

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI  
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2020**

**Veronika Hnojská**

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví (B5345)

**Veronika Hnojská**

Studijní obor: Zdravotní laborant (5345R020)

**IMUNOHISTOCHEMICKÉ MARKERY V DIFERENCIÁLNÍ  
DIAGNOSTICE NÁDORŮ HLAVY A KRKU**

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: MUDr. Martina Baněčková

PLZEŇ 2020

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

Fakulta zdravotnických studií

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Veronika HNOJSKÁ**  
Osobní číslo: **Z17B0084P**  
Studijní program: **B5345 Specializace ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Imunohistochemické markery v diferenciální diagnostice nádorů hlavy a krku**  
Zadávací katedra: **Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví**

### Zásady pro vypracování

- Zpracovat seznam odborné literatury na vybrané téma
- Stanovit cíl kvalifikační práce
- Zpracovat teoretickou a praktickou část práce dle požadavků FZS
- Popsat metodiku praktické části
- Vypracovat diskuzi a závěr kvalifikační práce
- Dodržet formální úpravu kvalifikační práce dle požadavků FZS
- Dodržet citační normu



Rozsah bakalářské práce:  
Rozsah grafických prací:  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

- ŠTEINER, Ivo a POVÝŠIL, Ctibor. Speciální Patologie. Druhé doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-494-2.
- POVÝŠIL, Ctibor a ŠTEINER, Ivo. Obecná Patologie. Praha: Galén, 2011. ISBN 978-80-7262-773-8.
- SLOUKA, David. Otorinolaryngologie. Praha: Galén, 2018. ISBN 9788074923913.
- GOMOLČÁK, Pavol. Základy imunohistochemie v patologii. Brno, Česká Republika: DVPZ, 1997. ISBN 978-80-7013-239.
- HELLIQUIST, Henrik a SKALOVA, Alena. Histopathology of the Salivary Glands. Berlin Heidelberg: Springer, 2014. ISBN 9783540469155.
- ELLIS, Gary L. a L. AUCLAIR, Paul. Tumors of the Salivary Glands: AFIP Atlas of Tumor Pathology: Series 4. United states: Amer Registry of Pathology, 2009. ISBN 978-1881041023.

Vedoucí bakalářské práce: **MUDr. Martina Baněčková**  
Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Datum zadání bakalářské práce: **18. června 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce: **31. března 2020**



**PhDr. Lukáš Štich**  
děkan



**Mgr. Stanislava Reichertová**  
vedoucí katedry

V Plzni dne 31. ledna 2020

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně a všechny použité prameny jsem uvedl/a v seznamu použitých zdrojů.

V Plzni dne 29. 4. 2020

.....

vlastnoruční podpis

## **Abstrakt**

Příjmení a jméno: Veronika Hnojská

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Imunohistochemické markery v diferenciální diagnostice nádorů hlavy a krku

Vedoucí práce: MUDr. Martina Baněčková

Počet stran – číslované: 47

Počet stran – nečíslované: 20

Počet příloh: 0

Počet titulů použité literatury: 36

Klíčová slova: Imunohistochemie, imunohistochemické markery, nádory hlavy a krku, SOX10, GATA3, MYB, HMGA2

### **Souhrn:**

Tato práce se skládá z teoretické části, která se zabývá imunohistochemií, jejím principem a metodami, dále imunohistochemickými markery, jejich definicí a zaměřením na markery využívajícími se u nádorů hlavy a krku. Teoretickou část tvoří také popis jednotlivých typů nádorů hlavy a krku. Část praktická je zaměřená na aplikaci imunohistochemických markerů, popisem imunohistochemického barvení u vybraných typů nádorů a procentuálním zhodnocením pozitivitu a negativitu imunohistochemie, které přiblíží původ daného nádoru.

## **Abstract**

Surname and name: Hnojská Veronika

Department: Department of rescue services, diagnostic fields and public health

Title of thesis: Expression of the immunohistochemical markers in the differential diagnosis of head and neck tumors

Consultant: MUDr. Martina Baněčková

Number of pages – numbered: 47

Number of pages – unnumbered: 20

Number of appendices: 0

Number of literature items used: 36

Keywords: Immunohistochemistry, immunohistochemistry markers, head and neck tumors, SOX10, GATA3, MYB, HMGA2

### Summary:

The current bachelor thesis consists of the theory section and method section. The theory section summarizes data from immunohistochemistry, its principles, and methods, and provides main information about head and neck tumors. The method section applies the immunohistochemical markers in the praxis of the head and neck tumor investigation, particularly focusing on their origin and clarification of the final diagnosis.

## **Předmluva**

Práce byla napsána z důvodu přiblížení imunohistochemie jako moderní metody při diagnostice nádorových onemocnění a využití vybraných imunohistochemických markerů u nádorů hlavy a krku.

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat MUDr. Martině Baněčkové za odborné vedení práce, poskytnutí cenných rad, materiálu, trpělivost a vstřícnost, dále děkuji rodině a přátelům za psychickou podporu.



# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ .....	12
SEZNAM TABULEK .....	13
SEZNAM ZKRATEK .....	14
ÚVOD.....	16
TEORETICKÁ ČÁST .....	17
1 IMUNOHISTOCHEMIE.....	17
1.1 Historie imunohistochemie .....	17
1.2 Imunohistochemické metody .....	18
1.2.1 Metody přímé .....	18
1.2.2 Metody nepřímé.....	19
1.2.3 Technika enzym-bridge .....	19
1.2.4 Peroxidázová-antiperoxidázová metoda.....	19
1.2.5 Metoda avidin-biotinového komplexu.....	20
1.3 Protilátky.....	20
1.3.1 Polyklonální protilátky .....	21
1.3.2 Monoklonální protilátky .....	21
1.4 Antigeny.....	22
1.5 Metody podobné imunohistochemii .....	23
1.5.1 In situ hybridizace .....	23
2 NÁDOROVÉ MARKERY .....	24
2.1 Diagnostická role .....	24
2.2 Značení protilátek (markerů) .....	25
2.2.1 Značení enzymem.....	25
2.2.2 Značení fluorochromem .....	25
2.2.3 Značení radioizotopem .....	25
3 IMUNOHISTOCHEMICKÉ MARKERY V DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTICE NÁDORŮ HLAVY A KRKU .....	26
3.1 SOX10 .....	26
3.2 GATA3 .....	27
3.3 MYB .....	28
3.4 HMGA2 .....	28
4 NÁDORY HLAVY A KRKU .....	30
4.1 Patologie slinných žláz .....	30
4.2 Benigní nádory.....	31
4.2.1 Pleomorfní adenom .....	31
4.2.2 Myoepiteliom .....	32

4.2.3	Bazocelulární adenom .....	32
4.2.4	Warthinův tumor .....	33
4.2.5	Onkocytom .....	33
4.3	Maligní nádory.....	34
4.3.1	Acinický karcinom .....	34
4.3.2	Mukoepidermoidní karcinom .....	34
4.3.3	Adenoidně cystický karcinom .....	35
4.3.4	Polymorfní adenokarcinom a kribriformní adenokarcinom .....	36
4.3.5	Epiteliálně-myoepiteliální karcinom .....	36
4.3.6	Světlobuněčný karcinom .....	37
4.3.7	Salivární duktální karcinom .....	37
4.3.8	Myoepiteliální karcinom.....	38
4.3.9	Sekreční karcinom mamárního typu.....	38
4.3.10	Bazocelulární karcinom.....	38
4.3.11	Karcinom ex pleomorfní adenom.....	39
	PRAKTICKÁ ČÁST .....	40
5	CÍLE .....	40
6	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY .....	40
7	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	40
8	METODIKA .....	40
8.1	Zpracování tkáně.....	41
8.2	Obecná fixace materiálu .....	41
8.3	Fixace pro imunohistochemické metody .....	42
8.4	Optimalizace prezentace antigenů .....	42
8.5	Blokace endogenní aktivit enzymů.....	43
8.6	Krájení histologických řezů .....	44
8.7	Kontrola výsledků.....	44
8.8	Barvení hematoxylin-eosin .....	45
8.8.1	Eosin .....	45
8.8.2	Hematoxylin .....	45
8.9	Protilátky použité při imunohistochemii.....	46
8.10	SOX10.....	47
8.11	GATA3.....	48
8.12	MYB.....	49
8.13	HMGA2.....	50
9	VÝSLEDKY IMUNOHISTOCHEMIE U NÁDORŮ HLAVY A KRKU .....	51
9.1	Benigní nádory.....	51

9.2 Maligní nádory.....	53
10 DISKUZE .....	58
ZÁVĚR.....	61
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	63

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma přímé metody.....	18
Obrázek 2 Schéma nepřímé metody .....	19
Obrázek 3 Vnější pozitivní kontrola u tkáně .....	44
Obrázek 4 Barvení HE v acinickém karcinomu .....	46
Obrázek 5 Jaderná pozitivita SOX10 v acinickém karcinomu.....	48
Obrázek 6 Jaderná pozitivita GATA3 v sekrečním karcinomu.....	49
Obrázek 7 Jaderná pozitivita MYB v High-grade adenoidně cystickém karcinomu .....	50
Obrázek 8 Jaderná pozitivita HMGA2 v pleomorfním adenomu.....	50
Obrázek 9 IHC v pleomorfním adenomu .....	52
Obrázek 10 IHC v myoepiteliomu.....	52
Obrázek 11 IHC v adenoidně cystickém karcinomu .....	54
Obrázek 12 IHC v epiteliálně-myoepiteliálním karcinomu .....	55
Obrázek 13 IHC v sekrečním karcinomu mamárního typu .....	56
Obrázek 14 IHC v karcinomu ex pleomorfním adenomu .....	57
Obrázek 15 Schéma exprese markeru SOX10 v jednotlivých komponentách slinné žlázy	61

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka č. 1 Protilátky použité při studii.....	46
Tabulka č. 2 Výsledky IHC u benigní nádorů.....	51
Tabulka č. 3 Výsledky IHC u maligních nádorů.....	53

## **SEZNAM ZKRATEK**

Ab .....	Protilátka
ABC .....	Avidin-biotin
AciK .....	Acinický karcinom
AdK .....	Adenoidně cystický karcinom
Ag .....	Antigen
APAAP .....	Alkalická fosfatáza anti-alkalická fosfatáza
BA.....	Bazocelulární adenom
BK.....	Bazocelulární karcinom
B-SA.....	Biotin-streptavidin
DAB.....	Diaminobenzidin tetrahydrochlorid
EBV .....	Virus Epstein-Barr
ELISA.....	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMK .....	Epiteliálně-myoepiteliální karcinom
FFPE.....	Formalinem-fixované v parafínu zalité
FISH .....	Fluorescenčně in situ hybridizace
HMGA.....	High-mobility group AT-hook
HMG.....	High mobility group
HPV .....	Lidský papilomavirus
Ig .....	Imunoglobulin
IHC .....	Imunohistochemie
KA .....	Kribriformní adenokarcinom

Ka ex PA..... Karcinom ex pleomorfni adenom  
ME ..... Myoepiteliom  
MEK ..... Mukoepidermoidni karcinom  
MK..... Myoepiteliální karcinom  
OC..... Onkocytom  
PA..... Pleomorfni adenom  
PAK ..... Polymorfni adenokarcinom  
PAP..... Peroxidáza-antiperoxidáza  
SBK ..... Světlobuněčný karcinom  
SDK ..... Salivární duktální karcinom  
SK..... Sekreční karcinom  
SOX ..... SRY-related HMG-box  
TF ..... Transkripční faktor  
WT ..... Warthinův tumor

## ÚVOD

Imunohistochemie je v dnešní době velmi používanou metodou v případě, kdy není možné získat dostatek informací pomocí klasického histologického barvení hematoxylin-eosin. Tato metoda využívá vazby antigen-protilátka s její následnou vizualizací a napomáhá k určení podtypu rakoviny, typu nádorové buňky a původu těchto buněk v metastázách.

Nádory hlavy a krku mají pestré dělení. Jednou z lokalit, se samostatnou WHO klasifikací, je i oblast slinných žláz. Chirurgická terapie nádorů slinných žláz (benigních nebo maligních) je limitována do značné míry prostorem, kdy některé z lézí nelze dostatečně radikálně odstranit, zejména kvůli blízkosti důležitých orgánových a nervově-cévních struktur a jejich narušení by mohlo mít negativní následky pro pacienta. Maligní onemocnění mohou být výsledkem somatické změny genu, ztrátou funkce v nádorových supresorových genech, nebo aktivační mutací v proto-onkogenech.

Nádory slinných žláz jsou relativně vzácnými, morfologicky variabilními a heterogenními tumory. Mnohé histologické rysy jsou sdílené různými jednotkami, a proto mohou činit diferenciálně diagnostické rozpaky. Z tohoto důvodu jsou v diagnostickém přístupu využívány imunohistochemické markery, které rozpoznávají histogenetický původ jednotlivých nádorů, a to optimálně v kontextu molekulárně–genetického vyšetření, pokud je dostupné.

Marker je molekula v krvi, jiných tělních tekutinách nebo tkáních a slouží jako ukazatel normálního nebo abnormálního procesu. Každý typ buňky má svůj unikátní molekulární "podpis", který lze označit jako marker a vypovídá o aktivitě a úrovni buňky (schopnost genů a proteinů splňovat jejich funkce). Markery mají široké klinické využití v onkologii, například sledování průběhu nádorového onemocnění (follow-up), kontrola efektu terapie, prognóza nádorového onemocnění a nebo při podezření na nádorové onemocnění neznámého původu. Jinou variantou markeru je marker imunohistochemický, který se uchycuje na povrchu vyšetřované tkáně pomocí vazby protilátka-antigen a tím může být nápomocný v případě detekce histogenetického původu nádorové buňky. U vybraných nádorů hlavy a krku lze využít markery SOX10, GATA3, MYB a HMGA2.



# TEORETICKÁ ČÁST

## 1 IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemie (IHC), nebo také imunocytochemie, je metoda umožňující znázornit lokalizaci specifických antigenů ve tkáních nebo buňkách za pomoci reakce antigen-protilátka. (1)

Imunohistochemické metody využívají protilátky označené fluoresceinem (imunofluorescence) nebo enzymy (imunoperoxidáza) k prokázání proteinů (bílkovin) a dalších molekul v buňkách. V rámci diagnostiky jsou velmi rozšířené imunoperoxidázové metody, které jsou využívány k získání doplňujících informací o tkáních, které není možné zajistit základním histologickým barvením hematoxylin a eosin, světelným mikroskopem nebo elektronovou mikroskopií. Výhodou je identifikace molekul v buňce in-situ. Imunohistochemie je dnes používána v chirurgické patologii k určení typu rakovinné buňky, podtypu rakoviny a možnému určení původu buňky v metastázách neznámého původu. (2)

### 1.1 Historie imunohistochemie

Imunohistochemie má více než 70-ti letou historii, kdy Coons vyvinul imunofluorescenční techniku k detekci odpovídajících antigenů tkání odebrané metodou zmrazených řezů. Avšak uplatnění v chirurgické patologii našla IHC až od 90. let 20. století. Postupný vývoj a zdokonalování technologií vedly k následnému rozšíření uplatnění IHC, pokračující až do dnešní doby. Enzymatické značení křenovou peroxidázou umožnilo vizualizaci označené protilátky světelným mikroskopem v přítomnosti vhodného barevného substrátového systému. (1)

Na Oxfordské univerzitě Taylor a Burns (1) vyvinuli první úspěšnou ukázkou antigenu v rutinně zpracované formalinem-fixované v parafínu zalité (FFPE) tkáni. Problémem v prvotních fázích vývoje imunoperoxidázové techniky byla snaha dosáhnout větší citlivosti, která by usnadnila barvení FFPE tkání. Metody se vyvíjely z jednoduchého jedнокrokového a přímého konjugátu k vícekrokové detekční technice, jako peroxidáza-antiperoxidáza (PAP), konjugát avidin-biotin (ABC) a biotin-streptavidin (B-SA). Tento vývoj vedl k navýšení počtu imunohistochemických metod. (1)

## 1.2 Imunohistochemické metody

Protilátky nemohou být viděny pod světelným či elektronovým mikroskopem, pokud nejsou označeny metodou umožňující jejich vizualizaci. Existuje široké spektrum látek, které mohou být použity ke značení tkání jako, například fluorescein nebo enzym. (1)

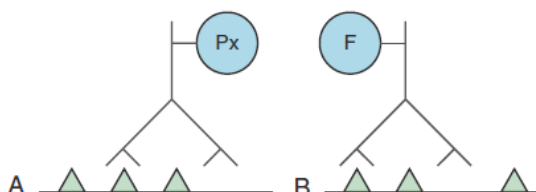
Mezi nejpoužívanější enzymy řadíme křenovou peroxidázu, alkalickou fosfatázu a případně také glukózooxidázu. V přítomnosti peroxidu vodíku mění enzymy barvu vhodného chromogenu, který slouží k vizualizaci antigenu, samotná vazba antigen-protilátka žádnou barevnou reakci nevyvolává. (3)

### 1.2.1 Metody přímé

V imunohistologii se velice často používá metoda značení protilátky pomocí chemických prostředků a poté přímého použití takto značeného konjugátu na vybraný vzorek tkáně. Cílem je vazba maximálního počtu molekul značky ke každé molekule protilátky. Je žádoucí, aby došlo k označení všech molekul protilátky (100 %) tak, aby žádná z nich nezůstala imunologicky inaktivní. Finální značená reagensie by neměla obsahovat volné molekuly neoznačené protilátky. (1)

Výhodou přímé metody je rychlost a jednoduchost. Čistota (monospecificita) primární protilátky nebo antiséra (polyklonální protilátka) je jednou z podmínek úspěchu. Problémem u antiséra je, že kromě konkrétní protilátky s požadovanou specificitou navíc obsahuje molekuly protilátky odlišné specificity, které mohou být v procesu konjugace též označené, mohou obarvit tkáň a tím dojde k chybné interpretaci výsledku. Praktickou nevýhodou je nezbytnost konjugovat každou primární protilátku samostatně, aby bylo možné detekovat rozdílné antigeny. Primární protilátka musí být použita v poměrně vysoké koncentraci, na rozdíl od nepřímé metody. (1)

**Obrázek 1 Schéma přímé metody**

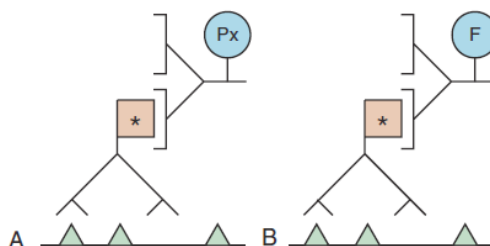


Zdroj: (35)

### 1.2.2 Metody nepřímé

Nepřímá, nebo také sendvičová, konjugační metoda je sice komplikovanější modifikací metody přímé, ale vyznačuje se větším množstvím výhod, protože jedna konjugovaná protilátka může být použita s několika rozdílnými primárními protilátkami. Primární protilátka může být méně koncentrovaná, v porovnání s protilátkou využívanou při přímé metodě. Značí se pouze sekundární protilátka, která je zaměřena proti imunoglobulinu toho druhu, ze kterého je odvozena primární protilátka. Tato metoda se dá využít k dalším kontrolám specifity tím, že primární specifická protilátka může být vynechána, nebo jiná protilátka s irelevantní specificitou může být nahrazena, což umožňuje cenné zhodnocení platnosti jakéhokoliv pozorovaného vzoru barvení. Všechny metody vedoucí k značení protilátky nepřímou technikou jsou v principu podobné. Primární (neoznačená) protilátka, specifická proti hledanému antigenu, je přidána ke vzorku a její přebytek je vymyt, následně se přidá označená sekundární protilátka, která je specifická proti antigenní determinantě primární protilátky. (1).

