

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2019

Radka Opavová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví B5345

Radka Opavová

Studijní obor: Zdravotní laborant 5345R020

**Moderní histologická diagnostika tumorů prsu, využití peroperačních
biopsií, imunohistochemie a molekulární genetiky a jejich vliv na
terapii pacientek**

Vedoucí práce: MUDr. Robert Slunečko

PLZEŇ 2019

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pouze s použitím zdrojů uvedených v seznamu citované literatury.

V Plzni dne 23. 8. 2019

.....

vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala za odborné vedení bakalářské práce MUDr. Robertu Slunečkovi a za poskytnutí cenných informací. Dále děkuji laborantce Gábině Suché za podnětné připomínky.

ANOTACE

Příjmení a jméno: Opavová Radka

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Moderní histologická diagnostika tumorů prsu, využití peroperačních biopsií, imunohistochemie a molekulární genetiky a jejich vliv na terapii pacientek

Vedoucí práce: MUDr. Robert Slunečko

Počet stran: 76 (číslované 52, nečíslované 24)

Počet příloh: 13

Počet titulů použité literatury: 55

Klíčová slova: histologie, diagnostika, tumor prsu, peroperační biopsie, vyšetření zmrazených řezů, hematoxylin – eosin, imunohistochemie

SOUHRN

Bakalářská práce se zabývá histopatologickou diagnostikou tumorů prsu s podrobnějším zaměřením na peroperační biopsie, jejich indikace, využití, možnosti a limitace. Práce je rozdělena na teoretickou a praktickou část. V teoretické části je popsána anatomická struktura prsu, dále je upozorněno na rizikové faktory vzniku nádorového onemocnění a následně probírána histopatologická diagnostika rakoviny prsu. Praktická část pojednává o zpracování tkáně metodou peroperační biopsie, imunohistochemie a barvení HE (hematoxylin - eosin). Ze statistického zpracování dat a z literatury byly vyvozeny pozitivní i negativní aspekty peroperačního vyšetření, nicméně s omezeným rozsahem diagnostických dat není možné učinit celkové objektivní zhodnocení prospěšnosti peroperačního vyšetření lézí prsu.

ANNOTATION

Surname and name: Opavová Radka

Department: Department of Rescue Services, Diagnostic Fields and Public Health

Title of thesis: Modern histological diagnosis of breast tumors, the use of peroperative biopsy, immunohistochemistry and molecular genetics, and their effect on the treatment of patients

Supervisor: MUDr. Robert Slunečko

Number of pages: 76 (numbered 52, unnumbered 24)

Number of appendices: 13

Number of literature items used: 55

Keywords: histology, diagnosis, breast tumor, peroperative biopsy, frozen section examination, hematoxylin – eosin, immunohistochemistry

SUMMARY

The bachelor thesis deals with histopathological diagnosis of breast tumors with a more focus on peroperative biopsies, their indications, utilization, possibilities and limitations. The thesis is divided into theoretical and practical part. In the theoretical part, the anatomical structure is described, as well as the risk factors of the onset of cancer and the histopathological diagnosis of breast cancer is discussed. The practical part then deals with the tissue processing by peroperative biopsy, the use of immunohistochemistry and HE staining (hematoxylin- eosin). From the statistical data analysis and the literature, both positive and negative aspects of intraoperative consultation were derived. However, the diagnostic data were not sufficient to objectively determine the overall usefulness of intraoperative diagnosis.

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ	
ANOTACE	
SOUHRN	
ANNOTATION	
SUMMARY	
OBSAH	
1 Úvod	1
Teoretická část	3
2 Histologie a anatomie prsu	3
2.1 Stavba a vývoj prsu	3
3 Nádory prsu	5
3.1 Karcinom prsu u žen	5
3.2 Epidemiologie karcinomu prsu v České republice	5
3.3 Etiologie	6
3.3.1 Rizikové faktory	6
3.4 Druhy léčby	7
4 Diagnostika rakoviny prsu	8
4.1 Klinické vyšetření	8
4.1.1 Klinické symptomy	8
4.2 Radiologické vyšetření	9
4.2.1 Mamografie a screening	9
4.3 Histopatologické vyšetření	9
4.3.1 Dělení nádorů prsu – typing	10
4.3.2 Patogeneze – dělení na hereditární a sporadické nádory	11
4.3.3 ICD–O klasifikace a grading	12
4.3.4 TNM Klasifikace a staging	12
4.3.5 Imunohistochemické vyšetření karcinomu prsu a molekulární klasifikace	13

4.3.6	Faktory prognostické a prediktivní	15
5	Laboratorní histopatologické vyšetření	16
5.1	Zpracování biologického materiálu pro histologické vyšetření.....	16
5.1.1	Odběr materiálu	16
5.1.2	Postup zpracování histologického vyšetření.....	17
5.2	Imunohistochemické vyšetření tkání	18
5.2.1	Vizualizace komplexu (značení protilátek)	19
5.2.2	Odběr a zpracování materiálu pro imunohistochemii.....	19
5.2.3	Imunohistochemické metody průkazu.....	19
6	Zpracování peroperačních biopsií	20
6.1	Předoperační lokalizace lézí prsu	20
6.2	Peroperační konzultace	21
6.2.1	Odběr materiálu na peroperační konzultace	21
6.2.2	Hodnocení výsledků z peroperační konzultace	22
6.2.3	Postup peroperační biopsie.....	23
6.3	Indikace, využití, možnosti a limitace peroperačního vyšetření prsu....	23
6.3.1	INDIKACE PEROPERAČÍCH BIOPSIÍ PRSU	23
6.3.2	VYUŽITÍ PEROPERAČNÍCH BIOPSIÍ PRSU	25
6.3.3	MOŽNOSTI PEROPERAČNÍCH BIOPSIÍ.....	25
6.3.4	LIMITACE PEROPERAČNÍCH BIOPSIÍ PRSU	28
6.3.5	Zpracování peroperačních biopsií zmrazovací technikou	30
7	Vliv peroperační biopsie, IHC a molekulární genetiky na terapii pacientek	32
	Praktická část	33
8	Cíle práce.....	33
9	Metodika.....	34
9.1	Metoda peroperační biopsie.....	34
9.1.1	Postup vyšetření.....	34
9.1.2	Reagencie.....	35
9.2	Metoda barvení HE z parafinového bloku.....	35
9.2.1	Postup vyšetření, reagencie	35

9.2.2	Hodnocení vyšetření	36
9.3	Metoda imunohistochemie.....	36
9.3.1	Postup vyšetření.....	36
9.3.2	Reagencie.....	37
9.3.3	Hodnocení vyšetření	37
10	Výsledky.....	39
10.1	Peroperační biopsie ŠÚP Lochotín.....	39
10.2	Benigní a maligní nádory prsu.....	41
10.2.1	Benigní nádory prsu.....	42
10.2.2	Maligní nádory prsu.....	42
10.3	Porovnání primárně a definitivně diagnostických dat	43
10.4	Porovnání dat z peroperačních a definitivních vyšetření prsu.....	44
10.5	Zhodnocení sentinelových uzlin	47
11	Diskuse	49
12	Závěr.....	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	
	SEZNAM TABULEK	
	SEZNAM GRAFŮ	
	SEZNAM PŘÍLOH.....	
	PŘÍLOHY	

1 ÚVOD

Globálně patří mezi nejčastější a život ohrožující malignity karcinom prsu, postihující především ženy. Zhoubné novotvary kůže jsou na prvním místě ve výskytu nádorového onemocnění, na druhé pozici žebříčku je umístěn karcinom prsu, malignita vyskytující se u žen převážně ve vyspělých zemích světa [1]. Toto onemocnění je společností velmi vnímáno, a to pro vysokou incidenci a mortalitu a též vzhledem k nákladné diagnostice i léčebné terapii. Většina tumorů prsu je diagnostikována radiologickými zobrazovacími metodami [2].

Histologie jako nauka o fyziologické stavbě a funkci buněk, tkání, je relativně mladý obor, zakládající se na objevu optického mikroskopu v 16. století. Vědomosti, z čeho je živočišné tělo sestaveno na mikroskopické úrovni, je základem pro určení diagnózy a prognózy onemocnění [3].

Tato práce má za úkol popsat dostupné moderní histopatologické diagnostiky tumorů prsu, se zaměřením na tři hlavní histologické techniky. Jsou jimi barvení hematoxylin – eosin (HE), imunohistochemické barvení (IHC) a zpracování peroperačních biopsií. Pomocí imunohistochemického vyšetření v definitivní diagnostice lze detekovat mikrometastázy na základě detekce buněčných a tkáňových antigenů specifickou protilátkou. Popisují také využití molekulární genetiky, jejíž metody jsou aplikovány na speciálních molekulárně – genetických pracovištích.

Na začátku práce jsem uvedla popis a strukturu mléčné žlázy a dále se zmiňuji o patologické klasifikaci nádorů prsu a určení stádia onemocnění, o vlivu genetických a negenetických faktorů na vznik nádorového bujení. V důsledku jasné genetické predispozice vzniká 5 – 10 % všech maligních nádorů, nejčastěji na podkladu mutace *BRCA1* a *BRCA2* genů[4].

V práci se blíže zaměřuji na vyšetření peroperační biopsie, jejich indikaci, využití, možnosti a limitace. V rámci peroperačních konzultací při operaci prsu není vyšetření zmrazených řezů snadné, jelikož je zde velké množství tukové tkáně špatně zpracovatelné zmrazovací technikou. Vyšetření zmrazených řezů lézí prsu je však velmi přínosné u hodnocení resekcčních okrajů, jelikož pacienta může ušetřit před další náročnou operací, v práci byl hodnocen přínos vyšetření peroperačně u 7 % pacientek, kde se poté rozšiřoval chirurgický výkon.

Vyšetření tkáně ze zmrazených řezů je považováno za nejpřesnější metodu patřící do peroperačních konzultací. Tato metoda má roli při třídění tkání, diagnostice a řízení postupu probíhající operace, slouží tedy pro určení peroperační diagnózy nikoliv pro diagnózu definitivní[5]. Peroperační vyšetření je limitováno rozsahem zpracovaného materiálu a krátkým časem potřebným pro stanovení předběžné diagnózy a určení tak dalšího průběhu operace.

Tkáňové artefakty, změny ve struktuře buněk nebo tkáně vzniklé během operace či v laboratoři při zpracování, jsou zdrojem diagnostických problémů a v této práci jsou dále popsány. Pečlivá a správná manipulace s tkání minimalizuje jejich vznik.

V praktické části jsem se zaměřila na postup práce výše uvedených laboratorních metod a porovnávala diagnostická data primárních, peroperačních a definitivních biopsií prsu. Zaměřila jsem se také na popsání problematiky sentinelové uzliny, která má v diagnostice metastáz důležitý prognostický význam.

Nejefektivnějším způsobem detekce nádoru prsu je v současné době mamografický screening, který zachycuje společně s klinickým vyšetřením minimálně 90 % všech nádorů v populaci[4]. Dostupnost mamografického screeningu zavedeného od r. 2002 v České republice umožňuje včasný záchyt nádoru v raném stádiu onemocnění. Nalezená ložiska podezřelá z nádorových struktur se ověří punkční biopsií a histologicky vyšetří na odděleních patologie, kde za použití metody biopsie sentinelové uzliny a stanovení stadia onemocnění, je vybrána vhodná terapie pro pacientky, čímž se zvýší jejich možnosti na delší přežití. Onkologická léčba je cílená pro individuálního pacienta a je sestavená podle jeho potřeb s ohledem na výsledky z laboratoří [4].

TEORETICKÁ ČÁST

2 HISTOLOGIE A ANATOMIE PRSU

Obor histologie se primárně zabývá morfologií buněk, tkání a orgánů, případně i jejich funkcí[6]. Anatomie studuje struktury organismů, jejich orgány a tkáně jak z pohledu makroskopického, tak i mikroskopického[7].

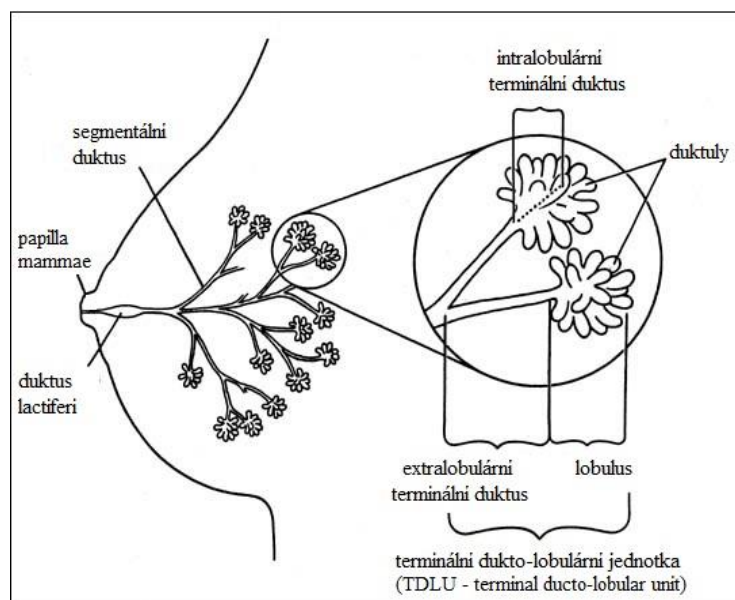
2.1 Stavba a vývoj prsu

Fyziologie prsu

Podklad prsu (mammy) tvoří mléčná žláza (glandula mammaria) spolu s tukovou tkání a vazivovým stromatem. Tukový polštář tvoří vrstvu premammární a retromammární. Žlázové těleso je složeno ze souboru 15–20 rozvětvených tuboalveolárních žláz, které se formují v laloky (lobi mammae) a dále samostatně vyúsťují na povrchu pravé nebo levé bradavky (papilla mammae). Povrch prsu je chráněn kůží a celý prs je inervován a cévně zásoben[6, 7].

Žlázové těleso je tvořeno epitelovými a stromálními buňkami[2]. Větve vývodního systému jsou označovány jako mlékovody (ductus lactiferi), jejichž stěna je tvořena dvouvrstevným epitelem[6]. Sekreční úseky drénované jedním terminálním kanálkem jsou označovány jako strukturální a funkční jednotka mléčné žlázy – lalůček (lobulus, v průměru cca 0,5 mm)[2]. Lalůček společně s terminálním kanálkem prezentují funkční jednotku mléčné žlázy, tj. terminální dukto–lobulární jednotku (*terminal ducto–lobular unit*, TDLU) viz. obrázek č.1. Tato jednotka je místem vzniku většiny benigních i maligních epitelových nádorů mléčné žlázy[6].

Mízní uzliny lymfatického systému slouží jako filtr, který je nedílnou součástí imunity[7]. Více jak 75 % lymfy je drenováno do axilárních uzlin, které jsou rozděleny podle lokalizace a vztahu k pektorálnímu na tři etáže, reziduálních 5 – 25 % lymfy odtéká do parasternálních uzlin[8].



Obrázek č.1: Anatomická struktura prsu (upraveno z

<http://editorial.glowm.com/resources/glowm/graphics/figures/v1/0270/002f.jpg>)

Vývoj prsu

Mléčná žláza je ektodermového původu. V embryonálním období u savců, tedy i u člověka u obou pohlaví, vzniká základ pro mléčnou žlázu, a to z mléčné lišty – silný pruh epitelu sahající od axily po tříslu (axilinguinální čára). Toto místo dává za vznik apokrinním žlázám jako je vývojově i mléčná žláza. V průběhu postnatálního období mléčné vývody pomalu rostou, větví se, jsou vytvořeny terminální konce, a v závislosti tlumivých vlivů mužských pohlavních hormonů testosteronu a androgenů už se dále mužská mléčná žláza nevyvíjí (výjimečně vzniká gynekomastie – zvětšení prsní žlázy u mužů).

V průběhu menstruačního cyklu, těhotenství a v menopauze se liší poměrové zastoupení strukturálních komponent prsu v závislosti na hladině hormonů. Na počátku puberty ženské pohlavní hormony mohou za pozvolné zmnožení vazivového stromatu, proliferaci systému vývodů a vytváření lalůčků (lobulů). Až v průběhu těhotenství dochází k plnému rozvoji žlázy, která se přestavuje k laktaci. Již v prvním trimestru těhotenství začíná přestavba žlázy a je hormonálně řízena zejména estrogény, progesteronem a prolaktinem. Estrogény ovlivňují proliferaci a diferenciaci epitelu žlázových vývodů. Progesteron a prolaktin mají za úkol řídit proliferaci a diferenciaci sekrečních oddílů žlázy[6].

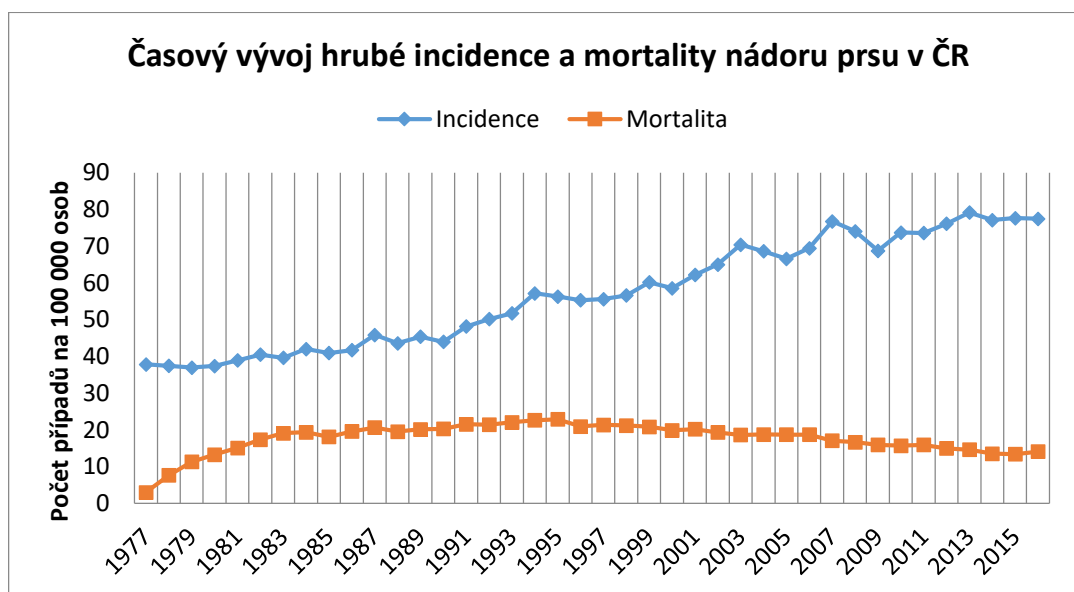
3 NÁDORY PRSU

3.1 Karcinom prsu u žen

Nejčastějším zhoubným nádorem u žen je karcinom prsu, který vzniká v anatomických strukturách mléčné žlázy, jeho vzniku předchází atypická duktální nebo lobulární hyperplazie (rozlišení podle vzhledu buněk a jejich buněčných mitóz)[1].

3.2 Epidemiologie karcinomu prsu v České republice

Epidemiologie se zabývá studiem faktorů, které ovlivňují zdraví a nemocnost populace obyvatel, jejíž cílem je navrhnout postupy ke snížení incidence a mortality na určité onemocnění ve sledované populaci[2]. Následující graf č.1 znázorňuje vývoj hrubé incidence (počet nových případů na 100 000 osob) a hrubé mortality (počet úmrtí na diagnózu na 100 000 osob) nádoru prsu v populaci České republiky v letech 1977 – 2016. Incidence karcinomu se zvyšuje s věkem [9]. Od roku 2002 byl spuštěn organizovaný mammární screening v ČR. Až 95 % karcinomů je detekováno pomocí mamografického screeningu, a proto je v grafu patrný vzrůst křivky incidence od roku 2002, ale nestoupá mortalita, jelikož jsou nádory odhaleny a léčeny v raných stádiích onemocnění[4].



Graf č.1: Časový vývoj hrubé incidence a mortality nádoru prsu v ČR; (Zdroj: [http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#\[9\]](http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#[9]))

3.3 Etiologie

Karcinom prsu se řadí mezi tzv. hormonálně závislé nádory. Kancerogenní účinky se připisují zejména estrogenům, které indikují expresi některých růstových faktorů a zřejmě i onkogenů, jejichž produkty působí významným způsobem na proliferační aktivitu buněk. Tyto účinky jsou s různými antiproliferačními látkami za fyziologických okolností v rovnováze, která může být ale narušena trvající estrogení stimulací nebo účinky dalších kancerogenních faktorů, které mohou dále způsobit různé genetické abnormality. Důsledkem genetických abnormalit je aktivace některých onkogenů (*myc*, *ras*, *HER-2/neu* aj.) nebo poškození tumor supresorových genů (*p53*, *Rb*). Projevuje se to postupnou fenotypovou změnou buněk, která se vyvine přes dysplastické změny, atypické dysplastické změny, karcinom *in situ* až ke vzniku invazivního karcinomu[1].

