



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Využití IHC markeru p16 u HPV lézí děložního čípku

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program:

SPECIALIZACE VE ZDRAVOTNICTVÍ

Autor: Kristýna Ilovičná

Vedoucí práce: MUDr. Jindřich Branžovský, Ph.D.

České Budějovice 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Využití IHC markeru p16 u HPV lézí děložního čípku jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

.....

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala vedoucímu své bakalářské práce MUDr. Jindřichu Branžovskému, Ph.D. za odborné vedení a čas, který mi věnoval. Dále za jeho cenné rady a připomínky, které mi pomohly při zpracování bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat MUDr. Vlastimilu Malíkovi z Gynekologického oddělení Nemocnice České Budějovice za rady z pohledu klinického lékaře. Poděkování rovněž patří mé rodině a zároveň i mým blízkým přátelům, kteří mi byli v těchto chvílích neskutečnou oporou.

Využití IHC markeru p16 u HPV lézí děložního čípku

Abstrakt

HPV je jednou z nejběžnějších pohlavně přenosných chorob. Většinou se šíří pohlavní cestou, méně často orálně, kontaminovanými prsty nebo ložním prádlem. Dále se může přenášet z matky na plod při porodu nebo transplacentárně. Převážně se vyskytuje u mladých žen ve věkovém rozmezí 20 až 25 let a během života se s ním setká asi 80 % sexuálně aktivních jedinců. Lidský papilomavirus je infekční agens, u kterého se prokázala souvislost se specifickým typem lidského nádorového onemocnění a vyskytuje se u 99,7 % všech nádorů děložního čípku. Doposud byla prokázána existence více než sta kmenů papilomavirů, ty můžeme rozdělit na skupinu s nízkým rizikem (lowrisk) a na skupinu s rizikem vysokým (highrisk). Jednou z nejlepších možných prevencí, jak snížit riziko onemocnění, je udržovat sexuální vztah pouze s jedním partnerem. Ovšem i partner může být nosičem infekce, aniž by se u něj vyvinuly příznaky. Preventivní opatření také představují pravidelná gynekologická vyšetření. Výskyt rakoviny děložního čípku výrazně poklesl v mnoha rozvinutých zemích především v důsledku cytologických screeningových programů. Onemocnění je tak možno zachytit již v raných stádiích, kdy jsou možnosti úspěšné léčby znatelně vyšší. V léčbě karcinomu cervixu se používají tři standardní postupy – chirurgie, radioterapie a chemoterapie.

V praktické části porovnávám pozitivitu markeru p16 u jednotlivých histologických skupin pomocí světelného mikroskopu NIKON Eclipse E400. Užívání imunologicky barvené tkáně na p16 zlepšuje celkovou diagnostickou přesnost. Za rok 2016 a 2017 bylo na Oddělení patologie v Nemocnici Písek a.s. takto vyšetřeno 173 vzorků. Ty jsme rozdělili podle stupně závažnosti na 34 low-grade lézí a 139 vysoko rizikových lézí. 18 lowrisk lézí a 130 high-grade lézí vykazovalo pozitivitu p16. Vyšetření zbylých sklíček vyšlo negativně.

Klíčová slova

Děložní čípek; HPV; lidský papilomavirus

The use of IHC marker p16 in HPV lesions of the cervix

Abstract

HPV is one of the most common sexually transmitted diseases. It mostly spreads by sexual way, less often orally, by contaminated fingers or by beddings. Another ways of transmission are from the mother to the fetus at birth or transplacentarily. It usually occurs in young women aged 20 to 25 years and approximately 80% of sexually active individuals have experience with it during their life. Human papillomavirus is an infectious agent associated with a specific type of human cancer and it occurs in 99,7 % of all cervical cancers. More than one hundred papillomaviruses have been identified so far, we can divided them into the lowrisk and the highrisk groups. One of the best possible ways to reduce the risk of a disease is to keep a sexual relationship with only one partner. But the partner can also be carrier of the infection without revealing any symptoms. Preventive measures also include regular gynecological examinations. The incidence of cervical cancer has significantly decreased in many developed countries, mainly due to cytological screening programmes. The disease could be detected in the early stages, when the possibilities of successful treatment are noticeably higher. There are three standard procedures in the treatment of cervical cancer - surgery, radiotherapy and chemotherapy.