#### Obrázek 2 Schéma nepřímé metody



Zdroj: (35)

### 1.2.3 Technika enzym-bridge

Nevýhodám chemického procesu konjugace lze předejít metodou enzym-bridge, která byla vyvinuta Masonen a spol. (1) Jedná se o metodu, kdy označená část je spojena s antigenem pomocí imunologického spojení. Tato metoda není příliš využívanou, ale má význam především ve výzkumu, kde je chemická konjugace nežádoucí. (1)

### 1.2.4 Peroxidázová-antiperoxidázová metoda

Ke dvoustupňovým nepřímým metodám, které se vyhýbají problému spojených s chemickou konjugací, patří peroxidázová-antiperoxidázová metoda. Zde se používá

komplex skládající se ze tří molekul peroxidázy a dvou králičích protilátek proti peroxidáze. Celý tento komplex je vázán na primární protilátku, na kterou se dále váže sekundární protilátka. Primární protilátka je králičí, zaměřena proti lidským antigenům, sekundární protilátka bývá prasečí, zaměřena proti primární (králičí) protilátce. (4)

Při nahrazení peroxidázy alkalickou fosfatázou získáme metodu alkalická fosfatáza-anti-alkalická fosfatáza (APAAP). Tato metoda je vhodná pro vyšetřování preparátů, kde je vysoká endogenní peroxidáza a nelze tak spolehlivě zaručit její úplnou inaktivaci. (3)

Podobnou metodou je systém DAKO Envision. Na polymerový nosič jsou navázány molekuly enzymu (křenová peroxidáza) a sekundární protilátky. Polymer se spojí přes sekundární protilátku s primární, která je navázána na tkáňový antigen. (4)

### **1.2.5 Metoda avidin-biotinového komplexu**

Nepřímá trojstupňová metoda ABC využívá k průkazu protilátek vysokou vazební afinitu mezi avidinem a biotinem. Na specifickou primární protilátku se naváže sekundární protilátka konjugovaná s biotinem. Dalším stupněm je komplex avidin-biotin-peroxidáza (lze použít i jiný enzym), který se na sekundární biotinylovanou protilátku pevně váže a pomáhá k zesílení signálu. Následně se komplex vizualizuje vhodným systémem. (4)

Lze také použít avidin získaný z bakterie *Streptomyces avidinii*, vzniklý komplex se nazývá streptavidin-biotin. K dispozici jsou velice citlivé detekční soupravy, kterými získáme uspokojivé výsledky i při minimálním množství komplexu antigen-protilátka. Sekundární protilátka se označí biotinem a naváže se (strept)avidin-biotinovým komplexem, který je označený křenovou peroxidázou. Enzymatická aktivita této peroxidázy indukuje místa v preparátu, kde došlo k primární specifické reakci. (3)

## **1.3 Protilátky**

Mezi nejdůležitější molekuly imunitního systému se řadí protilátky, skupiny imunoglobulinů (Ig), které jsou tvořeny B lymfocyty transformované v plazmatické buňky. Celkově existuje 5 druhů imunoglobulinů: IgA, IgD, IgG, IgM a IgE. Imunoglobuliny se tvoří při specifické imunitní reakci na antigen organické i anorganické povahy. Antigeny putují do lymfatických uzlin, kde jsou zachyceny folikulárními dendritickými buňkami tzv. antigen prezentujícími. Poté dochází k aktivaci imunitního systému, kde T-lymfocyty stimulují B-lymfocyty k produkci řady molekul cytokinů. B-lymfocyty následně prodělávají řadu mitotických cyklů, zvětšují se a mění se nejprve v centrocyty a posléze v

imunoblasty, které podléhají transformaci v plazmatické buňky tvořící při prvním kontaktu s antigenem protilátky třídy IgM. V pozdní primární či sekundární imunitní odpovědi produkuje transformující se B-lymfocyt v plazmatickou buňku protilátky třídy IgG a IgA a dává vznik též paměťovým B-lymfocytům, jež následně kolují v krevním oběhu. Protilátky IgM a IgG se tvoří v případě, že se antigen dostane do krve a následně do sekundárních lymfatických orgánů. Pokud se antigen do těla dostává povrchem sliznice, potom se tvoří protilátky typu IgA, které se účastní lokální imunitní reakce. (5)

Protilátky mají tvar písmene Y. Molekula IgG je tvořena dvěma těžkými a lehkými řetězci (kappa a lambda), tyto řetězce jsou spojeny jak disulfidickými můstky, tj. kovalentními, tak i nekovalentními vazbami. Tento typ struktury je společný pro všechny imunoglobuliny. Molekuly IgM mají tvar pentameru, který je tvořen pěti jednotkami, jež mají stejnou strukturu jako IgG. Pentamer obsahuje jednu kopii tzv. J řetězce, který je kovalentně vázán mezi dvěma sousedními Fc řetězci. (4)

Protilátky jsou limitovány životností, během které plní biologické funkce. Při poškození se degradují proteolytickými enzymy a z nich vzniklé aminokyseliny se využijí na tvorbu nových a funkčních molekul. Nejprve dochází ke štěpení na fragmenty a dále na malé peptidy až volné aminokyseliny. (5)

### **1.3.1 Polyklonální protilátky**

Polyklonální protilátky jsou secernovány různými aktivovanými liniemi B-lymfocytů. Jedná se o akumulaci molekul imunoglobulinů, které reagují proti specifickým antigenům, z nichž každý identifikuje odlišný epitop. Získávají se imunizací laboratorních zvířat po inokulaci antigenem. Po sérii injekcí se očekává, že zvíře vytvoří protilátky proti vloženému antigenu. Následně se odebere krev zvířete, z níž se izoluje sérum obsahující protilátky, jejichž specifita závisí na tom, v jaké fázi imunitní odpovědi zvířete jsou z něj protilátky získávány. (3)

U velké části antisér je často pozorována nežádoucí reaktivita, způsobená přítomností protilátek proti jiným proteinům, než proti kterým byla provedena imunizace. Tento nežádoucí prvek lze odstranit afinitním čištěním. (4)

### **1.3.2 Monoklonální protilátky**

Monoklonální protilátky jsou produktem pouze jednoho klonu B-lymfocytů, tedy identickou imunitní buňkou, která je klonem jedné unikátní rodičovské buňky. Specifické

protilátky jsou namířené proti jediné antigenní determinantě a váží se na stejný epitop. Nádory jsou charakterizovány monoklonální proliferací, kdy z jedné buňky mateřské vznikají buňky dceřiné se stejným imunofenotypem (imunohistochemickými i morfologickými rysy). V těchto dceřiných nádorových buňkách může časem dojít k dalším mutacím, jenž mají za následek vytvoření nové imunofenotypicky unikátní nádorové linie, která může být zodpovědná i za následnou rezistenci vůči původně účinné léčbě (chemoterapie, biologická cílená léčba, atd.) Příkladem monoklonální proliferace je mnohočetný myelom (též plazmocytární myelom). (3)

Kohler a Milstein vyvinuli techniku, která umožňuje *in vitro* růst buněčné populace jednoho klonu produkujícího protilátky žádané specificity. První fáze přípravy probíhá stejně jako příprava polyklonálních protilátek. Zvíře, nejčastěji myš, je imunizované vybraným antigenem. Ze sleziny imunizovaného zvířete je připravena buněčná suspenze, která je následně fúzována s relativně nesmrtelnými myelomovými buňkami. Fúze slezinných a myelomových buněk se provádí v prostředí, které stimuluje fúzi membrán, po níž následuje fúze jaderná. (4)

## 1.4 Antigeny

Antigeny jsou látky, které jsou schopné vyvolat imunitní odpověď organismu formou specifické vazby antigenu s protilátkou za vzniku imunokomplexů. Antigeny mají různorodý původ, mohou to být cizorodé látky z vnějšího prostředí (exoantigeny), infekční mikroorganismy a jejich složky. Antigeny mohou pocházet i z vlastního organismu a nazývají se autoantigeny. Alergen (exoantigen) má schopnost u senzibilizovaného jedince vyvolat patologickou alergickou imunitní odpověď. Superantigen je exoantigen (často produkt infekčních mikroorganismů), který vyvolá "nespecificky" aktivaci velkého počtu T-lymfocytů nezávisle na jejich antigenní specifitě, vedoucí k polyklonální T-buněčné aktivaci s masivním uvolněním cytokinů. Antigeny mohou mít jakoukoliv chemickou strukturu, může se jednat o proteiny, peptidy (řetězce aminových kyselin) a polysacharidy. Některé látky, například lipidy a nukleové kyseliny, se stávají antigeny jen v případě, pokud se kombinují s proteinovým či polysacharidovým nosičem. Část antigenu, která je rozeznávána imunitními receptory, se nazývá epitop. Antigen s protilátkou a komplementovanými fragmenty se označují imunokomplexy. (6)

## **1.5 Metody podobné imunohistochemii**

Následující metody lze využít v oboru specifických průkazů tkáňových a buněčných struktur. S imunohistochemií jsou spojeny historicky, použitím podobných principů a zpracováním vzorku v laboratoři. Využívají se k podobným účelům jako imunohistochemie. Tyto metody zařazujeme to tzv. afinitní histochemie. (3)

### **1.5.1 In situ hybridizace**

Je metoda, která umožňuje lokalizaci a identifikaci specifické sekvence nukleotidů v DNA. Využíváme procesu denaturace a reasociace DNA. Slovo hybridizační v názvu znamená, že se dle pravidel komplementarity spojí vlákno vyšetřované DNA s druhým vláknem – sondou, která bývá značená (např.: fluorescenčně). K hybridizaci dochází přímo ve vyšetřovaném biologickém materiálu, tedy na místě (in situ), nikoli na izolované struktuře. Nejčastěji využívanou metodou hybridizace in situ je metoda fluorescenčně in situ hybridizace (FISH), při které se používají fluorescenčně značené sondy. (3)

## 2 NÁDOROVÉ MARKERY

Marker je molekula, která se nalézá v krvi, jiných tělních tekutinách nebo tkáních a slouží jako ukazatel normálního nebo abnormálního procesu, stavu nebo nemoci, například nádorového onemocnění. Každý typ buňky má svůj unikátní molekulární "podpis", který lze označit jako marker a vypovídá o aktivitě a úrovni buňky (schopnost genů a proteinů splňovat jejich funkce). Markery jsou tedy předmětem měření nebo hodnocení fyziologických nebo patologických procesů, odpovědi na léky nebo léčbu. Existuje velké množství markerů, které mohou zahrnovat proteiny (enzymy, receptory), nukleové kyseliny (microRNA nebo jiná nekódující sekvence RNA), protilátky, peptidy a další. Mohou být zachyceny v krevní cirkulaci (plná krev, sérum, plazma) nebo v exkretech a sekretech (stolice, moč, sputum) a tím pádem snadno dosažitelné neinvazivně, odběr tkáně je již invazivní zákrok. Genetické markery mohou být zděděny a detekovány jako sekvence v zárodečné linii DNA izolované z plné krve, sputa, buňkách nebo v somatických buňkách identifikované jako mutace v DNA, která je odvozená od nádorové tkáně. Pojem nádorový marker definuje látku indikující přítomnost nádoru, která je buď produkována nádorovou tkání, či se jedná o nespecifickou reakci organismu na přítomnost neoplázie v organismu. Od látek produkováných normálními buňkami se odlišují kvalitativně (nádorově specifické – normálními buňkami produkováné minimálně) nebo kvantitativně (s nádory asociované – i v nenádorových buňkách přítomné). (7)

### 2.1 Diagnostická role

Markery mají široké klinické využití v onkologii, například sledování průběhu nádorového onemocnění (follow-up), kontrola efektu terapie, prognóza nádorového onemocnění nebo při podezření na nádorové onemocnění neznámého původu. Nádorové markery nejsou vhodné pro screening nádorových onemocnění (kvůli nedostatečné senzitivitě), staging (nemají dostatečnou rozlišovací kapacitu mezi jednotlivými stádii onemocnění). Je důležité, aby podstoupily přísné analytické a klinické zhodnocení a posouzení klinické užitečnosti před začleněním do běžné klinické praxe. V nedávné době se znalost nádorových markerů velice rozšířila, jelikož nabízí příležitosti ke zlepšení stavu pacientů s maligním nádorovým onemocněním zvýšenou účinností detekce a léčby. Nádorová onemocnění jsou příčinou vyšší morbiditativní i mortality obou pohlaví. Nádory hlavy a krku patří mezi šest nejčastějších příčin nádorového onemocnění celosvětově. Častěji jsou diagnostikovány až v pokročilé fázi onemocnění, kdy je většina pacientů indikována k paliativní péči. (7)



## **2.2 Značení protilátek (markerů)**

K lokalizaci cílové struktury (Ag) pomocí imunohistochemie je potřebné mít protilátky označené nejčastěji enzymem, fluorochromem nebo radioizotopem. (4)

### **2.2.1 Značení enzymem**

Značení enzymem je velmi často používaný způsob značení Ab v enzymové imunohistochemii, kde konečným produktem je barevná reakce stabilní pro světelnou mikroskopii. Metody využívají enzym-substrátové reakce, které konvertují rozpustné bezbarvé chromogeny do nerozpustných barevných produktů. (3)

Často používaným enzymem je křenová peroxidáza, kterou označujeme přímo primární protilátku, sekundární protilátku, případně i avidin, kterému se říká streptavidin. Nejběžnější chromogen pro tento enzym je 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB). (1)

### **2.2.2 Značení fluorochromem**

Toto značení se používá při imunofluorescenci. Princip tohoto značení je v tom, že fluorofory po ozáření (excitaci) světlem určité vlnové délky vyzařují (emitují) světlo jiné vlnové délky. Prohlížení v mikroskopu je umožněno pomocí filtrů, které propouští jedno procházející záření. Protilátky jsou chemicky konjugovány s fluorochromem. Často se označuje pomocí Cyaninu, Alexa Fluor, Fluoresceinu isothiokyanátu, aminometylkumarinu nebo pomocí Texas red, a další. (1)

### **2.2.3 Značení radioizotopem**

Tento typ značení se v imunohistochemii nepoužívá příliš často, jelikož existují novější metody, které nepoužívají radioaktivní záření (např. ELISA) a nejsou tolik nákladné na zabezpečení. Občas se využívají v onkologii a endokrinologii. (8)

### **3 IMUNOHISTOCHEMICKÉ MARKERY V DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTICE NÁDORŮ HLAVY A KRKU**

Nádorová transformace je mnoha krokový děj. Mezi klíčové vlastnosti nádorových buněk patří nestabilita genomu, necitlivost k signálům zastavující buněčný cyklus, narušení apoptózy, neomezený replikační potenciál, soběstačnost v produkci růstových signálů, schopnost zakládat metastázy, posílení angiogeneze, přeprogramování energetického metabolismu a vyhýbání se imunitní destrukci. (9)

Maligní onemocnění jsou často výsledkem somatické změny genu, které mohou vzniknout ztrátou funkce (loss-of-function) v nádorových supresorových genech nebo získáním nové funkce (gain-of-function) v proto-onkogenech. Nicméně i přes významné pokroky ve výzkumech v posledních desetiletích stále neznáme přesné molekulární mechanismy nádorových onemocnění. (10)

K odlišení typu nádorového onemocnění v případě diagnostických obtíží při hodnocení pouze z hematoxylin-eosinového preparátu mohou napomoci imunohistochemické markery. U vybraných nádorů hlavy a krku lze využít markery SOX10, GATA3, HMGA2 a MYB, jedná se především o transkripční faktory. Transkripční faktory (TF) jsou proteiny s DNA vazebnými doménami, které se účastní (samostatně nebo jako součást komplexu) navazování na rozpoznávací prvek zesilovače (enhanceru) nebo na promotor, který reguluje asociovaný gen. (11)