3.3.1 Rizikové faktory

a) NEGENETICKÉ RIZIKOVÉ FAKTORY

Jednoznačným primárním negenetických faktorem je považován hormon estrogen[10]. Délka expozice estrogenů, tj. časná menarche (před 12. rokem), pozdní menopauza (po 55. roce věku), nuliparita „(bezdětnost)“, pozdní věk první gravidity (po 35. roce) – zvyšuje riziko vzniku karcinomu[1]. Naopak diferenciaci epitelu prsní žlázy na zralé žlázové buňky během první gravidity můžeme zařadit mezi protektivní faktory. Tyto buňky po těhotenství setrvávají déle v G1–fázi, mají prodloužený buněčný cyklus, který není tak náchylný ke vzniku mutací[10]. Hormonální přípravky jako je antikoncepce a náhradní hormonální léčba v klimakteriu také mohou zvyšovat riziko vzniku karcinomu prsu[4].

Rizikovým faktorem vzniku nádorů jsou též účinky ionizujícího záření (maligní angiosarkomy po radioterapii karcinomu prsu), benigní chronická onemocnění prsní žlázy, větší tělesná hmotnost u premenopauzálních žen, kouření, nadměrná konzumace alkoholu, vliv chemických kancerogenů (pesticidy)[1, 10].

b) GENETICKÉ RIZIKOVÉ FAKTORY

Na regulaci buněčného dělení se podílejí **onkogeny**, které zvyšují, stimulují buněčné dělení. Jejich produkty jsou onkoproteiny. Dále jsou zodpovědné za regulaci **tumor–supresorové geny** (*antionkogeny*), které mají antiproliferační účinek a potlačují tak dělení

buněk. Dále se na regulaci účastní **geny regulující apoptózu**. Poruchy v regulaci buněčného cyklu mohou vést k nádorovému bujení.

Mezi rizikové genetické faktory patří abnormality, jako jsou mutace supresorových genů *BRCA-1*, *BRCA-2* a protoonkogenu *erbB2 (HER-2/neu)* vyskytující se u hereditárního karcinomu prsu, nebo mutace genu *TP53*[10].

- *HER-2/neu (erbB2)*

Gen, který kóduje velký transmembránový glykoprotein, jenž je prokazatelně z velké části homologní k receptoru EGFR (epidermal growth factor receptor) a také k receptoru pro růstový faktor s tyrozin kinázovou aktivitou. Dnes je využíván u metastazujících karcinomů s prokazatelnou zvýšenou expresí *HER-2/neu* léčebný přípravek Herceptin (trastuzumab), jakožto *monoklonální protilátka antiHER-2/neu*, který prokazatelně prodlužuje dobu přežití[10].

- *BRCA1 a BRCA2*

Oba genové produkty se podílejí na opravě škod DNA v buněčném jádře během G1/S-fáze buněčného cyklu. *BRCA1* je rozložen na 24 exonech a zabírá přes 100Kb DNA. *BRCA2* se nachází na 27 exonech, které se rozprostírají přes 70 Kb DNA. Oba proteiny spolupracují s P53 a s RAD-51 při opravě škod DNA způsobených zářením, takže při neúplné funkci *BRCA* genů nejsou aktivní mechanismy oprav molekuly DNA a může to vést k vyšší pravděpodobnosti vzniku mutací. V histologickém preparátu u pacientek s mutací *BRCA1* se vyskytuje vyšší pleomorfismus jader s vyšším počtem mitóz a snížená tvorba tubulů, oproti tomu nositel *BRCA2* vykazuje pouze nižší tvorbu tubulů[10].

3.4 Druhy léčby

Léčba musí vždy splňovat individuální potřeby a preference pacienta. Operace je primární léčbou časných stádií malignity prsu a mnoho žen se vyléčí pouze operací. Účelem zákroku je úplné odstranění primárního nádoru s negativními okraji, což zmenší riziko případného opakování tumoru. Mezi doplňující léčbu náleží radioterapie, chemoterapie a biologické látky, které se snaží o zmenšení rizika budoucího opakování výskytu nádoru a o snížení morbidity a mortality související s tumorem prsu[11].

4 DIAGNOSTIKA RAKOVINY PRSU

K odhalení nádorového onemocnění prsu je podstatná celková diagnostika pacienta, která se skládá z klinického, laboratorního a radiologického vyšetření s využitím zobrazovacích a bioptických metod. Diagnostický proces je klíčový pro výběr vhodné léčebné terapie a stanovení prognózy onemocnění[12].

Laboratorní diagnostika obsahuje hematologické a biochemické vyšetření společně s vyšetřením nádorových markerů, histopatologické vyšetření a molekulárně biologické vyšetření, které se specializuje především na mutace genů *BRCA-1* a *BRCA-2*. U nemocných s pozitivní rodinnou anamnézou a výskytem karcinomu před 30. rokem života je testování velmi důležité [1, 12].

4.1 Klinické vyšetření

Základem diagnostického postupu je klinické vyšetření, jehož součástí musí být důkladná rodinná a osobní anamnéza, celkové fyzikální vyšetření s velkou pozorností zaměřenou na prsa a axilární i krční lymfatické uzliny[11]. Lékař vyšetřuje prsní žlázy pohledem – aspekce a pohmatem – palpáce[1].

4.1.1 Klinické symptomy

První stádia karcinomu prsu, neinvazivních či již invazivních, jsou často asymptomatická. Pokud se jedná o nádor větších rozměrů, může se projevit jako hmatatelná bulka, většinou nebolestivá. Mastodynie (bolest prsu) doprovází častěji benigní nádory, týká se pouze 5 % případů[11].

Konfigurace prsu může též poukazovat na přítomnost nádoru, jeho zvětšení, zmenšení, popřípadě zvýraznění žilní pleteně. Na bradavce mohou být přítomny povrchové změny, jako je šupinatění, eroze a vtahování kůže. Projevem pokročilého stadia onemocnění je sangvinolentní výtok z bradavky, oploštění bradavky nebo její vpáčení. K celkovým projevům patří bolesti v kostech u metastatického postižení skeletu, úbytek hmotnosti, nechutenstvím aj.[1].

4.2 Radiologické vyšetření

Nedílnou součástí diagnostického postupu tumorů prsu je využití zobrazovacích metod. Převládající postavení z vyšetřovacích metod patří metodě mamografie, jejíž výtěžnost je minimálně 90 % ve spojení s klinickým vyšetřením, a tímto způsobem je diagnostikována převážná většina nádorů prsu. Mamografické vyšetření má důležitý význam i pro včasnou detekci recidivy, je využitelný i u žen s denzní prsní tkání, silikonovými implantáty a pozitivním nálezem v axilárních uzlinách. Ultrasonografie má vysokou senzitivitu (95 %) a zařazuje se jako doplňkové vyšetření po mamografii a pod její kontrolou lze provést cílené bioptické vyšetření[1]. Také je významnou screeningovou metodou u mladých žen s dědičnou dispozicí[10].

Pro posouzení změn v okolí maligního nádoru a odhalení metastatického poškození je užitečná počítačová tomografie (CT – *computed tomography*), magnetická rezonance, scintigrafie skeletu a PET (*pozitronová emisní tomografie*) [11].

4.2.1 Mamografie a screening

Mamografický screening je pravidelné a preventivní vyšetření žen bez příznaků onemocnění pro zvýšení kvality a délky jejich života. V České republice byl oficiálně zahájen v září roku 2002 pro ženy ve věku od 45 let, vyšetření je opakováno jednou za dva roky[13]. Cílem mamografického screeningu je detekovat rozvíjející se karcinom prsu v co nejčasnějším stádiu, kde je snáze léčitelný. Efektivně zachycuje až 95 % všech karcinomů v populaci prošlé screeningem. Úmrtnost u žen, které prošly screeningem, klesla o více než 40 %, kde je největší výtěžností pro tuto metodu věková oblast nad 50 let[4].

4.3 Histopatologické vyšetření

Histologická klasifikace znamená zařazení do skupiny nádorů se shodnou morfologií buněk, vlastnostmi a chováním k okolní tkáni. Při pozitivním klinickém či radiologickým nálezem je nutné histologické vyšetření léze a její diagnostická klasifikace. Nádory klasifikujeme podle buněčného typu (na základě histologického vyšetření), podle biologických vlastností a podle anatomické lokalizace[12]. Dle recentního vydání klasifikace WHO (World Health Organization) je určen „typing“ a „grading“, podle nejnovější verze TNM klasifikace histopatologický „staging“[14].

Histopatolog má za úkol vyhodnotit:

- velikost nádoru mm
- vzdálenost tumoru od resekcčních okrajů chirurgického řezu v mm
- histologický typ nádoru = typizace, typing (pokud se skládá nádor z více ložisek, určit jejich typ a poměrné zastoupení složek)
- stupeň diferenciacie nádoru = grading
- typ šíření nádoru do okolní tkáně (případně přítomnost perineurálního šíření), velikost intraduktální komponenty v procentech, případnou invazi nádorových buněk do lymfatického a krevního oběhu (lymfangiinvaze, angiinvaze)
- v případě exenterace axily počet vyjmutých uzlin a uzlin postižených metastázami.

Stádium nádorového onemocnění = staging, je určeno patologem na základě výše uvedených informací o nádoru. Při rutinním histologickém vyšetření se u 25 % pacientek s negativními axilárními uzlinami až po prokrájení a imunohistochemii prokážou okultní metastázy, které mohou ovlivnit celkové přežití u premenopauzálních pacientek [14]. „Rating“ je stanovení exprese receptorových proteinů jako je hormonální estrogenový a progesteronový receptor, receptor HER2/neu a dále stanovení markeru proliferace Ki67[14].

4.3.1 Dělení nádorů prsu – typing

Základní rozdělení nádorů z hlediska jejich biologických vlastností je na benigní, hraniční malignity (prekanceróza) a maligní tumory.

Benigní nádory (nezhoubné) ohraničené, zůstávají na místě vzniku a netvoří vzdálené metastázy. Při růstu mohou utlačovat jiné orgány a některé mohou dojít k malignímu zvratu. Z benigních tumorů se nejčastěji vyskytují epitelové papilomy a fibroadenomy smíšené epitel-mezenchymální [12]. Na rozmezí benigních a maligních nádorů rozlišujeme atypickou hyperplazii (ADH), která patří mezi benigní onemocnění se zvýšeným rizikem vzniku malignity.

Přehledné rozdělení nejčastějších benigních lézí:

- a) Neproliferující léze – epitelové metaplazie, cysty, papilom, fibroadenom, adenózy a mírné a střední epiteliální hyperplazie
- b) Proliferující léze bez atypií – těžké epiteliální hyperplazie
- c) Proliferující léze s atypiemi – atypická duktální hyperplazie[15].

Maligní nádory (zhoubné) rostou velmi rychle a nekontrolovatelně, vytvářejí metastázy [12]. Stoupá incidence, ale nestoupá mortalita, protože jsou dnes již odhalovány v časnějších stádiích růstu[13].

Nejčastější malignitou v prsu jsou karcinomy – zhoubné novotvary epitelového původu, ostatní malignity jsou všechny poměrně vzácné (mezenchymální tumory – sarkomy, vznikající na podkladu pojivové tkáně, např. sval, kost) . [1].

Karcinom můžeme rozlišovat podle jeho původu (nejčastěji na duktální, či lobulární) a z hlediska invaze na karcinom *in situ* – neinvazivní, nebo na invazivní – maligní novotvar, který prostupuje stěnami vývodů a směřuje do tukové tkáně[11]. Vyšší incidenci mají duktální karcinomy (*in situ* či invazivní) oproti lobulárním nebo smíšeným – duktálně lobulárním formám nádorů[16].

Malignity prsu:

- a) Karcinomy – duktální, lobulární, které tvoří přes 90 % tumorů a dále speciální jako jsou metaplastické, neuroendokrinní, papilární, mucinózní a další
- b) Sarkomy jsou vzácné – nejčastější je angiosarkom
- c) Smíšené – phyllodes tumor / fyloidní tumor
- d) Další malignity především hematologického charakteru
- e) V rámci prsu je možný výskyt veškerých kožních malignit, vzácně metastázy [17]

4.3.2 Patogeneze – dělení na hereditární a sporadické nádory

Vznik karcinomu prsu na podkladě dědičných genetických změn se vyskytuje u 5 – 10 % nemocných žen. Tyto genetické změny jsou způsobeny mutacemi genů *BRCA1* nebo *BRCA2*, které se dědí s autosomálně dominantní dědičností. *BRCA* mutace všeobecně způsobují zvýšené riziko vzniku karcinomu prsu, ovárií, kolorekta a prostaty[10]. U žen přenašeček mutovaného genu je riziko vzniku nádorového onemocnění velmi vysoké. Muži přenašeči jsou více ohroženi rizikem vzniku karcinomu prostaty nebo kolorekta[1].

Vývoj karcinomu prsu je dlouhodobý vícestupňový proces. Nádorová tkáň o průměru 1 cm obsahuje 10^9 nádorových buněk, které jsou výsledkem asi 30 zdvojení. K růstu nádoru a metastazování slouží aktivita stimulovaných stromálních buněk, produkujících proteolytické enzymy a angiogenní faktory. Tyto mechanismy se uplatňují u většiny sporadických nádorů[1].

4.3.3 ICD–O klasifikace a grading

K přesné identifikaci nádorového onemocnění se používá mezinárodní klasifikace nádorů dle ICD–O (International classification of diseases in oncology), kterou poskytuje Světová zdravotnická organizace (WHO – World Health Organization). Nádor je určen topografickým a morfoloogickým kódem, např. pro karcinom prsu je topografický kód C50.X, kde X upřesní jeho lokalizaci (př. C50.2 – zhoubný novotvar, horní vnitřní kvadrant prsu). Morfoloogický kód (M – kód) popisuje čtyřmi číslicemi histoloogický typ nádoru a pátou číslicí biologické chování nádoru (př. M – 8500/3 – invazivní duktální karcinom). Posledním krokem je stanovení stupně diferenciacce nádoru – grading[14].

- **Grading**

Vzhledem ke stupni diferenciacce (vyzrálosti) nádorových buněk karcinomu prsu stanovuje histopatoloog grade (G_x, G₁, G₂, G₃), který slouží jako další podmínka při vybírání vhodného léčebného postupu. V současné době je grading určován Nottinghamskou klasifikací a skórováním (modifikace metody dle Elstona a Ellise[18]), hodnotí se tvorba tubulů, jaderná polymorfie a počet mitóz, kde každé z těchto tří kritérií lze ohodnotit 1–3 body. Lze tedy říci, že čím více je nádor diferencovanější (a jeho nádorové buňky jsou podobné zdravým buňkám), tím je grade nižší a tím lépe bude odpovídat na léčbu, a proto je grading významnou prognostickou a prediktivní informací.

Vyhodnocení gradingu[10]:

G _x	stupeň diferenciacce nemůže být určen
G ₁	(3 – 5 bodů) dobře diferencovaný
G ₂	(6 – 7 bodů) středně diferencovaný
G ₃	(8 – 9 bodů) špatně diferencovaný

4.3.4 TNM Klasifikace a staging

TNM klasifikace zhoubných novotvarů se dělí na klinickou, předoperační cTNM, která zahrnuje výsledky z klinického a radioloogického vyšetření, a dále se rozlišuje patoloogická, postoperační pTNM klasifikace, která hodnotí primární nádorové ložisko (T – tumor), stav regionálních lymfatických uzlin (N – nodus), založení vzdálených metastáz (M – metastázy) a je tak podstatná pro posouzení prognózy onemocnění. Na základě zachycení a pečlivém zhodnocení těchto tří komponent je určeno klinické stádium

onemocnění – *staging (stadium 0. – IV.)*[10]. Z hlediska nasazení vhodného druhu léčebného postupu je velmi důležité vyhodnotit, v jakém stádiu onemocnění se pacientka nachází[11]. Staging slouží též vytvoření prognózy a porovnávání výsledků terapie[10].

4.3.5 Imunohistochemické vyšetření karcinomu prsu a molekulární klasifikace

Dále se hodnotí exprese receptorových proteinů, kterými jsou estrogenový receptor (ER), progesteronový receptor (PR), receptor pro lidský epidermální růstový faktor (ErbB2 či HER2/neu) a proliferační index Ki67.

- Klasifikace na molekulární subtypy

Dle výskytu specifických receptorů v nádorových strukturách dělíme tumory na pozitivní (ER+, PR+, HER2+)*¹ a negativní (ER–, PR–, HER2–). Na základě exprese těchto receptorů a parametrů (Ki67 a grade) karcinomy klasifikujeme z hlediska klinicky používané histologické klasifikace na molekulární subtypy, jsou jimi: 1. lumenální A, 2. lumenální B – HER2/neu negativní, 3. lumenální B – HER2/neu pozitivní, 4. HER2 pozitivní klasický (neexprimující ER– α a PR) a 5. triple–negativní karcinom prsu (karcinom neexprimující receptory: ER– α , PR a HER2)[19]. Poznámka: *¹Pozitivita je stanovena u receptorů ER a PR (znaménko +) od 5 % pozitivních jader nádorových buněk. Pozitivita HER2/neu souhlasí s membránovou pozitivitou receptorů HER 3+ (HercepTest, Dako) či 2+ (validováno FISH vyšetřením).

Lumenálním typem A jsou tumory, které exprimují receptory ER a PR a jsou bez exprese receptoru HER2, zatímco lumenální typ B je označení pro tumory, které exprimují současně ER, PR a buď i receptor HER2 a jsou označeny jako HER2 pozitivní nebo v opačném případě jako HER2 negativní. Agresivnější nádory bez exprese těchto tří receptorů (ER–, PR–, HER2–) jsou označovány jako „triple–negative“ a mají nejhorší prognózu. Triple negativní karcinomy prsu se vyskytují u 10–17 % pacientek, nejčastěji u nosiček mutace *BRCA1*, a většina triple negativních karcinomů vykazuje basal–like genotyp [20].

- **Status hormonálních receptorů**

Mezi rutinní imunohistochemické vyšetření karcinomu prsu zařadíme stanovení steroidních hormonálních receptorů ER a PR, pro vybrání senzitivní hormonální terapie. Status hormonálních receptorů je podmínkou pro zahájení počátku léčby a je prediktivním

markerem odpovědi na hormonální léčbu. Až u 70 % patientek s diagnostikovaným karcinomem prsu, jsou exprimovány estrogenové nebo progesteronové receptory [21].

- ***Onkoprotein HER2/neu***

HER2/neu (zkráceně HER2) je tyrozinkinázový transmembránový receptor vyskytující se u epiteliálních buněk. Rodina receptorů epidermálního růstového faktoru se skládá ze čtyř buněčných povrchových receptorů, zařadíme sem EGFR (epidermal growth factor receptor) tzv. HER1, HER2/ neu (human epidermal growth factor receptor–2), HER3 (human epidermal growth factor receptor–3) a HER4 (human epidermal growth factor receptor–4). Vazba specifických růstových faktorů nebo ligandů na tři z těchto receptorů způsobuje, že interagují nebo dimerizují buď s receptorem stejného typu, nebo s jiným členem rodiny. HER2 nereaguje přímo s žádným ligandem, proto je nazýván jako "sirotčí receptor". Místo toho dimeruje s ligandem vázaným receptorem EGF, HER3 nebo HER4. Dimerizace receptorů aktivuje signalizační cesty uvnitř buňky vedoucí k buněčnému růstu, proliferaci a přežití (př. zablokování apoptózy) [22].

V nádorových buňkách se vyskytují chromozomové aberace a genové mutace vlivem nestabilního genomu, kde diagnosticky významnou mutací je amplifikace genu *HER2/neu* dlouhého raménka 17. chromozomu. Tato amplifikace *HER2 genu* koreluje s overexpresí jeho proteinového produktu. HER2 pozitivní tumory (s nadměrnou expresí HER2) se chovají agresivněji s nepříznivou prognózou, oproti tomu je zde možnost dobrých výsledku na anti-HER2/neu biologickou léčbu trastuzumabem (Herceptin®), lapatinibem (Tyverb®) aj. Gen *HER2* je amplifikován přibližně u 20 % karcinomů prsu, to znamená, že buňky těchto nádorů obsahují extra kopie genu *HER2*[22].

K diagnostice HER2 se v první řadě využívá imunohistochemické vyšetření, v případě slabší positivity je nutné doplnit molekulárně–genetické vyšetření nádorových buněk metodou FISH (*fluorescenční in situ hybridizace*)[22].

Pokud je odhalen HER2 pozitivní karcinom na malém pracovišti, je nutné tuto skutečnost ještě ověřit na jednom z osmi referenčních pracovišť v ČR (např. Bioptická laboratoř Plzeň). Léčba je finančně nákladná a je určena pro nádory imunohistochemicky silně pozitivní (3+) nebo 2+ s FISH potvrzenou amplifikací genu *HER–2/neu* [23].

- ***Proliferační marker Ki67***

Marker Ki67 je jaderný protein exprimován buňkami, které procházejí buněčným dělením, proliferací. U buněk v G₀fázi (klidový stav buňky) se marker Ki67 nevyskytuje. Pokud marker vykazuje nadměrnou expresi, poukazuje tedy na vyšší proliferační aktivitu buněk nádoru, která koreluje s gradem a horší prognózou.

