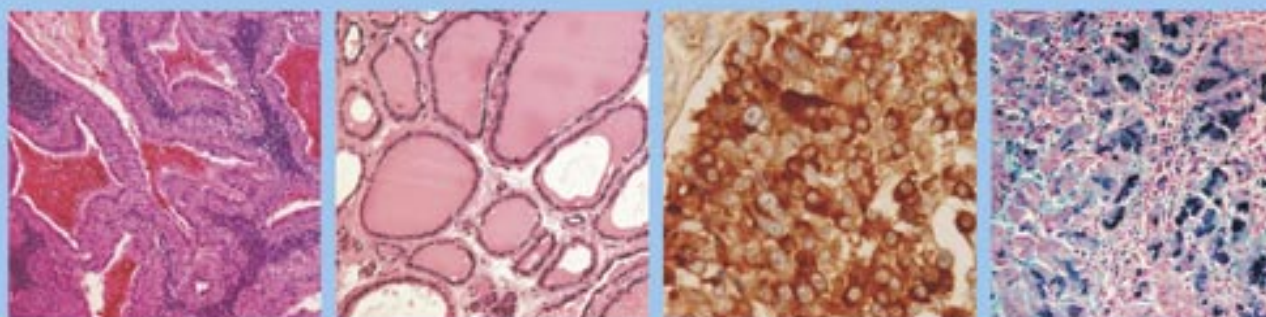


Histopatologický **ATLAS**



Svetlana Brychtová
Alice Hlobilková

Upozornění pro čtenáře a uživatele této knihy

Všechna práva vyhrazena. Žádná část této tištěné či elektronické knihy nesmí být reprodukována a šířena v papírové, elektronické či jiné podobě bez předchozího písemného souhlasu nakladatele. Neoprávněné užití této knihy bude **trestně stíháno**.

Používání elektronické verze knihy je umožněno jen osobě, která ji legálně nabyla a jen pro její osobní a vnitřní potřeby v rozsahu stanoveném autorským zákonem. Elektronická kniha je datový soubor, který lze užívat pouze v takové formě, v jaké jej lze stáhnout s portálu. Jakékoliv neoprávněné užití elektronické knihy nebo její části, spočívající např. v kopírování, úpravách, prodeji, pronajímání, půjčování, sdělování veřejnosti nebo jakémkoliv druhu obchodování nebo neobchodního šíření je zakázáno! Zejména je zakázána jakákoliv konverze datového souboru nebo extrakce části nebo celého textu, umísťování textu na servery, ze kterých je možno tento soubor dále stahovat, přitom není rozhodující, kdo takovéto sdílení umožnil. Je zakázáno sdělování údajů o uživatelském účtu jiným osobám, zasahování do technických prostředků, které chrání elektronickou knihu, případně omezují rozsah jejího užití. Uživatel také není oprávněn jakkoliv testovat, zkoušet či obcházet technické zabezpečení elektronické knihy.



Copyright © Grada Publishing, a.s.

Tato kniha vznikla díky sponzorským příspěvkům a spolupráci firem: Nikon, Bamed a Biotech.

Hlavní sponzor



Další sponzoři



HISTOPATOLOGICKÝ ATLAS

Autorky:

MUDr. Svetlana Brychtová, Ph.D., MUDr. Alice Hlobilková, Ph.D.

Ústav patologie, Laboratoř molekulární patologie, Biomedicínské centrum LF UP a BFÚ AV ČR

Recenzenti:

Prof. MUDr. Václav Mandys, CSc.

Prof. MUDr. Lukáš Plank, CSc.

Autorky děkují za připomínky prof. MUDr. Aleši Ryškoví, Ph.D., a MUDr. et RNDr. Tomáši Brychtovi, Ph.D.

Kniha je společným dílem obou autorek.

© Grada Publishing, a.s., 2008

Fotografie na obálce a v textu jsou z archivu autorek.

Cover Design © Grada Publishing, a.s., 2008

Vydala Grada Publishing, a.s.

