Chemikálie v lázních autotechnikonu s dobou působení (v minutách) při standartním zpracování přes noc na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM*

7.5.4. Zalití tkáně do parafínu

V dalším kroku k vytvoření histologického bločku se tkáň zalévá do parafínu, aby se vzorek dal krájet. K vlastnímu zalití tkání se využívá zalévací stanice, která se dělí na tři segmenty: vyhřívaná vanička pro kovové formy, zásobník a dávkovač parafínu, chladící plotna.

Do kovových formiček se z dávkovače nalije malé množství rozehřátého parafínu. Pomocí vyhřívané pinzety je tkáň přenesena a zorientována na dno formy. Orientace tkáně je důležitá pro správné zachycení celého vzorku v histologickém preparátu. Orientujeme tak, aby tkáň byla celou plochou na dně formičky.

Následně formičku se vzorkem zchladíme na malé chladicí destičce a přidáme plastovou kazetku s označením (bioptické číslo) a doplníme parafínem. Parafínový bloček zchladíme na chladící plotně o teplotě -12 až -14°C a zhruba za 5 minut se dá formička od parafínu odstranit.



Obrázek 3 – *Zalití tkáně do parafínu, foto: Tůmová Monika*

8. Krájení

Po zalití a nachlazení parafínového bločku nastává fáze krájení. Samotné krájení se provádí na poloautomatickém přístroji, který se nazývá mikrotom. Mikrotomy můžeme dělit na sáňkový nebo rotační, ale princip krájení je stále stejný. Důležitým faktorem pro vytvoření stejně silných parafínových řezů je seřízení a nastavení mikrotomu, stejnoměrné nachlazení parafínového bloku a zkušenosti laboranta, který krájení provádí.

Krájení se provádí pomocí broušených nožů nebo komerčně dodávaných žiletek, které jsou pevně upevněné ve svorce mikrotomu. Dnes se preferuje použití žiletek, které jsou k dostání od výrobců s různou tvrdostí a na různé druhy tkání (např. tvrdé a kalcifikované tkáně nebo malé vzorky).

Vzorky z gastrointestinálního traktu (jícen, žaludek a střevo) se zpracovávají v sériových řezech, tzn. krájení jednoho řezu za druhým a vytvoření parafínového pásku s 10-15 řezy. Optimální tloušťka parafínových řezů pro mikroskopování bioptických vzorků je 3 mikrometry a pro imunohistochemii 4 mikrometry.

Po ukrojení parafínového pásku se pomocí štětce snese pásek řezů ze žiletky a přenese se na hladinu vodní lázně. Vodní lázeň, která vyhřívá vodovodní vodu na 55 – 56 °C, slouží k vypnutí parafínových řezů do roviny. Na vodní hladině dochází ke kontrole kvality řezů a vybírání kvalitních, reprezentativních řezů k dalšímu zpracování.

Reprezentativní vzorky se natahují na podložní sklo, které musí být odmaštěné a označené příslušným bioptických číslem, stejným jako parafínový bloček.

Podložní skla s nataženými parafínovými řezy se pokládají na speciální vyhřívanou desku (54 – 56°C), kde dochází k dalšímu vypnutí, přilnutí parafínu k podložnímu sklu a vyschnutí přebytečné vody pod řezy.

Napnutá podložní skla jsou uložena do termostatu, který je vyhřívaný na 55 – 60°C. V termostatu dochází k úplnému odstranění vody pod řezy a pevnému přilnutí parafínových řezů k podložnímu sklu. Délka pobytu skel v termostatu se liší podle velikosti a druhu tkáně. Bioptické vzorky pro statimové zpracování se nahřívají při 56 - 58°C cca 45 minut a při běžném zpracování preparátů cca 10 – 14 hodin rovněž při 56 - 58°C.

9. METODICKÁ ČÁST

9.1. Barvení histologických preparátů

Barvení histologických preparátů je proces, kterým s použitím speciálních barviv dochází ke zvýraznění jednotlivých struktur tkání. Většina používaných histologických barviv je na vodní bázi. Obarvené histologické preparáty po zamontování do montovacího média prohlíží a hodnotí lékař (patolog) pod mikroskopem.

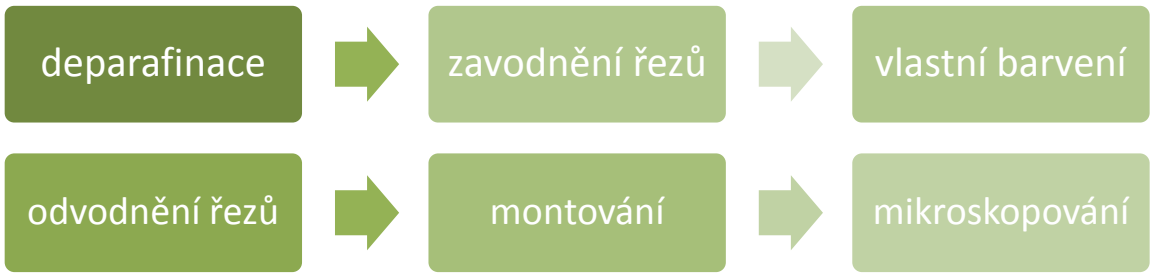


Schéma 3 – *Obecné schéma znázornění procesu barvení*

9.2. Deparafinace a zavodnění histologických řezů

Deparafinace a zavodnění histologických řezů je důležitým krokem, který vyžaduje zbavit se parafínu a opětovně zavodnit tkáň vodou, aby se tkáň stala barvitelnou. K deparafinaci se používá látka, která rozpouští parafín, a to xylen. Následné zavodnění řezů se využívá k převedení preparátů přímo do vody.

LÁZEŇ	CHEMIKÁLIE	ČAS (V MINUTÁCH)
1.	xylen	5
2.	xylen	5
3.	xylen	5
4.	96% etanol	5
5.	96% etanol	5
6.	96% etanol	5
7.	70% etanol	3

Tabulka 3 – *Deparafinační a zavodňovací řada histologických preparátů*

9.3. Vlastní barvení

Barvení histologických preparátů se provádí definovaným pracovním postupem, který vede ke znázornění jednotlivých struktur tkání.

Z bioptických vzorků (resekátů) gastrointestinálního traktu se krájí standardně tři histologické preparáty se čtyřmi řezy v sériovém pořadí: hematoxylin – eosin (HE), PAS reakce se Schiffovým činidlem nebo alciánová modř s Schiffovým činidlem (ALP) a opět hematoxylin - eosin. Jednotlivé barvící metody budou popsány níže.

9.3.1. Hematoxylin – eosin

Barvení hematoxylin – eosin patří mezi základní a nejčastěji používanou barvící techniku v histologii. Hematoxylin barví jádra buněk, zatímco eosin buněčnou cytoplazmu a většinu vláken pojivové tkáně.

Hematoxylin se extrahuje ze dřeva stromu *Haematoxylon campechianum*, který se dnes hlavně pěstuje v západní Indii. *[6]*

9.3.1.1. Pracovní postup barvení hematoxylin – eosin

1.	**deparafinace**	
2.	**voda**	**oplach**
3.	**Mayerův hematoxylin**	**10 minut**
4.	**voda**	**10 minut**
5.	**96% alkohol**	**oplach**
6.	**96% alkohol**	**oplach**
7.	**eosin**	**3 minuty**
8.	**odvodnění**	

Tabulka 4 – *Pracovní postup barvení hematoxylin-eosin používaný na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM, Praha*

9.3.1.2. Příprava roztoků pro barvení hematoxylin – eosin

Mayerův hematoxylin

4,2 g hematoxylinu s 200 ml destilované vody rozpustit za tepla. Po rozpuštění přidat 3600 ml destilované vody, 200g síranu hlinito-draselného a 0,6 g jodičnanu sodného. Po třech dnech přidat 200 g chloralhydrátu a 3 g kyseliny citrónové. Hotový hematoxylin zraje tři měsíce, poté je připraven k použití.