4.3.6 Faktory prognostické a prediktivní

Významné prognostické informace o průběhu nemoci jsou poskytnuty patologickou klasifikací nádoru a axilárních lymfatických uzlin[11]. Prediktivní faktory souvisí s odpovědí na léčbu. U karcinomu prsu je věk pacientky v době stanovení diagnózy a stádia onemocnění prognostickým a prediktivním faktorem. Dalšími faktory jsou grading, typing, status hormonálních receptorů, mitotický index, exprese receptoru HER2/neu, invaze do krevního a lymfatického systému a odpověď na neoadjuvantní terapii[24].

5 LABORATORNÍ HISTOPATOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

5.1 Zpracování biologického materiálu pro histologické vyšetření

Histologické vyšetření se skládá z rozboru odebraného vzorku tkáně buď z živého organismu = biopsie, nebo je materiál odebrán během pitvy z mrtvého organismu = nekropsie (nebo z usmrceného experimentálního zvířete)[25]. Vyšetření tkáně pacienta se skládá z následujících šesti úseků, které jsou podstatou histologické techniky:

- 1) odběr vzorku
- 2) fixace vzorku
- 3) zalévání vzorku do média
- 4) krájení řezů
- 5) barvení
- 6) montování – vznik trvalého preparátu

Na závěr je do média uzavřený řez – trvalý histologický preparát, hodnocen lékařem ve světelném mikroskopu[26].

5.1.1 Odběr materiálu

Pro histologické vyšetření je biologický vzorek odebrán lékařem v nejkratší možné době a nejšetrněji, aby nedošlo ke zhmoždění tkání pacienta. Odběrová nádoba je vždy popsána štítkem a spolu s informacemi na průvodním listu jsou při převzetí histologickou laboratoří patřičně zkontrolovány a zaevidovány do systému laboratoře [25].

- ***Bioptické metody***

Mezi bioptické metody v diagnostice lézí prsu patří aspirační tenkojehlové punkční biopsie = *FNAB*, *FNAC* (*fine-needle aspiration biopsy or cytology*), biopsie tlustou jehlou (*core-needle biopsy*) a excizní biopsie (vyříznutí)[10]. Odebraná tkáň metodou *FNAB* je nazývána minibiopsie a oproti *FNAC* je zde mírné zpřehlednění struktury tkáně docíleno vrstvenými mikrofragmenty tkáně, avšak jakákoliv aspirační biopsie zahrnuje cytologii, nikoliv histologii a slouží jako potvrzení či vyvrácení případné patologie[27].

Cílená biopsie tenkou jehlou (1 – 2 mm širokou) se provádí se za kontroly ultrazvuku a stereotaktické mamografie, buňky tkáně jsou odebrány bez zachování histologické

struktury. Aspirát je složen z krve, tkáňové tekutiny s buněčnou suspenzí případně nepatrnými drobnými kousky tkáně. Při *core* biopsii se získává z ložiska trojrozměrný válec tkáně a většinou je tato technika použita při větších tumorech[27, 28]. *Core* biopsie je preferována před FNAB, protože je spolehlivější a snižuje potřebu dalších biopsií. *Core* biopsie je užitečná pro hodnocení cytologických a architektonických znaků a pro diagnostiku invazivního karcinomu[28]. *Core cut biopsy* lézí prsu je v současné době považovaná za nejpoužívanější předoperační metodu a poskytuje oproti FNAC dostatečné množství materiálu pro diagnostiku a zhodnocení histologické struktury[29].

- ***Specifické požadavky pro odběr excizi***

Součástí přípravy histologického materiálu klinickým lékařem je orientace vzorku, musí být jasné tři body, aby byla jasná správná topografická orientace. Jedná se většinou o tři různé stehy, nebo kožní povrch a dva odlišné stehy. Při biopsii prsu musí být vzorek kompaktní, bez nařiznutí, aby bylo možné se jasně a zřetelně vyjádřit k okrajům excize. Pokud je materiál rozdělen na více vzorků, musí být označeno místo pro vzájemnou souvislost. Správně excidovaná axila by měla dorazit do laboratoře spolu s oddělenou sentinelovou lymfatickou uzlinou [30, 31].

5.1.2 Postup zpracování histologického vyšetření

Ihned po odebrání biologického materiálu fixací zabráníme autolýze buňky vlastními enzymy, a to buď fyzikálními, nebo chemickými metodami. Odebraná tkáň se vloží do fixačního roztoku nebo se zpracuje zmrazovací směsí [25].

K tomu abychom byli schopni nakrájet materiál na mikrotomu, je zapotřebí fixovaný vzorek nejprve prosytit zalévacím rozpustným nebo nerozpustným médiem. Pro praxi je souhrnně nejvíce využívaným médiem *parafin* (teplota tání 52–58 °C) a to pro nízkou nákladnost a jednoduchou recyklaci[25].

Před mikroskopováním je nutné obarvit tkáňové řezy speciálním barvivem, abychom byli schopni vzájemně odlišit jeho buněčné struktury[26]. Nejprve se jednalo o přírodní barviva (indigo, šafrán, hematoxylin), která se v optické mikroskopii používají od 2. poloviny 19. století, ale s postupným vývojem chemického průmyslu začala převaha využití syntetických barviv[25]. Důvodem je nižší cena, standardizace a urychlení práce v laboratoři[32].

Mezi barvicí metody patří nejzákladnější barvení hematoxylin–eosin (HE), dále barvení podle Weigert–van Giesona a speciální barvení k rozlišení pojivové tkáně a lipidů[25]. Hematoxylin je přírodní zásadité barvivo, izolované ze stromu Hematoxylon campechianum, které barví jádra buněk modrofialově. Schopnost obarvit struktury získává po oxidaci, kdy vzniká tzv. hematein a následnou reakcí s mořidlem (soli hliníku, železa). Zatímco eozin má acidofilní znaky a barví cytoplazmu růžově, svaly a vazivo červeně[31] [32].

Proces montování uzavírá řez mezi podložní a krycí sklíčko a vzniká tak trvalý histologický preparát [31]. Běžně využívaným médiem nerozpustným ve vodě jsou syntetické pryskyřice nebo kanadský balzám, který je dražší variantou[25].

Optický mikroskop

Optická mikroskopie se používá pro diagnózu již více než století a je tak „zlatým standardem“ lékařských diagnóz. Optický mikroskop využívá světla ve viditelné oblasti k zobrazení objektů, které nejsou rozeznatelné lidským okem s maximálním rozlišením 0,2 – 0,3 μm (při zvětšení 1000x). Mikroskop se skládá z mechanické části (stativ, stolek pro umístění preparátu, nosič tubusu), optické části (okulár, objektiv) a osvětlovacího zařízení (zdroj světla, kondenzor, clony)[25].

5.2 Imunohistochemické vyšetření tkání

Imunohistochemie je speciální histologická technika, která spočívá v prokázání konkrétního antigenu (typicky proteinu) v histologických preparátech použitím protilátky, která se *specificky* váže k tomuto antigenu. Oproti tomu imunocytochemie se zabývá důkazem antigenu v buněčných preparátech[33]. Imunohistochemické vyšetření bývá časově náročnější, vydání výsledků záleží na organizaci práce v laboratoři, ale obvykle trvá 3 pracovní dny i déle[30].

Antigen (Ag) je molekula, která navozuje tvorbu jedné či více protilátek. Strukturně může být antigenem polysacharid, protein a lipid [25].

Protilátky (Ab) jsou imunoglobulinové (Ig) proteiny produkované B–lymfocyty v přítomnosti antigenu. Imunoglobuliny se klasifikují do pěti hlavních izotypů: IgA, IgD, IgE, IgG a IGM, každý má vlastní funkci v imunitním systému[34].

5.2.1 Vizualizace komplexu (značení protilátek)

K zobrazení komplexu antigen – protilátka se používají vizualizační značky, jako jsou fluorescenční barviva (FITC – *fluorescein izothiokyanát*, rhodamin, Texas red a phycoerythrin), využívá se enzymové značení (peroxidázy, alkalická fosfatáza), dále částice koloidního zlata aj. Vazba mezi antigenem a protilátkou je vysoce specifická a pevná[25].

5.2.2 Odběr a zpracování materiálu pro imunohistochemii

Pro provedení imunohistochemické reakce je nezbytné, aby epitop (vazebné místo Ag) setrval přístupný pro protilátku a aby se současně zachovala i jeho struktura. Nejběžněji se biologické vzorky pro imunohistochemii fixují formaldehydem (10% formolem) a zalévají do parafínu[25].

Avšak tato fixace způsobuje zesíťování proteinů, čím se stávají epitopy pro protilátky znepřístupněny. Pro opravení vazebných míst se využívá metody odmaskování antigenu tzv. *antigen retrieval*, které lze provést enzymaticky částečným natrávením tkáně proteázou (př. trypsin, pepsin). Pro praxi má dnes význam odhalení antigenu působením zvýšené teploty za využití mikrovlnné trouby, vodní lázně nebo autoklávu[33].

5.2.3 Imunohistochemické metody průkazu

Přímá metoda

Jedná se o nejjednodušší způsob prokázání přítomnosti antigenu ve tkáni, a to pomocí primární protilátky, která je *přímo* značena fluoresceinem, enzymem nebo kovem. Podmínkou je dostatečně vysoká koncentrace antigenu ve studované tkáni zejména pak v nativních řezech, jelikož pro parafinové řezy je tato metoda málo citlivá[35].

Nepřímá metoda

Nepřímá *dvojstupňová* metoda je nejběžněji používanou metodou, která je citlivější. Na neznačenou primární protilátku navázanou na antigen se napojí sekundární značená protilátka/y, čímž dojde k amplifikaci signálu. Nepřímá *trojstupňová* metoda se skládá z reakce primární protilátky s antigenem, dále se přidá sekundární protilátka v nadbytku, která se naváže na Fc fragmenty primární protilátky a vytváří tzv. můstek. Třetím krokem je přidání značeného komplexu. Příkladem trojstupňových metody je metoda PAP (peroxidáza–anti–peroxidázový komplex) nebo APAAP (alkalická fosfatáza anti–alkalická fosfatáza)[35].

6 ZPRACOVÁNÍ PEROPERAČNÍCH BIOPSIÍ

Peroperační vyšetření je urgentní mikroskopické vyšetření tkáně, které během operace může rozhodnout o jejím dalším průběhu[30].

Historie prvních provedených zmrazených řezů k určení diagnózy sahá do doby před více než sto lety z nemocnice Glasgow Western Infirmary r. 1882, nejednalo se ale o peroperační vyšetření. Dále r. 1891, kdy doktor William H. Welch z John Hopkinsovi Nemocnice (The Johns Hopkins Hospital) úspěšně aplikoval mikrotom chlazený oxidem uhličitým na vyšetření prsní tkáně, zatímco pacient ležel na operačním sále[36].

6.1 Předoperační lokalizace lézí prsu

Léze jsou před samotnou operací lokalizovány radiologem buď vložením drátku do tkáně (*metoda Frankovou jehlou*) anebo injekcí pigmentu (živočišné uhlí – carbo adsorbens 4%). Značení *Frankovou jehlou* je velmi využívanou metodou k lokalizaci nehmotných ložisek. Bezprostředně před zahájením operace lékař pod kontrolou stereotaktické mamografie nebo metodou volné ruky (*freehand technique*) pod kontrolou ultrazvukem vpíchne jehlu do prsní tkáně a skrze jehlu „zakotví“ do ložiska drátek. Nevýhoda této metody je, že se musí aplikovat v krátkém čase před zahájením operace. Dalším omezením metody *Frankovou jehlou* je označení pouze jednoho bodu ložiska, mnohdy dochází k ukotvení koncového úseku drátku pouze v blízkosti léze, kde u případného výskytu mikrokalcifikací mohou vzniknout nejasnosti ohledně umístění konce lokalizačního drátku a nejsou zde jasně patrné hranice léze. Oproti tomu *injekcí pigmentu* je označeno několik bodů bezpečnostního lemu kolem ložiska, který je posuzován jako 10mm až 15mm pás sonograficky a mamograficky „zdravé“ okolní tkáně k minimalizování rizika reziduální nádorové tkáně. Výhodou tohoto způsobu značení pigmentem je setrvání barvy na původním označeném místě, provedení není omezeno časem ani významnější fagocytární reakcí organismu. Skovajsová uvádí, že lokalizace pigmentem může sloužit přímo k vymezení rozsahu operačního pole[37].

V předoperační diagnostice je důležitá správná komunikace mezi radiologem, chirurgem a patologem k omezení a prevenci vzniku možných nedopatření[38]. Patolog by měl obdržet formulář žádosti o peroperační konzultaci s dostatečným předstihem, s přesnou identifikací pacienta, jeho klinickou diagnózou a radiologickým nálezem. Kompletní lékařská

zpráva by měla sloužit jako podpora při hodnocení nejasných nálezů. Dále musí být zapsána identifikace zaslaného materiálu, důvod objednání peroperační biopsie a kontakt na operační sál. V případě nejasné identifikace pacientek na chirurgickém sále s totožným jménem, i datem narození by mohlo dojít k záměně vzorků biologického materiálu během transportu či v laboratoři, proto je nutná přesná identifikace pacienta jak na operačním sále, tak na průvodním listě a na biologickém vzorku jménem a příjmením, rodným číslem, označení původu materiálu (u většího počtu vzorků číselné rozlišení) a zasílající oddělení[39, 40].

6.2 Peroperační konzultace

Peroperační konzultace lézí prsu zahrnují postupy jako je pečlivé makroskopické zhodnocení a popis tkáně, využití cytologických metod, vyšetření tkáně zmrazovací technikou a komunikace mezi vyšetřujícím patologem a operujícím chirurgem[38]. Výjimečně lze provést metodu rychlé imunohistochemie během peroperačního vyšetření, ale používané protilátky nejsou ve většině laboratoří na tuto metodu kalibrované, a proto má metoda nízkou citlivost a výsledek je tedy nespolehlivý. R. Beach a D. Lawson ve své práci[41] uvádějí, že tato metoda pro nízkou senzibilitu není užitečná k hodnocení sentinelových uzlin peroperačně (využívaná protilátka cytokeratiny AE1–AE3). V práci porovnávají senzitivitu čtyř diagnostických metod k detekci metastáz u pacientek s rakovinou prsu, využívané metody: otisková cytologie (senzitivita 69 %), rychlá imunohistochemie (57% senzitivita), zmrazovací technika (86% senzitivita) a trvalé parafinové řezy (100% senzitivita)[41].

6.2.1 Odběr materiálu na peroperační konzultace

Histologické vzorky prsu pro peroperační biopsie vznikají na základě excizní biopsie, po lumpektomii anebo po mastektomii v závislosti na mamografickém a klinickém vyšetření. Excizní biopsie umožní odstranit i celý nádor, využívá se pro nehmavné léze, kde je zpravidla nezbytné předoperační označení barvicím materiálem nebo drátem[10].

- *Mastektomie, lumpektomie, excize*

Základním léčebným postupem karcinomu prsu v časných stádiích je chirurgický zákrok, který se s rozvojem současných dostupných léčebných metod odklání z *radikální mastektomie*, kdy je odstraněn celý prs (žláza, kůže, fascie velkého prsního svalu) a většinou následuje s axilární disekcí, bývá nahrazena ne tak invazivní metodou *parciální mastektomie* (lumpektomie, kvadrektomie), kde záleží na velikosti a poloze nádoru během operace

zachovávající prs (Breast conservative surgery), a je odstraněno pouze nádorové ložisko s bezpečnostním lemlem zdravé tkáně a následnou radioterapií. U pokročilých stádií karcinomu je nejprve indikována neoadjuvantní onkologická terapie a ve druhé části léčby chirurgický výkon. Vybrání optimálního individuálního léčebného postupu proto záleží na mezioborové spolupráci lékařů[10, 38]. Mastektomie s axilární disekcí je jedinou terapeutickou možností u pacientů s karcinomem prsu a s prokázanou dědičnou predispozicí. Prodloužení délky života při provedení profylaktické mastektomie u žen s mutací genů *BRCA1*, *BRCA2* je pokaždé individuální a snižuje se s přibývajícím věkem[10].

6.2.2 Hodnocení výsledků z peroperační konzultace

Pečlivé zhodnocení hrubého vzorku tkáně společně s obezřetným použitím zmrazovací techniky je rozhodující ke snížení rozsahu peroperačních chyb a následně tak ke snížení stresu na pacienta[38].

V první řadě musí být známy hrubé rysy procesu nemoci, buď optickou vizualizací bioptického vzorku či operativního pole (makroskopickým pohledem či mikroskopií) nebo komunikací mezi lékaři za využití tzv. *telepatologie (telepathology)*, metody, která se zakládá na telekomunikačních technologiích.

Telepatologie využívá přenosu diagnostických dat na dálku s vysokou mírou diagnostické přesnosti podobné konvenční mikroskopii, a tak dochází k prohlížení obrázků ze světelného mikroskopu na dálku[42]. Jako zlatý standard pro diagnostiku chirurgické patologie je brána přesnost 97 %, čehož je dosaženo konvenční mikroskopií. Ve své srovnávací studii diagnostické přesnosti[43] Rashid L. Bashur a kolegové uvádí, že pomocí jednoho z pěti nejvíce využívaných telepatologických systémů, je metoda WSI (*Whole Slide Imaging*). Pro zobrazení snímků v digitální podobě („virtuální preparát“) byla v aplikaci této metody dosažena nejvyšší míra přesnosti a to 95 %[43]. Jako mírnou nevýhodu můžeme brát prodloužení času na vyhodnocení histologických řezů, ke kterému může dojít při přenosu dat. Aplikace telepatologických systémů skrze peroperační konzultace se stále zvyšuje, efektivnějšímu využití času, který je omezen při peroperačních konzultacích a další výhodou je integrace informací a zlepšení produktivity patologů specializujícími se na specifické orgány, kteří nemusejí cestovat mezi zdravotnickými zařízeními k hodnocení obtížných komplikovaných případů, ale mohou zhodnotit patologické obrazy na monitoru počítače[42].

Další výhodou je možnost sdílení dat po celém světě mezi odborníky a vznik tzv. „virtuálních nádorových bank“, digitálních snímků buněk se specifickými morfologickými znaky[43].

6.2.3 Postup peroperační biopsie

Makroskopickým zhodnocením vzorku patologem je rozhodováno, jaká část tkáně bude předložena k peroperačnímu vyšetření. Před přikrojením tkáně je biopsie pečlivě popsána, změřena, zvážena a obarvena inkoustem pro jasný vztah léze k resekcčním okrajům. Již makroskopickým vzhledem tkáně lze určit povahu několika benigních a maligních lézí. Mezi nejčastěji se vyskytující léze prsu zařadíme fibroadenomy, fibrózně cystické změny (mastopatie) a karcinomy[38].

Benigní léze bývají ohraničené, elastické, bez nekróz. Oproti tomu maligní ložiska se vyskytují nejčastěji jako neohraničené, s nekrózami a infiltrují okolní tkáně. Pro fibroadenom je typickým makroskopickým nálezem ohraničený kulovitý tvar, velikosti nejčastěji do 2 cm a šedé až šedo–hnědé zbarvení. Fibrózně cystické změny zahrnují změny tkáně jako je tvorba tuhé fibrózní tkáně a cyst, ložiska velikosti od 0,5 cm do několika centimetrů. Pro invazivní duktální karcinom jsou charakteristická bílo–šedá tuhá ložiska s nepravidelným tvarem a ohraničením, mohou se vyskytovat drobné kalcifikace a prorůstání do okolních tkání (kůže, sval), velikost nejčastěji 2 až 4 cm[2, 38].

Dále je vzorek sériově rozkrájen se zachovalou prostorovou orientací a uložen do označených plastových kazet. Takto rozkrájený vzorek obsahující suspektní lézi spolu s periferií a koncovými okraji je po dalším zpracování předkládán k mikroskopickému vyhodnocení. Zbývá tkáň, která není podrobena peroperačnímu vyšetření zmrazovací technikou, musí zůstat až do jejího ukončení v nativním stavu, pokud by byla potřeba ukrojit další blok. Poté je vše fixováno formolem a připraveno na definitivní histologické zpracování[38].

6.3 Indikace, využití, možnosti a limitace peroperačního vyšetření prsu

6.3.1 INDIKACE PEROPERAČÍCH BIOPSIÍ PRSU

6.3.1.A.1 Stanovení primární diagnózy

Indikací peroperačních biopsií prsu je stanovení předběžné diagnózy (pokud již není známa) před definitivní chirurgickou terapií. Většina maligních tumorů je však již před

chirurgickým zákrokem diagnostikována prostřednictvím tenkojehlové punkční biopsie, anebo *core cut* biopsie. Pokud jsou výsledky těchto biopsií nejednoznačné, je vykonání peroperační biopsie zmrazeného řezu zcela vhodné [38].