Proto jsou geny, exprimující TF, zapojeny do regulace genové exprese. Uvádí se, že v lidském genomu je kódováno přibližně 2000 různých genů kódujících TF, z nichž mnohé jsou exprimovány způsobem specifickým pro daný buněčný typ, aby synchronizovaly programy genové exprese, které jsou základem řady buněčných procesů. Často je pozorováno, že lidské nádorové buňky vykazují trend deregulace genů kódujících TF. (12)

#### **3.1 SOX10**

Geny rodiny SOX představují zhruba 20ti člennou skupinu genů, jejichž produkty - proteiny-transkripční faktory se hrají klíčovou roli v determinaci pohlaví, diferenciaci či maturaci buněk. (10)

Jedním z genů SOX rodiny je gen SOX10 (SRY-related HMG-box 10) spadající do podskupiny SOX E společně s geny SOX 8 a SOX 9. SOX10 je genem, který představuje klíčovou roli při embryonálním vývoji mnoha tkání a orgánů. Během embryogeneze se SOX10 gen aktivuje v buňkách neurální lišty. Tyto buňky migrují při vývoji míchy do specifických oblastí embrya, kde podmiňují buněčnou diferenciaci a proliferaci zejména nervových buněk a melanocytů. (13)

Vazba SOX10 genu na DNA je zprostředkována vazbou tzv. vysoce konzervovanou doménou vysoké mobility = „high mobility group domain“ (HMG). Důkazy ukazují, že osud buněk a diferenciaci hlavních vývojových procesů jsou řízeny právě SOX transkripčními faktory, dále také naznačují, že dysregulace SOX TF může vyvolat progresi nádorového onemocnění. (10)

SOX10 je používán zejména k diagnóze nádorů ze schwanových buněk a melanocytů, obzvláště maligního nádoru z pochvy periferního nervu a maligního melanomu. Imunohistochemie využívající monoklonální protilátku anti-SOX10 má konzistentní výsledky a proto ji lze využít v praxi. Nádory slinných žláz jsou relativně vzácné, morfologicky rozmanité a heterogenní, jejichž epiteliální struktury se dělí do čtyř částí: aciny, vmezežené vývody, žíhané vývody a exkretční vývody. SOX10 je exprimovaný v acinárních buňkách, myoepiteliálních buňkách acinů a v luminálních i abluminálních buňkách vmezeřených vývodů. Expres SOX10 odlišuje dva podtypy nádorů slinných žláz. Nádory SOX10 pozitivní jsou acinické karcinomy, adenoidní cystické karcinomy, epiteliálně-myoepiteliální karcinomy, myoepiteliální karcinomy a pleomorfní adenomy, včetně komponenty pleomorfního adenomu v karcinomu ex pleomorfním adenomu. Druhou skupinu představují SOX10 negativní, mezi něž se řadí salivární duktální karcinom, mukoepidermoidní karcinom, onkocytární karcinom, onkocytomy a Warthinův tumor. SOX10 byl exprimován dále v solidních nebo morfologicky nespecifických nádorech slinných žláz, ale jeho exprese není popisována ve špatně diferenciovaném spinocelulárním karcinomu. (14)

### **3.2 GATA3**

GATA vázající protein 3 (GATA3) je zinc finger transkripční faktor, který se podílí na regulaci normálního vývoje prsu, T-lymfocytů, ledvin, nervů a kůže. GATA3 je jaderným imunohistochemickým markerem, jenž je exprimovaný zejména v novotvarech mamárního a uroteliálního původu. Kvůli podobnosti slinné a prsní žlázy je možno využít

GATA3 barvení též salivárního původu a za určitých okolností může být užitečným markerem k určení podtypů právě nádorů slinných žláz. GATA3 je pozitivní především v salivárním duktálním karcinomu a sekrečním karcinomu (mamárního typu), právě tyto nádory jsou morfologicky podobné nádorům prsu. Negativní GATA3 exprese je udávána v acinickém karcinomu low-grade adenokarcinomu a polymorfním low-grade karcinomu. I přestože GATA3 marker nelze využít k odlišení primárního nádoru slinných žláz od metastáz karcinomu prsu, stále má využití při rozlišování subtypů nádorů slinných žláz. (15)

### **3.3 MYB**

MYB je transkripční faktor, který byl u ptáků identifikován jako virový onkogen (v-MYB). Jeho buněčný protějšek byl následně izolován jako c-MYB, který má tři funkční domény: DNA vazebnou doménu, transaktivační doménu a negativní regulační doménu. Pro přežití je c-MYB nezbytný. Delece obou alel genu vede k embryonální smrti. MYB je vysoce exprimován v hematopoetických buňkách, nervové tkáni a je nutný pro vývoj T, B lymfocytů. Navíc byla nalezena aberantní exprese MYB v řadě solidních nádorových buněk a leukémie. (16)

### **3.4 HMGA2**

Strukturní chromatinové proteiny High Mobility Group A (HMGA) patří mezi jedny z nejvíce široce exprimovaných proteinů asociovaných s nádorovými onemocněními. Jejich nadměrná exprese koreluje se špatnou prognózou. (17)

Kromě toho dysregulace HMGA v důsledku specifických chromozomálních přeskupení je přítomná u široké škály běžných benigních mezenchymálních nádorů, díky čemuž jsou geny HMGA řazeny mezi nejčastěji přeskupené geny v lidských nádorech. Data naznačují kritickou roli nadměrné exprese HMGA také při genezi hypofyzárních adenomů. Proteiny HMGA, zahrnující HMGA1 (izoformy HMGA1, HMGA1b) a HMGA2, jsou strukturní jaderné faktory, které se podílejí na remodelaci chromatinu a genové transkripci genu, protože jsou klíčovými aktéry a kofaktory při sestavování transkriptomů nebo enhanzomů různých genů. (17)

Protein HMGA je tvořen třemi vazebnými doménami DNA obsahujícími krátké bazické repetece, tzv. AT-háčky, schopné vázat vazby bohaté na AT sekvence v malé drážce DNA a kyselý karboxy-terminální konec. Každá z těchto domén je kódována

odlišným exonem příslušného genu, který je umístěn buď na lidském chromozomu 6p21 (HMGA1) nebo 12q13-15 (HMGA2). Exprese HMGA je velmi vysoká během embryogeneze, zatímco v diferencovaných dospělých tkáních je nedetekovatelná nebo jen velmi nízká, přičemž je omezena, alespoň pro HMGA2. (17)

## 4 NÁDORY HLAVY A KRKU

Mezi nádory hlavy a krku patří nádory horních cest dýchacích, oblasti polykání, slinných žláz, dále nádory dutiny ústní a jazyka a všech okolních struktur, jako jsou kůže, nervy, cévy a další tkáně. Nádory hlavy a krku jsou většinou diagnostikovány až v pokročilém stavu onemocnění a to i přesto, že je tato oblast přístupná různým klinickým vyšetřením. Problematická je ovšem i nemožnost řešit většinu nádorových onemocnění, jak benigních, tak i maligních, z této lokality dostatečně radikálně chirurgicky odstranit z důvodu blízkosti důležitých orgánových a nervově-cévních struktur, jejichž odstranění by mělo mutilující následky pro pacienta a zhoršovaly by společenské uplatnění a mnohdy i začlenění do běžného života. (18)

Na vznik těchto nádorů hlavy a krku má vliv řada faktorů, především vnější prostředí, velmi často se vyskytují u kuřáků, alkoholiků a zejména při současném užívání jak nikotinových, tak alkoholických látek, karcinogenně působí také další návykové látky, například marihuana. Dále mohou onemocnění vyvolat viry, především virus HPV (lidský papilomavirus), který je spojován s nádory orofaryngu. Nepříznivě působí genetická predispozice, špatná výživa a hygiena. S věkem stoupá incidence nádorů hlavy a krku. (19)

### 4.1 Patologie slinných žláz

Slinné žlázy obsahují jednak párové velké žlázy (příušní žlázu, podčelistní a podjazykové) a jednak malé, které jsou rozptýleny v celém horním aerodigestivním traktu. Slinné žlázy jsou histologicky tuboalveolárně uspořádané. Periferní aciny jsou členěny na čistě serózní, mucinózní nebo smíšené. Strukturálně se sestávají ze dvou vrstev buněk lumenálními, slinami produkujícími a ablumenálními myoepiteliálními buňkami, které mají schopnost kontrakce. Na aciny navazují krátké interkalované vývody s lumenálními kubickými buňkami a ablumenálními myoepiteliálními buňkami. Interkalované vývody navazují na dlouhé žíhané a exkretční vývody, které jsou tvořené lumenálními oxyfilními buňkami, tak i ablumenálními bazálními buňkami. Aciny příušní žlázy se sestávají převážně ze serózních buněk, zatímco v submandibulárních a menších žlázách zahrnují směs serózních a mucinózních buněk a v sublingvální žláze převažují mucinózní buňky. Slinné žlázy vyprodukují kolem 1000 ml slin za den, produkce je řízena vegetativním nervovým systémem. (20)

## 4.2 Benigní nádory

Benigní nádory slinných žláz jsou nejčastější. Charakterizují se jako ohraničené útvary, pomalu rostoucí útvary, které jsou opouzdřené a pohyblivé. Buňky těchto nádorů jsou zralé a diferenciované, rostou expanzivně. Benigní nádory nemetastazují, ale jsou popsány vzácné výjimky u pleomorfního adenomu. (21)

Benigní nádory lze lépe operovat v porovnání s invazivně rostoucími maligními novotvary, v některých případech stačí prostá enukleace tumoru, ale i přesto některé benigní nádory mohou recidivovat při nekompletnosti excize, která může být dílem prostorem limitovaného chirurgického operačního přístupu v oblasti hlavy a krku. (22)

### 4.2.1 Pleomorfní adenom

Pleomorfní adenom (PA) je benigní nádor s variabilními cytomorfologickými rysy. Pro diagnostiku PA je nezbytná identifikace epiteliálních a myoepiteliálních/stromálních složek. PA je nejběžnějším nádorem slinných žláz u dětí i dospělých a vyskytuje se u jedinců všech věkových skupin. Většina případů je lokalizována v příušní žláze. PA je obvykle samostatně rostoucí, ale mohou se též objevit metachronní a synchronní nádory. (18)

Makroskopicky je PA pevná, mobilní, dobře ohraničená léze. Na řezu je světle hnědé až šedé barvy s chrupavčitými rysy a místy degenerativními či cystickými změnami. Nádory jsou složeny z variabilních epiteliálních a myoepiteliálních/stromálních buněk. Buňky PA mohou vykazovat spektrum fenotypů, oválné, vřetenité, epiteloidní, se světlou cytoplazmou a plazmacytoidní smíchané v chondromyxoidní stromatu. (18)

Genetický profil je u 70 % PA charakterizovaný translokací či intrachromosomální přestavbou, které resultují v genové fúze zahrnující transkripční faktory PLAG1 na chromosomu 8q12a HMGA2 na chromosomu 12q14-15. Recidiva PA může vzniknout, pokud je PA multinodulárně uspořádaný a nádorové struktury PA dosahují do resekcční linie. Metastazující PA je histologicky nerozeznatelný od PA, byl popsán v 81 případech. (23)

#### **4.2.2 Myoepiteliom**

Myoepiteliom (ME) je benigní nádor slinné žlázy složený téměř výhradně z buněk s myoepiteliální diferenciací. Muži a ženy jsou postiženi se stejnou frekvencí. Většina nádorů se vyskytuje u dospělých, ale byly hlášeny vzácné případy u dětí. Myoepiteliomy se vyvíjejí nejčastěji v příušní žláze, následuje tvrdé a měkké patro. Tyto typy nádorů jsou na řezu lesklé žlutohnědé barvy. Histologicky jsou OC tvořeny hnízdy nebo pruhy kulatých až polygonálních buněk, s centrálně umístěnými jádry a variabilním množstvím eosinofilní cytoplazmy. Mohou být přítomny příležitostné kanálky a mezibuněčné mikrocystické prostory. Recidivy ME jsou vzácné, asociované s inkompletní excizí. (18)

#### **4.2.3 Bazocelulární adenom**

Bazocelulární adenom (BA) je benigní nádor slinných žláz složený z malých bazaloidních buněk s občasnými vnitřními duktálními epiteliálními. BA představuje 1-3,7 % všech nádorů slinných žláz. Nejčastěji se vyskytují u starších pacientů. Většina BA se vyskytuje ve velkých slinných žlázách, hlavně v příušní žláze, po níž následuje submandibulární žláza, tento typ nádoru je v menších žlázách velmi vzácný. Nádory jsou typicky dobře ohraničené a pohyblivé solitární hmoty. (18)

Histologicky jsou popisovány čtyři růstové vzorce solidní, tubulární, trabekulární a membranózní – ale je pravděpodobné, že ve skutečnosti existují pouze dvě samostatné biologické entity, nemembranózní a membranózní BA. Nemembranózní BA představují část spektra myoepiteliomu a PA. Nádory jsou vejčité, dobře ohraničené masy, ve kterých jsou ostrůvky, hnízda a trámce bazaloidních buněk obklopeny odlišnou tenkou PAS-pozitivní bazální membránou. Membranózní BA (dermální analogový nádor) se vyskytuje převážně u mužů a může být multicentrický. Mikroskopicky nejsou opouzdřeny a jsou multinodulární. Nejcharakterističtějším znakem je depozice velkého množství hyalinního bazálního membránového materiálu, který je jasně eosinofilní a PAS pozitivní. Recidiva u nemembranózního BA je extrémně nízká. Terapeuticky je lokální excize s čistými okraji dostatečná. Naproti tomu až 25 % membranózní BA po chirurgickém zákroku recidivuje, což je pravděpodobně odrazem multicentricity tumoru. (20)



#### 4.2.4 Warthinův tumor

Warthinův tumor (WT) je benigní nádor slinných žláz složený z onkocytárních epiteliálních buněk lemujících duktální, papilární a cystické struktury v lymfoidní stromatu. WT je druhým nejčastějším nádorem slinných žláz, což představuje přibližně 5-15 % všech nádorů slinných žláz. Tyto nádory obvykle postihují jednotlivce v šesté až sedmé dekádě života. Byla zaznamenána mírná dominance u mužů. Nádory byly spojeny s kouřením cigaret či radiační expozice jsou spojeny se vznikem WT. Rovněž byla popsána souvislost mezi nádory WT, autoimunitními chorobami a infekcí EBV. WT jsou téměř výhradně lokalizované v příušní žláze, ale někdy se vyskytují v periparotideálních lymfatických uzlinách. Většina nádorů se nachází v dolním pólu příušní žlázy. Nádory se občas vyskytují multifokálně, buď synchronně nebo metachronně, ve stejných nebo dvoustranných žlázách. Mohou být spojeny s jinými typy nádorů slinných žláz. (18)

Klinicky se manifestují bezbolestnými, pomalu rostoucími a fluktuujícími otoky. Bolestivost nebo ochrnutí obličeje jsou neobvyklé, ale mohou se objevit v metaplastické variantě. WT jsou dobře ohraničené kulovité až oválné masy. Na řezu jsou solidně či multicysticky s papilárními formacemi. Terapie je chirurgická, kompletní chirurgická excize s adekvátními okraji je postačující. WT recidivuje vzácně. (18)

#### 4.2.5 Onkocytom

Onkocytomy (OC) jsou benigní nádory slinných žláz tvořené buňkami s granulární – na mitochondrie bohatou cytoplazmou. Většina OC je lokalizovaná v příušní slinné žláze s maximem mezi 50. – 70. rokem života. Někteří pacienti s onkocytárními nádory mají v anamnéze předchozí radiační expozici. Nejčastěji se jedná o bezbolestnou lézi. Makroskopicky je OC dobře ohraničený, lobulárně uspořádaný, červenohnědé barvy. Histologicky jsou OC tvořeny hustě eosinofilní granulární cytoplasmou s centrálně lokalizovanými vezikulárními jádry s jedním prominujícím jadérkem. Mohou růst v pruhovitých trabekulárních nebo dukty-napodobujících formacích. Nádor může být složen i zcela z jasných (clear-cell) buněk nebo může mít vlastnosti onkocytárního lipoadenomu. (20)

Terapie OC spočívá v chirurgické excizi. Recidivy jsou vzácné, ale ve zbytkové parotidě se mohou objevit další onkocyty. Byla hlášena souvislost mezi výraznou změnou čistých buněk a opakujícím se a bilaterálním onemocněním. (24)

### 4.3 Maligní nádory

Maligní nádory se vyznačují rychlým růstem, nepřesným ohraničením a zpravidla nejsou opouzdřené a pohyblivé. Buňky maligních nádorů jsou méně diferencované, nezralé s četnými mitózami včetně atypických. Nádory metastazují a rostou infiltrativně. Mohou vést k anémii, kachexii a dalším zdravotním komplikacím. Operativně jsou hůře přístupné. (21)

#### 4.3.1 Acinický karcinom

Acinický karcinom (AciK) je zhoubný novotvar slinných žláz složený z nádorových buněk s acinárními rysy. Průměrný věk pacienta v době onemocnění je 50 let, AciK je druhým nejčastějším onemocněním slinných žláz u dětí. Příušní žláza je postižená až v 90 %. AciK je pomalu rostoucí léze, často multinodulárně uspořádaná, může být fixovaná na kůži. Jedna třetina pacientů trpí bolestí a může se rozvinout obrna faciálního nervu. AciK je tvořený acinárními a duktálními buňkami. Histologicky vykazuje solidní, mikrocystické, papilárně cystické, makrofolikulární struktury. Acinární buňky AciK mají vlastnosti serózních acinárních buněk s bazofilní granulovanou cytoplasmou s přítomností zymogenních sekrečních PAS pozitivních granul; jsou polygonální, s kulatým a excentricky uloženým jádrem. Agresivita je vyšší u nádorů velkých slinných žláz. AciK metastazuje do regionálních krčních uzlin, je schopen zakládat vzdálené metastázy hematogenní cestou. (18)