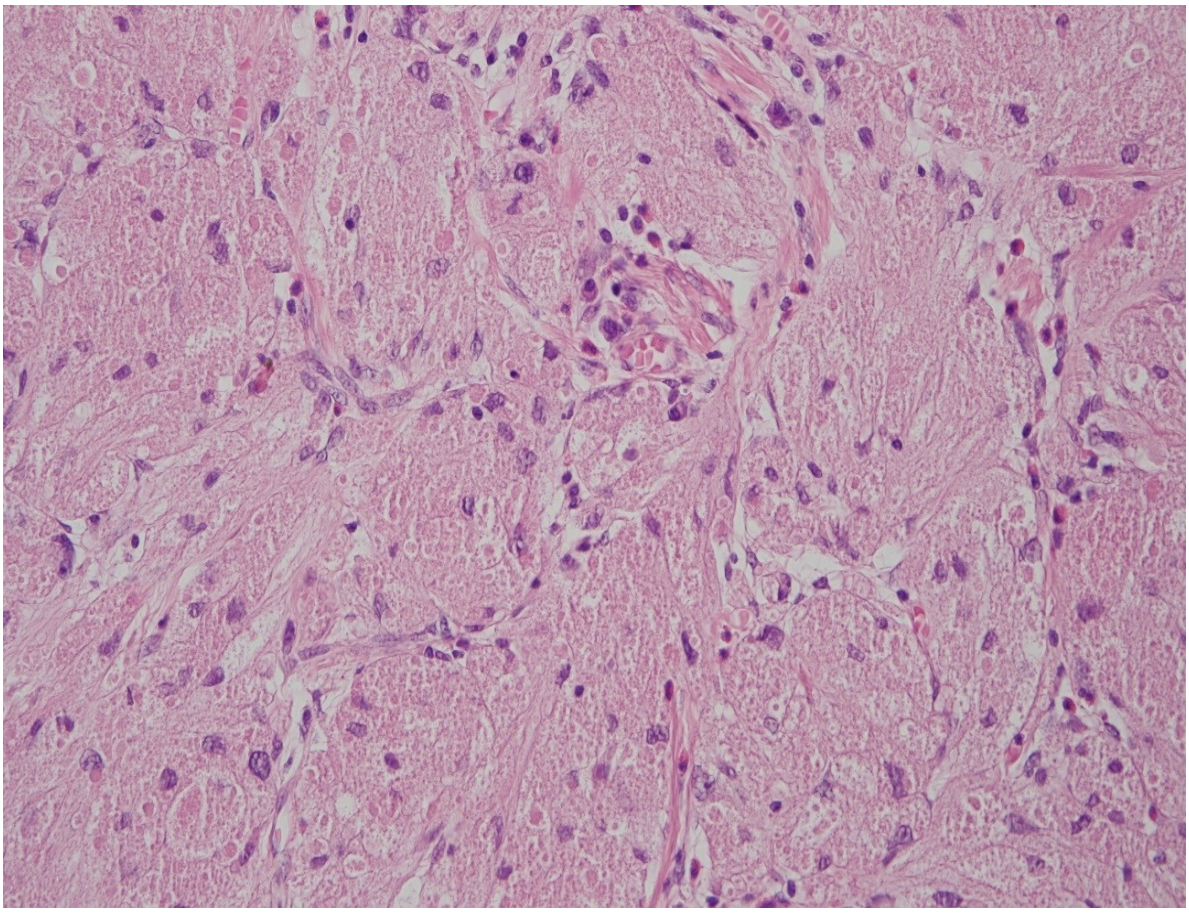
Eosin

Roztok č.1 připravit z 10 g eosinu a 1000 ml destilované vody, zahřát na teplotu 70 – 80 °C.

Roztok č.2 připravit 10 g erytrosinu do 1000 ml 96% etanolu.

Pracovní roztok

320 ml roztoku č.1 smíchat s 32 ml roztoku č.2 poté přidat 2496 ml 96% etanolu a 13 ml kyseliny octové.



Obrázek 4 – *Hematoxylin – eosin, zvětšení 400x, foto: Malušková Jana*

9.3.1.3. Výsledky barvení

- ✓ Jádra – modrá
- ✓ Cytoplazma a elastická vlákna – růžová
- ✓ Erytrocyty - červené

9.3.2. PAS reakce se Schiffovým činidlem

PAS reakce slouží k základnímu průkazu polysacharidů v tkáních.

Polysacharidy mají více funkcí. Jsou to složené, dlouhé řetězce obsahující více jak 10 monosacharidových jednotek spojených glykosidickou vazbou. Mezi polysacharidy patří celulosa, škrob, inulin nebo glykogen. *[15]*

Mukopolysacharidy tvoří zvláštní skupinu složených sacharidů, které jsou přítomné například v žaludku nebo kyselé mukopolysacharidy přítomné v hlenovitém sekretu. *[14]*

Princip reakce

Principem reakce je oxidace polysacharidů pomocí kyseliny jodisté za vzniku aldehydů, které reagují se Schiffovým činidlem. Při přítomnosti mukopolysacharidů a mukoproteinů vzniká růžové zbarvení. *[6]*