U Průhonu 22, Praha 7

jako svou 3150. publikaci

Odpovědná redaktorka Mgr. Jitka Straková

Sazba a zlom Václav Juda

Počet stran 112

1. vydání, Praha 2008

Vytiskly Tiskárny Havlíčkův Brod, a.s.

Husova ulice 1881, Havlíčkův Brod

Tato publikace je určena pro odbornou zdravotnickou veřejnost a pracovníky ve zdravotnictví vybraných oborů.

Názvy produktů, firem apod. použité v knize mohou být ochrannými známkami nebo registrovanými ochrannými známkami příslušných vlastníků, což není zvláštním způsobem vyznačeno.

Postupy a příklady v této knize, rovněž tak informace o lécích, jejich formách, dávkování a aplikaci jsou sestaveny s nejlepším vědomím autorek. Z jejich praktického uplatnění ale nevyplyvají pro autorky ani pro nakladatelství žádné právní důsledky.

Všechna práva vyhrazena. Tato kniha ani její část nesmějí být žádným způsobem reprodukovány, ukládány či rozšiřovány bez písemného souhlasu nakladatelství.

ISBN 978-80-247-1650-3 (tištěná verze)

ISBN 978-80-247-6723-9 (elektronická verze ve formátu PDF)

© Grada Publishing, a.s. 2011

1 Úvod	7
2 Mikroskopická technika a její interpretace	8
2.1 Zpracování tkání a příprava histologických preparátů	8
2.2 Histologické barvení	9
2.3 Histochemické techniky pro průkaz enzymů	9
2.4 Imunohistochemie	9
2.5 Fluorescenční mikroskopie	9
2.6 Polarizační mikroskopie	9
2.7 Elektronová mikroskopie	9
2.8 Molekulární techniky	9
3 Kardiovaskulární systém	12
4 Respirační systém	22
5 Trávicí systém	34
6 Játra, žlučové cesty, pankreas	44
7 Pohlavní systém ženský	52
8 Mléčná žláza	62
9 Pohlavní systém mužský	66
10 Vylučovací systém	70
11 Endokrinní systém	76
12 Nervový systém	82
13 Hematopatologie, slezina	90
14 Kůže	96
15 Pohybový systém	104
Literatura	108
Rejstřík	110

Poděkování

Naše poděkování patří prof. MUDr. A. Ryškovi, Ph.D., za cenné konzultace a odborné připomínky k textové i obrazové části publikace a MUDr. et RNDr. T. Brychtovi, Ph.D., za odbornou konzultaci klinických nálezů. Náš dík patří také prof. MUDr. J. Mačákovi, CSc., a jeho kolegům z Ústavu patologie FN Brno, prof. MUDr. R. Kodůuskovi, DrSc., a prof. MUDr. J. Ehrmannovi, Ph.D., za poskytnutí některých histologických preparátů.

Za neocenitelnou pomoc při zpracování mikrofotografií a grafických úpravách publikace děkujeme Mgr. O. Bláhovi, Mgr. V. Lukášovi, Ing. I. Višcorovi, Ph.D., a L. Popové. Stěží si lze představit, že by práce mohla vzniknout bez přispění i dalších členů kolektivu Ústavu patologie v Olomouci, kterým děkujeme zejména za pomoc při vyhledávání a zpracování preparátů. Za vstřícnost a umožnění realizace knihy bychom chtěly rovněž poděkovat prof. MUDr. Z. Kolářovi, CSc.

Autorky

Tuto publikaci jsme koncipovaly jako výběr základních histopatologických diagnóz. Je určena zvláště studentům pregraduálních lékařských oborů a začínajícím lékařům v oborech patologická anatomie a soudní lékařství.

Naprostou většinu histologických obrazů tvoří tkáně fixované ve formolu a zpracované klasickou parafrínovou technikou, řezy jsou barveny hematoxylinem-eozinem. Pouze v některých případech jsme pro ilustraci doplnily i speciální barvení a imunohistochemickou detekci, bez kterých se rutinní praxe v současné době neobejde. Před souborem fotografií je zařazena krátká kapitola, která v základech seznamuje čtenáře s histopatologickými a mikroskopickými technikami, včetně metod molekulární patologie, které se v moderní diagnostice stále více uplatňují.