In the practical part, I compare the positivity of the p16 marker between each histological groups by using light microscope NIKON Eclipse E400. The use of p16 immunohistochemically stained tissue improves total diagnostic accuracy. In this way 173 samples were examined at the Departement of Pathology Nemocnice Písek a.s. during years 2016 and 2017. We divided them, according to stage of severity, into 34 low-grade lesions and 139 highrisk lesions. 18 of the lowrisk lesions and 130 high-grade lesions expressed p16 positivity. Staining of remaining slides was negative.

Keywords

Cervix; HPV; human papillomavirus

Obsah

1	Teoretická část	10
1.1	Děložní čípek	10
1.2	Lidský papilomavirus	14
1.3	Neoplastické léze děložního čípku	18
1.4	Karcinom indukovaný HPV	21
1.5	Cytologické vyšetřovací metody	24
1.6	Histologické vyšetřovací metody	27
1.6.1	Imunohistochemie (IHC)	29
2	Cíl práce	31
3	Metodika	32
3.1	Příprava vzorku	32
3.2	Hodnocení preparátů	34
4	Výsledky	35
5	Diskuze	39
6	Závěr	41
7	Seznam zdrojů	42
	Internetové zdroje	44
	Seznam obrázků	47
	Seznam použitých zkratk	48

Úvod

Lidský papilomavirus se řadí mezi sexuálně přenosné choroby, jejichž původci jsou viry. Dnes se pokládá u více než 90 % mladých žen za přechodný. To znamená, že se tělo zbaví viru do pěti let bez jakýchkoliv příznaků nebo poškození. Papilomaviry můžeme rozdělit na nízkorizikové viry, které způsobují bradavice (kondylomy), rostou neomezeně, jsou velmi nakažlivé, ale nejsou nebezpečné a na vysokorizikové viry, ty jsou spojovány s rakovinou děložního čípku. Avšak pro vznik karcinomu je nutné spolupůsobení dalších kofaktorů – kouření tabáku, poruchy imunity, promiskuita, dlouhodobé užívání hormonální antikoncepce a některé další. HPV 16 a 18 jsou nejvíce onkogenními podtypy, které jsou prokazatelné přibližně u 70 % karcinomů cervixu. Vakcinace, zejména v době před začátkem pohlavního života může poskytovat ochranu před nejtěžšími přednádorovými stavy až v 93 procentech případů. Vzhledem k tomu, že v současnosti rozpoznáváme více než 20 typů onkogenních virů, nemusejí být ani vakcíny 100% ochranou. V ČR je podle posledních údajů jednorázově proočkováno 62 % dívek. Nejlepší možnou prevencí je na jednu stranu omezit sexuální partnery a na druhou pravidelně navštěvovat gynekologa. Raná stadia onemocnění se totiž většinou rozpoznají právě při preventivní prohlídce a nakažené buňky lze snadno odstranit ambulantním zákrokem. Ty se bohužel v naší republice diagnostikují jen v 50 % případů. Čím později se nemoc odhalí, tím je zákrok rozsáhlejší a pro ženu psychicky i fyzicky náročnější. Konizaci děložního čípku u nás každoročně podstoupí přibližně 16 000 žen. Počáteční stadia jsou často bez viditelných symptomů, kdežto mezi známky již pokročilého onemocnění patří vodnatý až krvavý výtok, krvácení, ke kterému může dojít mimo menstruační cyklus nebo po menopauze, krvácení po pohlavním styku, krev v moči, pálení při močení, bolest v podbřišku nebo nepravidelná menstruace. Mezi nejčastější cervikální nádory patří maligní epitelové nádory, ty se z histologického hlediska dělí na spinocelulární (vycházející z dlaždicových epitelových buněk) tvořících 80-90 % všech zhoubných lézí a na adenokarcinomy (odvozené ze žlázových buněk děložního kanálu), které se vyskytují v 10-15 %. Jiné zhoubné novotvary děložního hrdla se vyskytují jen zcela vzácně.