9.3.2.1. Pracovní postup metody PAS reakce

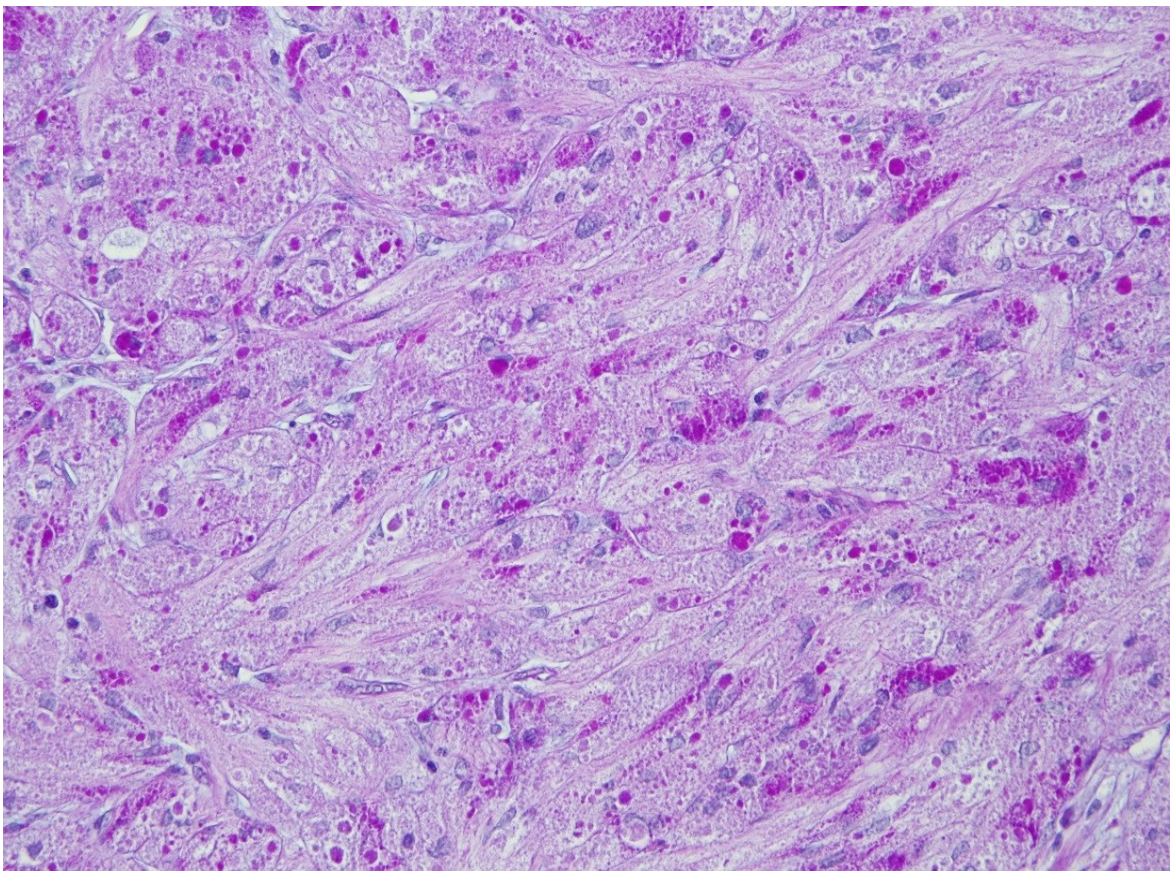
1.	**deparafinace**	
2.	**voda**	**oplach**
3.	**1% kyselina jodistá**	**10 minut**
4.	**voda**	**10 minut**
5.	**Shiffovo činidlo**	**5 – 10 minut**
6.	**vodovodní voda**	**10 minut**
7.	**Mayerův hematoxylin**	**5 minut**
8.	**voda**	**10 minut**
9.	**odvodnění**	

Tabulka 5 - *Pracovní postup barvení PAS reakce se Schiffovým činidlem používaný na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM, Praha*

9.3.2.2. Příprava roztoků k metodě PAS reakce

1% kyselina jodistá - 1 g kyseliny jodisté rozpustit ve 100 ml destilované vody.

Schiffovo činidlo **-** 2 g pararosalininu smíchat s 20 ml 96% etanolu a nechat 10 minut rozpouštět v termostatu při 55°C. Po rozpuštění přidat 340 ml destilované vody, 10 g pyrosiřičitanu draselného a 7 ml koncentrované kyseliny chlorovodíkové. Roztok míchat dokud se sraženina nerozpustí. Poté přidat 0,4 g hydrosiřičitanu sodného. K roztoku přidat 10 lžic aktivního uhlí, nechat ustát a po 15 minutách celý roztok přefiltrovat. Schiffovo činidlo uchovávat v lednici.



Obrázek 5 – *PAS reakce se Schiffovým činidlem, zvětšení 400x, foto: Malušková Jana*

9.3.2.3. Výsledky barvení PAS reakce

- ✓ Jádra – modrá
- ✓ Mukopolysacharidy – červenofialové
- ✓ Bazální membrány – sytě růžové

9.3.3. Alciánová modř se Schiffovým činidlem – ALP

Jedná se o kombinaci dvou barvících technik - alciánové modře a PAS reakce. Touto metodou se prokazují kyselé a neutrální mukopolysacharidy. Alciánovou modří se barví kyselé mukopolysacharidy a PAS reakcí se znázorňují neutrální polysacharidy. Výhodou je, že jednou barvící technikou lze od sebe odlišit kyselé a neutrální mukopolysacharidy.

9.3.3.1. Pracovní postup metody ALP

1.	**deparafinace**	
2.	**voda**	**oplach**
3.	**destilovaná voda**	**oplach**
4.	**3% kyselina octová**	**oplach**
5.	**1% alciánová modř**	**30 minut**
6.	**3% kyselina octová**	**oplach**
7.	**voda**	**10 minut**
8.	**1% kyselina jodistá**	**10 minut**
9.	**voda**	**10 minut**
10.	**destilovaná voda**	**oplach**
11.	**Schiffovo činidlo**	**5 - 8 minut**
12.	**destilovaná voda**	**oplach**
13.	**voda**	**10 minut**
14.	**Mayerův hematoxylin**	**5 minut**
15.	**voda**	**10 minut**
16.	**odvodnění**	

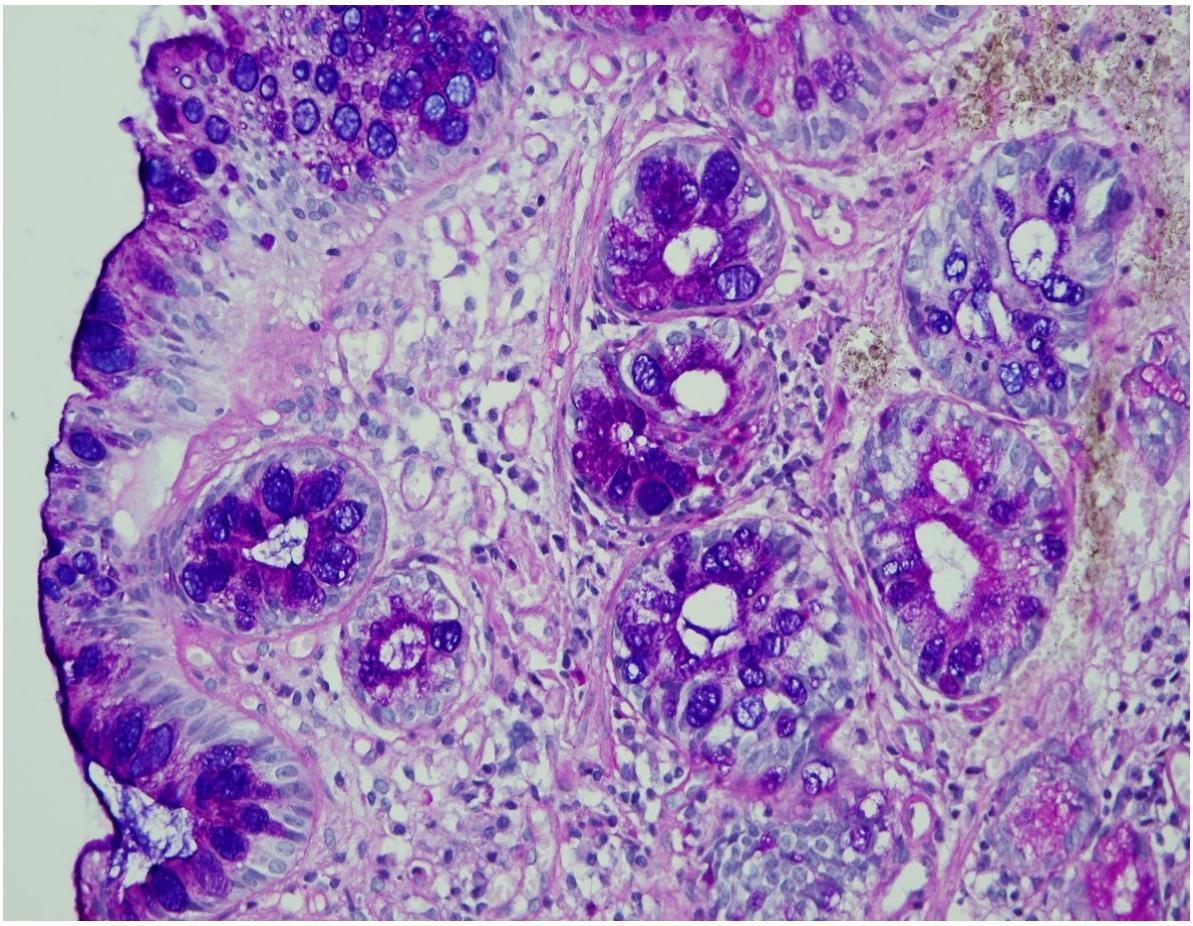
Tabulka 6 - *Pracovní postup barvení ALP používaný na Pracovišti klinické a transplantační patologie IKEM, Praha*