Doufáme, že barevné fotografie zachycující charakteristický histopatologický obraz onemocnění doplněné odborným komentářem napomohou lepší orientaci a přispějí k hlubšímu porozumění mikroskopických nálezů.

Mikroskopický obraz vzniká na zadní části objektivu ohybem světla strukturami v histologickém preparátu jako tzv. *primární obraz*. Zvětšením primárního obrazu okulárem získáme *sekundární obraz*. Výsledné zvětšení dostaneme násobením zvětšení okuláru a numerické apertury objektivu.

V běžné histologické praxi používáme okulár se zvětšením 10×, při použití tohoto okuláru získáme následující typy zvětšení:

- *přehledné*: objektiv se zvětšením 2,0–5,0×; celkové zvětšení 20–50×
- *malé*: objektiv se zvětšením 10–20×; celkové zvětšení 100–200×
- *velké*: objektiv se zvětšením 40×; celkové zvětšení 400×

Pokud potřebujeme zobrazit cytologické detaily, používáme imerzní objektiv se zvětšením 100×, celkové zvětšení bude tedy 1000×.

Abychom dosáhli kvalitního obrazu v mikroskopu, je nutné se zaměřit na několik faktorů, které musí být navzájem sladěny – světelný zdroj, systém čoček a oko. Artificiální světlo, většinou žluté nebo červené, se upravuje užitím modrého filtru. K regulaci světelného zdroje slouží kondenzor, jeho zvýšením nebo snížením získáme optimální a uniformní osvětlení sledovaného pole. Pro zlepšení kontrastu obrazu se používá clona.

Prvním krokem při vyšetření histologického preparátu je jeho prohlédnutí prostým okem. Získáme tak základní topografické informace o velikosti a rozložení vzorku; teprve potom použijeme mikroskop. Přehledné zvětšení nám ukáže základní přehled o strukturách tkání, malé zvětšení zobrazí tyto struktury ve větším detailu. Získáme tak ucelený obraz všech důležitých struktur, které se v lézi nacházejí. Je nesmírně důležité pečlivě a systematicky prohlédnout celý preparát. Prakticky všechny histopatologické změny mohou být diagnostikovány při malém zvětšení (20×). Toto zvětšení poskytne dostatečné informace o složení tkáně, velikosti a tvaru buněk, množství, vzhledu a barvě cytoplazmy, velikosti a uložení jader. Velké zvětšení pak umožní pozorovat jednotlivé detaily, jako jsou struktura cytoplazmy, rozložení jaderného chromatinu, mitózy atd., a pouze upřesňuje již získané informace z malého zvětšení.

Je důležité si uvědomit, že správnou histologickou diagnózu můžeme stanovit pouze tehdy, pokud zachováme správný postup mikroskopování. Získáme ji analýzou a syntézou pozorovaných změn – z tohoto důvodu je stěžejní všechny přítomné struktury a změny zaznamenat. Přehlédnutí i drobného detailu může vést k osudnému omylu, který by mohl pacienta významně poškodit. Studenti často

začínají mikroskopovat přímo ve větším zvětšení a hodnotí preparát jen na základě detailů. Vystavují se tak nebezpečí, že klíčová místa vůbec nezachytí, a jejich diagnóza pak bývá nesprávná.

Drobné technické poznámky pro začátky mikroskopování:

- Snažíme se pracovat s co možná nejnižší intenzitou světelného zdroje, předcházíme tak únavě a bolesti očí.
- Pokud máme rozmazaný obraz, který se nám nedaří zaostřit, preparát je pravděpodobně obrácen krycím sklem dolů.
- Černě lemované obrazce vznikají v důsledku vzduchových bublin, které se tvoří při vysychání preparátu.