Diferenciální diagnóza zahrnuje sekreční karcinom mamárního typu, mukopeidermoidní karcinom a světlobuněčné tumory zejména hyalinizující světlobuněčný karcinom a metastáza světlobuněčného renálního karcinomu. (20)

#### 4.3.2 Mukoepidermoidní karcinom

Mukoepidermoidní karcinom (MEK) je maligní nádor slinných žláz rostoucí solidně či cysticky. MEK se vyskytuje v širokém věkovém rozpětí a je nejčastější malignitou slinných žláz u dětí a mladých osob s maximálním výskytem ve druhé dekádě života. Příušní žláza je nejběžnějším místem MEK, následují slinné žlázy patra, submandibulární žláza, další intraorální místa a malé žlázy. Primární intraoseózní Mukoepidermoidní karcinomy jsou vzácné. (18)

Nádory jsou obvykle přítomny jako měkká, pevně ohraničená či infiltrativně rostoucí léze, často s cystickou složkou. MEK je tvořen různým množstvím různě četně zastoupených buněk mucinózní, skvamoidní a intermediální diferenciace. Mucinózní

buňky převažují v cystické variantě MEKu. V MEK byla popsána translokace t(11;19) s fúzí CRTIC1-MAML2 genů a v menším množství případů dále t(11;15) s CRTIC3-MAML2 genovou fúzí. V diferenciální diagnóze je nutné zvážit benigní afekce jako nekrotizující sialometaplázií či sklerózující polycystickou adenózu. Z maligních lézí zase spinocelulární karcinom, adenoskvamózní karcinom, karcinom z jasných buněk, ale i SC. Některé MEK mohou vykazovat rozsáhlou onkocytární metaplázií, která může překrýt většinu nádoru a imponovat tak jako benigní či maligní onkocytární léze. Léčba je chirurgická. (20)

### **4.3.3 Adenoidně cystický karcinom**

Adenoidně cystický karcinom (AdK) je pomalu rostoucí maligní nádor slinných žláz složený z epiteliálních a myoepiteliálních neoplastických buněk, které vytvářejí různé vzory, včetně tubulárních, kribriformních a solidních forem. AdK představuje méně než 1 % všech nádorů hlavy a krku a méně než 10 % všech nádorů slinných žláz. Nádor se vyskytuje nejčastěji ve velkých slinných žlázách, ale více než třetina případů je přítomná v malých slinných žlázách dutiny ústní, či sinonasální oblasti. (18)

AdK je pevná, šedo-bílá, neopouzdřená masa, dosahující značné velikosti. Přítomnost nekrózy a/nebo krvácení může indikovat možnost high-grade transformace. AdK jsou tvořené tubulárními a kribriformními strukturami s variabilním podílem solidní komponenty. Nádorové buňky obsahují málo cytoplasmy, mají malá zahnutá a hyperchromatická jádra. (18)

Diferenciální diagnóza zahrnuje primární nádory – polymorfní low-grade adenokarcinom, pleomorfní adenom, BA, bazocelulární karcinom či bazaloidní varianty epiteliálně-myoepiteliálního a dlaždicobuněčného karcinomu. Geneticky byla v AdK popsána translokace t(6;9) s fúzí MYB-NFIB genů, méně často byla popsána translokace t(8;9) s MYBL1-NFIB genovou fúzí. (20)

Průměrná doba přežití 5 až 10 let je asi 60 %, respektive 40 %, ale většina pacientů na nemoc umírá. Hlavními prognostickými faktory jsou místo výskytu (submandibulární horší než parotis), histologický typ růstu, stádium nádorového onemocnění, perineurální infiltrace, přítomnost AdK v resekčním okraji. Pro obtížné chirurgické řešení AdK léčba vyžaduje adjuvantní radioterapii. (20)

#### **4.3.4 Polymorfní adenokarcinom a kribriformní adenokarcinom**

Polymorfní adenokarcinom (PAK) je maligní epiteliální nádor charakterizovaný cytologickou uniformitou, morfológickou diverzitou a infiltrativním růstem. Synonymem pro tento typ nádoru je polymorfní low-grade adenokarcinom a kribriformní adenokarcinom (KA). Kribriformní adenokarcinom se však v poslední době od PAK odlučuje a jsou snahy o jeho identifikaci jako samostatné jednotky. PAK nejčastěji postihuje malé slinné žlázy horního aerodigestivního traktu a představuje druhou nejčastější nádorovou jednotku v salivární patologii. Histologicky rostou jednotlivé nádorové buňky v pruzích, řadách a trabekulech či tubulech, které se koncentricky kupí kolem nervů a vaskulárních struktur. (18)

Všeobecně se PAK definuje jako low-grade nádor s 19 % rizikem relapsu a s 13 – 17 % rizikem zakládání metastáz do lymfatických uzlin. Naproti tomu KA by měl být od PAK odlišovaný díky unikátní histologii a vyššímu riziku lymfogenních metastáz. V 70 % PAK byla zastižena hotspot aktivace postihující PRKD1 gen, zatímco v 80 % KA byli popsány genové translokace zahrnující PRKD1, PRKD2 či PRKD3 geny. Fakt, že KA a PAK jsou asociované s aktivací PRKD1 genu ovšem jinými mechanismy, přispívá k názoru, že se jedná o dva odlišné nádory a nikoliv jednu jednotku. (25)

#### **4.3.5 Epiteliálně-myoepiteliální karcinom**

Epiteliálně-myoepiteliální karcinom (EMK) je maligní nádor slinných žláz bifázického uspořádání z vnitřních lumenálních a zevních myoepiteliálních buněk. EMK je vzácnější novotvar, který představuje méně než 5 % všech malignit slinných žláz. Vyskytuje se nejčastěji v 6. a 7. dekádě života s mírnou převahou v mužské populaci. Většina případů se nachází v příušní žláze a submandibulární žláze. Méně častá místa zahrnují sinonasální dutinu a patro. EMK obvykle roste multinodulárně a je charakterizována dvouvrstevnatým uspořádáním malých vnitřních lumenálních duktálních buněk s hustou eosinofilní cytoplazmou a vnějších ablumenálních polygonálních myoepiteliálních buněk s čistou cytoplazmou. Strukturně je tento typ nádoru podobný myoepiteliálnímu karcinomu (MK). EMK je obvykle indolentní, ale lokální relaps není vzácný, zatímco hematogenní diseminace a metastázy do lymfatických uzlin vzácné jsou. (18)

#### **4.3.6 Světlobuněčný karcinom**

Světlobuněčný karcinom (SBK) slinných žláz je low-grade maligní nádor složený z maligních buněk s vodojasnou cytoplazmou, s nebo bez hyalinizace. Tento nádor je častější u žen v rozmezí 5.-8. dekády života. SBK se nejčastěji vyrůstá z malých slinných žláz patra a na jazyku. SBK se nejčastěji manifestuje otoky a možnou povrchovou ulcerací, doprovázenou bolestí, invazí do kostí či fixací k měkkým tkáním. Nádory se vyskytují jako špatně ohraničené, tuhé, šedo-bílé léze. (18)

Výrazná hyalinizace může být patrná i makroskopicky. Perineurální invaze a invaze do kosti jsou časté. Histologicky je SBK tvořený dukty a žlázovými prostory zanořenými v hyalinizovaném stromatu obklopujícími nádorová hnízda, přecházející ve fibrocelulární myxoidní stroma. Nádorové buňky jsou polygonální s dobře vytvořenými buněčnými hranicemi s lehce eosinofilní až vodojasnou cytoplazmou. SBK může také vykazovat dlaždicovou a dokonce mucinózní diferenciaci. SBK mají všeobecně dobrou prognózu, pokud jsou léčeny kompletní chirurgickou excizí. Může se objevit lokální relaps s metastázami do lymfatických uzlin. Případy high-grade transformace SBK s rearanží EWSR1 genu byly též popsány v literatuře. (26)

#### **4.3.7 Salivární duktální karcinom**

Salivární duktální karcinom (SDK) je adenokarcinom, který se histologicky podobá duktálnímu karcinomu prsu. Představuje asi 4–6 % všech karcinomů slinných žláz. Většina pacientů je starších 50 let, poměr mužů a žen je přibližně 4:1. Vyskytuje se hlavně v příušní žláze, méně často v submandibulární a pouze příležitostně v malých slinných žlázách. SDK může vzniknout de novo, ale až polovina případů se vyvíjí jako maligní komponenta karcinomu ex pleomorfního adenomu. (20)

SDK je špatně ohraničený, invazivně rostoucí nádor. Histologicky je SDK podobný invazivnímu duktálnímu karcinomu. Tento nádor se skládá hlavně z buněk s eosinofilní cytoplazmou s vezikulárními pleomorfními jádry s prominujícími jádérky. Mezi relativně neobvyklé varianty SDK patří papilární, mikropapilární, na mucin bohatá a onkocytární, jakož i sarkomatoidní SDK, směs obvyklých karcinomů slinných duktů a vřetenovitých. Standardní léčbou je v současné době kompletní chirurgická excize s radikální disekcí krku následovanou radioterapií nádorového lůžka a případně chemoterapie. (20)

#### **4.3.8 Myoepiteliální karcinom**

Myoepiteliální karcinom je vzácný nádor vyskytující se nejčastěji v příušní žláze. Obvykle se jedná o nebolestivou lézi příležitostně rychle rostoucí s možným postižením lícního nervu. Histologicky je tvořený dezorganizovanými noduly maligně vyhlížejících myoepiteliálních buněk s invazivními okraji. Nádorové buňky rostou v solidních, trabekulárních a retikulárních růstových vzorcích, stroma může být myxoidní či hyalinizované. Nádorové buňky jsou IHC pozitivní s myoepiteliálními markery. EWSR1 genové rearanže byly popsány v podskupině MK s agresivními znaky, nekrózami a s predominancí buněk s vodojasnou cytoplasmou. MK má rozmanité chování a sklon k distálním (obvykle plicním) metastázám. Jedna třetina pacientů je léčena resekci a u jedné třetiny pacientů se vyvine metastatické a progresivní onemocnění. (18)

#### **4.3.9 Sekreční karcinom mamárního typu**

Sekreční karcinom (mamárního typu) (SK) je nedávno popsáný nádor slinných žláz s přestavbou genu ETV6. Jak název napovídá SK je histologicky a imunohistochemicky podobný sekrečnímu karcinomu prsu. SK je typicky přítomen u dospělých, průměrný věk 46,5 let s rovnoměrným zastoupením mužů a žen. Nejčastěji je lokalizovaný v příušní žláze. (20)

Nádory jsou gumovité a bílo-hnědé, dobře ohraničené, ale neopouzdřené léze. SK vykazuje lobulární způsob růstu. Ve většině případů je SK složena z mikrocystických/solidních a tubulárních struktur. Buňky mají eosinofilně granulární a vakuolizovanou cytoplasmu s malými, uniformními jádry. Nádorové buňky mají low-grade vezikulární kulatá až oválná jádra s jemně granulárním chromatinem. Genetický profil SK je charakterizovaný nespecifickou translokací t(12;15) s fúzí ETV6-NTRK3 genů, která je přítomná v 95-98 % případů. SK je low-grade malignita, charakterizována mírným rizikem lokální recidivy (15%) a metastáz v lymfatických uzlinách (20 %) a nízkým rizikem vzdálených metastáz (5 %). (20)

#### **4.3.10 Bazocelulární karcinom**

Bazocelulární karcinom (BK) je maligní nádor složený z buněk bazálního typu s tendencí k invazi a potenciálem zakládat metastázy. BK je vzácný, představuje přibližně 2 % karcinomů slinných žláz. Většina případů se vyskytuje u pacientů starších 50 let a u obou pohlaví se stejnou incidencí. Obvyklým místem výskytu je příušní žláza, byly však popsány v submandibulárních, sublinguálních a malých slinných žlázách. (18)

BK může dosahovat 7 až 70 mm. Mikroskopicky jsou rozlišovány čtyři růstové vzorce – solidní, tubulární, trabekulární a membranózní – ačkoli se nezdá, že by měly prognostický význam. Nádorové ostrůvky obsahují směs velkých, bledých a malých bazaloidních buněk, přičemž poslední z nich obvykle vykazují periferní palisadování, i když je to méně zastoupeno v porovnání s BA. Odlišení BK od BA je na základě jejich infiltrativního chování, perineurální a lymfovaskulární propagaci, vyšším mitotickým indexem a nekrozami. BC se obvykle chová jako maligní low-grade nádor. (18)

#### **4.3.11 Karcinom ex pleomorfní adenom**

Karcinom ex pleomorfní adenom (Ka ex PA) je epiteliální a/nebo myoepiteliální maligní tumor vyvíjející se z primárního nebo recidivujícího pleomorfního adenomu. Karcinomová složka může být přítomna čistě v epiteliální nebo myoepiteliální s infiltrací do okolní žlázoové a mimo žlázoové tkáně. Ka ex PA představuje 3,6 % všech nádorů slinných žláz a 12 % všech malignit slinných žláz. Většina případů karcinomu ex PA se vyskytuje v příušní žláze. (18)

Histologický typ maligní složky je důležitý. Většina nádorů jsou high-grade adenokarcinom, obvykle fenotypu SDK. Mezi další typ Ka ex PA patří myoepiteliální karcinom ex PA, který představuje 35 % případů. Minimálně invazivní Ka ex PA může představovat časně onemocnění. Karcinom ex PA je agresivní malignita s lokálními nebo vzdálenými metastázami vyskytujícími se až v 70 % případů a celkovou 5letou mírou přežití čítající 25-65 %. (18)

# **PRAKTICKÁ ČÁST**

## **5 CÍLE**

Cílem práce je zpracování problematiky nádorů slinných žláz a využití imunohistochemických markerů, které napomáhají k získání informací o původu nádorových buněk, kdy je nedostatečné barvení hematoxylin-eosin. Vyhodnocení pozitivita a negativita imunohistochemického barvení pro markery SOX10, GATA3, MYB a HMGA2 u jednotlivých maligních a benigních nádorů slinných žláz.

## **6 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY**

K lepšímu posouzení původu daného nádoru (z jaké buňky vznikl) poslouží určení pozitivita nebo negativita u jednotlivých typů nádorů slinných žláz.

## **7 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU**

Praktickou část své bakalářské práce jsem zpracovávala v Biopstické laboratoři s.r.o. v období od 1.3.2019 do 30.11.2019.

Vyšetřovaný soubor se skládal ze vzorků pacientů, kterým bylo diagnostikováno nádorové onemocnění slinných žláz.

## **8 METODIKA**

Pro praktickou část bakalářské práce byl proveden sběr případů pacientů s nádorovým onemocněním. Následně bylo od každého typu maligního a benigního nádoru slinných žláz vybráno 10 vzorků, u některých typů nádorů nebylo možné vybrat všech 10 vzorků. Ze zpracované tkáně se následně provedlo imunohistochemické barvení markery SOX10, GATA3, MYB a HMGA2, následně se u vybraných naskenovaných případů provedl popis a celkově se procentuálně zhodnotila pozitivita/negativita u jednotlivých nádorů.