9.3.3.2. Příprava roztoků k metodě ALP

3% kyselina octová – 3 ml kyseliny octové nalít do 97 ml destilované vody

1% alciánová modř – 1 g alciánové modře smíchat se 100 ml 3% kyseliny octové

Schiffovo činidlo – používá se stejné jako k metodě PAS reakce



Obrázek 6 – *Alciánová modř se Schiffovým činidlem, zvětšení 400x, foto: Malušková Jana*

9.3.3.3. Výsledky barvení ALP

- ✓ Jádra – modrá
- ✓ Glykogen – růžový
- ✓ Kyselé mukopolysacharidy – modrozelené

9.4. Odvodňování obarvených histologických preparátů

Obarvené histologické preparáty se po vlastním barvení musí odvodnit třemi lázněmi 96% etanolu, jednou lázní karboxylenu a dvěma lázněmi xylenu. Xylen se opět využívá k vytvoření trvalého histologického preparátu připraveného k zamontování do syntetického montovacího média.

LÁZEŇ	CHEMIKÁLIE	ČAS (V MINUTÁCH)
1.	96% etanol	2
2.	96% etanol	2
3.	96% etanol	1
4.	karboxylen	5
5.	xylen	2
6.	xylen	2

Tabulka 7 – *Odvodňovací řada po vlastním obarvení histologických preparátů*

Karboxylen

Karboxylen se používá k projasnění již obarvených preparátů jako mezikrok mezi etanolem a xylenem. Připravuje se z kyseliny karbolové a xylenu v poměru 1:3.

9.5. Montování

Konečnou fází je montování, které se provádí po nasycení preparátu xylenem do montovacího média, které je nerozpustné ve vodě. Cca tři kapky montovacího média se nanesou pomocí skleněné tyčinky na podložní sklo, které se následovně překryje krycím sklem. Montovací médium je čirá, hustá tekutina, která na vzduchu tvrdne. Zaschlý a vyčištěný histologický preparát je připraven k mikroskopování.

10. Imunohistochemické metody

Imunohistochemie je metoda využívající detekce jednotlivých tkáňových antigenů pomocí specifických primárních protilátek. Lze ji tedy chápat jako aplikaci imunologických principů a metod při studiu buněk a tkání. V případě pozitivní reakce je tato vazba znázorněna barevným produktem.

V patologii se využívá k účelům diagnostickým (vyhledávání a znázorňování antigenů specifických pro určité typy buněk a tkání) i prognostickým.

Pro průkaz antigenů se využívají jak polyklonální, tak monoklonální protilátky. Polyklonální protilátky jsou antiséra získaná opakovanou imunizací zvířat daným antigenem a jsou používána ve výzkumu i v diagnostice mnoho desetiletí. Polyklonální protilátky obsahují směs protilátek s různou specifitou, afinitou k antigenu a mají různé fyzikálně chemické vlastnosti. Monoklonální protilátky vznikají jako produkt jednoho klonu B lymfocytů, jsou jedné podtřídy, váží se na stejnou antigenní determinantu a mají stejné fyzikálně-chemické vlastnosti. *[16]*

10.1. Definice antigenů používaných k diagnostice GIT lézí

V této kapitole budou popsány čtyři základní antigeny, které se používají k základní diagnostice gastrointestinálních lézí. Samozřejmě jsou používány i další imunohistochemické antigeny, kterými odlišujeme různé typy nádorů. Například jsou to antigeny AMACR, p40, chromogranin, synaptofyzin, CD 56, Ki67, CAM 5.2, CD 117 (C-KIT), S -100 protein.

10.1.1. CD 31 (PECAM – 1 Platelet endothelial cell adhesion molecule)

Antigen CD31 je transmembránový glykoprotein, který je exprimován na povrchu souvislého endotelu (arterie, arterioly, vény, venuly). Dále je nacházen na povrchu megakaryocytů a krevních destiček, myeloidních buněk, NK buněk a některých B a T prekurzorů, makrofágů, Kupfferových buněk. V imunohistochemii se používá k průkazu endotelových buněk. Jedná se o vhodný marker v hodnocení stupně nádorové novotvorby krevních cév (angiogeneze). *[17]*

10.1.2. Aktin (SMA)

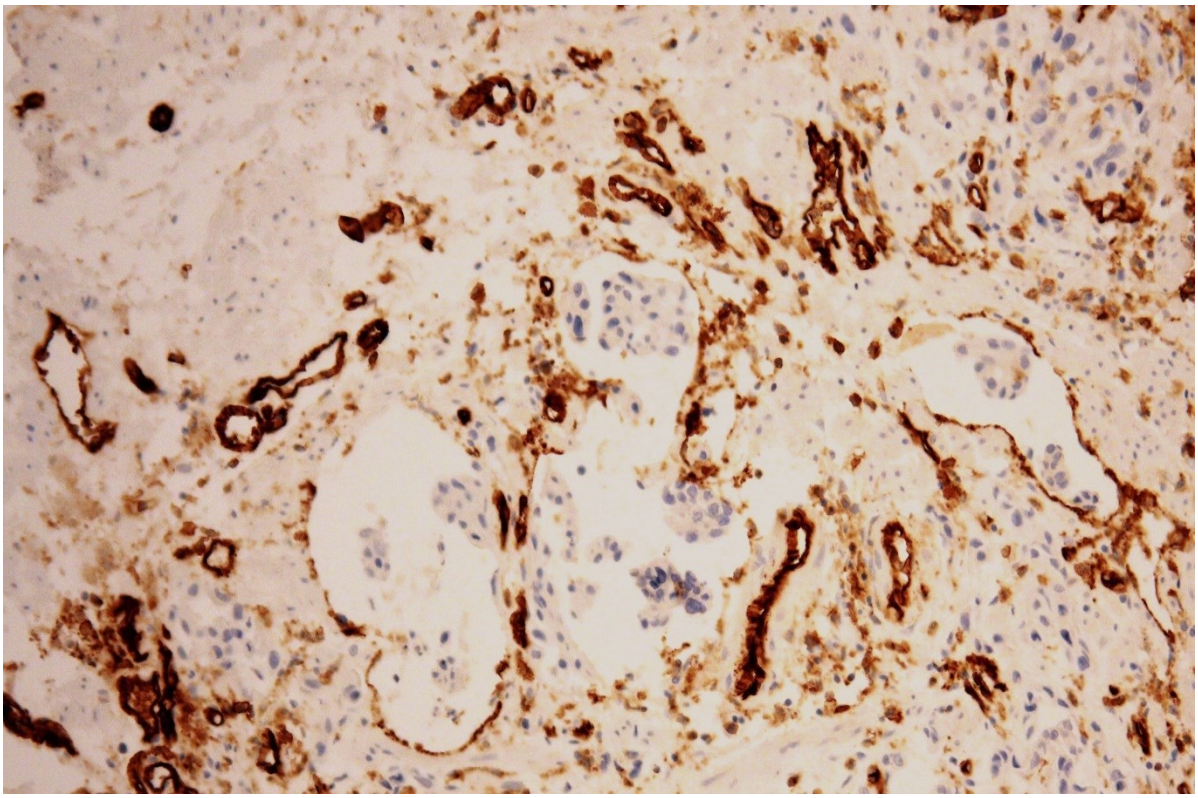
Aktin je protein cytoskeletu některých buněk. Hojně je využíván jako marker svalové diferenciace buněk, především v diagnostice leiomyomů, leiomyosarkomů a rabdomyosarkomů.