V současné době žije s nádorem děložního čípku v České republice asi 18 000 žen, přičemž ročně nově onemocní okolo tisíce dalších a každým rokem zhruba 350 žen s touto diagnózou umírá. Celosvětově je karcinom cervixu třetím nejčastějším nádorovým onemocněním u žen a čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na nádorová

onemocnění vůbec. Souhrnně se míra vyléčení u všech stádií karcinomu děložního čípku odhaduje asi na 50 %. V rozvojových zemích, kde neexistuje screeningový program, který by poskytl včasné rozpoznání prekanceróz nebo časných stádií karcinomu, dochází až u 85 % případů k úmrtí s ním spojeným. Oproti zemím (Finsko, Nizozemsko, ...), kde dochází dlouhodobě k organizovanému screeningu cervikálních prekanceróz, je incidence v České republice několikanásobně vyšší.

Toto téma bakalářské práce jsem si zvolila, protože nádorová onemocnění jsou stále celosvětovým problémem, i přesto, že technika a věda šla a stále jde kupředu.

Praktickou část bakalářské práce jsem zpracovávala na Oddělení patologie Nemocnice Písek, a.s pod odborným vedením MUDr. Jindřicha Branžovského, Ph.D. Společně jsme si vytyčili 2 cíle práce. Porovnat pozitivitu markeru p16 u jednotlivých histologických skupin cervikálních neoplázií a potvrdit znatelně nižší výskyt positivity markeru p16 u low-grade lézí oproti high-grade lézím, což jsme prováděli za pomoci světelné mikroskopie.

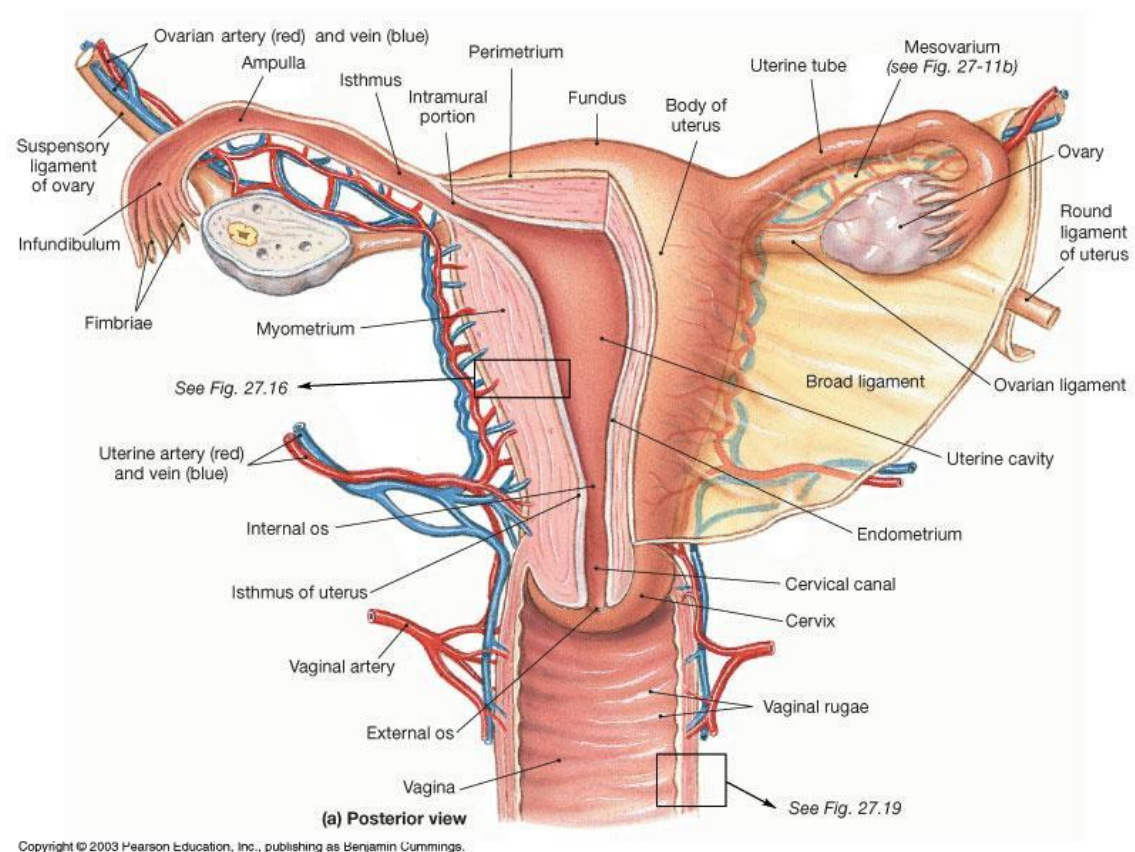
Je popsáno mnoho studií, které dokládají, že exprese proteinu p16 byla z imunohistochemického hlediska pozorována ve velmi vysokém počtu případů cervikálních dysplazií (např. 30-60 % lézí CIN I, 80-100 % lézí CIN II a téměř všechny léze CIN III). Užívání imunologicky barvené tkáně na p16 zlepšilo celkovou diagnostickou přesnost. Interpretace cervikálních řezů by se měla provádět ve spojení s řezy připravenými ze stejného vzorku tkáně nabarvenými hematoxylinem eozinem. Toto imunohistochemické vyšetření se dá pokládat za tzv. pomocné, neboť stanovuje výslednou diagnózu na základě předběžné diagnózy, zjištěné z již předem vyhotovených preparátů.