Například se může jednat o peroperační vyšetření suspektní tkáně podezřelé z nádorových změn nebo o určení histologického typu nádoru, kde se v případě benigních nádorů nepovažuje za tak významné hodnocení resekcčních okrajů [44]

6.3.1.A.2 Vyhodnocení resekcčních okrajů

Další indikace peroperačního vyšetření je vyhodnocení resekcčních okrajů a měla by být aplikována v takových případech, kde se může předpokládat další rozsah chirurgického výkonu, aby následovala případně dodatečné excize k dosažení negativních okrajů při chirurgické léčbě tumorů prsu [38].

Hodnocení stavu mikroskopických okrajů excize resekovaného vzorku prsu patří mezi nejdůležitější faktory spojené s vyšším rizikem výskytu tumorů ipsilaterálního prsu (lokální recidiva) po konzervativní léčbě prsu (operaci zachovávající prs) u invazivního karcinomu a duktálního karcinomu *in situ* (DCIS). Pozitivní okraje invazivního karcinomu a DCIS na linii obarvené inkoustové tkáně souvisejí s vyšším rizikem lokální recidivy než okraje negativní. Proto je nejčastějším cílem chirurgického zákroku dosažení negativních okrajů při současném zachování morfologie prsu. Případně je žádoucí odstranit indexovou lézi s dostatečnou okolní tkání tak, aby byla reziduální nádorová tkáň co nejmenší pro následnou radiační terapii. Je však třeba podotknout, že existuje míra neshody mezi lékaři o to, co představuje adekvátní rozpětí negativních okrajů, avšak výsledky retrospektivních studií neprokázaly významnou změnu ve snížení recidiv u invazivního karcinomu, který nedosahuje inkoustového okraje při zvyšování šíře negativních okrajů s intervalem 1 až 5 cm. Není stanoven těsný resekcční okraj, ale standardně nádorové buňky nesmějí zasahovat do inkoustové okrajové linie[45].

6.3.1.A.3 Předběžné zhodnocení tkáně v komplikovaných případech

Možnou indikací je také posouzení adekvátnosti tkáně pro další diagnózu v bioptickém vzorku z otevřeného nebo komplikovaného operačního postupu. Tím je možné zjednodušit stanovení rozsahu nádorových lézí v nejasných situacích, kdy je potřeba provést větší množství histologických analýz (průtoková cytometrie, genetické vyšetření) [44].

6.3.2 VYUŽITÍ PEROPERAČNÍCH BIOPSÍ PRSU

Během operačního výkonu slouží ke stanovení předběžné diagnózy, a to v průběhu několika minut, zatímco pacient leží na operačním sále [5]. Doba pro zpracování peroperačních biopsií je definována jako časový interval, kdy vzorek tkáně dorazí do laboratoře z operačního sálu do doby, kdy je diagnóza hlášena chirurgovi. Dle doporučení CAP (College of American Pathologists) je horní limit tohoto času 20 minut pro jeden vzorek a jeden kryostat, v složitých případech je přijatelné mít čas prodloužený [46]. Různá oddělení se mohou lišit v požadované rychlosti na výsledek histopatologické diagnózy, ale více urychlit diagnostický proces již není prakticky možné. Hraje zde roli rychlost transportu materiálu, po přijetí vzorku pečlivé zhodnocení lékařem a vybrání správné části materiálu na peroperační techniky, ve které je důležitá manuální zručnost a zkušenost laboranta v manipulaci s malými vzorky, aby nedošlo k znehodnocení tkáně zapadnutím do struktury kryostatu je nutné připevnění a zmrazování tkáně na vrstvě speciálního lepidla. Posledním bodem, který se podílí na délce peroperačního vyšetření je zhodnocení preparátu mikroskopii (optická, digitalizovaná) a telefonování výsledků na operační sál [5, 39].

Peroperační vyšetření se provádí zejména při konzervativní chirurgii tumoru prsu, za účelem snížení potřeby následných operací. Bez peroperačního vyhodnocení okrajů léze míra počtu reoperací převyšuje 20 % [47].

Přesnost diagnostiky zmrazených řezů od historických záznamů po současnost je velmi dobrá. Tato skutečnost však mohla přivést některé klinické lékaře k nevhodnému objednávání této techniky ze zvědavosti pro zkrácení času diagnostického procesu a získání definitivní diagnózy dříve. Spolehlivost zmrazovací techniky se však nemůže vyrovnat definitivnímu histopatologickému vyšetření, které je schopné odhalit i vzácné nemoci a které by mělo být určujícím při stanovování definitivní diagnózy [5].

6.3.3 MOŽNOSTI PEROPERAČNÍCH BIOPSÍ

6.3.3.A.1 Vyšetření zmrazených řezů (*frozen section examination*)

Pro zpracování peroperačních biopsií prsu patří mezi základní metodiku pro diagnostiku vyšetření zmrazených řezů *zmrazovací technikou* k urychlení diagnostického procesu. V průběhu let se snižuje množství vzorků prsu hodnocených peroperační biopsií zmrazovací technikou, protože nové diagnostické metody posunuly klinickou léčbu. Převážná

většina objednaných peroperačních biopsií prsu se týká hodnocení resekčních okrajů, jelikož diagnóza je předem známá z primární punkční biopsie. Diagnostické chyby týkající se peroperačních konzultací vznikají převážně na základě nesprávné interpretace např. při výskytu artefaktů vzniklé během odběru materiálu nebo při zpracování a v neposlední řadě během nedostatečné komunikace mezi operujícím chirurgem a patologem. Nesprávná interpretace se také vztahuje na možné artefakty vznikající při zmrazení vzorku anebo na nedostatečnou zkušenost patologa při vyhodnocení [38].

6.3.3.A.2 Intraoperační cytologie

Vhodnou doplňkovou technikou histologického vyšetření je *intraoperační otisková cytologie (imprint cytology)*, kterou však nelze posoudit tkáň jako celek, ale lze takto hodnotit jednotlivé buňky, což je užitečné při hodnocení fibrotických tumorů a při vyšetření sentinelových uzlin. Cytologické otisky jsou užitečné k ostrému znázornění jednotlivých cytoplazmatických a jaderných detailů v buňce a jsou používány v metodice molekulární patologie[5, 38]. Postup otiskové cytologie je takový, že se na odmaštěné podložní sklíčko „otiskne“ vyšetřovaný vzorek tkáně, tak aby nedošlo ke zhmoždění materiálu. Většinou se zhotovují dva informativní otisky z jedné ukrojené plochy vzorku, poté se obarví a mikroskopicky hodnotí, výsledek cytologie je během několika minut [9].

Cytologie je rychlejší a méně finančně náročná než vyšetření zmrazovací technikou, a přitom je její přesnost v určení typu nádoru prakticky stejná. Při cytologii se navíc nevyskytují artefakty vzniklé při zmrazování. Nicméně zmrazovací technika má lepší diagnostickou využitelnost při hodnocení resekčních okrajů vzhledem k přehlednému zobrazení obarvené histologické struktury tkáňového řezu[48]. Dále se cytologií nedá stanovit grade – stupeň diferenciacie nádoru (vyzrálosti nádorových buněk) a povaha nádoru, zda a jak se šíří do okolní tkáně [23].

Cytologickým vyšetřením se zpracovávají nátěry na podložní skla z punkční cytologické biopsie prsu nebo u tekutého obsahu z cyst dojde po fixaci alkoholem ke vzniku sraženiny, která se dále histologicky zpracovává[9].

6.3.3.A.3 Vyšetření sentinelových lymfatických uzlin neboli biopsie sentinelové uzliny (sentinel lymph node biopsy – SLNB)

Další technikou je *mapování sentinelových lymfatických uzlin*, která zahrnuje postup pro identifikaci takových axilárních uzlin, které obsahují případné metastázy a je zakládána na chirurgické peritumorální injekci nejčastěji dvou detekčních látek v závislosti na pracovištích, jsou jimi radioaktivní barevné roztoky, používá se značení izotopem technecia ⁹⁹Tc metodou lymfoscintigrafie sentinelové uzliny, v kombinaci s aplikací vitálního modrého barviva (methylenová modř, patentní modř, 1% isosulfan)[49].

Sentinelová uzlina (nebo skupina uzlin) je první lokací při šíření nádoru do lymfatických cév. Jestliže není sentinelová uzlina nalezena a označena během mapování, je nutné provést disekci axily, jelikož se předpokládá zneprůchodnění uzliny nádorovými buňkami a zneprístupnění tak proniknutí barviva. Zpravidla patolog vyhodnocuje peroperačně zmrazovací technikou jednu až tři uzliny a pokud je odhalena pozitivita, chirurgický zákrok pokračuje s axilární disekcí v rozsahu I. – II. etáže. Disekce axily je nutný chirurgický výkon při postižení nonsentinelových uzlin k udržení regionálního dohledu nad nádorem. Peroperačně se vyšetří minimální část tkáně, kdy se zhotovuje pouze několik řezů na sklo, problém může nastat u mikrometastáz zastižitelných jen v několika mikrořezech. Proto je zcela nutné následné kompletní zpracování v definitivním vyšetření pro jednoznačný výsledek[38]. Každá uzlina by měla být sériově prokrájena rovnoběžně s dlouhou osou, při tloušťce řezu 2 až 3 mm, pokud je to technicky možné a následně zpracována v parafinovém bloku barvením HE a imunohistochemií za použití směsi cytokeratinů AE1/AE3. Okultní metastázy jsou identifikovány IHC u 25 % žen s negativními sentinelovými uzlinami hodnocenými standardním barvením HE[49].

Není nutné provést disekci axily, pokud je sentinelová uzlina negativní u obou barvení. Stav regionálních lymfatických uzlin a velikost primárního nádoru jsou dvěma nejdůležitějšími faktory pro určení stagingu a prognózy infiltrujícího karcinomu prsu[38].

V detekci metastáz v sentinelových uzlinách je možné využít několika dalších postupů, kam zařadíme molekulárně genetickou metodu jako je reverzní PCR, multiparická průtoková cytometrie nebo přístrojově asistentované hodnocení vzorku (computer assisted image analysis) [49].

6.3.3.A.4 *Prostorové zobrazování frekvenční domény*

Jednou z nově se rozvíjejících experimentálních metod potenciálně vhodných pro rychlé určování resekcčních okrajů je tzv. *prostorové zobrazování frekvenční domény* (*spatial frequency domain imaging, SFDI*). Tato metoda využívá prostorové analýzy absorpce a rozptylu světla v blízké infračervené oblasti, které je absorbováno a odraženo od povrchu zobrazované tkáně. Princip metody spočívá ve vyhodnocení frekvenčních spekter v jednotlivých bodech pozorované plochy při několika vlnových délkách. Z těchto dat je pak možné určit parametry (např. relativní koncentrace různých látek přítomných v diagnostikované tkáni), které mohou korelovat s lokalizací nádorových buněk. Tím je teoreticky možné z naměřených dat získat některé informace o povaze nádoru, zejména jeho tvar a velikost. Tato technika je ve výzkumné fázi a byla by možným doplňkem k současným metodám peroperační biopsie [50].

6.3.4 **LIMITACE PEROPERAČNÍCH BIOPSIÍ PRSU**

Limitací pro využití zmrazovací techniky je dostatečně reprezentativní velikost vyšetřované tkáně, a tedy správné rozhodnutí patologa o tom, zda nebude výhodnější vzorek ponechat na zpracování v parafínovém bloku.

Čas pro peroperační vyšetření je též limitovaný, jelikož se jedná o závažná rozhodnutí, která ovlivní průběh chirurgického výkonu.

Ve zmrazovací technice je velkým problémem provedení a interpretace zmrazeného řezu ve vzorku adipózní/tukové tkáně prsu. Jak při mrznutí, tak při řezání tukové tkáně mohou vznikat nežádoucí artefakty, které mohou dále zkomplikovat či znemožnit diagnózu[38]. K dosažení tenkého a kompaktního zmrazeného řezu musí proběhnout rovnoměrné zmrazení tkáně bioptického vzorku. Oproti parafínovým preparátům bývají zmrazené řezy silnější. Pokud dojde k nedostatečnému namrazení vzorku, řezy jsou rozmazané a na druhou stranu, pokud laborant tkáň přemrazí, řezy budou prskat a třepit se [38].

Morfologické artefakty:

Artefakty s morfologickými a cytologickými rysy omezují standardní postup histopatologického vyšetření. Jedná se o artefakty vzniklé během chirurgického výkonu, artefakty vzniklé během fixace a zpracování v laboratoři, skrze krájení na mikrotomech, při barvení a během montování preparátu pod krycí sklíčko. Proto je nezbytné tyto struktury správně identifikovat během interpretace preparátů.

a) Artefakty vzniklé z operace („prefixation artifacts“):

- Fulgurační artefakt („fulguration artifact“) – termální degradace tkáně elektro–kauterizačními nástroji – nejvýraznější na okrajích, tedy znesnadňuje identifikaci resekčních okrajů + může pozměnit receptorovou aktivitu, schopnost vazby na detekční protilátku a tím ztížit správnou diagnózu či klasifikaci tumoru
- Rozdrcené buňky („crush artifacts“) – stlačení, zhmoždění tkáně chirurgickým nástrojem či rozdrcení buněk nejčastěji během *core biopsy*, jsou velmi těžce interpretovatelné ve zmrazených histologických řezech, proto je doporučeno zažádat si o další materiál před vydáním diagnózy[38]
- „Injekční artefakt“ – vznikající po lokální injekci anestetického roztoku do léze, které může způsobit krvácení s extravazací (únik tekutiny mimo cévní systém), či způsobit separaci pojivové tkáně a vakuolizaci
- Artefakt škrobu („starch artifact“) – prášek škrobu z vnitřní části chirurgických rukavic, nebo fragment šicího materiálu
- Artefakt autolýzy – z nedostatečně rychlé fixace, dochází ke ztrátě enzymů, poškození mitochondrií, degradaci RNA (v důsledku se snižuje bazofilie tkáně) a k degradaci proteinů, ke snížení mitotické aktivity[51]

b) Artefakty vzniklé během fixace a zpracování v laboratoři:

Biopický vzorek by měl být během přepravy do laboratoře připevněn na podložku pro správnou orientaci popsán identifikačním štítkem a dodán s průvodním listem, aby nedošlo k záměně s jiným materiálem. Histopatologie zmrazeného řezu může být zkreslena artefakty, jako jsou ohyby či roztržení tkáně, překrývání jednotlivých vrstev tkáně v nedostatečně tenkém řezu. Komplikace při řezání mohou nastat při výskytu mikrokalcifikací ve tkáni nebo mohou vznikat opakující se značky mikrotomové čepele tzv. „artefakt chvění“. Těmto situacím lze předcházet, pokud budou vždy k dispozici dostatečně ostré nástroje a proškolený personál[5].

- Artefakt krystalů ledu (*Ice–crystal artifact*) – krystaly ledu, vznikají zejména při pomalém zmrazování velkých vzorků[38]
- Artefakt vzniklý zmrazením (*freezing artifact*) – potrhání tkáně v důsledku tvorby krystalů ledu z fixačního roztoku biopsie

- Retrakční artefakt – nesprávné zmrazování může také tvořit artefakty smrštění stromatu okolo nádorových struktur, které mohou být nesprávně interpretovány jako lymfatické nebo vaskulární invaze
- Artefakty vzniklé nedostatečnou či nesprávnou fixací, dehydratací (artefakt smrštění) nebo nesprávným barvením (*staining*) – neúplné odstranění rozpouštědla či nedostatek/přebytek barviva[38]
- Artefakty na trvale zabudovaných formol parafinových blocích, z původně zmrazené tkáně – jedná se o různé architektonické aberace, zkreslení velikosti buněk, abnormality shlukování chromatinu, obtíže při hodnocení mitotické aktivity a buněčné apoptózy[5]

Vznik artefaktů je často nevyhnutelný, ale hodnotící lékaři jsou specialisté v oboru patologické anatomie, a zkušenostmi se učí artefakty rozpoznávat, předvídat jejich potenciál skrýt definitivní patologii a toto správně interpretovat ve zmrazených řezech [5].

6.3.5 Zpracování peroperačních biopsií zmrazovací technikou

A. Odběr, transport, fixace materiálu pro peroperační vyšetření

Materiál k peroperačnímu vyšetření je nutné neprodleně po vyjmutí z těla pacienta přepravit do laboratoře spolu s vyplněným průvodním listem a to buď zaměstnancem nemocnice, nebo potrubní poštou jako je tomu v areálu FN Lochoťín v Plzni. Biologický vzorek je obvykle umístěn do předem popsané nádoby, případně naorientovaný a připevněný na speciální podložce. Při transportu je možné vzorek zabalit do gázy napuštěné fyziologickým roztokem, zabrání se tak oschnutí a poničení buněčné struktury[30].

B. Krájení kryostatových řezů

Vzorek je umístěn do tzv. kryostatu (obrázek č.2), jedná se o rotační mikrotom situovaný v mrazicím boxu (teplota $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Zde je fixačním prostředkem zmrazen a dále nakrájen laborantem na řezy o potřebné tloušťce v μm . Ukrojené řezy sbírá laborant z antirolovací destičky, umístěné za nožem kryostatu, a přitiskne je přímo na podložní sklo. Podložní sklíčko je čisté nebo obsahuje adhezivní vrstvu proti deformaci tkáně [25].



Obrázek č.2: Kryostat Leica CM1850 převzato z

Zdroj:https://drp8p5tqcb2p5.cloudfront.net/typo3temp/_processed_/csm_Leica_CM1850_Cryostat_03_0038cf22a1.png

C. Barvení, montování řezů

Barvení a montování skel je automatizované nebo se zpracovávají preparáty ručním barvením rychlé peroperační biopsie. Jako poslední krok následuje uzavírání vzorku do solakrylu a vznik preparátu[30].

7 VLIV PEROPERAČNÍ BIOPSIE, IHC A MOLEKULÁRNÍ GENETIKY NA TERAPII PACIENTEK

Reexcize po konzervativní léčbě prsu způsobuje prodlevy v navazující terapii, která je nákladná. Reexcize má spojitost se zvýšenou morbiditou zapříčiněnou zvýšeným výskytem možnosti infekce při otevřeném operačním zákroku. Zhoršený estetický/kosmetický výsledek operace má dopad na zvýšenou úzkostlivost pacientek[52].

Lokoregionální recidivy se nejčastěji vyskytují v 5 až 10 letech po operaci. V současné době se pohybuje ve většině institucí 10letá míra lokální recidivy po lumpektomii a radiační terapii v rozmezí 5 % až 10 %. U nejběžnější podskupiny pacientů s ER–pozitivními nádory je míra lokálních recidiv do 5 %[45]. Po chirurgickém zákroku mastektomii je uváděn nižší výskyt regionálních recidiv bez vzdálených metastáz v 10letém sledování a to kolem 3 %, nevýhodou oproti operaci zachovávající prs je výskyt kožních komplikací během léčby a negativní estetický a psychologický výsledek operace na život pacientky[53].

Lokální recidivy se tedy objevují u obou chirurgických výkonů, předpokladem prevence jejího vzniku je zajištění negativního resekcčního okraje během peroperačních konzultací. Radiologům stačí 1 – 2 mm lem zdravé tkáně, ale zatím není dostatek studií, které by určovaly přesnou šíři tohoto lemu[54].

Výsledky retrospektivních studií dosud nedokázaly významné snížení lokální recidivy u pacientů s invazivním karcinomem prsu (po chirurgické a radiační terapii) při zvyšování šířky resekcčních okrajů v milimetrových intervalech od 1 mm až 5 mm. Toto tvrzení je komplikované prokázat na základě možných komplikací s odběrem vzorku, dále s technickým omezením spojeným s vyhodnocením okrajů peroperačních biopsií prsu a vzhledem k distribuci nádoru[45].

PRAKTICKÁ ČÁST

8 CÍLE PRÁCE

Cíle práce:

- 1) Zmapovat dostupné histologické metody diagnostiky tumoru prsu, s podrobnějším zaměřením na peroperační biopsie
- 2) Statistické zpracování souboru diagnostických dat pacientek, které podstoupily chirurgickou léčbu rakoviny prsu za účelem zjištění vlivu peroperačního vyšetření na terapii pacientek

Výzkumné problémy:

- 1) *Jsou diagnostické metody používané při peroperačním vyšetření lézí prsu dostatečně spolehlivé navzdory své rychlosti?*
- 2) *Má peroperační vyšetření lézí prsu i přes své limitace pozitivní vliv na terapii pacientek?*

9 METODIKA

Preanalytická, analytická a postanalytická fáze laboratorního vyšetření. Fáze preanalytická zahrnuje odběr a transport vzorku, vlastní analytická fáze zpracování vzorku laboratorními metodami. V postanalytické fázi probíhá diagnostika lékařem a zapsání výsledků z jednotlivých metod vyšetření do laboratorního systému. Výsledky molekulárně genetického vyšetření jsou pracovníkům Šiklova ústavu patologie FN Lochotín předány ze smluvní laboratoře Bioptická laboratoř s.r.o. V příloze bakalářské práce (příloha č.2 – č.13) jsou uvedeny obrázky nádorů a jejich průkaz histopatologickými metodami.