2.1 Zpracování tkání a příprava histologických preparátů

Odebrané vzorky tkáně jsou pro standardní histopatologické zpracování nejčastěji fixovány ve formolu (4% formalin). Fixace tkáňových vzorků, při níž dochází ke koagulaci a denaturaci bílkovin, zabraňuje autolýze a bakteriálnímu rozkladu. Optimální doba fixace je do 24 hodin, je však závislá na velikosti tkáně. Doporučuje se, aby objem fixačního činidla byl nejméně 10× větší, než je objem fixovaného vzorku. Pro molekulární diagnostiku je fixace formolem nevhodná vzhledem k degradaci nukleových kyselin. Pro analýzu nukleových kyselin z tkáňových vzorků jsou vhodnější fixační činidla na bázi etanolu nebo je možné tkáň ihned po odběru zmrazit.

Po fixaci se větší tkáňové vzorky krájí do bločků, zpravidla o velikosti přibližně 2 × 0,5 cm. V autotechnikonu se odvodňují a prosycují parafínem a pak se při teplotě 60 °C zalijí do parafínových bločků. Parafín dokonale proniká do tkání, vzorky si zachovávají strukturu a mohou být skladovány a vyšetřovány i po létech. Z bločků se získají krájením pomocí mikrotomu histologické řezy o síle 5–8 µm, které se zachycují na podložní skla. Následuje odparafínování, zavodnění, barvení, odvodnění, zamontování do montovacího média (např. kanadského balzámu) a překrytí krycím sklem.

Další často užívanou metodou pro zpracování vzorku místo fixace formolem je zmrazování tkání, které se využívá například v peroperačních biopsiích a pro detekci přítomnosti tuků nebo enzymů. Výhodou je rychlost zpracování, nevýhodou je větší tloušťka řezu a méně kvalitní histologický obraz.

Kvalita preparátů závisí na šetrnosti odběru, rychlosti transportu do fixačního činidla nebo zmrazení

a technice zpracování. Poškozením tkání vznikají artefakty, které zhoršují kvalitu preparátu. Celá procedura je časově poměrně náročná. Lékař dostává preparáty k prvnímu hodnocení většinou až za 48 hodin po odběru. Aplikace dalších metod nezbytných pro diagnózu časový interval bioptického vyšetření dále prodlužuje.

2.2 Histologické barvení

Barviva používaná v histologii se dělí na *zásaditá* a *kyselá*. Kyselá barviva barví cytoplazmu, zásaditá jádra buněk. Podkladem odlišné barvitelnosti buněčných struktur jsou rozdílné fyzikálně-chemické vlastnosti, zvláště elektrostatické vazby.

Nejpoužívanější z kyselých barviv je eozin, nejpoužívanější ze zásaditých hematoxylin. Jejich kombinace představuje základní barvicí metodu hematoxylin-eozin. Pokud je třeba zvýraznit určité tkáňové struktury, preparáty se barví speciálními metodami. Jedná se vždy o kombinaci bazického barviva a jednoho nebo více kyselých barviv.

Základní přehledné a speciální barvicí metody jsou uvedeny v tabulce na konci kapitoly.

2.3 Histochemické techniky pro průkaz enzymů

Histochemické techniky jsou nejčastěji užívány k průkazu chloracetátesterázy, cholinesterázy, kyselé nebo alkalické fosfatázy a tyrozinázy.

2.4 Imunohistochemie

Jedná se o aplikaci imunologických metod, které využívají afinity specifické protilátky k určitému antigenu.

U *přímých metod* se pro detekci antigenu buď aplikuje primární protilátka značená např. enzymem, který po reakci se speciálním substrátem vyvolá barevnou změnu, nebo je primární protilátka přímo konjugována s fluoroforem (fluorescenční barvou).

Citlivější jsou pak *metody nepřímé*, používající druhý krok. Při těchto dvoustupňových metodách se na neznačenou primární protilátku naváže sekundární protilátka s enzymem nebo fluoroforem. Používá se i třístupňová nepřímá metoda, založená na afinitě mezi avidinem/streptavidinem a biotinem. Na primární protilátku se naváže sekundární konjugovaná protilátka s biotinem. Třetím stupněm je vytvoření komplexu avidin-biotin-enzym (např. peroxidáza), který se

v dalším kroku vizualizuje. Druhým a třetím krokem se signál výrazně zesiluje.