1 Teoretická část

1.1 Děložní čípek

Vnitřní pohlavní orgány ženy jsou uloženy v malé pánvi a rozdělují se na vaječníky, vejcovody, dělohu a pochvu. Vaječníky jsou párový orgán produkující ženské pohlavní hormony (estrogeny a gestageny) a současně také ženské pohlavní buňky - vajíčka (oocyty). Vejcovody jsou trubcovitým párovým ohránem, které vystupují v děložních rozích a končí fimbriemi u ovarií. Jejich funkcí je transport oocyty či oplozeného plodového vejce do dělohy. Děloha je dutý svalový orgán hruškovitého tvaru. Anatomicky se dělí na tělo (corpus), krček (isthmus) a čípek (cervix). Vrstvy děložní stěny se označují endometrium, myometrium a perimetrium (seroza). Děloha je nejdůležitějším orgánem pro těhotenství, zde se plodové vejce zanoří do endometriální vrstvy, kde poté probíhá vývoj embrya a následně plodu. Změny děložní sliznice v rámci menstruačního cyklu či v průběhu těhotenství přesahují rámec této práce. Děložním čípkem (cervixem) se označuje kaudální část dělohy. Konkrétně část děložního hrdla, která ční do pochvy se nazývá portio vaginalis cervicis uteri a část, která je nad úponem dělohy pak portio supravaginalis uteri. Středem děložního hrdla prochází kanálek, který obsahuje hlen viz níže.

Mezi zevní pohlavní orgány patří stydký pahorek, poštváček, velké a malé stydké pysky a poševní introitus. Klitoris je tvořen topořivými tělísky. Uvnitř velkých labií jsou kavernozní tělesa a Bartholiniho žláza. **(1, 2, 6, 13)**



Obrázek č. 1: Anatomie vnitřních ženských pohlavních orgánů

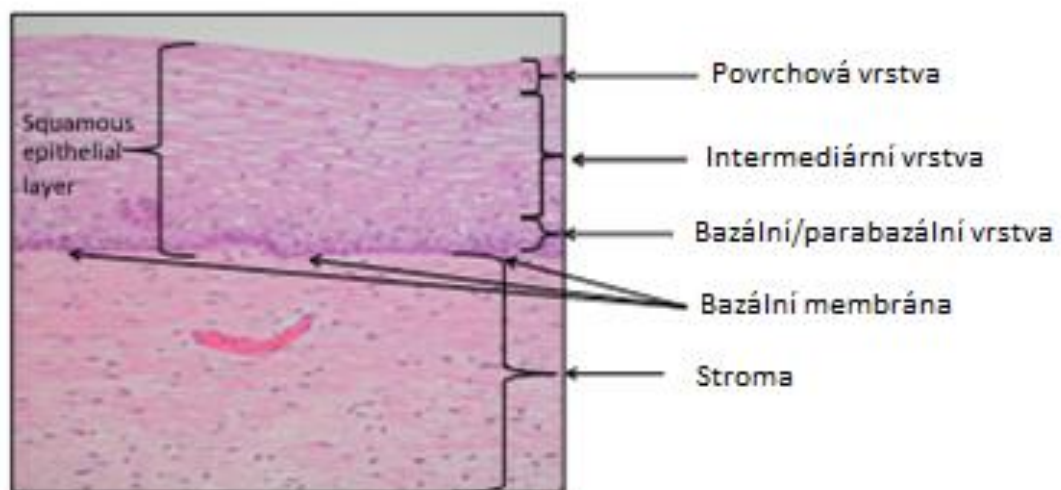
Zdroj: <https://www.thinking.com/scene/788394854651527170>