9.1 Metoda peroperační biopsie

Při transportu nativního vzorku je možné ještě vzorek zabalit do gázy s fyziologickým roztokem a zabránit tak poničení struktury. Velikost léze by měla být větší než 1 cm³, aby se zbylá část vzorku mohla rutinně zpracovat pro parafinový bloček a barvení HE, IHC. Lékař nejprve vzorek změří, popíše makroskopicky, vybere z léze suspektní ložisko a přikrojí materiál pro zpracování metodou rychlé peroperační biopsie a vždy by měl zůstat materiál na definitivní zpracování ve formol – parafinových blocích[30].

9.1.1 Postup vyšetření

Vzorek se zmrazí v kryostatu (Leica CM 1850, Leica CM1950), kde je ustálená nastavitelná teplota (–20 °C), aplikuje se chladicí sprej „cryo spray“ (tetrafluorethan), poté se nakrájí a přichytí štětečkem na podložní sklo, dále následuje barvení. Postupem je nejprve fixace řezu v kyvetě se 70% alkoholem (1 min), poté následuje oplach sklíčka ve vodě, dále obarvení buněčných jader Harrisovým hematoxylinem (dodáván lékárnou) po dobu 1 min. Následuje oplach sklíčka ve vodě (2x), pokračuje se diferenciací ve Scotově vodě (1 min) a dochází ke zmodrání tkáňových struktur. Další v pořadí je oplach sklíčka ve vodě, krátké obarvení v roztoku eosinu (cca 5 vteřin), oplach ve vodě (2x) a odstranění tak přebytečného barviva, poté oplach v 96% alkoholu (3x), oplach v acetonu, v aceton–xylolu, xylol–acetonu, oplach ve xylolu, a jako poslední uzavírání vzorku do solakrylu a vznik preparátu[30]. Preparát ihned zhodnotí patolog a výsledek se telefonuje na operační sál. Délka zpracování vzorku by měla být do cca 20 minut. Zbytek materiálu po peroperačním vyšetření je fixován 10% formolem a dále rutinně zpracován v parafinovém bloku[31, 32].

9.1.2 Reagencie

Scottova voda, eosin, roztoky aceton – xylen a xylen – acetonu se připravují v laboratoři (roztoky aceton – xylen a xylen – acetonu v poměru 60 % / 40 % až 70 % / 30 %). Scottova voda je připravována jako vodný roztok hydrogenuhličitanu sodného (3,5 g NaHCO₃ + 500 ml H₂O), síranu hořečnatého (20 g MgSO₄ + 500 ml H₂O) a 40% formaldehydu (1 ml HCHO). Barvení v roztoku eosinu se připravuje z 10 g eosinu žlutavého, 5 g dichromanu draselného, 800 ml deionizované vody, 100 ml nasyceného roztoku kyseliny pikrové a 100 ml 100% alkoholu[30].

9.2 Metoda barvení HE z parafínového bloku

9.2.1 Postup vyšetření, reagencie

Fixace tkáně 10% formolem, nutná k zabránění autolýze buňky, by optimálně měla trvat 24 hodin. Vzorky jsou vloženy v plastových kazetách do autotechniky, kde dochází k odvodnění tkáně, ve zvyšujících se koncentracích vodných roztoků etanolu – *vzestupná etanolová řada* (70 %, 80 %, 96 % a 100 %), aby se zamezilo pokračování fixace. Následuje oplach v acetonu, dále ve xylenu a prosycení tkáně dvěma lázněmi parafínu. Následně se zalijí vzorky na parafínové lince (Medite TES 99), používají se kovové vaničky na jejíž dno se orientuje tkáň, zalije parafínem (BaWax) a nechá se zchladnout na chladicí desce (PF-100).

Shrnutí postupu:

- I. Odvodnění tkáně vzestupnou etanolovou řadou
- II. Prosycení tkáně intermédiem – projasnění
- III. Prosycení tkáňového bločku ve 3 lázních parafínu
- IV. Vlastní zalití tkáně do parafínu [31]

Krájení zalitých parafínových bloků je prováděno na sáňkových mikrotomech (Leica SM2010, HM 430), poté jsou řezy tenké 4 – 5 μm položeny do vytemperované vodní lázně (LEICA HI 1210, 50 °C) s přidanou želatínou, kde dochází k jejich rovnoměrné napnutí pomocí preparačních jehel na sklíčko polepené identifikačním štítkem. Poté se vloží do termostatu (TERMOSTAT BT 120), po usušení se odparafínují v lázních xylenu a sestupnou etanolovou řadou se zavodní. Barvení a montování je prováděno ručně nebo pomocí

automatů. Preparáty jsou vloženy do barvicího automatu (TST 44), následně jsou vyjmuty a vloženy do automatu na montování krycích skel (RCM 7000)[25, 30, 32].

Obecný postup barvení HE:

- I. Odparafinování preparátu
- II. Vlastní barvení
- III. Odvodnění, projasnění
- IV. Montování řezů[30, 31]

Postup ručního barvení HE se skládá z odparafinování preparátu působením xylenu a *sestupnou etanolovou řadou* (100% a 96% alkohol). Následuje opláchnutí v destilované vodě a vlastní barvení nejdříve v lázni hematoxylu přibližně po dobu 5 minut. Poté se preparát přenesse k tzv. diferencování do kyselého alkoholu, sloužící k odbarvení nežádoucích struktur a následně se sklíčko s řezem opláchně pod tekoucí vodou. Alkalické prostředí zapříčiní zmodrání buněčných jader. Na řadu přichází barvení v roztoku eosinu s diferencováním v 80% alkoholu. Posledním krokem před montováním řezů pod krycí sklo je odvodnění v roztocích vzestupné etanolové řady (70 %, 80 %, 96 % a 100 %), a projasnění v kyvetách obsahujících aceton, dále směs aceton – xylenu, xylen – acetonu a xylenu[30, 31].

9.2.2 Hodnocení vyšetření

Z připraveného preparátu lze hodnotit v optickém mikroskopu obecné informace o současném stavu tkáně. Barvením HE se jádra buněk barví – šedomodře, červeně – cytoplazma buněk, kolagenní vazivo – růžově, svalstvo – červeně a hyalinní chrupavka – modře[31].

9.3 Metoda imunohistochemie

9.3.1 Postup vyšetření

Vzorky určené k imunohistochemii jsou formalinově fixovány, dále krájeny v parafinovém bloku na sáňkovém mikrotomu (Leica SM2010R). Dále jsou vloženy na hladinu temperované destilované vodní lázně (Medax, 50 °C) a napínány na speciální silanizované podložní sklo, označené evidenčním štítkem. Následuje sušení v termostatu při 56 °C (12h – 24h), délka záleží na množství tukové tkáně. Obarvit vzorek lze dnes na ŠÚP Lochotín pomocí automatu BenchMark ULTRA VENTENA, ruční barvení se již neprovádí.

Postup je ale stejný, pouze se do přístroje vloží potřebné reagensy, který vše automaticky zpracuje sám. Nejprve jsou řezy deparafinizovány v xylenu a následně hydratovány v řadě roztoků se sestupnou etanolovou řadou (96 %, 80 %, 70 %). Následuje oplach v destilované vodě a poté aplikace imunochemie, postup je vylíčen následovně.

Řezy jsou rozděleny na základě doporučení demaskování zablokovaných epitopů, tyto informace jsou uvedeny v Datasheetu pro konkrétní protilátku. Preparát je orámován speciální perem, aby reagensie nestékaly ze sklíčka.

Postup: Trávení a blokáda endogenní peroxidázy, inkubace v neimunním séru, poté v primární protilátce, dále následuje inkubace v sekundární (spojovací) protilátce, pokračuje se vyvoláním použitím chromogenního činidla, následujícím krokem je kontrastování a dobarvení preparátů Gillovým hematoxylinem. Poté následuje odvodnění ve vzestupné etanolové řadě (70 %, 80 %, 96 % a 100 %) a projasnění v kyvetách obsahujících aceton, aceton – xylen, xylen – aceton a xylen. Posledním krokem je montování řezů. (DataSheet – Vendeta)[30, 31]. Nakrájené řezy mikrotomem se doporučují lepit na sklíčka pokrytá poly-L-lysinem, který podporuje adhezi a je odolný vůči proteázám[25].

9.3.2 Reagensie

- **Nejčastěji používané protilátky** – estrogenní a progesteronové receptory, MIB–1 (proliferační aktivita), Her2, cytokeratiny, E–cadherin

Protílátky proti ER, PR jsou nakupovány laboratoří od společnosti Ventana. Protilátka MIB–1 pro stanovení proliferačního markeru Ki–67 je využívána od společnosti DAKO, cytokeratiny od firmy Roche. HercepTest od firmy DAKO.

K vyšetření sentinelové uzliny se používá protilátka CK7, tkáně používané pro negativní a pozitivní kontrolu jsou uvedeny v příbalovém letáku výrobce. Demaskování epitopů je umožněno pomocí proteolytických enzymů. E–cadherin slouží k rozlišení lobulárního a duktálního karcinomu.

9.3.3 Hodnocení vyšetření

Výsledky imunohistochemického vyšetření se v hodnocení exprese ER a PR vyjadřují v procentech (souvisí s počtem pozitivních buněk). V procentech bývá udáván stejně tak i proliferační index Ki67, kde patolog hodnotí proliferační aktivitu nádorových buněk

k celkovému počtu hodnocených buněk s aplikací protilátky MIB1. Pokud je v preparátu přítomen hledaný antigen, výsledná pozitivita imunokomplexů je hnědé zbarvení jader.

Hodnocení exprese HER2 receptoru je v souvislosti s manuálem HerceptTestu od firmy Dako a doporučeními společnostmi ASCO a CAP (*American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*). HER2 negativní karcinomy neexprimují HER2 protein nebo je prokázán gen *HER2/neu* bez amplifikace (IHC skóre 0; 1+). Karcinomy s pozitivní expresí HER2 jsou hodnoceny stupněm 2+ nebo 3+ a jsou vyšetřovány metodou FISH lokusově specifickou sondou na případný průkaz amplifikace genu *HER2/neu* (HerceptTest, Dako).

10 VÝSLEDKY

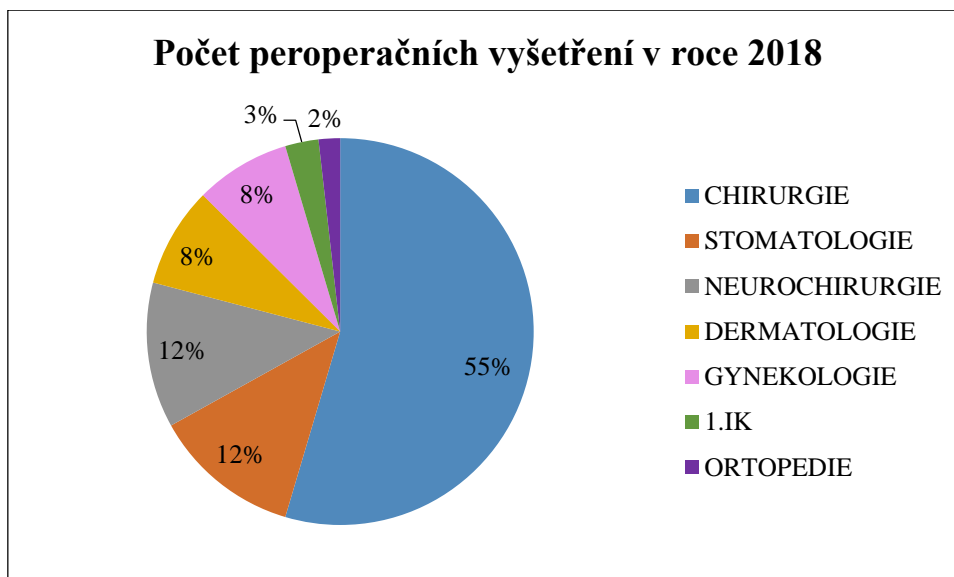
V rámci této práce byla zpracovávána diagnostická data na Šiklově ústavu patologie Fakultní nemocnice Plzeň na Lochotíně za kalendářní období leden 2018 – prosinec 2018. Zaměstnanci ŠÚP vyšetřují histologický materiál i z externích klinik, ale tyto údaje ve své práci nezohledňují. Podle typu odběru lze bioptické vzorky členit na primárně diagnostické (z punkční biopsie), peroperační a definitivně diagnostické. Výsledky těchto dat jsou dále v této práci porovnávány. Počet provedených biopsií za rok 2018 na ŠÚP Lochotín bylo celkem 18 320, dále bylo objednaných 502 peroperačních biopsií a souhrn všech provedených imunohistochemických vyšetření činí 28844. Parařinové bločky s biologickým materiálem jsou archivovány ve FN Plzeň prakticky nepřetržitě a sklíčka s preparáty po dobu 10. let.

10.1 Peroperační biopsie ŠÚP Lochotín

V následujícím grafu č.2 je uveden poměr žádostí jednotlivých oddělení nemocnice o peroperační vyšetření, kterých bylo objednáno celkem 502 za rok 2018. Peroperační biopsie jsem vyhledávala v evidenční knize, kam jsou velmi pečlivě zapisovány laboranty a dále archivovány. Nejvíce biopsií z jednotlivých oddělení FN nemocnice zaslalo oddělení chirurgie s počtem 274 a z celkového počtu 502 přijatých žádostí o peroperační vyšetření zaujímá 55 %, dále 62 vzorků (12 %) bylo zasláno ze stomatology, poté z neurochirurgie 61 vzorků (12 %), dermatologie 42 vzorků (8 %). Celkem 40 žádostí o peroperační vyšetření bylo přijato z gynekologického oddělení (8 %), 1.Interní klinika odeslala 14 vzorků (3 %) a nejméně často přicházely vzorky z ortopedie celkem 9krát (2 %). Hodnoty zaslanych biopsií jsou uvedeny v tabulce č.1

Peroperačních biopsií celkem	502
CHIRURGIE	274
STOMATOLOGIE	62
NEUROCHIRURGIE	61
DERMATOLOGIE	42
GYNEKOLOGIE	40
1.IK	14
ORTOPEDIE	9

Tabuka č.1: Peroperační biopsie ŠÚP za rok 2018 (Zdroj: Autor)



Graf č.2: Souhrn vyšetřených peroperačních biopsií na ŠÚP Lochotín v roce 2018 (Zdroj: Autor)

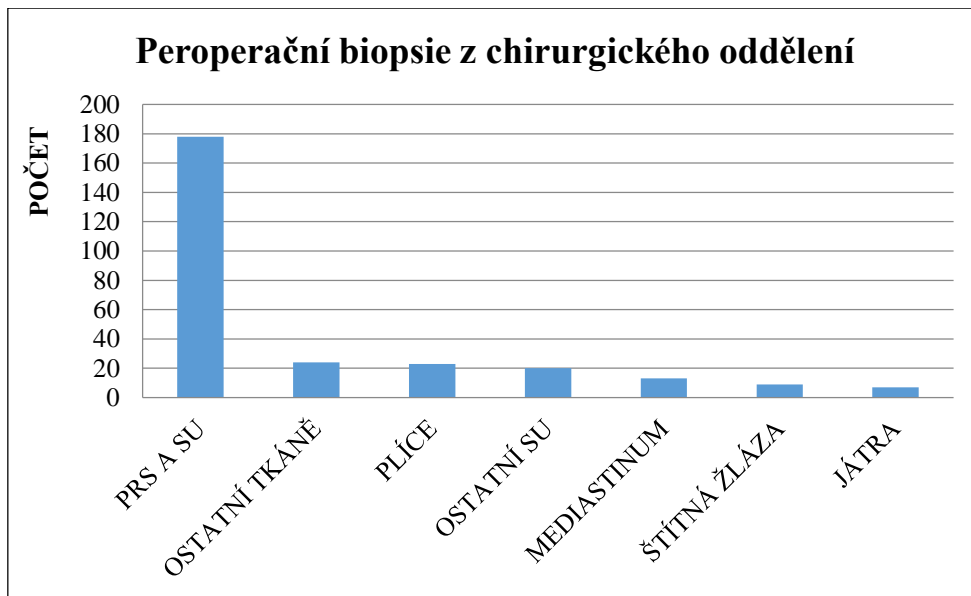
Z přijatých 274 žádostí z chirurgického oddělení o peroperační konzultaci laboratoř obdržela 178 vzorků prsou a jejich sentinelových uzlin, a z celkového počtu provedených peroperačních vyšetření za rok jsou na prvním místě. Tedy z celkového počtu 502 peroperačních biopsií tvoří v mém šetření počet 178 biopsií prsu a sentinelových uzlin celou jednu čtvrtinu – tedy 26 % ze všech objednaných peroperačních konzultací za rok 2018. Tabulka č.2 zobrazuje zastoupení přijatých tkání z chirurgického oddělení na peroperační konzultaci.

CHIRURGIE	274 vzorků
PRS A SU	178
OSTATNÍ TKÁNĚ	24
PLÍCE	23
OSTATNÍ SU	20
MEDIASTINUM	13
ŠTÍTNÁ ŽLÁZA	9
JÁTRA	7

Tabulka č.2: Biopsie z chirurgického oddělení za rok 2018 (Zdroj: Autor)

Další v pořadí často zasílané biopsie z chirurgie jsou v grafu č.3 zapsány jako „ostatní tkáně“ s počtem 24krát (nejčastěji tkáň žlučníku, střeva aj.), biopsie plic 23krát, poté 20 sentinelových uzlin (jiných spádových oblastí než prsu). Biopsií mediastina bylo zasláno

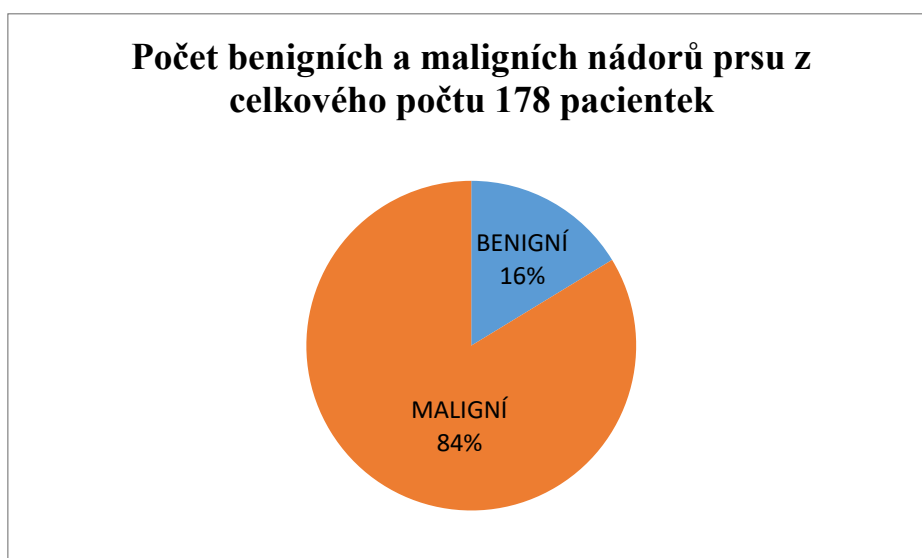
celkem 13 na peroperační vyšetření, 9 bylo přijato peroperačních biopsií štítné žlázy a s nejnižším počtem 7krát byla zaslána biopsie jater (viz. Graf č.3).



Graf č.3: Porovnání počtu peroperačních vyšetření z chirurgického oddělení (Zdroj: Autor)

10.2 Benigní a maligní nádory prsu

Z celkového počtu 178 objednaných peroperačních biopsií prsu bylo v definitivní diagnostice vyhodnoceno 29 případů jako benigních (16 %) a 149 maligních lézí bylo diagnostikováno u 84 % pacientek, procentuální zastoupení je znázorněno v grafu č.4.



Graf č.4: Počet benigních a maligních onemocnění prsu (Zdroj: Autor)

10.2.1 Benigní nádory prsu

V případě benigních nádorů se diagnostikovaly nejčastěji intraduktální papilomy (8x) a fibroadenomy (7x), typická a atypická duktální hyperplázie (prekanceróza) byla stanovena u 2 pacientek, adenóza s radiální sklerozující lézí (radiální jizvou) bez malignit též u 2 pacientek, fibrózní mastopatie byla diagnostikována 5 pacientkám, regresivní změny parenchymu byly zaznamenány u 2 případů, 1 krát zaznamenány dilatované dukty s chronickým zánětem, 1 krát vazivové dukty bez hyperplazie a v jediném případě se jednalo o profylaktický výkon mastektomii levého a pravého prsu, jelikož byla pacientce diagnostikována mutace *BRCA1*.