2.5 Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční techniky využívají vlastnosti některých molekul – fluoroforů – absorbovat světlo určité vlnové délky a emitovat záření větší vlnové délky.

Při použití fluoroforů pro studium tkání a buněk je jejich záření pozorováno pomocí fluorescenčního mikroskopu vybaveného rtuťovou výbojkou a sestavou vhodných filtrů. Některé fluorofory se specificky vážou na jednotlivé komponenty v buňce (např. DAPI na DNA).

Další aplikací fluorescenční mikroskopie je použití vysoce citlivého fluoroforu v kombinaci se specifickou primární protilátkou – *imunofluorescence*. Výhodou tohoto spojení je vysoká citlivost a možnost pozorovat zároveň několik znaků pomocí fluoroforů s rozdílnou emisí.

2.6 Polarizační mikroskopie

Polarizační mikroskopie je založena na vlastnosti opticky aktivních materiálů stáčet rovinu polarizovaného světla, které vzniká průchodem přes polarizační filtr světelného mikroskopu. Nejčastěji se používá pro průkaz krystalizujících látek (např. oxidu křemičitého nebo šavelanu), rovněž je specifická pro průkaz amyloidu, který se projeví zelenou birefringencí.

2.7 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie slouží především ke studiu ultrastruktury buněk. Své místo stále nachází zejména v diagnostice metabolických onemocnění, glomerulonefritid a popřípadě i k typizaci nádorů.

2.8 Molekulární techniky

Molekulární techniky se v patologii využívají zejména pro analýzu změn na úrovni nukleových kyselin. Uplatnění nacházejí především *polymerázová řetězová reakce (PCR)*, *in situ hybridizace (ISH)*, *fluorescenční in situ hybridizace (FISH)*, *mutační analýza a sekvenování*.

Uvedené metody se využívají k upřesnění mikroskopické diagnózy a mohou být podkladem pro stanovení terapie, predikci rizika vzniku onemocnění nebo jeho recidivy. V moderní patologii se stále více uplatňují a v budoucnu si práci bez nich lze jen obtížně představit.

Tabulka Základní přehledné a speciální barvicí metody

Typ barvení	Prokazovaný objekt (buněčná struktura, anorganická, organická látka, patogenní organismus)	Výsledné zbarvení
alciánová modř	kyselé mukopolysacharidy	modrozelená
berlínská modř (Pearlsova reakce)	železo	modrá
Grocott	houby, paraziti	černá
rezorcin-fuchsin	elastická vlákna	modročerná
	jádra	červená
Fontana-Masson	melanin	černá
Giemsa	jádra, bazofilní látky	modrá
	eozinofily, cytoplazma, kolagen	červená
Gomori	retikulární vlákna, bazální membrány	černá
Gram	bakterie Gram +	modrá
	bakterie Gram –	červená
Hale-Müller	kyselé mukopolysacharidy	modrozelená
hematoxylin-eozin (HE) základní barvení	jádra, bazofilní materiál, bakterie a kalcium	modrá
	cytoplazma, pojivové tkáně	červená
konžská červeň (Kongo)	amyloid	červená
metazolová modř	myelin	červenofialová
orcein	elastická vlákna, cytoplazmatické inkluze porvrchového antigenu hepatitidy B	hnědočervená
PAS (Periodic Acid Schiff)	glykogen, neutrální mukopolysacharidy, houby, paraziti, bazální membrány	růžovofialová
Sudan III	neutrální tuky	červená
trichrom Massonův	kolagen	zelená
	svalovina	červená
van Gieson	cytoplazma, svalovina, amyloid, fibrin, fibrinoid	žlutá
	pojivová tkáň, hyalin	červená
von Kossa	kalcium	černá
Weigert	jádra	červená
	fibrin, bakterie	modrá
Ziehl-Neelsen	acidorezistentní tyčky	červená
	jádra	modrá