## 8.1 Zpracování tkáně

Zásady pro odběr a zpracování materiálu se liší podle typu vzorku tkáně, tělesné tekutiny získané punkcí (punktát), spontánním vyloučením (moč, sputum) aspirací (kostní dřev) nebo stěrem či otiskem (otisková cytologie). Odběr tkáně provádí vždy lékař, který pak celý materiál odesílá patologovi. Větší vzorky (např. prsní excize, resekáty z oblasti hlavy a krku a tak podobně) je vhodné označit stehem, barevně tuší nebo jiným vhodným a viditelným materiálem. Tkáň by měla být po odebrání vložena do vhodné nádoby a ihned fixovaná, k tomuto účelu se nejčastěji využívá pufrovaný 10 % formol (tedy 4 % formaldehyd). Fixační tekutiny musí být vždy dostatečné množství, doporučeno je 10x větší množství vzorku, než je objem tkáně. Materiál určený k fixaci by měl být tekutinou zcela zakryt, aby se zabránilo procesu autolýzy a osidlování mikroorganismy, které by mohly tkáň zničit a znehodnotit pro následující histologické, imunohistochemické či molekulárně-genetické vyšetření. (4)

Po doručení materiálu je lékařem či zkušenou laborantkou proveden makropopis, který diktuje do diktafonu, makropopis je přikládán k preparátům odevzdaným odečítajícímu patologovi. Vždy se popíše velikost ve třech rozměrech, barva, konzistence a případný vztah k resekční linii. Konkrétní makropopis a typ příkrojení se děje s ohledem na jednotlivé orgány a tkáň. Drobné excize (do 10 mm) se zpracovávají kompletně. Pro velké excize platí všeobecně jeden řez na jeden centimetr tkáně/tumoru. Proces příkrojení probíhá ve speciálních boxech s odsavačem par, aby docházelo k menšímu vdechování toxických výparů, které jsou obsažené ve fixačních tekutinách. Tkáň připravenou patologem poté umístí laborant do perforovaných kazet, pro lepší průnik fixativa, dále do speciálních košů, v nichž probíhá další fáze fixace. (4)

## 8.2 Obecná fixace materiálu

Důležitou částí zpracování tkáně je jeho fixace, aby nedošlo ke znehodnocení materiálu. Hlavním cílem je zachovat strukturu buněk a tkání, která se co nejvíce podobá stavu, v němž se nacházejí zaživa. Fixace má zásadní význam pro imunohistochemii, jelikož správné rozpoznání povrchových antigenů závisí na jejich zachování v tkáňových řezech. Zastavením metabolických dějů nebo jejich zpomalení, stabilizací enzymů či proteinů lze dosáhnout několika způsoby. Mezi základní metody patří fixační roztoky a páry. Fixace může být provedena také zmrazením tkáně nebo působením mikrovlny, kdy nedochází ke ztrátě proteinů ve srovnání s metodou chemickou. (3)

Formaldehyd je nejpoužívanějším fixačním roztokem pro histochemické i imunohistochemické účely. Ve zředěných vodních roztocích je používán 4 % roztok formaldehydu, většina formaldehydu je ve formě metylenglykolu  $\text{CH}_2(\text{OH})_2$ . Formolová fixace zakrývá některé funkční skupiny, jež jsou potencionální součástí antigenní determinanty nebo epitopu hledaného antigenu, toto je nutno zohlednit zejména v imunohistochemii. Dalším druhem fixativ jsou koagulační fixativa, nejčastěji alkoholy, do této skupiny řadíme fixaci etanolem, metanolem, případně jejich roztoky (Carnoyova tekutina, Mathacarn, chloroform-metanol). Pro imunohistochemické metody je z této skupiny nejvíce používán methacarn, jenž uchovává reaktivitu antigenních determinant lépe než formol. Glykogen je aldehydy špatně fixovaný, alkoholová fixace zadrží v odebrané tkáni (nebo řezu) 70 % glykogenu, u formaldehydu je to pouze 12 %. Nejcitlivější na fixaci jsou enzymy, pro jejichž detekci je nutno vytvořit nefixované řezy z hluboce zmrazených bloků. (4)

### **8.3 Fixace pro imunohistochemické metody**

V současné době je možno využít rozsáhlé spektrum reagensů, které umožňují provést imunohistochemické reakce na běžných řezech, tedy fixovaných puřrovaným neutrálním roztokem formaldehydu a zalitých do parafinu. Reaktivitu antigenů v IHC reakci podle vztahu místa změn k reakčnímu místu antigenu mohou ovlivnit jejich změny během fixace. Výrobce doporučený způsob fixace je nutno vybrat pro jednotlivé imunohistochemické metody. Používanými jsou nejčastěji aldehydy, 4 % vodný roztok formaldehydu, který má schopnost udržet si pH i po přidání kyselého nebo zásaditého roztoku. Aldehydy reagují s aminoskupinami aminokyselin a za určitých podmínek ponechají enzymatickou a imunoglobulinovou aktivitu, která je potřebná při imunohistochemii, když prokazujeme lokalizaci příslušných aktivit ve tkáni. (3)

### **8.4 Optimalizace prezentace antigenů**

Pokud je tkáň dobře fixovaná, bývají původní tkáňové antigeny obtížněji prokazatelné, tyto vlivy fixace na tkáňové antigenní struktury je možno zmírnit. Důležité je pro další zpracování tkáň ošetřit, aby na povrchu nabízela antigeny primární protilátce a nebyly překryty molekulami, které neumožňují specifickou reakci. Navrácení antigenní vlastnosti materiálu v bločku zalitém do parafinu lze dosáhnout částečnou digescí (natrávením) molekul tkáň proteolytickými enzymy. Často používané proteázy pro imunohistochemické metody jsou trypsin, pepsin, pronáza a ficin, tyto látky mají omezený

rozsah účinnosti a narušují jen povrchové oblasti proteinů. Nevýhodou je, že po aplikaci těchto enzymů mají tkáňové řezy horší přilnavost na mikroskopická sklíčka. Ke zvýšení přilnavosti se používají speciální média, mezi která patří například APES, Elmerova želatina nebo poly-L-lysin). Další využívanou metodou pro obnovení antigenních struktur je působení mikrovln, kdy se uplatňuje tepelný efekt, jenž podporuje chemické reakce a stabilizuje proteiny. Za normálních okolností vysoká teplota negativně ovlivňuje tkáň a způsobuje denaturaci bílkovin, zde je však výjimka. Některé protilátky přímo od výrobce využívají mikrovln, jejich využití je také potřeba v případě, kdy výrobce zdůrazní účinek preparátu použitím speciálního detekčního systému nebo média k fixaci. Laboratoře mohou provádět testování protilátek na vzorcích, kde porovnávají účinnost mikrovln nebo digesce. Pro určité látky, například estrogenní receptor, se pro obnovení antigenu používá povahení řezu v citrátovém pufru v mikrovlnné troubě. Při pohlčení mikrovln dochází k ustálení uspořádání antigenu, tato metoda je pro některé IHC metody lepší variantou. (3)

## **8.5 Blokace endogenní aktivit enzymů**

K průkazu komplexu antigen-protilátka se používají protilátky značené enzymem, nejčastěji to jsou alkalická fosfatáza nebo peroxidáza, tyto enzymy se ale vyskytují v přirozené formě v tkáních odebraných na vyšetření a tudíž mohou narušit vyhodnocení a vytvářet falešně pozitivní reakci, je nutné zablokovat tyto enzymy, respektive jejich aktivitu. Pokud k průkazu používáme peroxidázu, je nutné použít 1-3 % roztok  $H_2O_2$  v metanolu nebo destilované vodě po dobu 20-30 minut, u alkalické fosfatázy používáme v závěrečném médiu lavamizol. Při blokaci avidinu a biotinu používáme blok s 0,1-0,01 % avidinem ve fosfátovém pufru podobu 20 minut. K falešně pozitivním výsledkům nemusí nutně docházet pouze z důvodu endogenních enzymů, ale způsobuje je celá řada faktorů, mezi nejčastější patří kontaminace řezů nebo reagentů cizorodými látkami, reakce protilátek s podobnými epitopy na různých antigenech, nespecifická reakce primární protilátky s pojivovými strukturami nebo interakce terciálních protilátek s Fc receptory imunoglobulinů přítomných ve tkáni, poškození řezu při zpracování, které vede ke špatné reaktivitě pozadí. Vysycením tkáně bílkoviny lze předcházet nespecifickému vychytávání specifické protilátky, používá se například nespecifické sérum nebo mléko. (3)

## 8.6 Krájení histologických řezů

Tkáň se krájí pomocí mikrotomu na požadovanou tloušťku, nejlépe 5 $\mu$ m, kdy se zachytí jedna vrstva buněk. Takto nakrájené řezy je potřeba přenést na vodní hladinu a natáhnout na podložní sklíčko opatřené lepivým prostředkem. U imunohistochemie je nutné použít takový prostředek, který je účinný, trvanlivý a nezpůsobuje nespecifickou reakci. Pro lepší orientaci v řezu při imunohistochemické technice využíváme přehledných typů histologických barvení (dobarvení jader) pro lokalizaci pozitivní reakce k okolním strukturám v řezu. (3)

## 8.7 Kontrola výsledků

Faktory působící falešně pozitivní reakci mohou ovlivnit výsledek imunohistochemického vyšetření, snažíme se o senzitivitu, specificitu. Pro IHC se zařazují negativní a pozitivní kontroly. Negativní kontrolu u IHC reakce má takový preparát, který nemá prokazovanou protilátku (antigen), pokud jsme vynechali reakci s primární protilátkou, ale zároveň obsahuje prokazovaný antigen. Pro kontrolu by se měla otestovat i účinnost blokování endogenní aktivity enzymů (peroxidáza) a nespecifická zkřížená reaktivita detekčního systému. K pozitivní kontrole používáme preparát, o němž víme, že obsahuje prokazovaný antigen. Zpravidla se kontroly umísťují na stejné podložní sklo jako preparát. (3)

### Obrázek 3 Vnější pozitivní kontrola u tkáně



Zdroj: vlastní

Zde je na obrázku větší vzorek tkáně, v němž detekujeme příslušnou protilátku (konkrétně SOX10). Menší řez je pozitivní vnější kontrola.

## 8.8 Barvení hematoxylin-eosin

Hematoxylin a eosin je nejčastěji používanou histologickou technikou. Je automatizovaný a jasně demonstuje různé struktury tkání. Hematoxylin barví buněčná jádra modro-černě, přičemž zachovává jaderné detaily, zatímco eosin obarví buněčnou cytoplazmu a nejvíce pojivová tkáňová vlákna v různých odstínech růžové, oranžové a červené. V dnešních laboratořích se běžně používají automatizované barvicí stroje a komerčně připravené roztoky hematoxylinu a eosinu pro běžné barvení. (27)

### 8.8.1 Eosin

Eosin je fluorescenční xanthenové barvivo, které se váže na soli s eosinofilními sloučeninami obsahujícími pozitivní náboj. Je to nejvhodnější barva, kterou lze kombinovat s hematoxylinem, aby se prokázala obecná histologická struktura tkání. Eosin má schopnost rozlišovat mezi cytoplazmou různých typů buněk, vlákny pojivových tkání a matric, barvením těchto struktur do různých odstínů červené a růžové. Komerčně je k dispozici několik typů eosinu. Nejrozšířenější je eosin Y, který je rozpustný ve vodě a alkoholu. Jako cytoplazmatické barvivo se obvykle používá ve formě 0,5 % nebo 1 % roztok v destilované vodě s přídavkem krystalu thymolu. Barvení eosinem může být po fixaci rtuť intenzivní a mohou se vyskytnout obtíže při získávání adekvátní diferenciaci. (27)

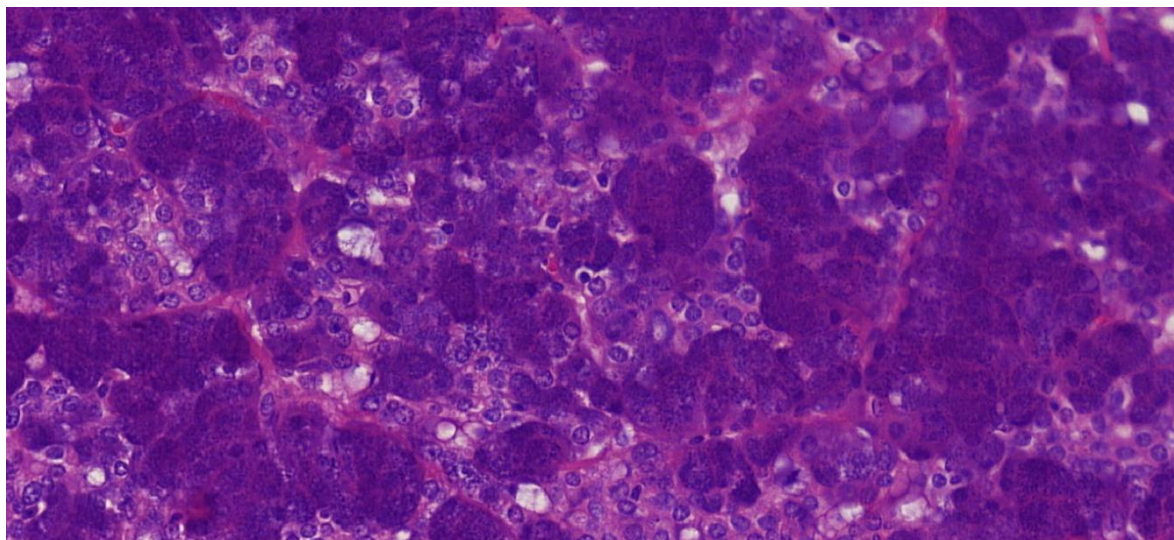
### 8.8.2 Hematoxylin

Hematoxylin je pravděpodobně nejběžnějším jaderným barvivem. K dispozici jsou různé typy, které jsou tříděné podle použitého barviva a podle toho, zda jsou progresivní nebo regresivní. Všechny z nich dodávají buněčným jádrům modrou barvu různého odstínu a intenzity. Hematoxylin samotný je aniontové barvivo, a proto nemá přílišnou afinitu k DNA. U progresivních hematoxylinů (jako Mayer, Carazzi a Gill) jsou tkáně nebo buňky inkubovány v hematoxylinu, dokud není dosaženo požadovaného stupně jaderného zbarvení. Pro srovnání, v případě regresivních hematoxylinů (Harissův) se tkáně nebo buňky inkubují až do dosažení určitého stupně nadměrného zbarvení, a poté se část přebytečného hematoxylinu odstraní ponořením do kyselého roztoku. Tento proces se nazývá diferenciaci. (28)

Progresivní hematoxyliny jsou proto vhodnější pro použití než regresivní, kvůli absenci diferenciačního kroku a výsledné kompatibilitě s alkoholově rozpustnými enzymovými / substrátovými produkty. Ať už je progresivní nebo regresivní, jakmile je

dosaženo požadované úrovně jaderného zbarvení, jsou hematoxyliny „namodralé“. Při kyselém pH hematoxyliny barví jádra červeně. Jakmile je však hematoxylin vystaven alkalickému prostředí, změní jeho modrou barvu. (28)

**Obrázek 4 Barvení HE v acinickém karcinomu**



Zdroj: vlastní

## 8.9 Protilátky použité při imunohistochemii

**Tabulka č. 1 Protilátky použité při studii**

Protilátka	Klon	Roztok	Čas znovuzískání antigenu	Zdroj
GATA3	L50-823	1:200	CC1/52 min.	BioCareMedical
SOX10	polyklonální	1:100	CC1/64 min.	Cell Marque
HMGA2	D1A7	1:100	CC1/52 min.	Cell Signaling
MYB	EP769Y	1:100	CC1/64 min.	Ab Cam

Zdroj: vlastní

Všechny použité primární protilátky jsou shrnuty v Tabulce 1, kde je vždy uvedeno, o jaký klon se jedná, ředění, čas obnovení antigenu a firmu, která danou protilátku dodává. Navázané protilátky byly vizualizovány pomocí ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche) a ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Roche). Sklíčka byla kontrastně barvena Mayerovým hematoxylinem. Byly použity vhodné pozitivní a negativní kontroly.

Pro imunohistochemické studie byly vytvořeny řezy o tloušťce 4  $\mu\text{m}$  z parafinových bloků a umístěny na pozitivně nabitá podložní sklíčka (TOMO, Matsunami Glass IND, Japonsko). Řezy byly zpracovány na BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), deparafinizovány a poté podrobeny tepelně indukovanému získávání epitopů ponořením do roztoku CC1 (EDTA pufr) při pH 8,6 a 95 °C.

## 8.10 SOX10

Protilátka je určena pro diagnostiku in vitro. SOX10 od firmy Cell Marque je použita k identifikaci přítomnosti souvisejících antigenů imunohistochemickými metodami pomocí světelného mikroskopu v tkáňových řezech, které jsou fixované fomalínem a zalité do parafinových bloků. Tato protilátka umožňuje ve spojení s detekčním systémem (streptavidin, biotin) a IHC barvením vizualizaci antigenů pomocí sekvenční aplikace specifické protilátky (primární) proti antigenu, dále sekundární (spojovací) protilátky proti primární protilátce, komplexu enzymů a chromogenního substrátu (musí dojít k promývání). Používá se také polymerní detekční systém bez biotinu. K viditelnému reakčnímu produktu v místě antigenu dojde enzymatickou aktivací chromogenu. Vzorek se může doplnkově barvit a překrýt krycím sklem. Výsledek se odečítá pod světelným mikroskopem a používá se k diferenciatní diagnostice patofyziologických procesů, které mohou a zároveň nemusí souviset s konkrétním antigenem. Přípravky s předtím zředěnou protilátkou jsou optimálně zředěné pro použití s detekčními soupravami Cell Marque, použít se také mohou s rozsáhlou řadou detekčních souprav, které nabízejí jiní výrobci.