10.1.3. Podoplanin (D2-40)

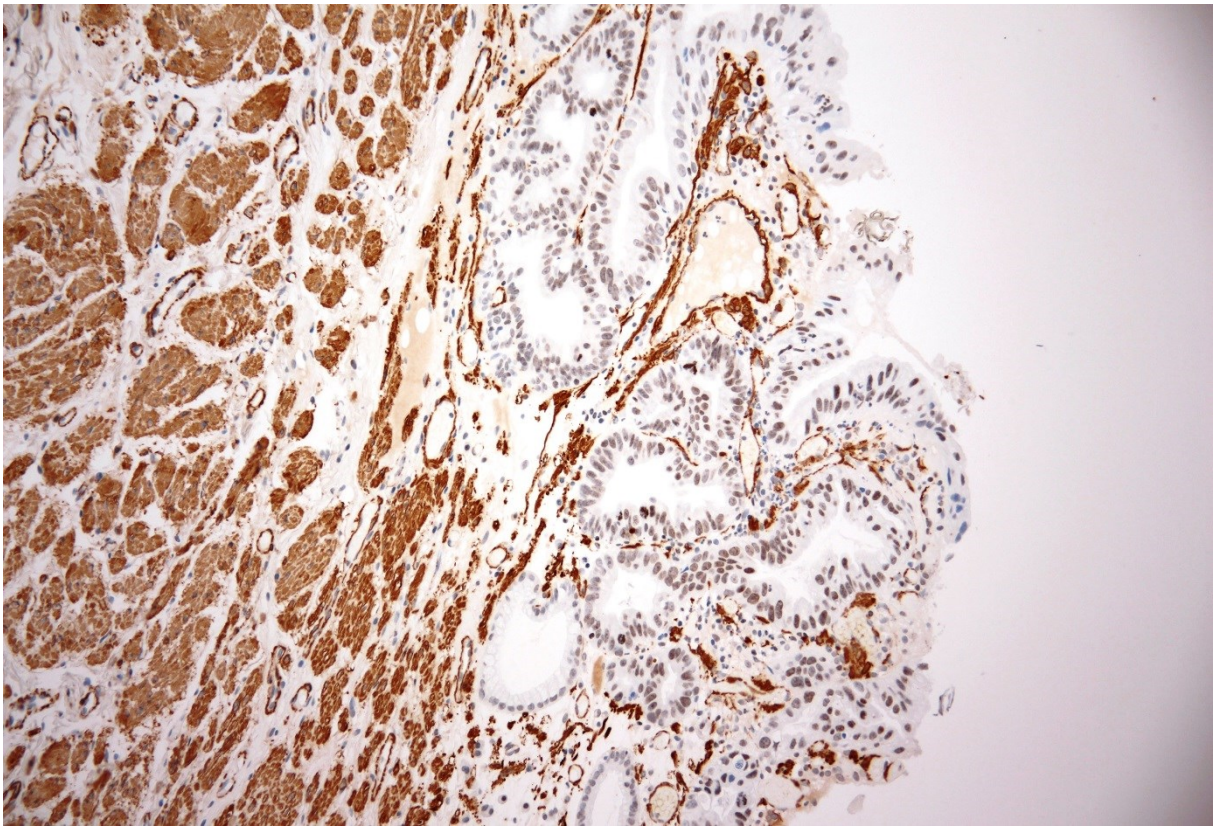
Podoplanin nebo-li D2-40 je mucinový transmembránový protein exprimovaný v endotelu lymfatických kapilár, není však exprimován v krevní vaskulatuře. Kromě primární exprese v lymfatickém endotelu je podoplanin přítomen v řadě dalších tkání, včetně mezotelových buněk, retikulárních buněk, folikulárních dendritických buněk. Díky jeho výskytu v lymfatických kapilárách je užitečným markerem při zjišťování prorůstání nádorů do cév (lymfangioinvaze). *[18]*

10.1.4. p53

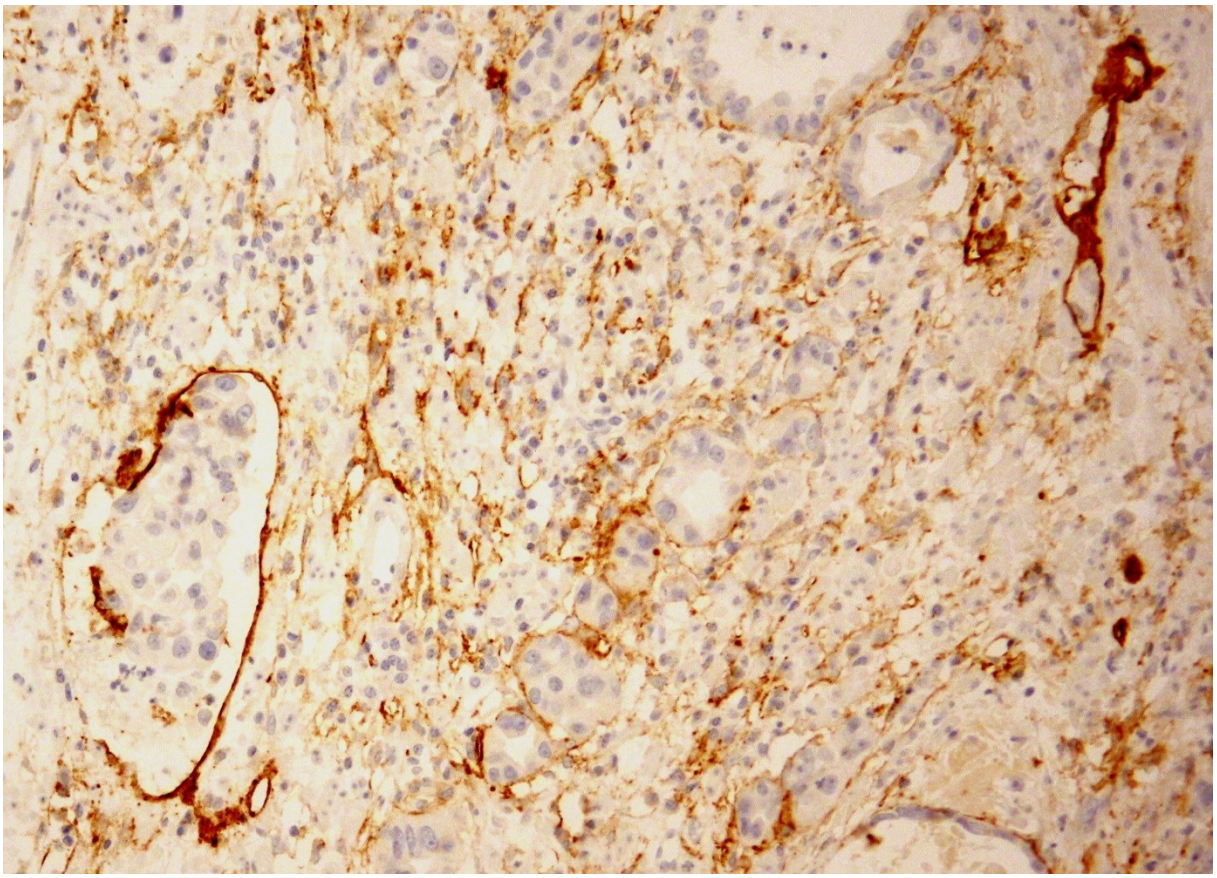
p53 je jaderný fosfoprotein regulující buněčný cyklus, který je přítomný v normálních buňkách, ale jeho poločas je příliš krátký na to, aby mohl být běžně prokazován. Průkaz tohoto proteinu je možný u mutované formy, která je mnohem stabilnější. Expresi p53 nacházíme zejména v buňkách maligních nádorů. *[19]*