Benigní nádory prsu	29 pacientek
Intraduktální papilom	8
Fibroadenom	7
Hyperplazie	2
Adenóza a radiální sklerozující léze	2
Fibrózní mastopatie	5
Regresivní změny parenchymu	2
Profylaktický výkon	1
Dilatované dukty s chronickým zánětem	1
Vazivové dukty bez hyperplazie	1

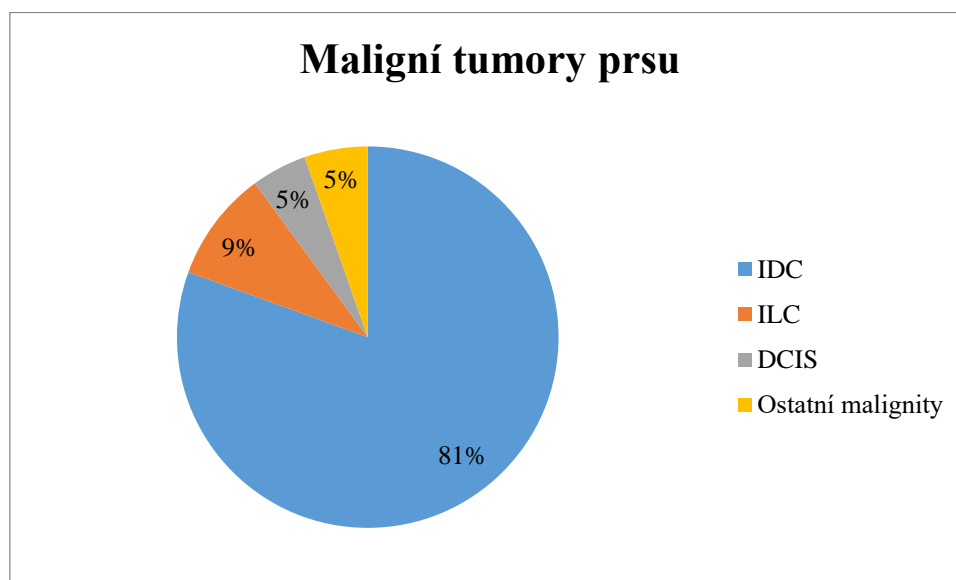
Tabulka č.3: Benigní nádory (Zdroj: autor)

10.2.2 Maligní nádory prsu

Mezi nejčastěji se vyskytující karcinomy prsu patří invazivní duktální karcinom (IDC), a i v mém šetření je na prvním místě tabulky s počtem 120 případů. Invazivní duktální karcinomy zaujímají 81 % ze 149 diagnostikovaných maligních nádorů. Prognózu v tomto případě udává grade, velikost tumoru, postižení lymfatických uzlin a cév, pozitivita ER a overexprese HER2. Druhým nejčastějším karcinomem je invazivní lobulární karcinom ILC objevující se celkem u 14 pacientek v mém průzkumu maligních nádorů činí 9 %, který lze prokázat imunohistochemicky použitím E-cadherinu (výsledek je E-cadherin negativní). Mezi další časté malignity prsu patří DCIS diagnostikovaný u 7 pacientek (5 %). Mezi ostatní malignity v grafu č.5 patří diagnózy: 3x mucinózní (koloidní) karcinom (2 %), 2x enkapsulovaný papilární karcinom (1 %), 1x Pagetův karcinom bradavky a DCIS, 1x zhoubný novotvar bez určení lokalizace a 1x se jednalo o smíšený fyloidní tumor (viz. tabulka č.4).

Maligní nádory prsu	149 pacientek
IDC	120
ILC	14
DCIS	7
Mucinózní (koloidní) karcinom	3
Enkapsulovaný papilární karcinom	2
Pagetův karcinom bradavky a DCIS	1
Zhoubný novotvar bez určení lokalizace	1
Fyloidní tumor	1

Tabulka č.4: Maligní nádory prsu (Zdroj: Autor)



Graf č.5: Maligní tumory prsu (Zdroj: Autor)

10.3 Porovnání primárně a definitivně diagnostických dat

V této části práce porovnávám primárně diagnostická data pacientek z punkční biopsie a výsledky z definitivní diagnózy. Měla jsem k dispozici primárně diagnostická data pouze od 69 pacientek z celkového počtu 178, jelikož tyto zákroky mohou probíhat i na jiných menších histologických pracovištích a informace o punkční biopsii jsou zasílány klinickému lékaři. Shoda v přesné typizaci nádoru jak v primární punkční biopsii, tak v definitivním vyšetření nastala v 55 (80 %) případech, z toho však ve 12 případech bylo nalezeno v definitivě další nádorové ložisko, převážně struktury DCIS u diagnostikovaného IDC.

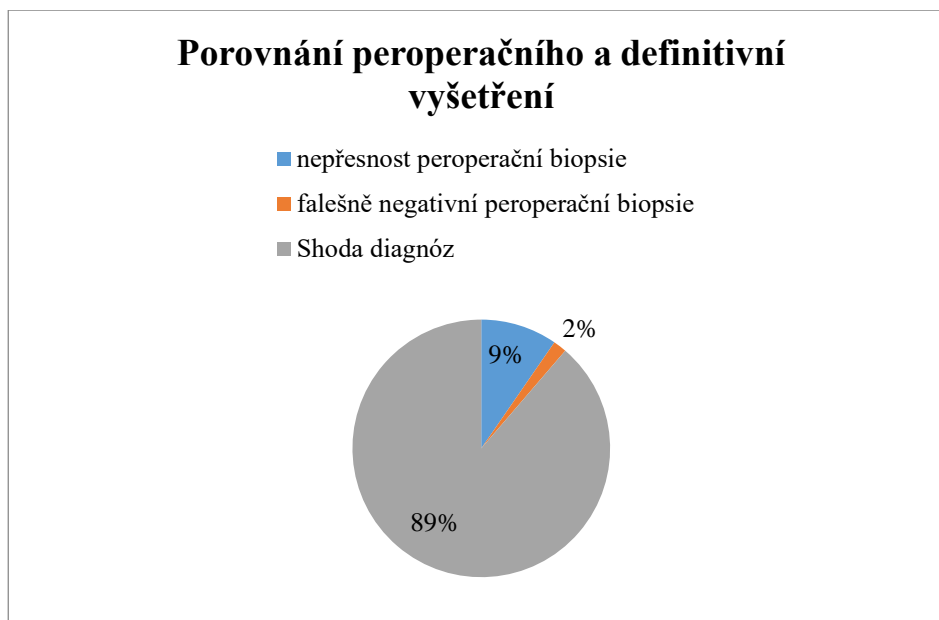
Punkce a definitivní vyšetření	69 pacientů
Shoda v typizaci nádoru	55 (80 %)
v definitivě odhalena invaze z DCIS na IDC	4 (6 %)
rozdílné diagnózy	7 (10 %)
Suspektní ložisko odstraněno punkcí	3 (4 %)

Tabulka č.5: Porovnání primárně a definitivně diagnostických dat (Zdroj: Autor)

Nepřesnosti v diagnózách byly hodnoceny u 14 pacientek. Z tabulky č.5 vyplývá, že byla odhalena nádorová invaze celkem u 4 pacientů z DCIS na IDC. U 7 pacientů se během porovnávání primárního a definitivní vyšetření zjistil rozdíl v typizaci nádoru. Do položky rozdílné diagnózy v tabulce č.5 patří tyto neshodné nálezy: Punkce dg. ADH (prekanceróza) x def.dg. benigní fibrózní mastopatie; punkce dg. léze nejasné etiologie x def.dg. intraduktální papilom; punkce dg. LIC x def.dg. IDC; punkce dg. ADH x v definitivě odhalena malignita IDC, punkce dg. IP x v definitivě pouze dilatované dukty s chronickým zánětem, punkce dg. IDC x def. dg. LIC, punkce dg. papilokarcinom x DCIS. Punkční biopsií lze suspektní ložisko i zcela odstranit, jak tomu bylo ve 3 případech DCIS.

10.4 Porovnání dat z peroperačních a definitivních vyšetření prsu

Ze 178 pacientek objednaných na peroperační biopsii prsu, byla v jediném případě peroperační biopsie odložena na definitivní vyšetření, jednalo se o klinicky nehmotný nádor pod 7 mm, tkáň se rozpadala a hrozilo poškození suspektního nádoru. Shoda v diagnostice peroperačního a definitivního vyšetření se týkala 157 pacientů, nepřesnost peroperačního vyšetření byla zaznamenána u 17 pacientek a u dalších 3 pacientek bylo peroperační vyšetření hodnoceno jako falešně negativní. Shoda 157 případů v typizaci nádoru a případném upřesnění jejího typu zaujímá 89 %, nepřesnost peroperačního vyšetření 9 % a falešně negativní peroperační biopsie činí 2 % z celkového porovnání peroperační a definitivní vyšetření viz. graf č.6.



Graf č.6: Porovnání diagnóz peroperačního a definitivního vyšetření (Zdroj: Autor)

Ve shodně diagnostikovaných 157 biopsiích k přesné typizaci nádoru došlo u 141 pacientek, nutné upřesnění typu nádoru v definitivě bylo požadováno u 16 biopsií. V definitivě se neměnila diagnóza, ale pouze upřesnila. Nejčastěji se jednalo o invazivní duktální karcinom 6x IDC, 3x ILC, 1x zhoubný novotvar bez určení lokalizace, 1x intraduktální papilom, 2 krát byla peroperačně léze hodnocena jako cystická papilární léze nejasné biologické povahy a v definitivě hodnocena jako enkapsulovaný papilární karcinom, 2x byla diagnostikována prekanceróza (hyperplázie) a v jednom případě se jednalo o celulární fibroadenom (tabulka č.6).

Celkem pacientů	178
SOUHLAS v peroperačním a definitivním vyšetření	157
NEPŘESNOST peroperační vyšetření / definitivní	17
FALEŠNĚ NEGATIVNÍ peroperační výsledek	3
Odmítnutí peroperační biopsie	1

Tabulka č.6: Porovnání peroperačních a definitivních vyšetření (Zdroj: Autor)

Bylo nalezeno 17 nepřesností peroperačního vyšetření v porovnávání s definitivní diagnózou, převážně se jednalo o odhalení dalších nádorových ložisek v definitivě tomu tak

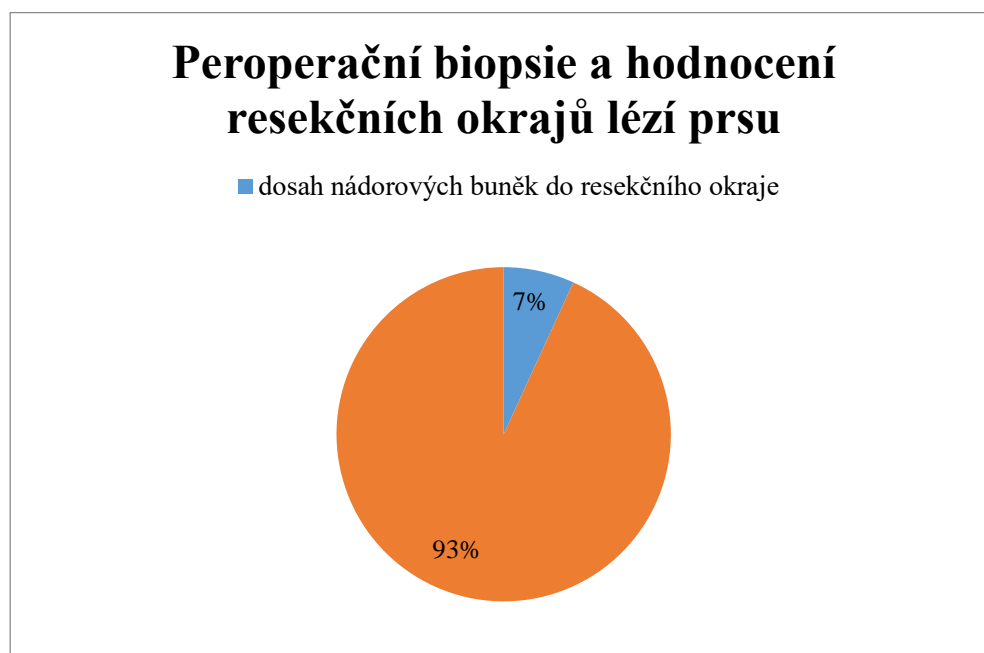
bylo u 9 biopsií (popsáno ložisko DCIS v rámci nádoru IDC 2x, 1x objeveno ložisko intraduktálního papilomu v okolí IDC, 5x objevena ložiska DCIS v okolí peroperačně diagnostikovaného IDC, 1x ložisko hyperplázie – prekancerózy v okolí intraduktálního papilomu), odhalení invazivity duktálního karcinomu (3x IDC) po prokrájení již prokázané maligní nádorové tkáně DCIS. Peroperačně byla hlášena u 3 pacientek tkáň jako benigní a v definitivě po zpracování celé biopsie odhalena malignita (2x DCIS, 1x IDC). Jedenkrát bylo invazivní ložisko karcinomu peroperačně zcela vykrájeno a v definitivě zastiženo pouze DCIS. Další nepřesnost v typizaci nádoru u pacientky peroperačně hodnocené jako 2 ložiska IDC, v definitivě po druhém čtení hodnoceno jako LIC (při prvním čtení smíšený dukto–lobulární karcinom).

Falešně negativní výsledek peroperačního vyšetření lze zhodnotit u 3 případů ze 177 hodnocených peroperačních biopsií, kde nebyla peroperačně prokázána nádorová tkáň, ale až v definitivním hodnocení byla detekována imunohistochemií ojedinělá struktura nádorových buněk IDC. Jednalo se o recidivu prokázanou z punkční biopsie, u další pacientky byla provedena excize DCIS s nekrózou, následovalo zaslání rezistence na peroperační vyšetření a u třetí pacientky byl hodnocen peroperačně lem tkáně kolem karcinomu bez nádorových struktur viz tabulka č.7.

	věk pacienta	Klinická diagnóza	Peroperační biopsie	Definitivní vyšetření	Porovnání peroperačního a definitivního vyšetření
1. biopsie	33	recidiva IDC	nádorová tkáň neprokázaná, pouze významná elastóza	IDC ojedinělá skupina nádorových bb. (e–CATHERIN A CK OSCAR)	FALEŠNĚ NEGATIVNÍ
2. biopsie	60	DCIS	vyšetření rezistence, bez nádorových struktur	IDC ojedinělá struktura (menší než 1 mm, 3 myoepiteliární marker)	FALEŠNĚ NEGATIVNÍ
3. biopsie	57	DCIS	lamela kolem tumoru bez nádorových struktur	IDC ojedinělá struktura	FALEŠNĚ NEGATIVNÍ

Tabulka č.7: Falešně negativní peroperační biopsie (Zdroj: Autor)

U 7 % pacientek, kterým byl v peroperační biopsii prokázán dosah nádorových buněk do resekcčního okraje. Peroperační vyšetření tak bylo užitečné k rozšíření chirurgického zákroku operace prsu. Ze 177 biopsií prsu se jednalo o 13 pacientek (Graf č.7).



Graf č.7: Peroperační biopsie a hodnocení resekcčních okrajů (Zdroj: Autor)

10.5 Zhodnocení sentinelových uzlin

Důležitým prognostickým faktorem je zjištění pacientova stavu sentinelových lymfatických uzlin, což nám následně vypovídá o situaci uzlin regionálních. Pozitivní SU z peroperační biopsie vede ihned k exenteraci axilárního tuku, negativní SU znamená pouze, že je nutné čekat na výsledek definitivního vyšetření a případnou exenteraci provést dodatečně.

Vyšetření SU peroperačně a zároveň v definitivní biopsii

Sentinelové uzliny byly peroperačně a zároveň v definitivním vyšetření hodnoceny u 15 pacientek a u jedné třetiny byly identifikovány metastázy. Jednalo se o 5 případů detekovaných metastáz invazivního duktálního karcinomu. Mezi peroperačním a definitivním vyšetření SU jsem našla 1 nepřesnost. U pacientky byla zastižena peroperačně v 1 ze 3 uzlin subkapsulární metastáza, ale až po prokrájení a použití imunohistochemie (CK AE1–3) byla odhalena metastáza i v uzlině druhé.

Vyšetření SU pouze v definitivní biopsii

Také bylo zjištěno, u kolika pacientek byly sentinelové uzliny zaslány a zkoumány pouze v definitivě, bylo tomu tak u 102 pacientek. Celkem bylo identifikováno 24 pacientek s metastázami. Metastázy byly detekovány u 25% pacientek se zaslanými SU na definitivní vyšetření. Z toho byly 4 metastázy enkapsulované, 4 mikrometastázy a jeden shluk buněk subkapsulárně tvořící totožnou tkáň primárního karcinomu. Jednalo se převážně o metastázy téže typu, jako je primární nádoru. Až na jednu výjimku, ve které byl histologicky diagnostikován duktální invazivní karcinom, ale v uzlině byla detekována metastáza dlaždicového karcinomu, to nejspíše souvisí s jiným karcinomem léčeným před 2lety, patolog navrhuje podrobnou klinickou korelaci. (23x metastáza IDC, 1x metastáza LIC, 1x metastáza dlaždicového karcinomu).

Celkové zhodnocení pozitivních SU

Počet nalezených metastáz v SU u různých věkových kategorií představuje graf č.7. Vyšetřilo se celkem 117 pacientů protokolem pro sentinelovou lymfatickou uzlinu, u 29 pacientek byla prokázána metastáza. Metastatické poškození se týká 25 % pacientek s vyšetřenými uzlinami. Nejstarší pacientce bylo 78 let a nejmladší 30 let. Nejvíce metastáz bylo zachyceno u pacientek, ve věku 60 a více let.

Jedna metastáza byla diagnostikovaná pacientce narozené r. 1940, 7 pozitivních SU bylo nalezeno pacientkám ve věkové kategorii 1941–1950, 11 pozitivních SU v kategorii 1951–1960, v kategorii 1961–1970 identifikováno 6 pozitivních SU, 4 pozitivní SU v kategorii 1971–1980 a jedna metastáza odhalena u pacientky narozené r.1988.

11 DISKUSE

V rámci této bakalářské práce jsem zpracovala diagnostická data pacientek z Šiklova ústavu patologie Fakultní nemocnice Plzeň. Jednalo se o výsledky z vyšetření uskutečněné v kalendářním roce leden – prosinec 2018.

V rámci mé bakalářské práce jsem stanovila 2 cíle:

- 1) Zmapovat dostupné histologické metody diagnostiky tumoru prsu, s podrobnějším zaměřením na peroperační biopsie
- 2) Statistické zpracování souboru diagnostických dat pacientek, které podstoupily chirurgickou léčbu rakoviny prsu za účelem zjištění vlivu peroperačního vyšetření na terapii pacientek

Dále byly v rámci práce stanoveny dva výzkumné problémy:

1) Jsou diagnostické metody používané při peroperačním vyšetření lézí prsu dostatečně spolehlivé navzdory své rychlosti?

V mé práci byla z celkového počtu 177 peroperačně hodnocených lézí prsu v roce 2018 ve FN v Plzni diagnostická shoda s definitivním vyšetřením v typizaci nádoru potvrzena u 157 pacientek, což činí 89 %. Pro porovnání, S. Kale udává shodu peroperační a definitivní diagnózy 88 % [48]. Vzhledem k výrazným limitacím peroperačních biopsií u prsu byla přítomna i vysoká nepřesnost mezi peroperační diagnózou a definitivní diagnózou a to u 9 % pacientek. Falešně negativní peroperační biopsie pak zaujímala v celém souboru 2 %. Senzitivita detekce nádorových buněk (bez určení konkrétního typu nádoru) pomocí vyšetření zmrzlých řezů činila tedy 98 %. Literatura udává hodnoty 96 % [48] a 99 – 99,5 % [38].

Spolehlivost peroperačního vyšetření je tedy relativně vysoká, nicméně nedosahuje spolehlivosti histopatologického definitivního vyšetření. Limitace peroperačních vyšetření jsou způsobeny zejména nedostatkem času a artefakty ze zpracování vzorku. Tuková tkáň patří obecně mezi špatně zpracovatelné tkáně a rychlým zmrazením dochází k jejímu poškození a následnému ztížení či znemožnění diagnostického procesu. Kratší diagnostický čas u peroperačních metod oproti definitivnímu vyšetření je tedy vynahrazen zhoršenou diagnostickou spolehlivostí. První výzkumný problém byl potvrzen.

2) *Má peroperační vyšetření lézí prsu i přes své limitace pozitivní vliv na terapii pacientek?*

Současné metody peroperačního vyšetření jsou obecně rychlé a dostatečně spolehlivé, což z nich činí pohodlný nástroj pro operujícího chirurga. Jejich praktičnost však může vést jak ke zbytečnému nadužívání těchto metod, tak k vkládání nepřiměřené důvěry v tyto metody. Zejména přílišné spoléhání se na diagnózu získanou rychlou peroperační technikou, obzvláště z adipózní tkáně prsu, může přivodit chybná rozhodnutí v průběhu chirurgického zákroku.

Peroperační biopsie také nevedou ke zpřesnění diagnostiky typu karcinomu, jelikož diagnóza je před operací většinou známa z radiologického vyšetření a histologicky ověřené punkční biopsie. Zmrazené řezy z peroperačních biopsií jsou však velmi cenné při hodnocení podezřelých resekcčních okrajů a mohou významně snížit výskyt recidivy a počet následných operací, což má zásadní vliv na mortalitu pacientek i na kosmetický výsledek operace[55].