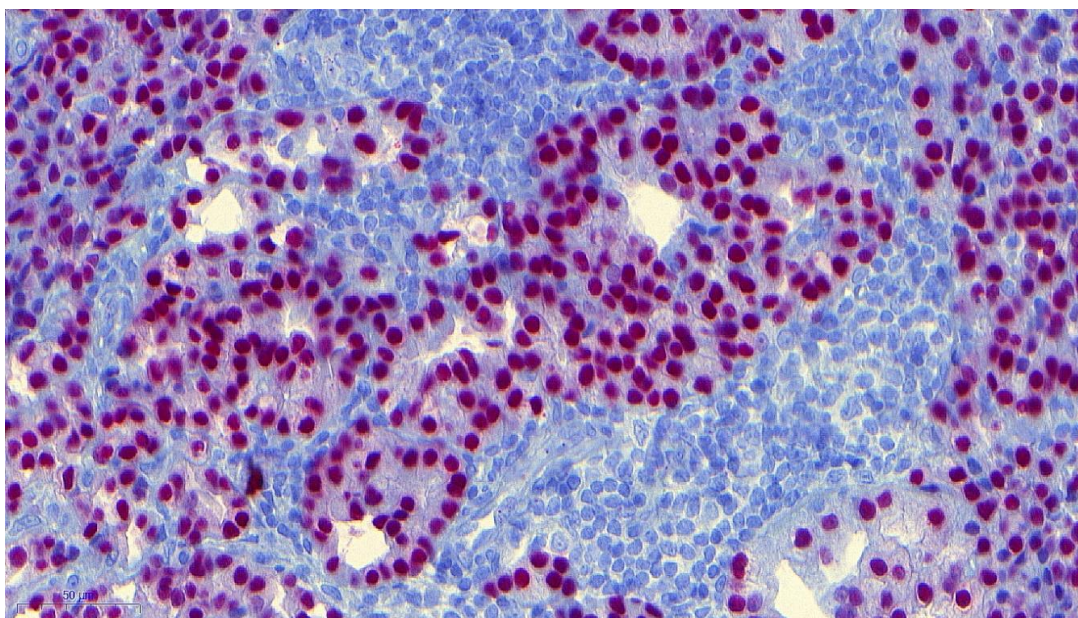
(29)

Tkáňový blok je nejprve nutné nařezat na tloušťku 3 $\mu\text{m}$  a umístit na pozitivně nabitě sklíčko, kde se suší nejméně 2 hodiny při teplotě 58 až 60 °C  $\pm$  5 °C. Předředěný přípravek SOX10 (383A-77, 383A-78) obsahuje činidlo připravené k použití. Rozsah koncentrace imunoglobulinů je v tomto přípravku 5-10  $\mu\text{g/ml}$ . Přípravek s koncentrovanou protilátkou (383A-74, 383A-75, 383A-76) obsahuje koncentrované činidlo, předředěné i

koncentrované formy této protilátky jsou zředěny v tlumivém roztoku Tris, pH 7,3-7,7, s 1 % BSA a <0,1 % azidem sodným, rozsah koncentrace Ig v tomto roztoku je 125-375 µg/ml. Doporučené ředění je 1:25 až 1:100, používají se imunoglobuliny IgG. (29)

Postup barvicího protokolu pro SOX10 protilátku (série 383A) začíná vymytím parafinu sestupnou řadou alkoholů, rehydratací a obnažením epitopů za použití elektrického tlakového hrnce, po dokončení 5krát oplach sklička s řezem destilovanou nebo deionizovanou vodou. Při použití detekčního systému horseradish peroxidase (křenová peroxidáza) se umístí skla do peroxidového bloku na 10 minut a oplach, pokud používáme jiný detekční systém (například alkalickou fosfatázu) tento krok se vynechá. Po aplikaci protilátky probíhá inkubace 10-30 minut, poté je nutno materiál opláchnout. Následně je na 10-30 minut naneseo zesilovací činidlo králičí/myší HiDef Detection a opět proplach. Po naneseu polymerového detektoru probíhá 10 minut inkubace, proplach a dále aplikace velkého množství chromogenu s inkubací 1-10 minut a opět proplach. (29)

#### **Obrázek 5 Jaderná pozitivita SOX10 v acinickém karcinomu**



Zdroj: vlastní

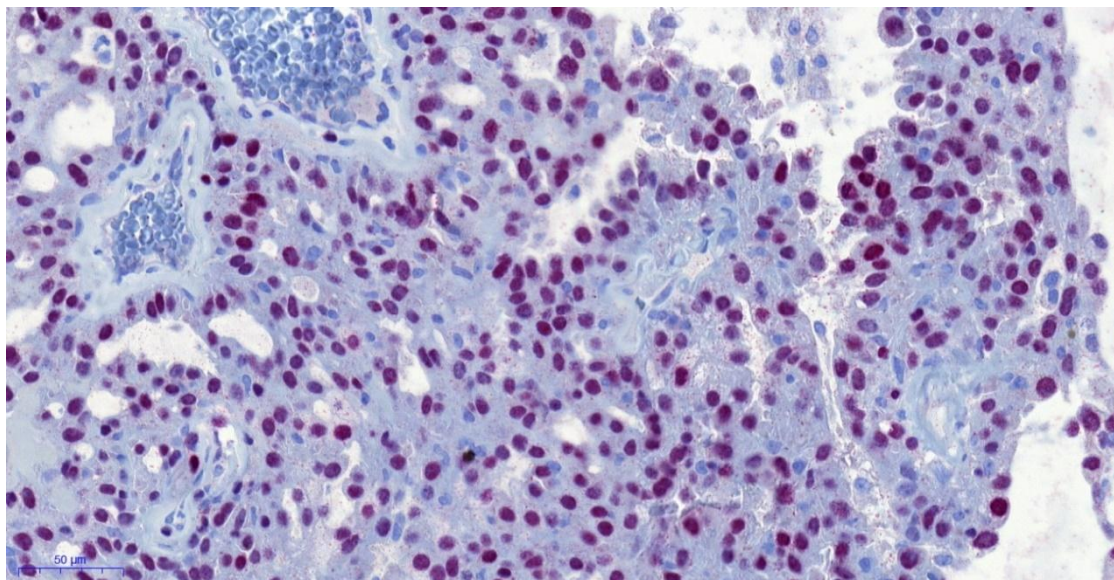
### **8.11 GATA3**

GATA3 je myší monoklonální protilátka, klon L50-823 s isotypem IgG1/kappa. Epitopem je zde peptid mezi transaktivační a DNA-vázající doménou GATA3. GATA3 je jaderný marker, který se používá se u formalínem fixovaných a v parafínu zalitých bloků. Postup barvení začíná blokací proteinů v tkáňových řezech pomocí 10-ti minutové



inkubace materiálu při pokojové teplotě s univerzálními blokujícími reagensii (Biocare's Background Punisher). Po přidání primární protilátky dochází k její inkubaci po dobu 30 minut, následně se vloží do roztoku sekundární sonda a polymer a s každým se materiál inkubuje 10 minut. Poté dochází ke smísení s chromogenem, s nímž se inkubuje dalších 5 minut. Jako kontrastní barva se používá hematoxylin, dále oplach deionizovanou vodou. (30)

#### **Obrázek 6 Jaderná pozitivita GATA3 v sekrečním karcinomu**

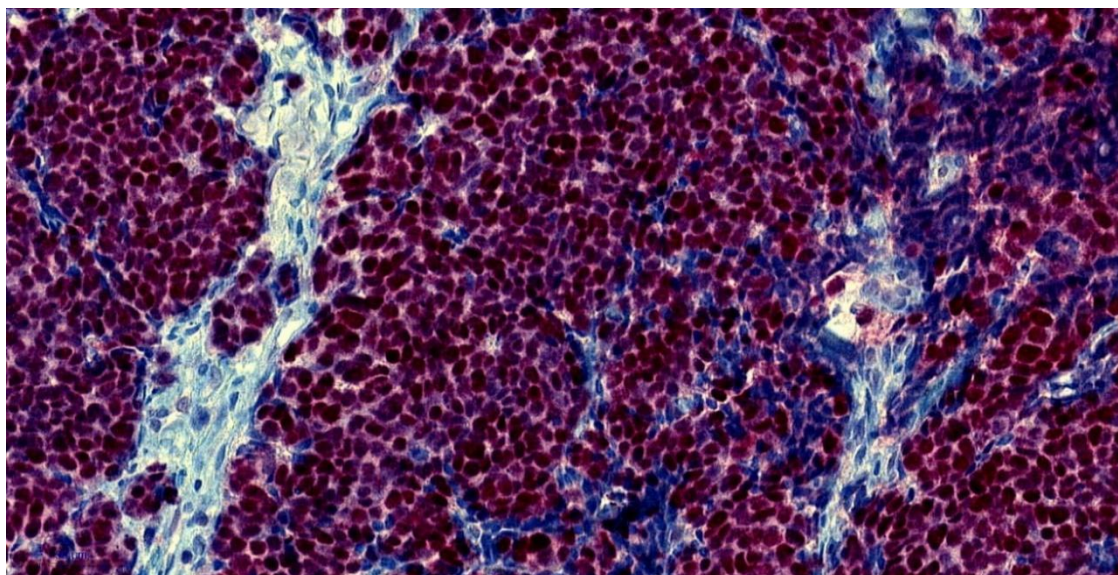


Zdroj: vlastní

#### **8.12 MYB**

Jedná se o monoklonální králičí protilátku (EP769Y). Proces barvení začíná inkubací buněk, které probíhá v 1 % roztoku bovinního sérového albuminu a glycinu ve fosfátovém pufru po dobu 30 minut až do doby zablokování nespecifických vazeb protilátek. Následně se tkáň 1 hodinu inkubuje se zředěnou protilátkou ve vlhké komůrce při pokojové teplotě či přes noc při 4 °C. Poté je nutno roztok dekantovat a promýt buňky 3x (á 5 minut každé promytí) po dobu 5 minut. Poté se buňky po dobu jedné hodiny inkubují ve tmě se sekundární protilátkou v 1 % bovinním sérovém albuminu při pokojové teplotě a následně se dekantuje roztok se sekundární protilátkou a opět 3x proplach (á 5 minut každé promytí). (31)

**Obrázek 7** Jaderná pozitivita MYB v High-grade adenoidně cystickém karcinomu

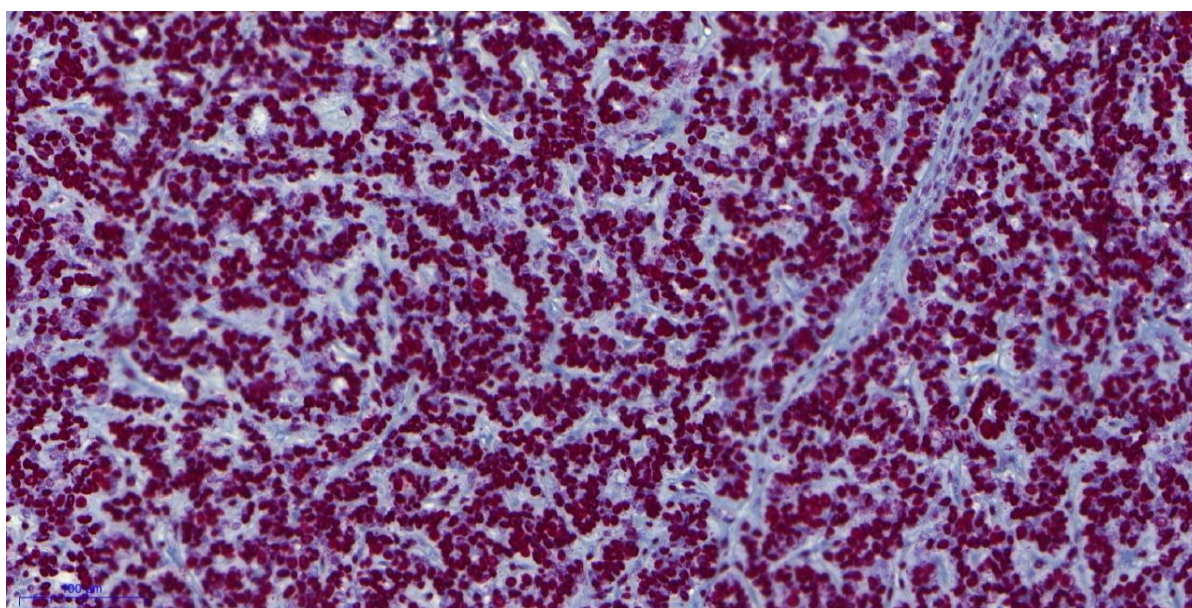


Zdroj: vlastní

### **8.13 HMGA2**

HMGA2 (D1A7) je králičí monoklonální protilátka. Blokace vzorku v blokovacím pufru po dobu 60 minut, aspirace blokovacího roztoku a aplikace primární protilátky s následnou inkubací přes noc při 4 °C. Následující den se materiál 3x propláchne ve fosfátovém pufru po dobu 5 minut. (32)

**Obrázek 8** Jaderná pozitivita HMGA2 v pleomorfním adenomu



Zdroj: vlastní

## 9 VÝSLEDKY IMUNOHISTOCHEMIE U NÁDORŮ HLAVY A KRKU

### 9.1 Benigní nádory

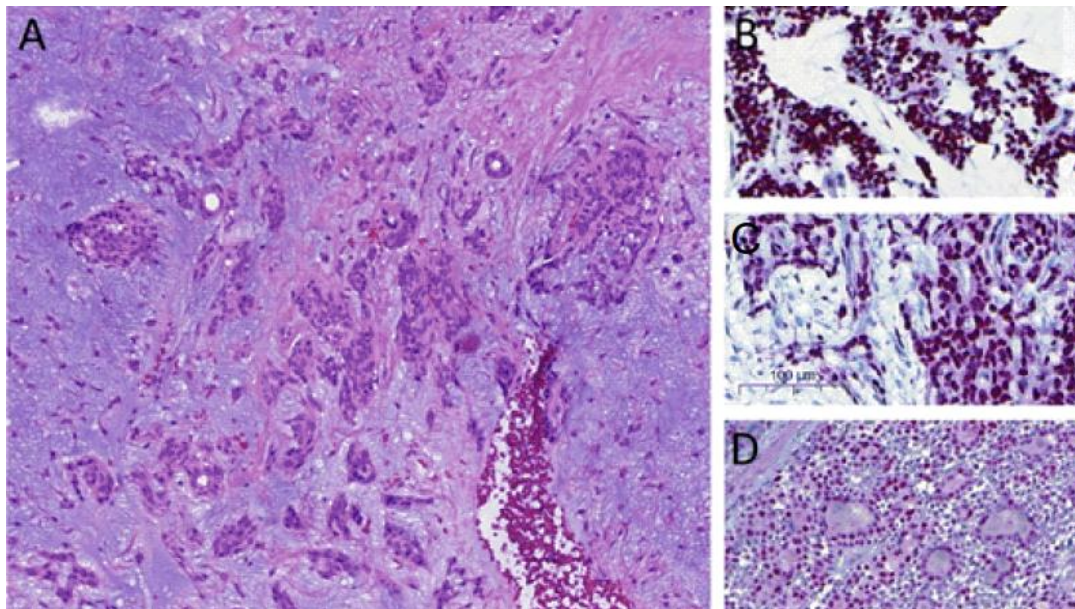
Tabulka č. 2 Výsledky IHC u benigních nádorů

Benigní nádory									
Název nádoru	Počet případů	SOX10		GATA3		MYB		HMGA2	
		P	N	P	N	P	N	P	N
Pleomorfní adenom	10	10	0	2	8	0	10	3	7
Myoepiteliom	10	10	0	0	10	0	10	3	7
Bazocelulární adenom	10	10	0	4	6	2	8	-	-
Warthinův tumor	7	0	7	1	6	0	7	-	-
Onkocytom	10	1	9	1	9	0	10	-	-

Zdroj: vlastní

U benigních nádorů slinných žláz lze vyčíst, že marker SOX10 je pozitivní u pleomorfního adenomu, myoepiteliomu a bazocelulárního adenomu. Další markery (GATA3, MYB) byly u těchto nádorů z velké míry negativní, kromě bazocelulárního adenomu, kde byly i případy positivity. HMGA2 nebyl použit u všech nádorů, na použitých typech vycházel spíše negativní. U Warthinova tumoru byla všechna imunohistochemická barvení negativní, podobné to bylo i u onkocytomu, u těchto nádorů nebyl použit HMGA2.

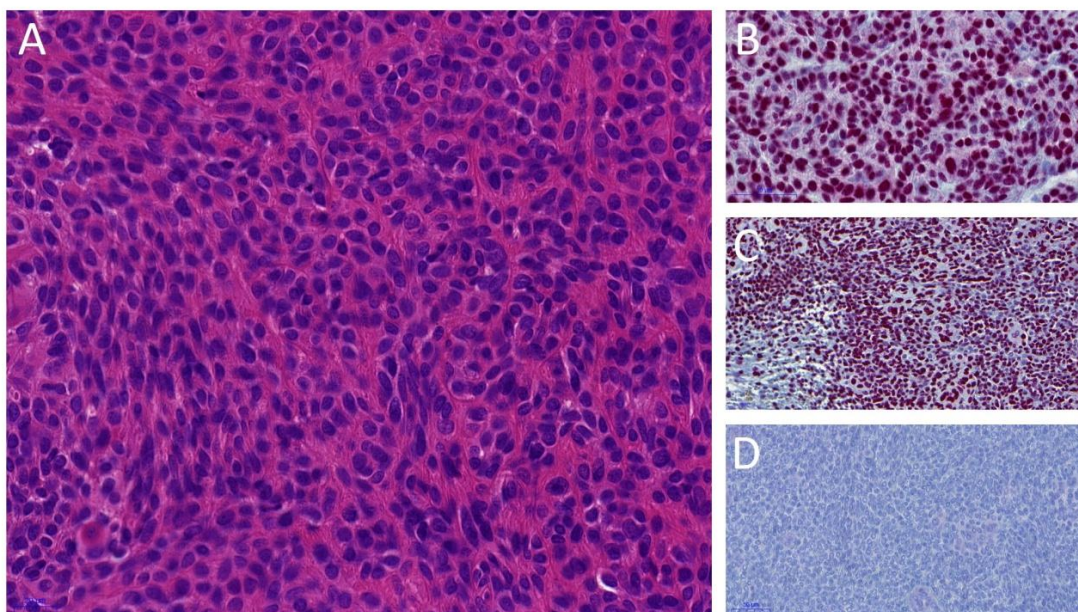
### Obrázek 9 IHC v pleomorfním adenomu



Zdroj: vlastní

Na obrázku A benigní pleomorfní adenom s převahou chondromyxoidního stromatu a s ostrůvky myoepiteliálních větvenitých buněk. Na obrázku B a C vidíme difúzní jadernou pozitivitu s markery SOX10 (B) a HMGA2 (C). Na obrázku D lze vidět jadernou pozitivitu markeru GATA3 v myoepiteliální variantě benigního pleomorfního adenomu, zejména kolem duktálních formací.

### Obrázek 10 IHC v myoepiteliomu



Zdroj: vlastní

Na obrázku A myoepiteliom tvořený solidně uspořádanými vřetenitými buňkami, místy jemným fibrovaskulárním stromatem. Duktální formace ani chondromyxoidní stroma nejsou přítomné. Difúzní jaderná pozitivita s markery SOX10 je patrná na obrázku B, totéž pro barvení HMGA2 na obrázku C. Kompletně negativní GATA3 v nádorových buňkách je na obrázku D.