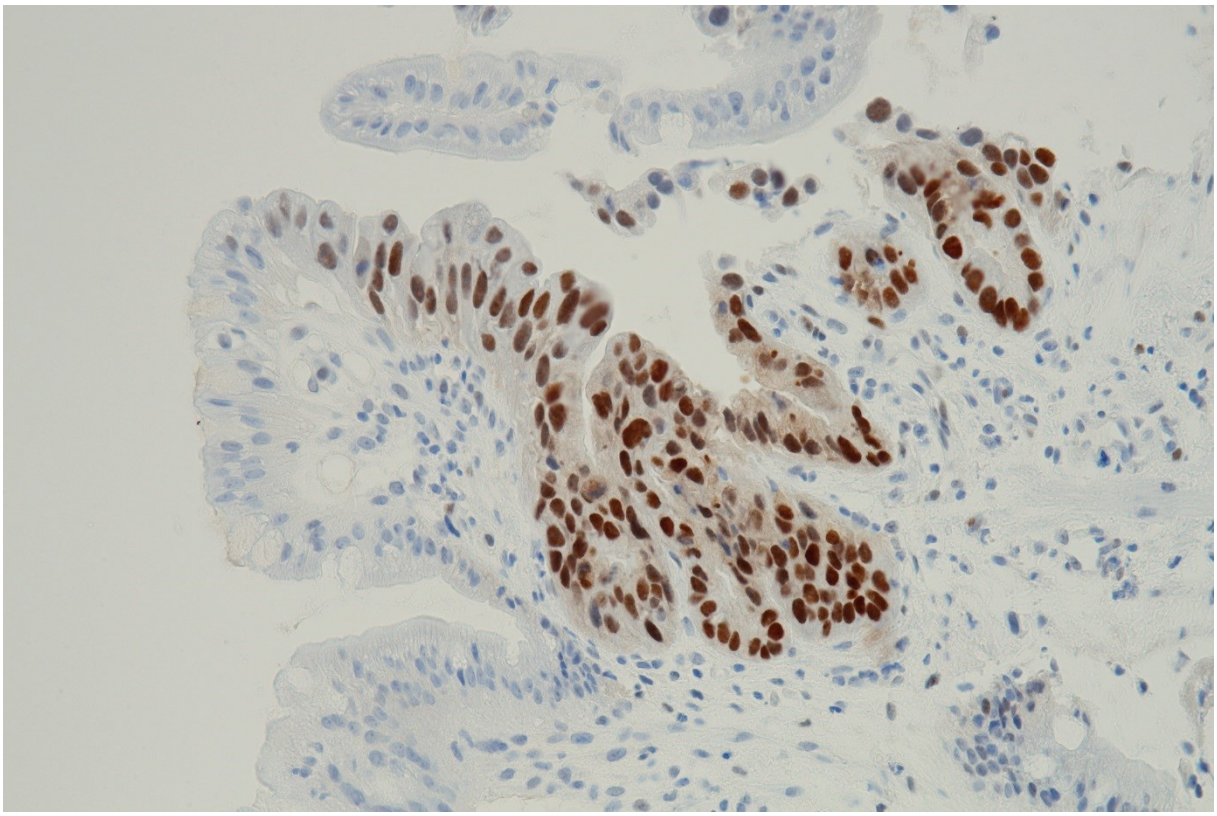
Obrázek 7 – *Pozitivní průkaz antigenu CD 31 (hnědě), zvětšení 200x, foto: Malušková Jana*



Obrázek 8 – *Pozitivní průkaz antigenu aktin – SMA (hnědě), zvětšení 200x, foto: Malušková Jana*



Obrázek 9 – *Pozitivní průkaz antigenu D2-40 (hnědě), zvětšení 200x, foto: Malušková Jana*



Obrázek 10 - *Pozitivní průkaz antigenu p53 (hnědě), zvětšení 400x, foto: Malušková Jana*

11. Hodnocení histologických preparátů

Histologické preparáty jsou hodnoceny podle přesně stanovených kritérií a na základě definitivní diagnózy je pak rozhodováno o další léčbě pacienta.

V první fázi je třeba určit typ léze v barvení hematoxylinem-eozinem. Od toho se pak odvíjí další postup a indikují se případná doplňující vyšetření. Dále se hodnotí přesně dané parametry léze, které pak umožňují stanovit pokročilost léze a odhadnout její další chování. Mezi tyto parametry patří stupeň diferenciace (grade), hloubka invaze, přítomnost invaze do krevních či lymfatických cév, disociace nádorových buněk a vzdálenost léze od okrajů excize.

11.1. Hodnocení typu léze

Jak už bylo uvedeno v předchozím textu, endoskopické resekční metody se používají u polypů GIT, u dysplastických změn sliznice GIT a u časných karcinomů, ev. ostatních lokálně málo pokročilých nádorů.

U polypů a dysplastických lézí většinou není zapotřebí indikovat doplňující vyšetření, pouze při nejistotě, zda jde již o dysplazii, či zda se jedná pouze o vystupňované reaktivní změny, můžeme doplnit imunohistochemický průkaz markeru p53.

U časných karcinomů se v první fázi určí typ karcinomu, tzn. dlaždicový karcinom, adenokarcinom, ev. neuroendokrinní tumor/karcinom. Ve všech případech doplňujeme imunohistochemický průkaz hladkosvalového aktinu (SMA) k ozřejmění hloubky invaze a imunohistochemickou vizualizaci výstelky krevních a lymfatických cév protilátkami CD31 a D2-40, abychom byli schopni posoudit případnou angioinvazi a lymfangioinvazi nádoru. U nízce diferencovaných tumorů doplňujeme průkaz imunohistochemických markerů, které nám pomohou identifikovat, zda se jedná o nádor vycházející z dlaždicového epitelu (marker p40), nebo zda jde o nízce diferencovaný adenokarcinom (marker AMACR a cytokeratin CAM5.2). Pro identifikaci neuroendokrinních tumorů používáme markery chromogranin, synaptofyzin, CD56 a k určení jejich biologické povahy ještě proliferační marker Ki67. K určení typu mezenchymálních nádorů používáme nejčastěji protilátky SMA, CD 117(C-KIT) a S -100 protein.

11.2. Hodnocení stupně diferenciace léze

Diferenciace (grade) nádoru je hodnocen ve 4 stupních.