Například S. J. Schnitt a M. Morrow[45] zjistili, že provedení peroperační biopsie zmrazených řezů při konzervativní operaci prsu je spojeno s podstatným snížením reexcizi (tzn. následných operací). U téměř poloviny všech pacientů (49 %), kteří neměli objednané vyšetření zmrzlých řezů resekcčních okrajů při úvodní lumpektomii, byla provedena v určitém čase reexcize, ve srovnání s pouze 15 % pacientů u kterých toto hodnocení bylo peroperačně provedeno.

V mé práci byl z peroperačně hodnocených 177 biopsií prsu prokázán u 13 pacientek dosah nádorových buněk do resekcčních okrajů a bylo tak nutné rozšířit chirurgický výkon. Z celkového počtu peroperačních vyšetření se jedná o 7 %. Je pravděpodobné, že pacientky byly díky této diagnostice ušetřeny další případné operace. Za předpokladu, že všem 13 pacientkám byla ušetřena další operace, je teoretický „počet nutný k léčbě“ (number needed to treat, NNT) pro prevenci reexcize 13,6.

Hlavní negativní dopad peroperačního vyšetření na terapii pacientek je poskytnutí falešně negativních výsledků, jejichž výskyt byl v mnou zpracovaném souboru 2 %. Literatura uvádí, že procento falešně negativních diagnóz se pohybuje od 0,5 % do 4,0 % [38, 48]. Obecně však falešně negativní výsledek peroperační biopsie by neměl mít vážný vliv na výsledek operace,

pokud si je operující chirurg vědom limitací, které tyto metody nesou. Důležitá je až definitivní diagnóza s případným využitím imunohistochemie.

Naopak hlavní pozitivní vliv peroperačního vyšetření v hodnocení resekcčních okrajů je prevence dalších operací, jehož míra se ale bohužel nedá z analyzovaných dat určit, jelikož nebyla k dispozici data s počtem případných recidiv. Hodnocení peroperační biopsie již prokázaného nádoru nemá prakticky vliv na terapii pacientek. Druhý výzkumný problém byl alespoň částečně potvrzen.

12 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo zmapovat moderní dostupné histopatologické diagnostiky tumoru prsu se zaměřením na peroperační konzultace a přiblížit jejich aplikování v praxi. Metody spadající do této diagnostiky jsou barvení HE, vyšetření peroperačních biopsií a IHC, molekulární genetika s výjimkou vyšetření Her2, je zatím využívána spíše výzkumně.

Během porovnávání peroperačních a definitivně diagnostických dat u 177 biopsií byla nalezena shoda v 89 %, bylo odhaleno 11 nepřesností a 3 falešně negativní výsledky peroperačně, z důvodu limitace peroperačního vyšetření. Jednalo se o ojedinělou strukturu nádorových buněk, které lze zastihnout až po důkladném prokrájení celého vzorku v definitivním vyšetření.

U většiny pacientek byly zaslány lymfatické uzliny na definitivní vyšetření. V porovnání peroperační a definitivní vyšetření SU u 15 pacientek byla odhalena jedna nepřesnost peroperační diagnostiky při zachycení mikrometastázy. Detekce mikrometastáz je ve většině případů po prokrájení celé uzliny a za použití imunohistochemie v definitivním vyšetření.

Peroperační diagnostika je též užitečná v hodnocení resekčních okrajů a u 7 % případů pacientek byl rozšířen chirurgický zákrok. Aby bylo možné hodnotit přínos peroperační biopsie, bylo by nutné mít k dispozici další analyzovaná data pacientek týkající se možných recidiv či reexcizi.

Automatizace a současná modernizace práce v laboratořích umožňuje denně zpracovat a zhodnotit zpravidla více vzorků než při ručním zpracování materiálu v minulosti. S využitím dalších diagnostických metod umožňují histopatologické diagnostiky vybrat vyhovující chirurgickou a onkologickou léčbu zaměřenou na zvýšení kvality života pacientů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Klener, P., *Klinická onkologie*. 2002, Praha: Galén.
2. Abrahámová, J., *Atlas nádorů prsu*. 2000, Praha: Grada.
3. Vajner, L., *Lékařská histologie I.: Cytologie a obecná histologie*. 2018, Praha: Karolinum.
4. Abrahámová, J., *Co byste měli vědět o rakovině prsu*. 2009, Praha: Grada.
5. Taxy, J.B., *Frozen section and the surgical pathologist: a point of view*. Arch Pathol Lab Med, 2009. **133**(7): p. 1135-8.
6. Lüllmann-Rauch, R., *Histologie*. 2012, Praha: Grada.
7. Čihák, R., *Anatomie 3*. 2004, Praha: Grada.
8. Eliška, O. and M. Elišková, *Lymfatická drenáž mléčné žlázy a prsu*. 1998, Praha: Karolinum.
9. Dušek, L., et al. *C50,D05 - Nádory prsu: Časový vývoj hrubé incidence a mortality*. 2005 19. 2. 2019]; Available from: <http://www.svod.cz/report.php?diag=C50,D05&type=pdf>.
10. Becker, H.D., *Chirurgická onkologie*. 2005, Praha: Grada.
11. Nair, M. and I. Peate, *Patologie pro zdravotnické obory*. 2017, Praha: Grada.
12. Vrtišková, M., *Zdravotní nauky*. 2012, Praha: Vyšší odborná škola sociálně právní.
13. *Program mamografického screeningu v České republice*. 2019 16. 2. 2019]; Available from: <http://www.mamo.cz/>.
14. Nenutil, R. and A. Ryška, *Doporučený postup pro zpracování a vyšetření bioptických vzorků prsu*, S.č. patologů, Editor. 2013.
15. Rob, L., *Gynekologie*. 2008, Praha: Galén.
16. Ehemann, C.R., et al., *The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(6): p. 1763-9.
17. Freire, C.C.D. *Breast malignant, males, children*. 2018 19. 2. 2019]; Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/breastmalignant.html>.
18. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.
19. Svoboda, M., et al., *[Triple-negative breast cancer: analysis of patients diagnosed and/or treated at the Masaryk Memorial Cancer Institute between 2004 and 2009]*. Klin Onkol, 2012. **25**(3): p. 188-98.
20. Palácová, M., J. Vyskočil, and D. Macková, *Triple negativní karcinom prsu - chemorezistentní onemocnění?*, in *XXXIV. Brněnské onkologické dny a XXIV. Konference pro sestry a laboranty*. 2010: Brno.
21. Petráková, K., et al., *Mechanismy rezistence na tamoxifen*. Klin Onkol, 2007. **20**(6): p. 369-376.
22. Ross, J.S., et al., *Targeted Therapy in Breast Cancer*. The HER-2/neu Gene and Protein, 2004. **3**(4): p. 379-398.
23. Ryška, A. *Histologické vyšetření karcinomu prsu*. 2010 22. 8. 2019]; Available from: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/nadory-prsu-c50/histologicke-vysetreni-karcinomu-prsu/>.
24. Skálová, A. and J. Fínek, *Prognostické a prediktivní faktory v diagnóze invazivního karcinomu prsu*, in *XIII. Jihočeské onkologické dny*. 2006: České Budějovice.

25. Jirkovská, M., *Histologická technika: Pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. 2017, Praha: Galén.
26. Čech, S., *Histologická praktika a metody vyšetřování tkání a orgánů*. 1998, Brno: Masarykova univerzita.
27. Dvořák, K., et al., *Základy histopatologických vyšetřovacích metod*. 2008, Brno: Masarykova univerzita.
28. Warzecha, H. *Core biopsy of breast lesions*. 2010 19. 2. 2019]; Available from: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/breastcore.html>.
29. Skálová, A. and J. Fínek, *Kontroverze v onkologické diagnostice: limity a výhody core cut biopsie v diagnostice lézí prsu*. *Oncology*, 2015. **9**(2): p. 64-66.
30. Daum, O., *Laboratorní příručka ŠÚP FN Plzeň: Přehled laboratorních vyšetření, referenčních mezí a doporučení*. 2018, Plzeň: FN.
31. Vacek, Z., *Histologická technika II.část*. 1995, Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví.
32. Paulsen, D.F., *Histologie a buněčná biologie: Opakování a příprava ke zkouškám*. 2004, Praha: H & H.
33. Čížková, K., *Základy histochemických metod*. 2018, Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.
34. Rentshaw, S., *Imunohistochemistry and immunocytochemistry: Essential Methods*. 2018, London: Wiley-Blackwell.
35. Beranová, M. and Z. Tonar, *Principy a příklady imunohistochemie: Příručka pro studenty*. 2002, Plzeň: Ústav histologie a embryologie LF UK v Plzni.
36. Gal, A.A., *The Centennial Anniversary of the Frozen Section Technique at the Mayo Clinic*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2005. **129**(12): p. 1532-1535.
37. Skovajsová, M., *Detailní lokalizace nádoru v prsu jako kvalifikovaný základ spolupráce radiologa, chirurga, chemoterapeuta a patologa.*, in *2007 XXXI. Brněnské onkologické dny a XXI. Konference pro sestry a laboranty*. 2007: Brno.
38. Laucirica, R., *Intraoperative Assessment of the Breast: Guidelines and Potential Pitfalls*. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2005. **129**(12): p. 1565-1574.
39. Argani, P. and A. Cimino-Mathews, *Intraoperative Frozen Sections: Diagnostic Pitfalls*. 2013, New York: Demos Medical Publishing.
40. Taxy, J.B., A.N. Husain, and A.G. Montag, *Biopsy interpretation: The frozen section*. 2010, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Health.
41. Beach, R.A., et al., *Rapid Immunohistochemistry for Cytokeratin in the Intraoperative Evaluation of Sentinel Lymph Nodes for Metastatic Breast Carcinoma*. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 2003. **11**(1): p. 45-50.
42. Dietz, R.L., et al., *Review of the use of telepathology for intraoperative consultation*. *Expert Review of Medical Devices*, 2018. **15**(12): p. 883-890.
43. Bashshur, R.L., et al., *The Empirical Foundations of Telepathology: Evidence of Feasibility and Intermediate Effects*. *Telemedicine and e-Health*, 2017. **23**(3): p. 155-191.
44. Švajdler, M. and P. Švajdler, *Peroperačná biopsia: história, indikácie, kontraindikácie a kontrola kvality*. *Česko-slovenská patologie*, 2018. **54**(2): p. 47.
45. Schnitt, S.J. and M. Morrow, *Should Intraoperative Frozen Section Evaluation of Breast Lumpectomy Margins Become Routine Practice?* *American Journal of Clinical Pathology*, 2012. **138**(5): p. 635-638.
46. Folpe, A.L. *Q & A of CAP Today*. 2007 22. 8. 2019]; Available from: http://www.captodayonline.com/Archives/q_and_a/0707qa.html.

47. Tan, M.P., N.Y. Sitoh, and A.S. Sim, *The Value of Intraoperative Frozen Section Analysis for Margin Status in Breast Conservation Surgery in a Nontertiary Institution*. International Journal of Breast Cancer, 2014. **2014**: p. 7.
48. Kale, S., et al., *Intraoperative frozen section and imprint cytology of breast lesions: A comparative study*, in *7th World Hematologists Congress*. 2017: Barcelona.
49. Pecha, V., et al., *Biopsie sentinelové uzliny u žen s časným karcinomem prsu*. Oncology, 2011. **5**(1): p. 16-22.
50. Laughney, A.M., et al., *Spectral discrimination of breast pathologies in situ using spatial frequency domain imaging*. Breast cancer research : BCR, 2013. **15**(4): p. R61-R61.
51. Taqi, S.A., et al., *A review of artifacts in histopathology*. Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP, 2018. **22**(2): p. 279-279.
52. Jung, W., et al., *Factors Associated with Re-excision after Breast-Conserving Surgery for Early-Stage Breast Cancer*. Journal of Breast Cancer, 2012. **15**(4): p. 412.
53. Čoupek, P., P. Šlampa, and A. Malíř, *Neobvyklý průběh regionální recidivy karcinomu prsu*, in *9. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii*. 2004: Praha.
54. Gatěk, J., et al., *Lokální recidivy po konzervativních výkonech u karcinomu prsu*, in *2008 13. ročník odborného sympózia na téma Onkologie v gynekologii a mammologii a 3.ročník pro NLZP*. 2008.
55. Anila, K.R., et al., *Role of frozen section in the intra-operative margin assessment during breast conserving surgery*. Indian Journal of Cancer, 2016. **53**(2): p. 235.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Zkratka	Význam
Ab	protilátka (antibody)
ADH, ALH	atypická duktální / lobulární hyperplazie
Ag	antigen
APAAP	alkalická fosfatáza–anti–alkalická fosfatáza
<i>BRCA1</i>	gen <i>BRCA1</i> (breast cancer 1)
<i>BRCA2</i>	gen <i>BRCA2</i> (breast cancer 2)
CK	cytokeratiny
CT	počítačová tomografie (computed tomography)
DCIS, LCIS	duktální / lobulární karcinom in situ (ductal/lobular carcinoma in situ)
dg.	diagnóza
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
EGFR	receptor pro lidský epidermální růstový faktor ErbB–1 čili HER1 (epidermal growth factor receptor)
ER	estrogenový receptor
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
FN	Fakultní nemocnice
FNAB	biopsie tenkou jehlou (fine–needle aspiration biopsy)
HE	Hematoxylin – eosin
HER2/neu	receptor pro lidský epidermální růstový faktor 2 čili ErbB–2 (human epidermal growth factor receptor 2)
Ig	imunoglobulin
IDC/ILC	invazivní duktální/lobulární karcinom
IHC	imunohistochemie
Ki67(MIB1)	antigen Ki67, nukleární protein
<i>myc</i>	<i>myelocytomatosis viral oncogene</i>
p53	protein p53
PAP	peroxidáza–anti–peroxidázový komplex

PET	pozitronová emisní tomografie (positron emission tomography)
PP	pracovní postup
PR	progesteronový receptor
<i>ras</i>	rat sarcoma oncogene
SU	sentinelová uzlina
SOPV	Standardní operační postup vyšetřovací
ŠÚP	Šiklův ústav patologie
TNM	klasifikace nádorů podle tumoru, uzlin a metastáz (<u>t</u> umor, <u>n</u> odi, <u>m</u> etastasis)
ÚZIS ČR	Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky
μm	mikrometr

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Peroperační biopsie ŠÚP za rok 2018 (Zdroj: Autor)

Tabulka 2: Biopsie z chirurgického oddělení za rok 2018 (Zdroj: Autor)

Tabulka 3: Benigní nádory (Zdroj: autor)

Tabulka 4: Maligní nádory prsu (Zdroj: Autor)

Tabulka 5: Porovnání primárně a definitivně diagnostických dat (Zdroj: Autor)

Tabulka 6: Porovnání peroperačních a definitivních vyšetření (Zdroj: Autor)

Tabulka 7: Falešně negativní peroperační biopsie (Zdroj: Autor)

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Časový vývoj hrubé incidence a mortality nádoru prsu v ČR; (Zdroj:<http://www.svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>)

Graf 2: Souhrn vyšetřených peroperačních biopsií na ŠÚP Lochotín v roce 2018 (Zdroj: Autor)

Graf 3: Porovnání počtu peroperačních vyšetření z chirurgického oddělení (Zdroj: Autor)

Graf 4: Počet benigních a maligních onemocnění prsu (Zdroj: Autor)

Graf 5: Maligní tumory prsu (Zdroj: Autor)

Graf 6: Porovnání diagnóz peroperačního a definitivního vyšetření (Zdroj: Autor)

Graf 7: Peroperační biopsie a hodnocení resekcčních okrajů (Zdroj: Autor)

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici Plzeň.

Příloha 2: Duktální karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (20x)

Příloha 3: Duktální karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (200x)

Příloha 4: Duktální karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (20x)

Příloha 5: Duktální karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (200x)

Příloha 6: DIC, E-cadherin pozitivní reakce (20x)

Příloha 7: DCIS, ER pozitivní reakce (100x)

Příloha 8: DCIS, PR pozitivní reakce (10x)

Příloha 9: Her 3+ pozitivní reakce (400x)

Příloha 10: Lobulární karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (20x)

Příloha 11: Lobulární karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (200x)

Příloha 12: Lobulární karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (10x)

Příloha 13: Lobulární karcinom, PR – negativní reakce (20x)

PŘÍLOHY

Příloha 1: Povolení sběru informací ve Fakultní nemocnici Plzeň



Vážená paní
Radka Opavová
Studentka oboru Zdravotní laborant
Fakulta zdravotnických studií, Katedra teoretických oborů
Západočeská univerzita v Plzni

Povolení sběru informací ve FN Plzeň

Na základě Vaší žádosti Vám jménem Útvaru náměstkyně pro ošetrovatelskou péči FN Plzeň **uděluji souhlas** se sběrem a zpracováním anonymizovaných dat z výsledků laboratorních vyšetření, používaných v *Šiklově ústavu patologie (ŠÚP) FN Plzeň*. Tento souhlas je vydáván, při splnění níže uvedených podmínek, v souvislosti s vypracováním Vaší bakalářské práce s názvem „*Moderní histologická diagnostika tumorů prsu využití peroperačních biopsií, imunohistochemie a molekulární genetiky a jejich vliv na terapii pacientek*“.

Podmínky, za kterých Vám bude umožněna realizace Vašeho šetření ve FN Plzeň:

- Vrchní zdravotní laborantka ŠÚP souhlasí s Vaším postupem.
- Osobně povedete svoje šetření.
- Vaše šetření nenaruší chod pracoviště ve smyslu provozního zajištění dle platných směrnic FN Plzeň, ochrany dat pacientů a dodržování Hygienického plánu FN Plzeň. Vaše šetření bude provedeno za dodržení všech legislativních norem, zejména s ohledem na platnost zákona č. 372/2011 Sb., o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování, v platném znění.
- Údaje ze zdravotnické dokumentace pacientů, které budou uvedeny ve Vaší bakalářské práci, musí být anonymizovány.
- **Sběr informací budete provádět pod přímým vedením oprávněného zdravotnického pracovníka, kterým je pan MUDr. Robert Stunečko, lékař ŠÚP FN Plzeň.**

Po zpracování Vámi zjištěných údajů poskytnete zdravotnickému oddělení / klinice či organizačnímu celku FN Plzeň závěry Vašeho šetření, pokud o ně projeví oprávněný pracovník ZOK / OC zájem a budete se aktivně podílet na případné prezentaci výsledků Vašeho šetření na vzdělávacích akcích pořádaných FN Plzeň.

Toto povolení nezakládá povinnost zdravotnických pracovníků s Vámi spolupracovat, pokud by spolupráce s Vámi narušovala plnění pracovních povinností zaměstnanců. Spolupráce zaměstnanců FN Plzeň na Vašem šetření je dobrovolná.

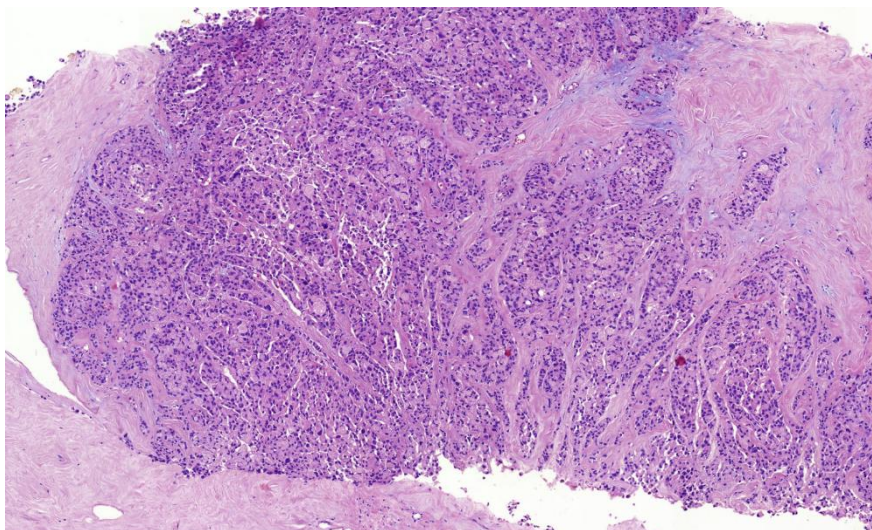
Přeji Vám hodně úspěchů při studiu.