## 9.2 Maligní nádory

Tabulka č. 3 Výsledky IHC u maligních nádorů

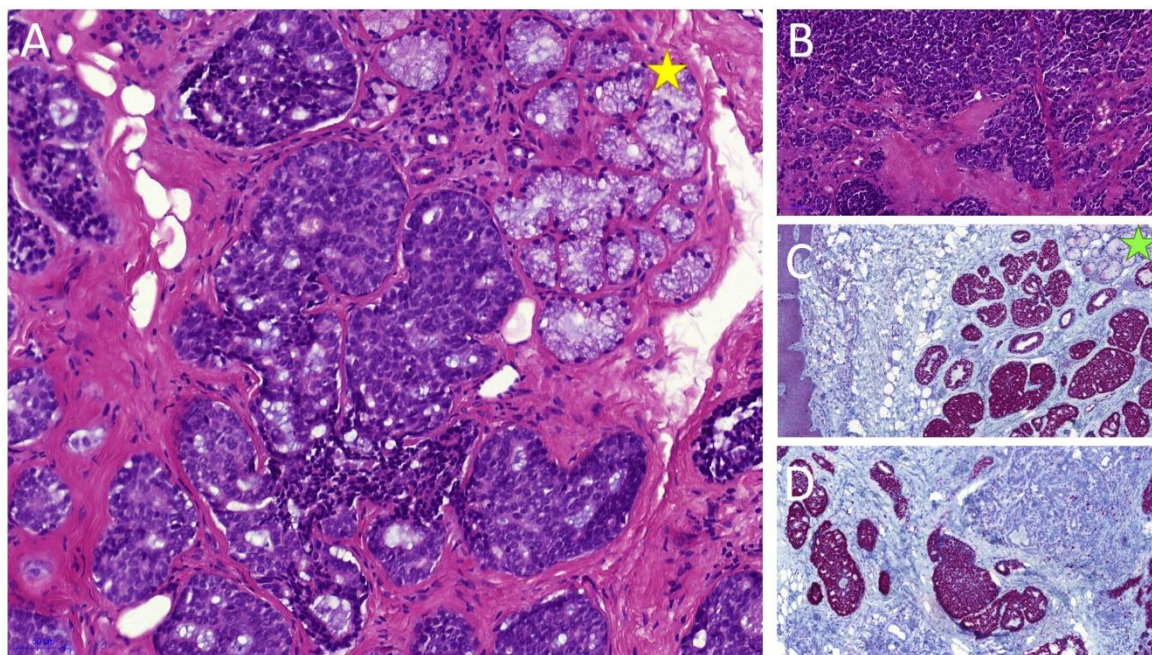
Maligní nádory									
Název nádoru	Počet případů	SOX10		GATA3		MYB		HMGA2	
		P	N	P	N	P	N	P	N
Acinický karcinom	10	10	0	2	8	0	10	-	-
Mukoepidermoidní karcinom	10	0	10	0	10	0	10	-	-
Adenoidně cystický karcinom	10	10	0	0	10	8	2	-	-
Polymorfní LG adenokarcinom	8	8	0	3	5	0	10	-	-
Epiteliální-myoepiteliální karcinom	10	10	0	7	3	0	10	-	-
Světlobuněčný karcinom	10	2	8	2	8	0	10	-	-
Salivární duktální karcinom	10	0	10	6	4	0	10	0	10
Myoepiteliální karcinom	10	6	4	0	10	1	9	0	10
Sekreční karcinom mamárního typu	10	9	1	10	0	0	10	-	-
Kribriiformní adenokarcinom	9	8	1	1	8	0	9	-	-
Bazocelulární adenokarcinom	9	9	0	0	9	3	6	-	-
Karcinom ex pleomorfní adenom	9	8	1	6	3	0	9	1	8

Zdroj: vlastní

Marker SOX10 byl pozitivní u většiny nádorů, pouze u třech vycházel negativně, a to u mukoepidermoidního karcinomu, světlobuněčného karcinomu a u salivárního duktálního karcinomu. Marker GATA3 vycházel naopak u většiny negativně, kromě epiteliálního-myoepiteliálního karcinomu, sekrečního karcinomu mamárního typu a částečně pozitivně u salivárního duktálního karcinomu a karcinomu ex PA, u ostatních nádorů tento marker vycházel negativně. Marker MYB, kromě adenoidně cystického karcinomu, vycházel opět u většiny nádorů negativně. HMGA2 byl použit pouze u tří typů

(salivární duktální karcinom a myoepiteliální karcinom a karcinomu ex PA) s negativním výsledkem.

### Obrázek 11 IHC v adenoidně cystickém karcinomu

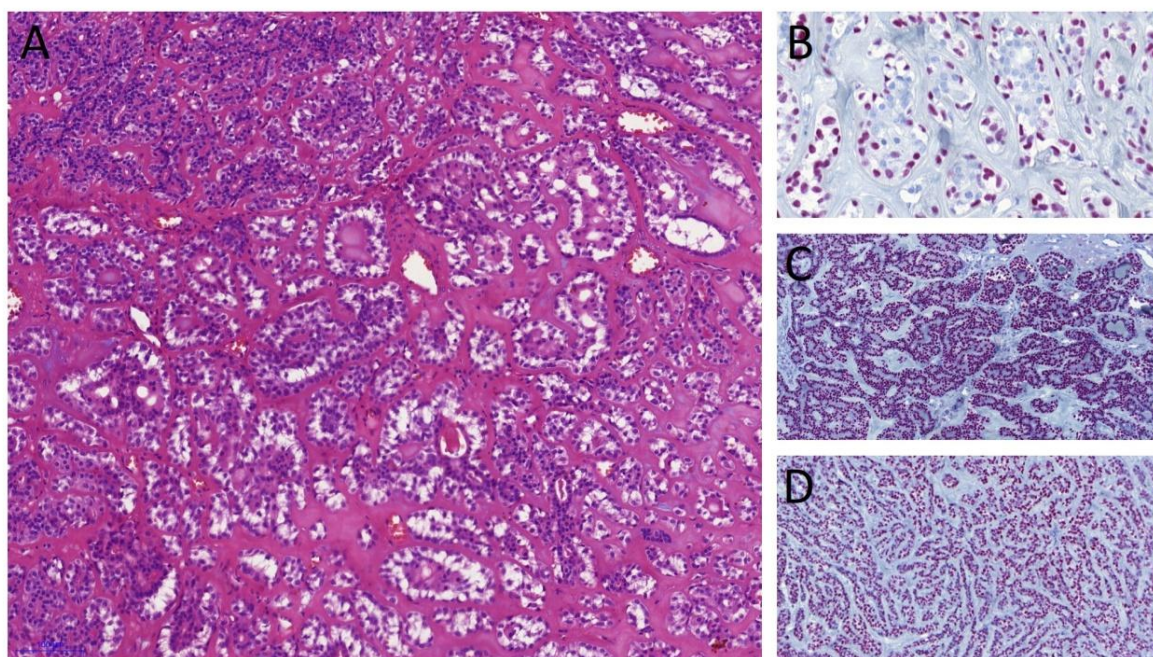


Zdroj: vlastní

Na obrázku A low-grade oblast adeonoidně cystického karcinomu tvořícího kribiformní a solidně tubulární struktury. Na periferii s reziduálními aciny jsou malé mucinózní slinné žlázy (žlutá hvězda). Na obrázku B high-grade adenoidně cystický karcinom, morfologicky napodobující „nádory z malých modrých kulatých buněk“ se zcela solidním uspořádáním a high-grade jadernými atypiami.

SOX10 difúzní pozitivita na obrázku C, společně s negativní kontrolou ve vrstevnatém dlaždicovém epitelu (levá část obrázku) a vnitřní pozitivní kontrolou v reziduálních duktech malé mucinózní slinné žlázy (zelená hvězda). Na obrázku D je k vidění difúzní jaderná pozitivita MYB markeru svědčící o možné přítomnosti rearanže genu MYB, která byla v tomto případě potvrzena metodou sekvenování nové generace s nálezem genové fúze MYB-NFIB.

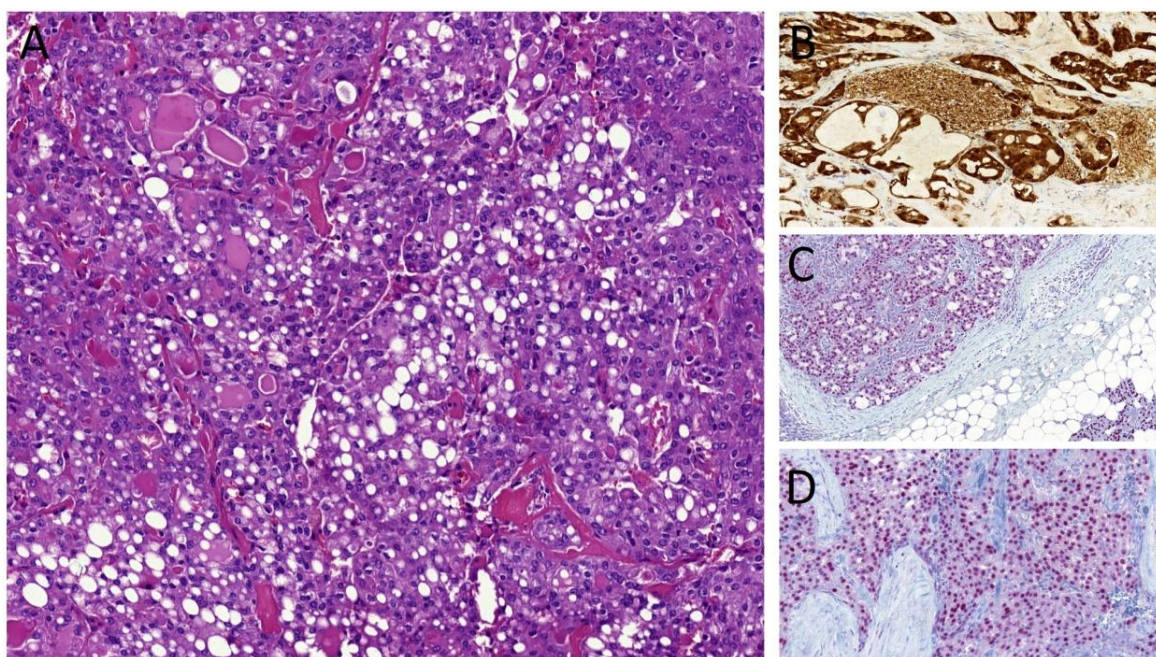
## Obrázek 12 IHC v epiteliálně-myoepiteliálním karcinomu



Zdroj: vlastní

Na obrázku A epiteliálně-myoepiteliální karcinom, pro který je charakteristická bifázická morfolgie tvořená vnitřní vrstvou malých luminálních buněk s eosinofilní cytoplasmou a vnější vrstvou větších abluminálních buněk s vodojasnou cytoplasmou. Příležitostně lze uvnitř lumin zastihnout hustý eosinofilní materiál. Žlázové formace jsou odděleny silně hyalinizovaným stromatem. Bifázický způsob růstu potvrzuje jednak barvení p63 (myoepiteliální marker) na obrázku B a jednak SOX10 na obrázku C. GATA3 vykazuje též difúzní jadernou pozitivitu v nádorových buňkách na obrázku D.

**Obrázek 13 IHC v sekrečním karcinomu mamárního typu**

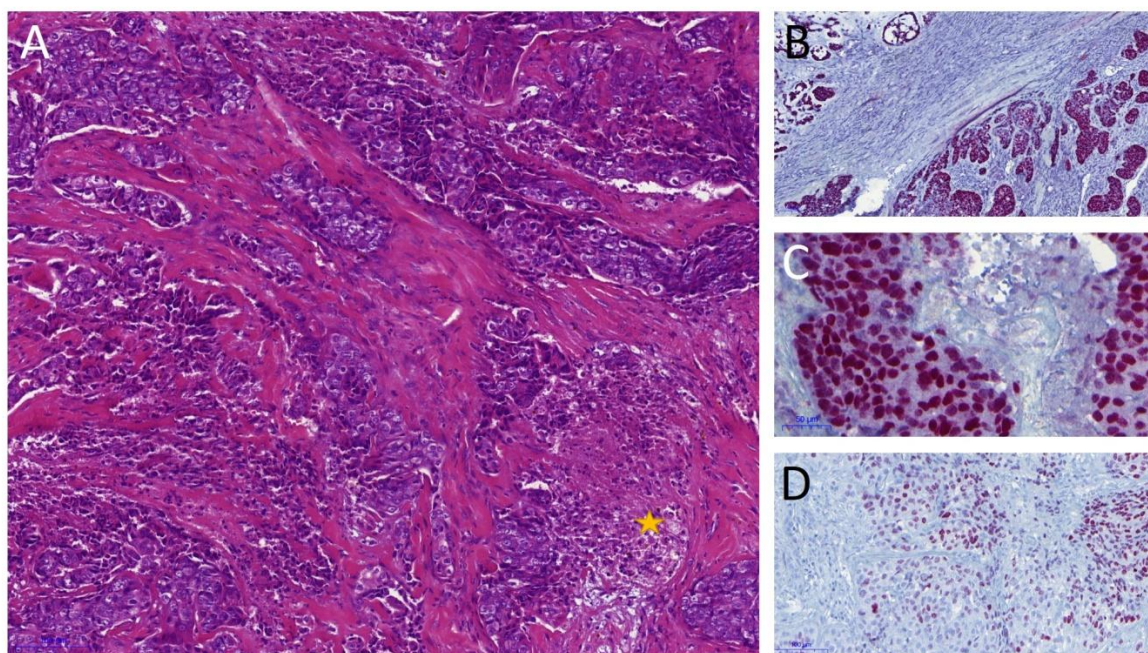


Zdroj: vlastní

Na obrázku A sekreční karcinom tvořící solidně až mikrocysticky uspořádané oblasti s eosinofilním materiálem. Nádorové buňky jsou monomorfní, střední velikosti, s low-grade jádry a eosinofilní světlou, místy vakuolizovanou, cytoplazmou. Obrázek B high-grade sekreční karcinom se zastiženou perineurální invazí zvýrazněnou imunohistochemickým barvením S100 protein. Na obrázku C difúzní SOX10 pozitivita s pozitivní vnitřní kontrolou zachycenou ve zdravé tkáni slinné žlázy pravém dolním rohu obrázku. Poslední obrázek D zobrazuje GATA3 nukleární pozitivitu.



## Obrázek 14 IHC v karcinomu ex pleomorfním adenomu



Zdroj: vlastní

Na obrázku A je infiltrativně rostoucí špatně diferenciovaný karcinom, solidně trabekulární a tubulární struktury vzhledu salivárního duktálního karcinomu s rozsáhlými ložisky nekróz (žlutá hvězda), výraznou hyalinizací až desmoplázií stromatu. Nádorové buňky vykazují značné cytologické atypie, včetně jaderné pleomorfie, hyperchromázie, zvýrazněných jadérek a nepravidelností jaderné membrány. Na periferii léze byly zachyceny reziduální struktury pleomorfního adenomu, ze kterého tento špatně diferenciovaný high-grade karcinom vzniká. Na obrázku B je difúzní jaderná pozitivita SOX10 v reziduálních strukturách pleomorfního adenomu (levý horní roh) a tatáž silná pozitivita v nádorových buňkách karcinomu (pravý dolní roh). Silná jaderná pozitivita GATA3 na obrázku C v nádorových buňkách, barvení zvýrazňuje jadernou pleomorfii. Fokální HMGA2 jaderná pozitivita byla zastižena v jednom případě karcinomu ex pleomorfního adenomu na obrázku D.

## 10 DISKUZE

Imunohistochemické markery rozpoznávají histogenetický původ jednotlivých nádorů, a to optimálně v kontextu molekulárně – genetického vyšetření, pokud je dostupné. Celkově se vyšetřilo 115 případů u 12 typů maligních nádorů a 47 případů u 5 typů benigních nádorů, použity byly imunohistochemické markery SOX10, GATA3, MYB a HMGA2.