- *Grade 1* - odpovídá dobře diferencovanému nádoru, který nejvíce napodobuje původní struktury tkáně, ze které vychází.
- *Grade 2* - znamená střední stupeň diferenciace
- *Grade 3* - nízký stupeň diferenciace.
- *Grade 4* - se přiřazuje nádoru zcela nediferencovaného, kdy nelze určit, z jakého typu epitelu či tkáně vychází.

11.3. Hodnocení hloubky invaze

Hloubka invaze odpovídá tomu, do jaké vrstvy stěny GIT nádor prorůstá. U lézí GIT léčených endoskopicky se můžeme setkat s maximální hloubkou invaze do lamina muscularis propria, která odpovídá v TNM klasifikaci nádoru kategorii T2. Rovněž spektrum etáží invaze má u některých typů lézí svá specifika, o kterých bude pojednáno níže.

Obecně lze říci, že rozlišujeme nádory se slizniční invazí, která se v histologických nálezech označuje písmenem „m“, a nádory s invazí do submukózy, kterou označujeme „sm“.

11.3.1. Hodnocení hloubky invaze u adenokarcinomu jícnu v terénu Barrettova jícnu

U adenokarcinomu jícnu u pacientů s Barrettovým jícnem rozlišujeme 4 stupně slizniční invaze (***m1-4***) a 3 stupně submukózní invaze (***sm1-3***).

m1 – nádor je omezený na epitel (carcinoma in situ)

m2 – nádor prorůstá do lamina propria mucosae

m3 – nádor prorůstá do horní vrstvy lamina muscularis mucosae

m4 – nádor prorůstá do dolní vrstvy lamina muscularis mucosae

Dělení lamina muscularis mucosae na dvě vrstvy je specifické pro Barrettův jícen. U ostatních lézí jícnu má lamina muscularis mucosae pouze jednu vrstvu.

sm1 – nádor prorůstá do horní třetiny submukózy (u adenokarcinomu to je invaze do 500 µm od nejnižšího vlákna lamina muscularis mucosae)

sm2 – nádor prorůstá do střední třetiny submukózy

sm3 – nádor prorůstá do dolní třetiny submukózy.

U nádorů, které prorůstají do submukózy, se dále ještě měří šířka části nádoru v submukóze a celková tloušťka nádoru.

11.3.2. Hodnocení hloubky invaze u dlaždicového karcinomu jícnu

U dlaždicového karcinomu jícnu rozlišujeme 3 stupně slizniční invaze (***m1-3***) a 3 stupně submukózní invaze (***sm1-3***).

m1 – nádor je omezený na epitel (carcinoma in situ)

m2 – nádor prorůstá do lamina propria mucosae

m3 – nádor prorůstá do lamina muscularis mucosae

sm1 – nádor prorůstá do horní třetiny submukózy (u adenokarcinomu to je invaze do 200 µm od nejnižšího vlákna lamina muscularis mucosae, protože dlaždicový karcinom má agresivnější chování)

sm2 – nádor prorůstá do střední třetiny submukózy

sm3 – nádor prorůstá do dolní třetiny submukózy.

11.4. Hodnocení invaze do krevních a lymfatických cév

Abychom byli schopni rozlišit jednotlivé typy cév, používáme již zmíněné imunohistochemické markery, a to CD31 k ozřejmění výstelky cév krevních a D2-40 cév lymfatických.

V histologickém nálezu se krevní invaze značí písmenem A. A0 je stav bez nádorové krevní invaze, A1 znamená přítomnost invaze nádoru do krevních cév.

Analogicky u cév lymfatických je invaze značena písmenem L. A opět L0 je stav bez nádorové lymfangioinvaze a L1 s lymfangioinvazí.

11.5. Disociace nádorových buněk

Disociace nádorových buněk je stav, kdy nádorové elementy ztrácejí soudržnost a ve tkáni jsou přítomny buď jednotlivě, nebo jen v malých skupinkách. V bioptických protokolech je tento stav označován jako TCD (z anglického tumor cells dissociation) a má 4 stupně (0-3).

11.6. Hodnocení resekčních okrajů

Hodnotí se jak boční okraje excize, tak spodina excize. Boční okraje se značí písmeny HM (horizontal margins/horizontální okraj), spodina (VM – vertical margin/vertikální okraj). HM 0 či VM 0 znamená, že nádor nezasahuje do linie excize. HM 1 či VM 1 je stav, kdy nádor zasahuje do laterálních okrajů či do spodiny excize. Pokud je HM 0, VM 0, je excize léze kompletní a označuje se R 0. Pokud nádor zasahuje do spodiny excize nebo bočního okraje, ev. do obou, tak léze nebyla odstraněna kompletně a označuje se R 1.

11.7. Statistika provedených endoskopických resekcí a diagnostikovaných patologických změn v gastrointestinálním traktu v IKEM Praha

	JÍCEN		MIMO JÍCEN	
ROK	POČET PACIENTŮ	POČET ODBĚRŮ	POČET PACIENTŮ	POČET ODBĚRŮ
2013	32	103	2	4
2014	26	58	7	9
2015	21	43	4	4
2016	37	75	12	18
2017	33	62	12	15

Tabulka 8 – *Statistika počtu pacientů a odebraných vzorků v IKEM v letech 2013 – 2017 pomocí endoskopické resekce (ER) nebo endoskopické submukózní disekce (ESD)*

	2013	2014	2015	2016	2017
Adenokarcinom	15	14	12	21	16
Dlaždicový karcinom	6	4	3	7	10
BJ + dysplázie	11	7	5	5	6
GIST	0	0	0	2	0
Tumor jícnu z granulárních buněk	0	0	0	1	1
Ostatní	0	1	1	1	0

Ostatní – leiomyom, slizniční fibrom, GIST – gastrointestinální stromální tumor

Tabulka 9 – *Diagnostikované patologické změny jícnu v IKEM v letech 2013 – 2017 ve vzorcích získaných pomocí endoskopické resekce (ER) nebo endoskopické submukózní disekce*

Místo odběru	Patologické změny	2013	2014	2015	2016	2017
ŽALUDEK	Adenokarcinom	1	1	2	6	1
	NET	1	1	0	0	2
	MANEC	0	0	0	1	0
	Adenom	0	1	0	0	0
	Hyperplastický polyp	0	1	1	1	0
	Ostatní (gastritis, Schwannom)	0	0	1	1	0
TLUSTÉ STŘEVO	Adenokarcinom	0	0	0	0	1
	NET	0	0	0	0	0
	MANEC	0	0	0	0	0
	Adenom	0	1	0	3	6
	Ostatní (jizva po EPE, bazaloid.SCC	0	0	0	0	3

Tabulka 10 - *Diagnostikované patologické změny žaludku a tlustého střeva v IKEM v letech 2013 – 2017 ve vzorcích získaných pomocí endoskopické resekce (ER)*

12. Diskuse

Klíčovou součástí diagnostického procesu u většiny onemocnění, která mají příslušný morfologický korelát, je histopatologické zhodnocení bioptických vzorků. Nejinak je tomu i u onemocnění gastrointestinálního traktu.

Celý diagnostický proces začíná odběrem bioptického materiálu při endoskopickém vyšetření. Materiálu musí být odebráno dostatečné množství, aby bylo možno v definitivních histologických preparátech bezpečně posoudit změny jednotlivých struktur tkáně pocházející z GIT. Stejně tak musí být materiál odebrán pokud možno šetrně, aby nedošlo k arteficiálním strukturálním změnám, které mohou výrazně zkomplikovat stanovení definitivní diagnózy.