Mgr. Bc. Světluše Chabrová
manažerka pro vzdělávání a výuku NELZP
zástupkyně náměstkyně pro oš. péči

Útvar náměstkyně pro oš. péči FN Plzeň
tel.: 377 103 204, 377 402 207
e-mail: chabrovas@fnplzen.cz

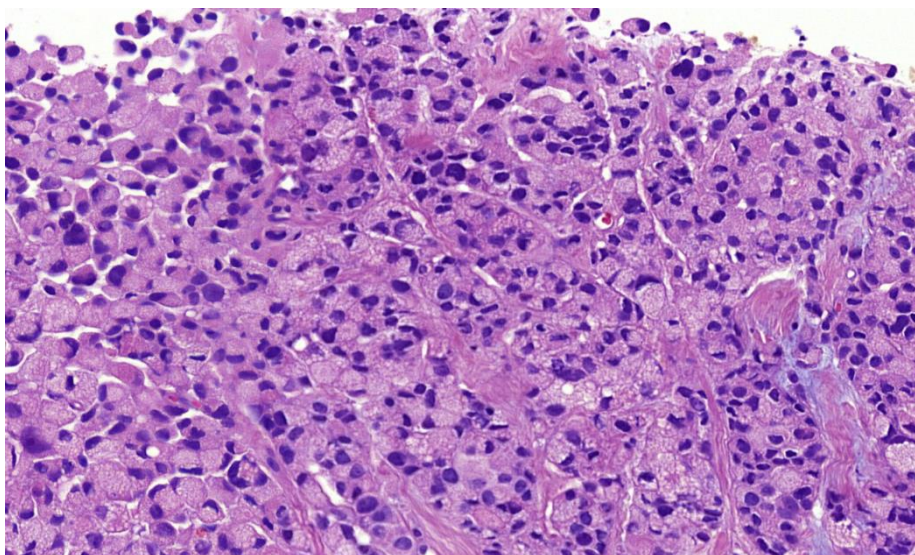
26. 2. 2019

Příloha 2: Duktální karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (20x)



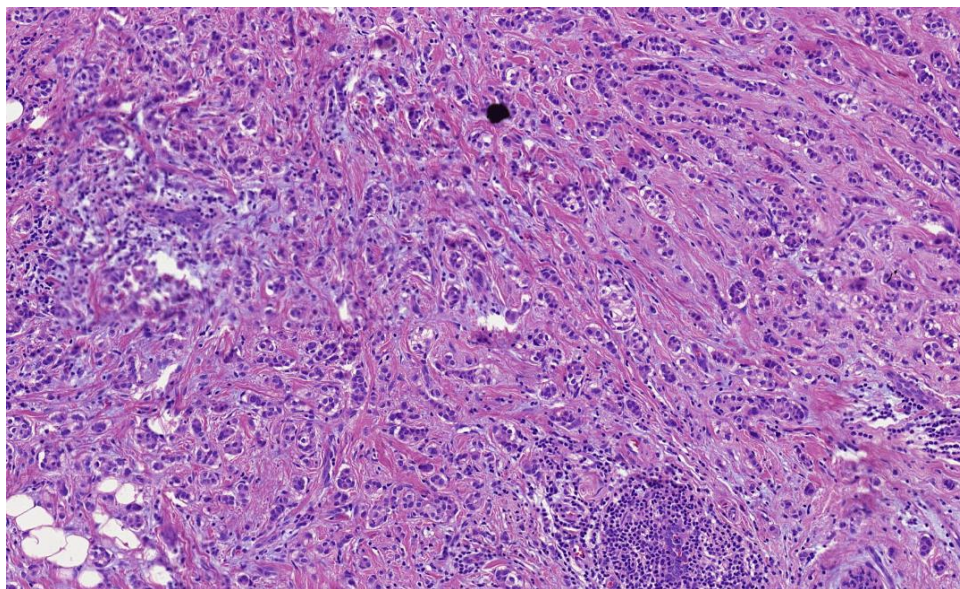
Zdroj: Autor

Příloha 3: Duktální karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (200x)



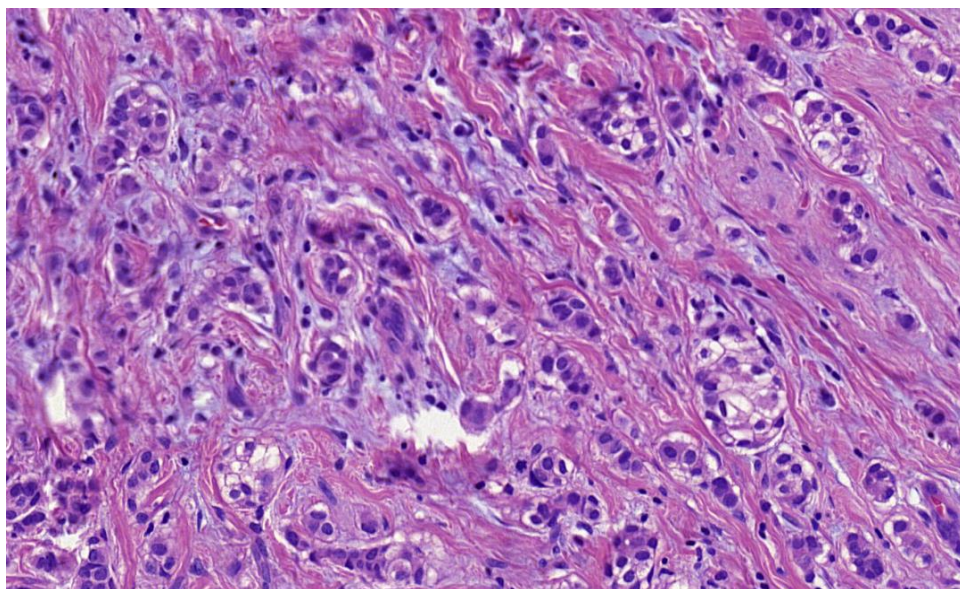
Zdroj: Autor

Příloha 4: Duktální karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (20x)



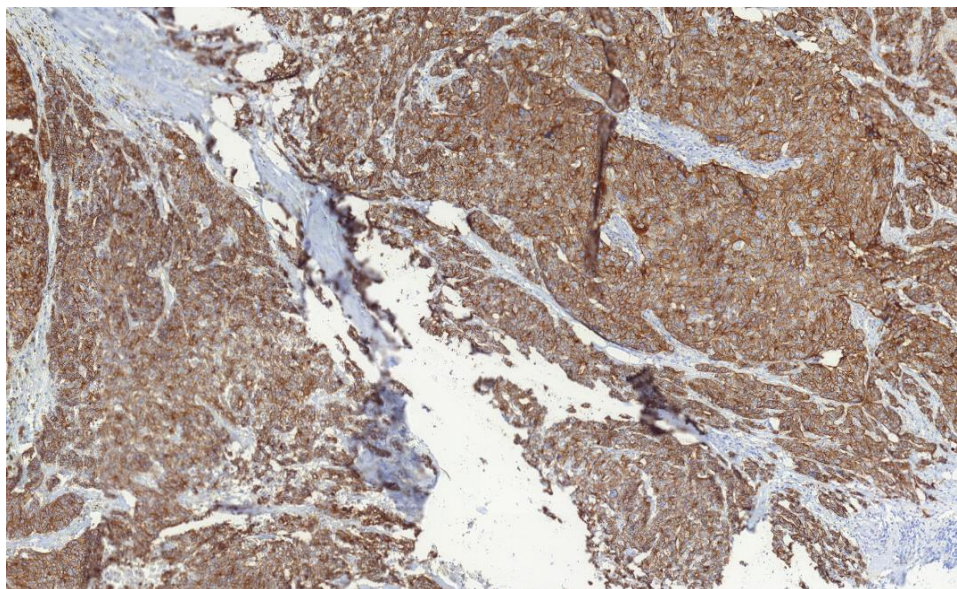
Zdroj: Autor

Příloha 5: Duktální karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (200x)



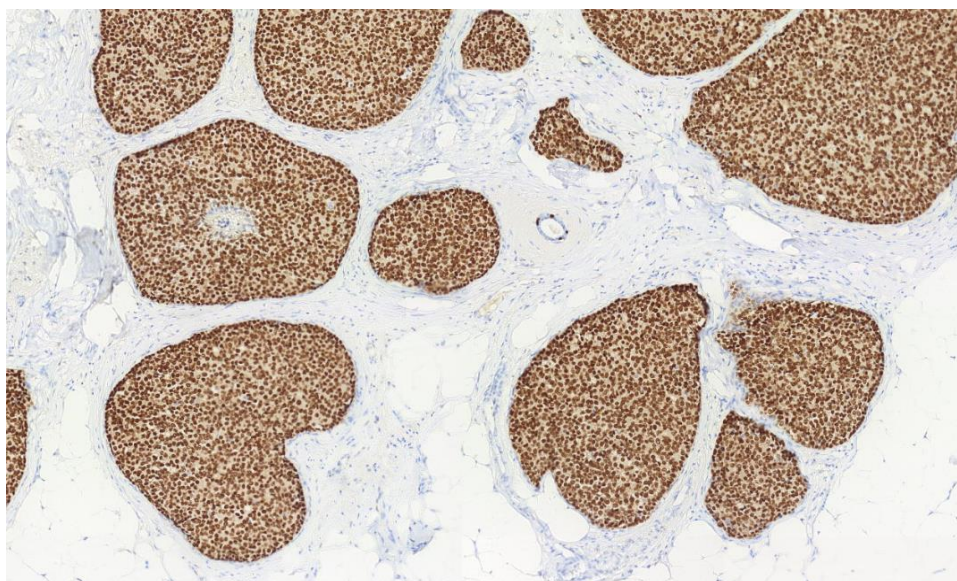
Zdroj: Autor

Příloha 6: DIC, E-cadherin pozitivní reakce (20x)



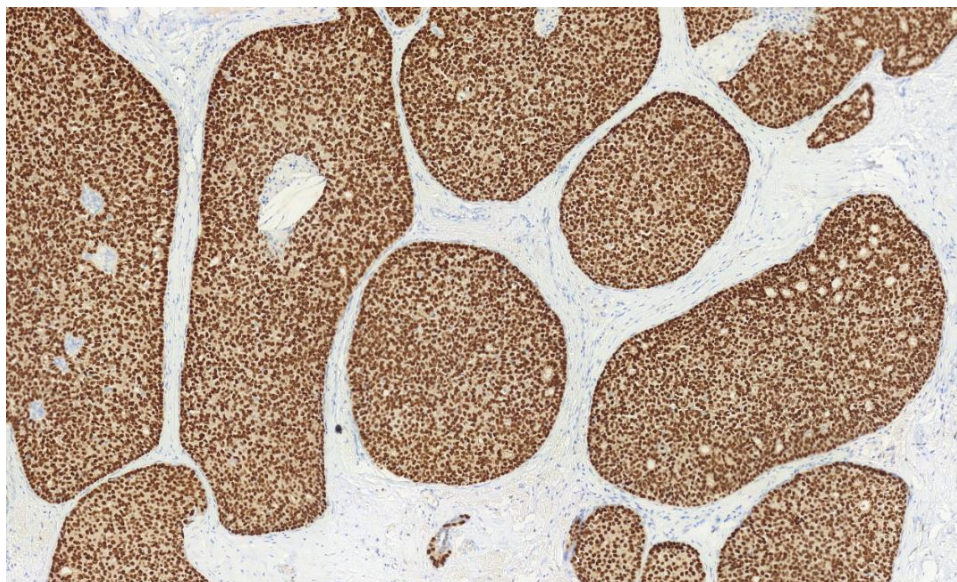
Zdroj: Autor

Příloha 7: DCIS, ER pozitivní reakce (100x)



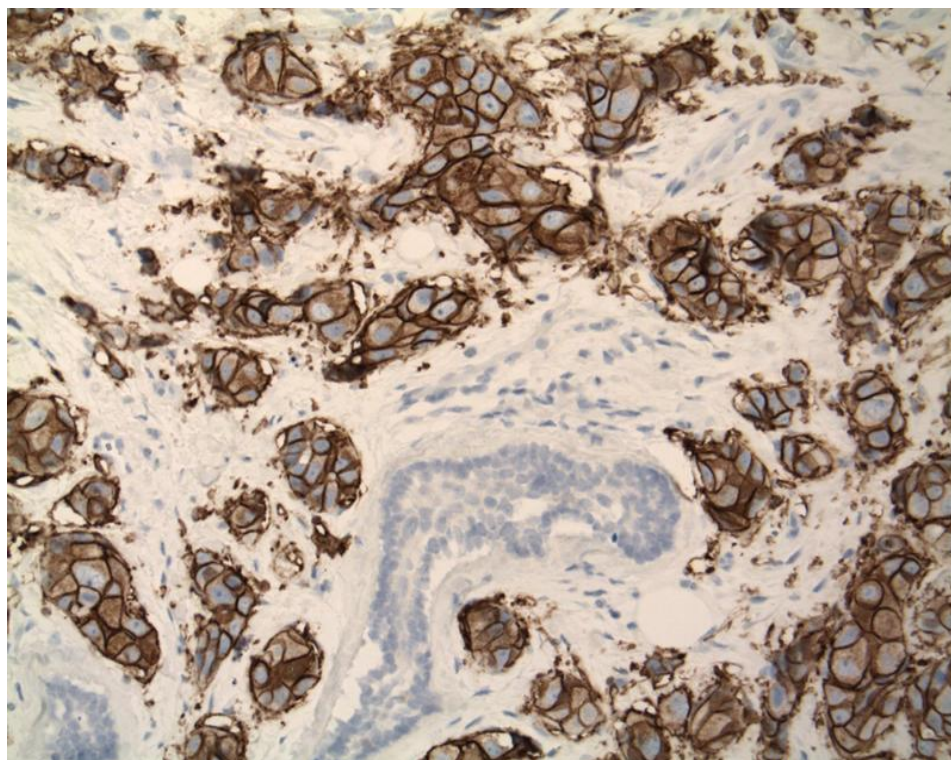
Zdroj: Autor

Příloha 8: DCIS, PR pozitivní reakce (10x)



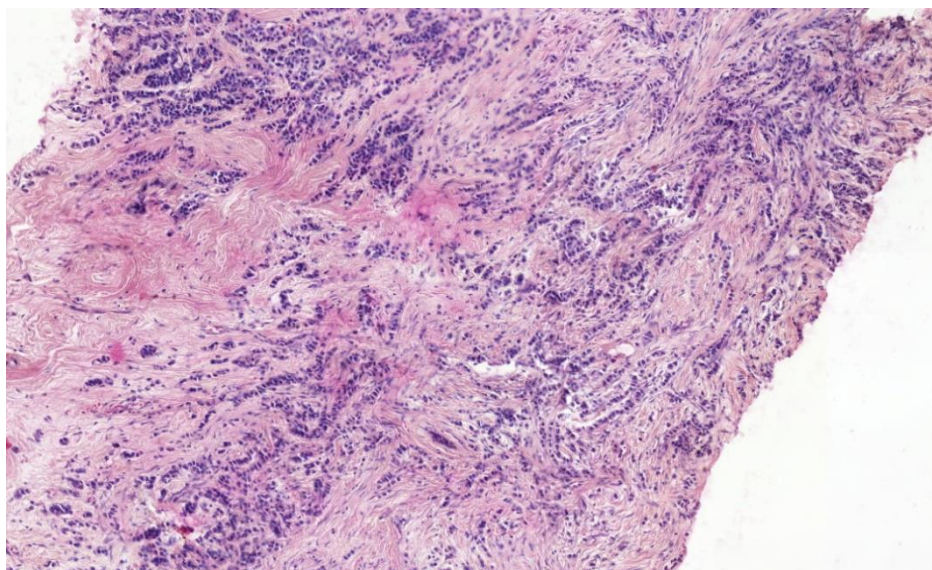
Zdroj: Autor

Příloha 9: Her 3+ pozitivní reakce (400x)



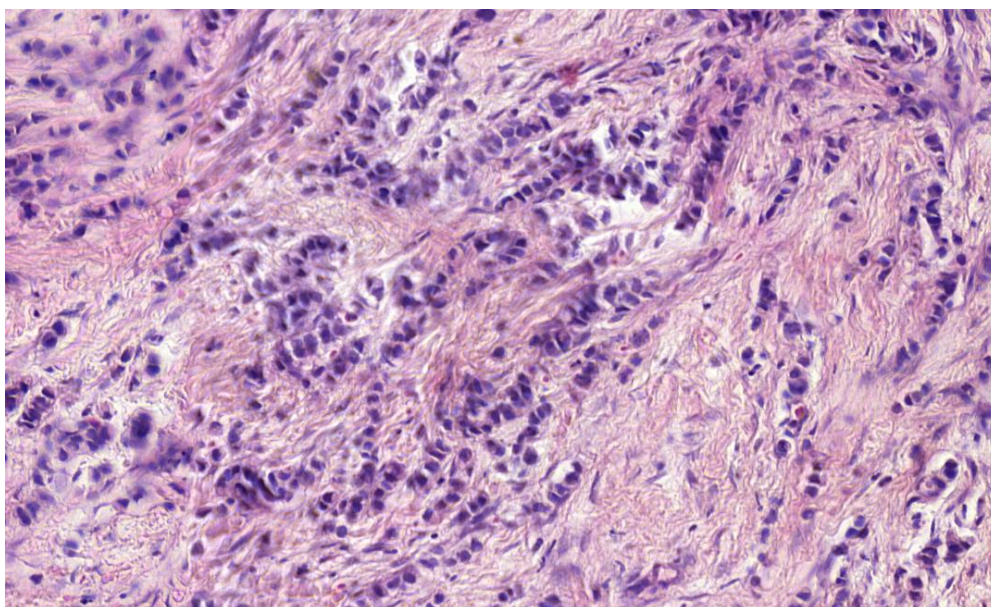
Zdroj: Autor

Příloha 10: Lobulární karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (20x)



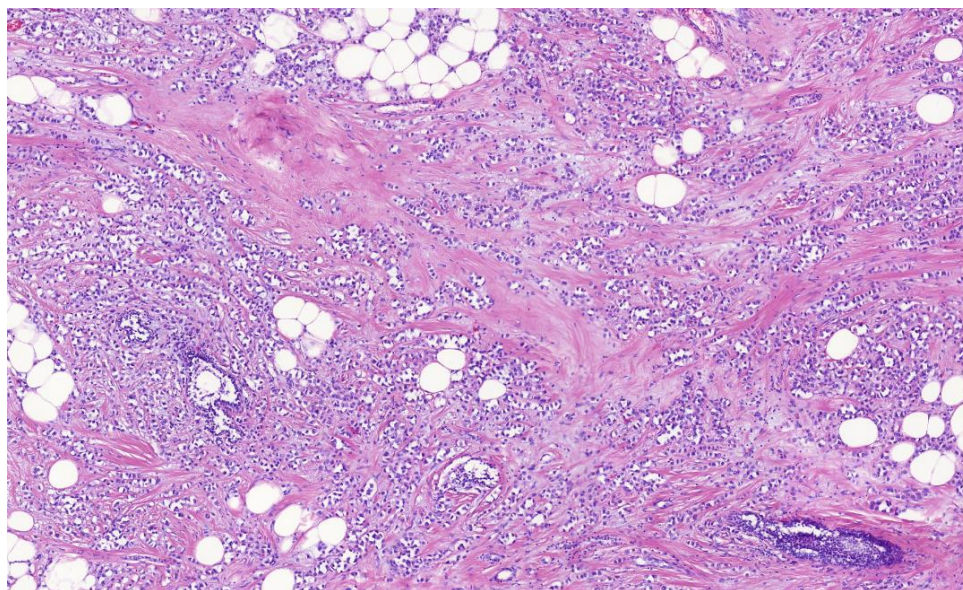
Zdroj: Autor

Příloha 11: Lobulární karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (200x)



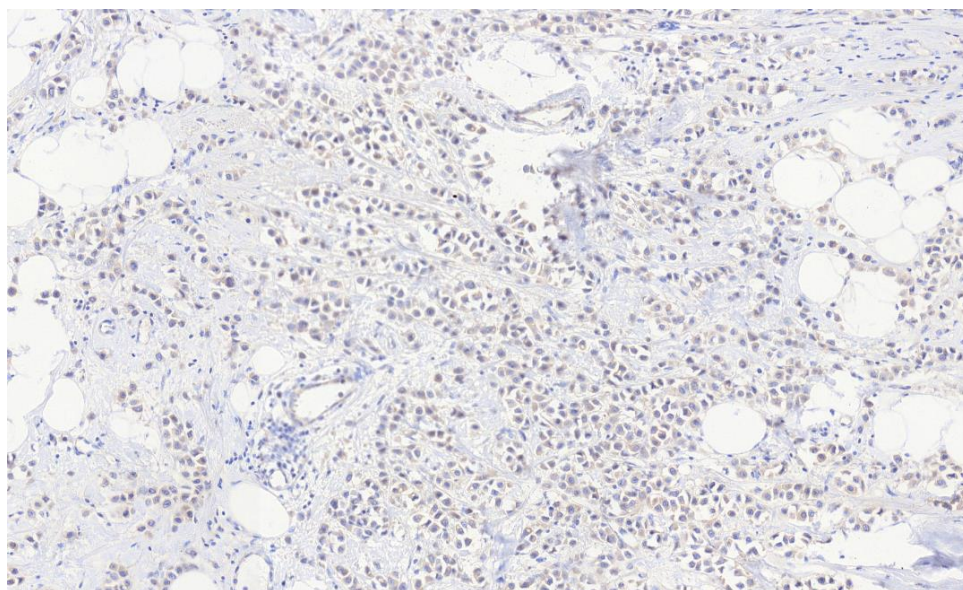
Zdroj: Autor

Příloha 12: Lobulární karcinom – Barvení Hematoxylin eosin (10x)



Zdroj: Autor

Příloha 13: Lobulární karcinom, PR – negativní reakce (20x)



Zdroj: Autor