SOX10 marker je v normální slinné žláze detekován v buňkách acinů a v lumenálních i ablumenálních buňkách vmezeřených vývodů a tímto je exprimován v nádorech, které jsou histogeneticky podobné výše popsaným strukturám. Můžeme tak říci, že SOX10 marker rozděluje salivární tumory na dvě skupiny. Jednak SOX10 pozitivní skupina, která je představována acinickým karcinomem, adenoidně cystickým karcinomem, polymorfním low-grade adenokarcinomem, epiteliálně-myoepiteliálním karcinomem, myoepiteliálním karcinomem, sekrečním karcinomem (mamárního typu), kribriformním adenokarcinomem, bazocelulárním karcinomem, karcinomem ex pleomorfním adenomem především pokud má rysy myoepiteliálního karcinomu, myoepiteliomem a pleomorfním adenomem. A druhou skupinu představují SOX10 negativní nádory: salivární duktální karcinom, světlobuněčný karcinom, mukoepidermoidní karcinom a z benigních dále Warthinův tumor a onkocytom. (14)

Zarážející je ovšem SOX10 pozitivita v jednom případě „onkocytomu“. V tomto typu nádoru nebyl SOX10 marker doposud v literatuře popisovaný jako pozitivní. Při následném vyšetření se ukázalo, že tento konkrétní případ „onkocytomu“ dále exprimoval S100 protein a PLAG1. Navíc molekulárně genetické vyšetření za použití fluorescenční in situ hybridizace (FISH) prokázalo zlom v genu PLAG1, což vedlo k následné reklasifikaci „onkocytomu“ v onkocytární variantu pleomorfního adenomu či myoepiteliomu. Nelze s jistotou potvrdit, která diagnóza je správná, a to z toho důvodu, že myoepiteliom a pleomorfní adenom mají překrývající se diagnostická kritéria a některými autory jsou brány jako nádory ze stejného spektra myoepiteliálních lézí. Přežívání pacientů se SOX10 negativními nádory je dle klinickopatologických studií horší než u pacientů se SOX10 pozitivními nádory. (14)

Exprese GATA3 je popisována zejména ve tkáni prsu a uropoetického traktu. Právě pro stejný ektodermální původ a histologickou podobnost prsní a slinné žlázy, byl tento marker testován i v širokém spektru nádorů salivárního původu. Naprosto nejvyšší četnosti pozitivních případů dosahoval GATA3 v sekrečním karcinomu (mamárního typu) a v salivárním duktálním karcinomu. Pozadí tkáně nepostížené slinné žlázy vykazovalo obvyklou slabou pozitivitu jak v acinech, tak v duktech. GATA3 marker není omezený jen na tumory prsu a uropoetického traktu, ale je exprimován napříč různými typy nádorů slinných žláz. Salivární původ by měl být zvážen při nálezů GATA3 pozitivních karcinomů, zejména v oblastech hlavy a krku i přesto, že GATA3 není nápomocný v diferenciální diagnóze mezi primárními nádory slinných žláz a metastázou karcinomu prsu. Ale jeho využití je využitelné zejména v subtypizování salivárních nádorů, jmenovitě salivárního duktálního karcinomu a sekrečního karcinomu (mamárního typu). (15)

Exprese markeru MYB může být nukleární a cytoplazmatická, avšak pouze nukleární se bere jako správně pozitivní. V parenchymu zdravé slinné žlázy jeho exprese popisována není. (33)

Nejsignifikantnější exprese MYB markeru byla zastižena v AdK (8/10). V ostatních typech byla zastoupena minoritně a především fokálně, a to jak v jednom pozitivním myoepiteliálním karcinomu tak ve dvou bazocelulárních karcinomech. Třetí případ bazocelulárního karcinomu, s pozitivním MYB markerem, vykazoval bifazickou morfolologii a spíše připomínal low-grade adenokarcinom. Z benigních nádorů se MYB exprimoval ve dvou případech bazocelulárního adenomu, ovšem velmi slabě, fokálně a převážně cytoplazmaticky s ojediněle detekovanou jadernou pozitivitou.

HMGA2 je vysoce specifickým (96,2 %), ale nízké senzitivním (29,8 %) markerem, využívaným v rozlišení pleomorfního adenomu, myoepiteliomu a karcinomu ex pleomorfního adenomu od jejich imitátorů. Jmenované nádory jsou často asociované s rearanžemi HMGA2 lokusu. (34)

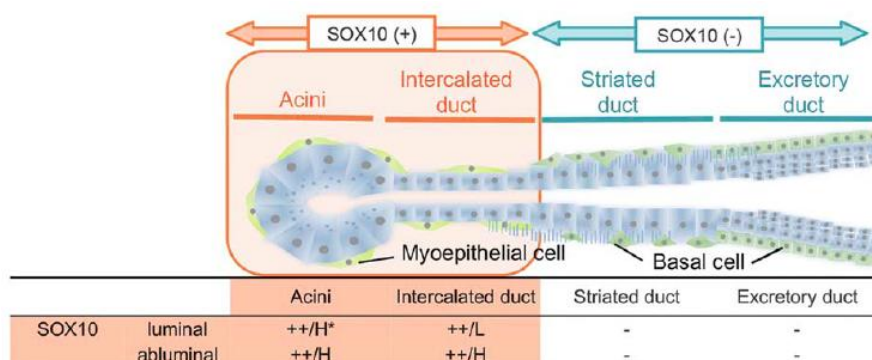
Shrňme-li získané poznatky, SOX10 je nápomocný k vyloučení nádorů pocházejících z exkrečních vývodů (salivární duktální karcinom, mukoepidermoidní karcinom). GATA3 je vhodný pro subtypizaci primárních salivárních nádorů zejména salivárního duktálního karcinomu a sekrečního karcinomu (mamárního typu). MYB je vhodný pro diagnostiku adenoidně cystického karcinomu, zvláště v případech, kdy

histologický nález je nejistý a může být podpořen molekulárně-genetickým vyšetřením hledající genovou fúzi MYB-NFIB. HMGA2, obdobně jako PLAG1, je jaderný marker vhodný pro použití v panelu dalších protilátek (p63, p40, calponin, S100, SOX10, SMA) k typizaci myoepiteliálních nádorů, jmenovitě pleomorfního adenomu, myoepiteliomu a též pro detekci komponenty pleomorfního adenomu v karcinomu ex pleomorfní adenom, který může morfologicky představovat diagnostické obtíže. Imunohistochemické markery HMGA2 a PLAG1 je možné dále podpořit molekulárně genetickým vyšetřením (FISH, RT-PCR či metodou sekvenování nové generace), detekujícím zlomy v těchto genech, případně hledající příslušné genové fúze.

## ZÁVĚR

V parenchymu normální slinné žlázy je marker SOX10 jaderně exprimován v obou vrstvách buněk jak luminálních (epiteliálních), tak abluminálních (myoepiteliálních) buňkách serózních acinů a vmezeřených duktů, zatímco exprese SOX10 v luminálních buňkách mucinózních acinů chybí. Intenzita jaderného barvení SOX10 byla vyšší v atrofickém parenchymu slinných žláz a intenzita barvení v serózních acinárních buňkách byla nižší než v interkalovaných duktálních epiteliálních buňkách. SOX10 protilátka byla pozitivní u většiny maligních nádorů slinných žláz, negativně vyšla pouze u mukoepidermoidního karcinomu (10/10), světlobuněčného karcinomu (8/10), salivárního duktálního karcinomu (10/10), hraničně vycházela pozitivita u myoepiteliálního karcinomu (6/10), celkově byla pozitivní z 69,6 % (80 ze 115 případů). U benigních nádorů opět převažovala pozitivita SOX10 a to u pleomorfního adenomu (10/10), myoepiteliomu (10/10) a bazocelulárního adenomu (10/10). Negativní byl SOX10 pouze u Warthinova tumoru (7/7) a u onkocytomu byl (9/10), celkově byl tento marker pozitivní u zhruba 66 % (31 ze 47 případů).

**Obrázek 15** Schéma exprese markeru SOX10 v jednotlivých komponentách slinné žlázy



Zdroj: (14)

Marker GATA3 vykazoval pozitivitu u 32,2% (37 ze 115 případů) maligních nádorů slinných žláz, jaderná pozitivita byla nalezena u sekrečního karcinomu mamárního typu (10/10) a salivárního duktálního karcinomu (6/10), a dále byla zastižena u epiteliálně-myoepiteliálního karcinomu (7/10) a karcinomu ex PA (6/9), jasná negativita vyšla u mukoepidermoidního karcinomu (10/10), adenoidně cystického karcinomu (10/10), myoepiteliálního karcinomu (10/10) a bazocelulárního adenokarcinomu (9/9). U benigních

nádorů slinných žláz byl marker GATA3 převážně negativní, pozitivní byl pouze v 17 % (8 ze 47 případů) zjišťovaných nádorů a to v pleomorfním adenomu (2/10), bazocelulárním adenomu (4/10) a v jednom případě onkocytomu (1/10).

Expres MYB nebyla pozorována v normálním parenchymu slinných žláz. Jaderná expres MYB markeru byla omezena na adenoidní cystický karcinom myoepiteliálního původu, kde byla zastižena signifikantní pozitivita z celkového počtu vyšetřovaných pouze u adenoidně cystického karcinomu (8/10), u ostatních maligních nádorů vyšel tento marker převážně negativně, celkově byla pozitivita pouhých 10,4 % (12 ze 115 případů), minoritně byla expres zastižena v bazocelulárním adenokarcinomu (3/9), myoepiteliomu (1/10) a v karcinomu ex pleomorfním adenomu (1/10). Podobně se tento marker prokázal i u benigních nádorů slinných žláz, kde měl ještě nižší pozitivitu, a to zhruba 4 % (2 ze 47 případů) pouze u bazocelulárního adenomu.

Imunohistochemický marker HMGA2 byl použit pouze u vybraných nádorů, z maligních se vyšetřovaly salivární duktální karcinom, myoepiteliální karcinom a karcinom ex pleomorfní adenom. Případy SDK a MK byly negativní (10/10) v každé skupině. Ve skupině karcinomu ex PA byl jeden případ pozitivní, kde se jednalo o myoepiteliální karcinom vznikající na podkladě pleomorfního adenomu dle imunoprofilu, ale morfologicky spíše připomínal salivární duktální karcinom se strukturami Warthinova tumoru v uzlinách. Ve skupině benigních nádorů byl HMGA2 marker pozitivní u pleomorfního adenomu (3/10), myoepiteliomu (3/10), celkově byla pozitivita 30 % (6 z 20 případů).

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. DABBS, David J. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and genomic applications*. 4. Philadelphia: ELSEVIER SAUNDERS, 2014. ISBN 978-1-4557-4461-9.
2. HANAHAN, Douglas a Robert A WEINBERG. *The Hallmarks of Cancer*. Cell [online]. 2000, 100(1), 57-70 [cit. 2020-01-15]. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400816839>
3. BERANOVÁ, Milena a TOLAR, Zbyněk. *Principy a příklady imunohistochemie*. Plzeň, 2002.
4. LUKÁŠ, Zdeněk, a další. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod*. 2008.
5. FERENČÍK, Miroslav. *Imunitní systém: informace pro každého*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2005. ISBN 80-247-1196-6.
6. HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTŮŇKOVÁ. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton, 2009. ISBN 978-80-7387-280-9.
7. DANIEL, Diana a R.M. LALITHA. *Tumor markers – A bird's eye view*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology [online]. 2016, 28(6), 475-480 [cit. 2020-02-8]. ISSN 2212-5558. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221255581630093X>
8. SUVARNA, S. Kim, Christopher LAYTON a John D. BANCROFT. *Bancroft's Theory and Practise of Histological Techniques*. 7. London: Churchill Livingstone, 2013. ISBN 978-0-7020-4226-3.
9. HANAHAN, Douglas a Robert A. WEINBERG. *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*. Cell [online]. 2011, 144(5), 646-674 [cit. 2020-01-20]. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411001279>
10. KUMAR, Prasann a Tapan Kumar MISTRI. *Transcription factors in SOX family: Potent regulators for cancer initiation and development in the human body*. Seminars in Cancer Biology [online]. 2019, 144(5), 646-674 [cit. 2020-01-27]. DOI: 10.1016/j.semcancer.2019.06.016. ISSN 1044579X. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044579X19300016>

- ps://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X18301846 11. Nebert, D. W. *Transcription factors and cancer: an overview*. 2002. 0300-483x.
12. LEE, Tong Ihn a Richard A. YOUNG. *Transcriptional Regulation and Its Misregulation in Disease*. Cell [online]. 2013, , 1237-1251 [cit. 2020-02-14]. ISSN 0092-8674. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867413002031>
13. JUNGBLUTH, Achim A., BUSAM, Klaus J. *Immunohistochemistry for the Diagnosis of Melanocytic Proliferations*. 2019. ISBN 9780323374576.
14. OHTOMO, Rie, Taisuke MORI, Shinsuke SHIBATA, et al. *SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis*. Modern Pathology [online]. 2013, 26(8), 1041-1050 [cit. 2020-03-02]. DOI: 10.1038/modpathol.2013.54. ISSN 0893-3952. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/modpathol201354>
15. SCHWARTZ, Lauren E., Shahnaz BEGUM, William H. WESTRA, et al. *GATA3 Immunohistochemical Expression in Salivary Gland Neoplasms: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis*. Head and Neck Pathology [online]. 2013, 7(4), 311-315 [cit. 2020-03-10]. DOI: 10.1007/s12105-013-0442-3. ISSN 1936-055X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12105-013-0442-3>
16. WANG, Xunde, Nikolas ANGELIS a Swee Lay THEIN. *MYB – A regulatory factor in hematopoiesis*. Gene [online]. 2018, 655, 6-17 [cit. 2020-03-07]. ISSN 0378-1119. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111918304396>
17. FEDELE, Monica, Alfredo FUSCO a Swee Lay THEIN. *HMGA and Cancer. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* [online]. 2010, 1799(1-2), 48-54 [cit. 2020-02-11]. DOI: 10.1016/j.bbagr.2009.11.007. ISSN 18749399. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874939909001448>
18. EL-NAGGAR, A.K., J.K.C. CHAN, J.R. GRANDIS, T. TAKATA a P.J. SLOO-TWEG. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4. Lyon: IARC, 2017. ISBN 978-92-832-2438-9.
19. SADETZKI, S., A. CHETRIT, A. JARUS-HAKAK, et al. *Cellular Phone Use and Risk of Benign and Malignant Parotid Gland Tumors--A Nationwide Case-Control Study*. American Journal of Epidemiology [online]. 2008, 167(4), 457-467 [cit. 2020-01-11].



DOI: 10.1093/aje/kwm325. ISSN 0002-9262. Dostupné z: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwm325>

20. CARDESA, Antonio, Pieter J. SLOOTWEG, Nina GALE a Alessandro FRANCHI, ed. *Pathology of the Head and Neck*. 2. Berlin: Springer, 2016. ISBN 978-3-662-49670-1.

21. MAČÁK, Jiří, SLOOTWEG, Pieter J., Nina GALE a Alessandro FRANCHI, ed. *Obecná patologie*. 2. Olomouc: Univerzita Palackého, 2002. ISBN 80-244-0436-2

22. WASSERMAN, Jason K., Brendan C. DICKSON, Adam SMITH, David SWANSON, Bibianna M. PURGINA a Ilan WEINREB. *Metastasizing Pleomorphic Adenoma*. *The American Journal of Surgical Pathology* [online]. 2019, 43(8), 1145-1151 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001280. ISSN 0147-5185. Dostupné z: <http://Insights.ovid.com/crossref?an=00000478-201908000-00016>

23. KNIGHT, James, Kumaran RATNASINGHAM, Adam SMITH, David SWANSON, Bibianna M. PURGINA a Ilan WEINREB. *Metastasizing pleomorphic adenoma: Systematic review*. *International Journal of Surgery* [online]. 2015, 19(8), 137-145 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1016/j.ijssu.2015.04.084. ISSN 17439191. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1743919115002113>

24. DAVY, Carmel L., Irving DARDICK, Elizabeth HAMMOND, M. Jane THOMAS, Bibianna M. PURGINA a Ilan WEINREB. *Relationship of clear cell oncocytoma to mitochondrial-rich (typical) oncocytomas of parotid salivary gland: Systematic review*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* [online]. 1994, 77(5), 469-479 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1016/0030-4220(94)90226-7. ISSN 00304220. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0030422094902267>

25. XU, Bin, Andrea L. BARBIERI, Justin A. BISHOP, et al. *Histologic Classification and Molecular Signature of Polymorphous Adenocarcinoma (PAC) and Cribriform Adenocarcinoma of Salivary Gland (CASG): Systematic review*. *The American Journal of Surgical Pathology* [online]. 2020, 44(4), 545-552 [cit. 2020-03-03]. DOI: 10.1097/PAS.0000000000001431. ISSN 0147-5185. Dostupné z: <http://journals.lww.com/10.1097/PAS.0000000000001431>

26. Jin, R, a další. *Recurrent hyalinizing clear cell carcinoma of the base of tongue with high-grade transformation and EWSR1 gene rearrangement by FISH*. *Head Neck Pathol*, 2012. 389-94.
27. SUVARNA, S. Kim, Christopher LAYTON a John D. BANCROFT. *Bancroft's Theory and Practise of Histological Techniques*. 7. London: Churchill Livingstone, 2013. ISBN 978-0-7020-4226-3.
28. WILD, David a . *The Immunoassay Handbook*. 4. Eslevier Science, 2013. ISBN 978-0-08-097037-0.
29. Cell Marque. *SOX-10: Rabbit Polyclonal Antibody*. Rocklin, 2013.
30. BioCare Medical. *GATA-3: Concentrated and Prediluted Monoclonal Antibody*. Pacheco, 2017.
31. Abcam. *Anti-v-Myb + c-Myb [EP769Y] antibody - ChIP Grade ab45150*. 2015.
32. Cell Signal. *HMGA2 (D1A7) Rabbit mAb #8179*. [Online] únor 2010. [Citace: 3. březen 2020.] <https://www.cellsignal.com/products/primary-antibodies/hmga2-d1a7-rabbit-mab/8179?site-search-type=Products>.
33. LEE, Ji Hyun, Hye Ju KANG, Chong Woo YOO, et al. *PLAG1, SOX10, and Myb Expression in Benign and Malignant Salivary Gland Neoplasms*. *Journal of Pathology and Translational Medicine* [online]. 2019, 53(1), 23-30 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.4132/jptm.2018.10.12. ISSN 2383-7837. Dostupné z: <http://jpatholm.org/journal/view.php?doi=10.4132/jptm.2018.10.12>
34. MITO, Jeffrey K, Vickie Y JO, Simion I CHIOSEA, et al. *HMGA2 is a specific immunohistochemical marker for pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma*. *Histopathology* [online]. 2017, 71(4), 511-521 [cit. 2020-03-11]. DOI: 10.1111/his.13246. ISSN 03090167. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/his.13246>
35. TAYLOR, Clive Roy a Richard J. COLE. *Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist*. 3. Michigan: Saunders, 2006. ISBN 9780721601823.
36. WEGNER, Michael. *All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 42(3), 381-390 [cit.

2020-03-09].

ISSN

1357-2725.

Dostupné

z:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272509001964>