Dalším krokem je zpracování bioptického materiálu v histopatologické laboratoři. Zde musí být dodrženy přesně stanovené pracovní postupy, aby se zabránilo znehodnocení endoskopických vzorků. Důležitá je správná fixace materiálu, od které se dále odvíjí správné výsledky jednotlivých barvících metod. Při špatné fixaci je ovlivněno i krájení vzorků zalitých do parafínových bločků, kdy může dojít k potrhání tkáně a tím ke ztížení hodnocení strukturálních změn v mikroskopu. Pokud by došlo k chybě v jakémkoliv kroku zpracování vzorků v bioptické laboratoři, mohou být ovlivněny i výsledky doplňujících imunohistochemických vyšetření.

Obecnou tendencí ve vývoji endoskopických léčebných metod je pak stále větší snaha o rozšíření jejich spektra a současně snaha o to, aby tyto metody byly co nejšetrnější k pacientovi.

13. Závěr

Endoskopické metody jsou dynamicky se rozvíjející oblastí medicíny. Zdokonalování endoskopických technik sebou přináší i rozšíření spektra odebíraných histologických vzorků a měnící se nároky na jejich zpracování a hodnocení.

IKEM Praha je specializovaným centrem, které provádí endoskopické léčebné metody, jako je radiofrekvenční ablace, submukózní disekce nebo mukózní resekce. Odebraný bioptický materiál je odesílán na Pracoviště klinické a transplantační patologie IKEM, kde vzorky hodnotí specializovány jícnový patolog.

Dle získaných statistik od roku 2013 – 2017 bylo na Pracovišti klinické a transplantační patologii IKEM vyšetřeno celkem 341 endoskopických resekátů jícnu od 149 pacientů. Mimo jícen to bylo 50 endoskopických vzorků od 37 pacientů. Z celkového počtu 341 endoskopických resekátů bylo histologicky diagnostikováno 78 případů adenokarcinomů jícnu, 30 dlaždicových karcinomů jícnu a 34 pacientů mělo Barrettovův jícen s dysplázií.

Cílem bakalářské práce bylo komplexně popsat metodiku zpracování histologických vzorků získaných při endoskopických vyšetřovacích a léčebných metodách. Již od samého prvopočátku, tedy od odběru endoskopických vzorků, je kladen vysoký důraz na kvalitu odběru. Pouze správně odebraný histologický materiál umožní v konečné fázi správné stanovení definitivní diagnózy, což není možné u vzorků zhmožděných nebo jinak poškozených.

Nedílnou součástí celého procesu je precizní histologické zpracování endoskopických vzorků. Jakákoliv chyba v celé kaskádě jednotlivých kroků může vést k nevratnému poškození struktury tkání, což znemožní přesné posouzení povahy léze.

14. Seznam zkratek

GIT	gastrointestinální trakt
EMR	endoskopická mukózní resekce
ESD	endoskopická submukózní disekce
RFA	radiofrekvenční ablace
ER	endoskopická resekce
HGD	high grade displázie
LGD	low grade displázie
BJ	Barretův jícen
HE	hematoxylin – eosin
PAS	periodic acid Schiff
ALP	alciánová modř se Schiff činidlem
AMACR	Alpha-methylacyl-CoA racemase
TCD	tumor cells dissociation
HM	horizontal margins
VM	vertical margins

Tabulka 11 – *Seznam zkratek*

15. Seznam literatury a zdrojů

1. **VAJNER L., UHLÍK J.,** et al. Lékařská histologie II. Praha: Karolinum, 2014. Str. 42 – 43, 51 – 52. ISBN: 978-80-246-2165-4

2. **KLIKA E.** Histologie pro stomatology. Praha: Avicenum/zdravotnické nakladatelství, 1988. Str. 266 – 269.

3. **JIRÁSEK V.** Indikace k endoskopickému vyšetření horní a dolní části trávicí trubice (gastroskopie a kolonoskopie). Interní medicína pro praxi. 2003, 360-362

4. **MESSMANN H.** Atlas of colonoscopy. New York: Georg Thime Verlag, 2006. Str.2. ISBN: 1-58890-431-8

5. **TAMS T.R., RAWLINGS A.C.** Small animal endoscopy. , 3rd edition Missouri: Elsevier Mosby, 2011. Str.97. ISBN: 978-0-323-05578-9

6. **BENCROFT, J. D. a GAMBLE, M.** Theory and Practice of Histological Techniques. 5th. Philadelphia : Churchill Livingstone, 2002. str.63 - 182. ISBN: 0-443-06435-0.

7. **STEFANOVÁ M., TUČKOVÁ I**., et al. Biopsie nejsou dostatečné pro přesnou diagnostiku neoplazie u pacientů s Barrettovým jícnem. Gastoent Hepatol. 2013, 67(4): 264-270

8. **WEON J.K, GA WON S.** et al. Endoscopic resection of early gastric cancer: current status and new approaches. Gastroenterol Hepatol. 2016, 1:24

9. **ŠPIČÁK J., URBAN O.** et al. Novinky v digestivní endoskopii. Praha: Grada, 2015. Str. 49 – 80. ISBN: 978-80-247-5925-8

10. **MARTÍNEK J., FALT P., GREGAR J.** et al. Standardy České gastroenterologické společnosti – endoskopická léčba pacientů s Barrettovým jícnem a časnými neoplaziemi jícnu. Gastroent Hepatol. 2013, 67(6): 479-487

11. **BRYAN B., HWANG J.H**. Endoscopic resection of gastric and esophageal cancer. Gastroentrol Rep. 2015, 3(4): 330 – 338

12. **MARTÍNEK J., FALT P., SUCHÁNEK Š.** et al. Radiofrekvenční ablace v gastointestinálním traktu – aktuální stav ve světě a v ČR. Gastroent Hepatol. 2011, 65(5): 279-285

13. **JIRKOVSKÁ M.** Histologická technika pro studenty lékařství a zdravotnické techniky. Praha: Galén, 2006. Str. 13. ISBN: 80-7262-263-3

14. **VACEK Z.** Histologie a histologická technika. Praha: Aviceum/zdravotnické nakladatelství, 1988. Str. 286 – 302

15. **KOOLMAN J., RÖHM K.H.** Barevný atlas biochemie. Praha: Grada Publishing, 2012. Str. 32., ISBN: 978-80-247-2977-0

16. **BERANOVÁ M., TONAR Z.** Principy a příklady imunohistochemie. LF UK v Plzni: Příručka pro studenty, 2002.

17. **PUSZTASZERI M.P., SEELENTAG W**. et al. Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 2006, 54(4): 385 – 395

18. **UGORSKI M., DZIEGIEL P.** et al. Podoplanin - a small glycoprotein with many faces. Am J Cancer Res. 2016, 6(2): 370 **–** 386

19. **XIN L., SHOUYU W.** et al. Synergistic Role between p53 and JWA: Prognostic and Predictive Biomarkers in Gastric Cancer. PLoS One. 2012, 7(12): e52348

20. **MALUŠKOVÁ J.** Ústní sdělení, Praha 2018. MUDr. Jana Malušková

21. **LODERERROVÁ A.** Ústní sdělení, Praha 2018. RNDr. Alena Lodererová

22. **INTERNÍ DOKUMENTY:** Pracoviště klinické a transplantační patologie. IKEM Praha, 2018