Cervix je kaudální část dělohy válcovitého tvaru, měří 3 cm na délku a 2,5 cm na šířku. Jeho stěna je tvořena svalovinou a vazivem, které je zde obsaženo více než ve stěně děložního těla. Anatomicky se člení na ektocervix, endocervix a endocervikální kanál. Toto dělení vychází z histologického obrazu jednotlivých částí. Ektocervix je vnější část čípku krytá nerohovějícím dlaždicovým epitelem citlivým na hormonální vlivy. Endocervikální kanál, spojuje děložní dutinu s pochvou. Ústí cervikálního kanálu komunikující s vaginou se označuje jako zevní ústí (ostium externum) a jako vnitřní ústí (ostium internum) je označováno druhé ústí, pozvolna přecházející v dutinu děložní. Endocervix vychází z cervikálního kanálku a je vystlán jednovrstevným cylindrickým žláznovým epitelem. Přestože na sebe ekto- a endocervix bezprostředně naléhají, je jejich odlišení (kolposkopicky i histologicky) poměrně snadné díky tzv. skvamokolumnární junkci. V tomto místě dochází k přechodu vrstevnatého nerohovějícího dlaždicového ektocervikálního epitelu v epitel jednovrstevný cylindrický endocervikální. Poloha SCJ se v průběhu života mění v důsledku hormonálního vlivu. Po menopauze pak bývá SCJ většinou zanořená v endocervikálním kanálu. U každé ženy dochází v plodném věku k tzv. dlaždicové metaplázii. To je přirozený proces, kdy se přemění jeden plně vyztřálý typ epitelu na jiný, opět plně vyztřálý. V tomto případě jsou méně odolné cylindrické buňky nahrazovány odolnějšími dlaždicovými. Jak cylindrické, tak i nezralé dlaždicové buňky jsou citlivé k infekci a mikrotraumatům. Transformační zóna představuje oblast nejčastějších metaplastických změn na cervixu mezi původní a aktuální SCJ. Zde vzniká většina abnormalit a téměř všechny karcinomy vycházejí právě z této oblasti. **(1, 6, 20)**

Děložní čípek představuje bariéru mezi vnějším prostředím pochvy a vnitřním prostředím dělohy. Buňky endocervikálního kanálu vylučují neutrální až kyselý hlen obsahující elektrolyty a jednoduché cukry. Jeho konzistence i složení je ovlivněno hladinou hormonů v průběhu menstruačního cyklu. V období ovulace hlen řídne, je vodnatější, složen z jemné bezbuněčné vláknité sítě usnadňující průnik spermií z pochvy do dělohy a vejcovodů, kde může dojít k oplození. Po ovulaci se hlen naopak stává viskóznějším a brání tak průchodu jednak spermiím, ale hlavně vytváří v hrdle zátku, která brání vniknutí patogenů nebo různých drobných nečistot do děložní dutiny. **(20)**

Cervix je tvořen kromě epitelů (cylindrického a dlaždicového) také podložním pojivem, převážně elastického typu, a stejně jako děloha také hladkou svalovinou. Pojivová tkáň i svalovina udržují čípek povětšinou zavřený a brání jeho otevření v nesprávný čas. Naopak v průběhu porodu se musí celé hrdlo roztáhnout přibližně na deset centimetrů, aby umožnilo průchod plodu. (1, 6)

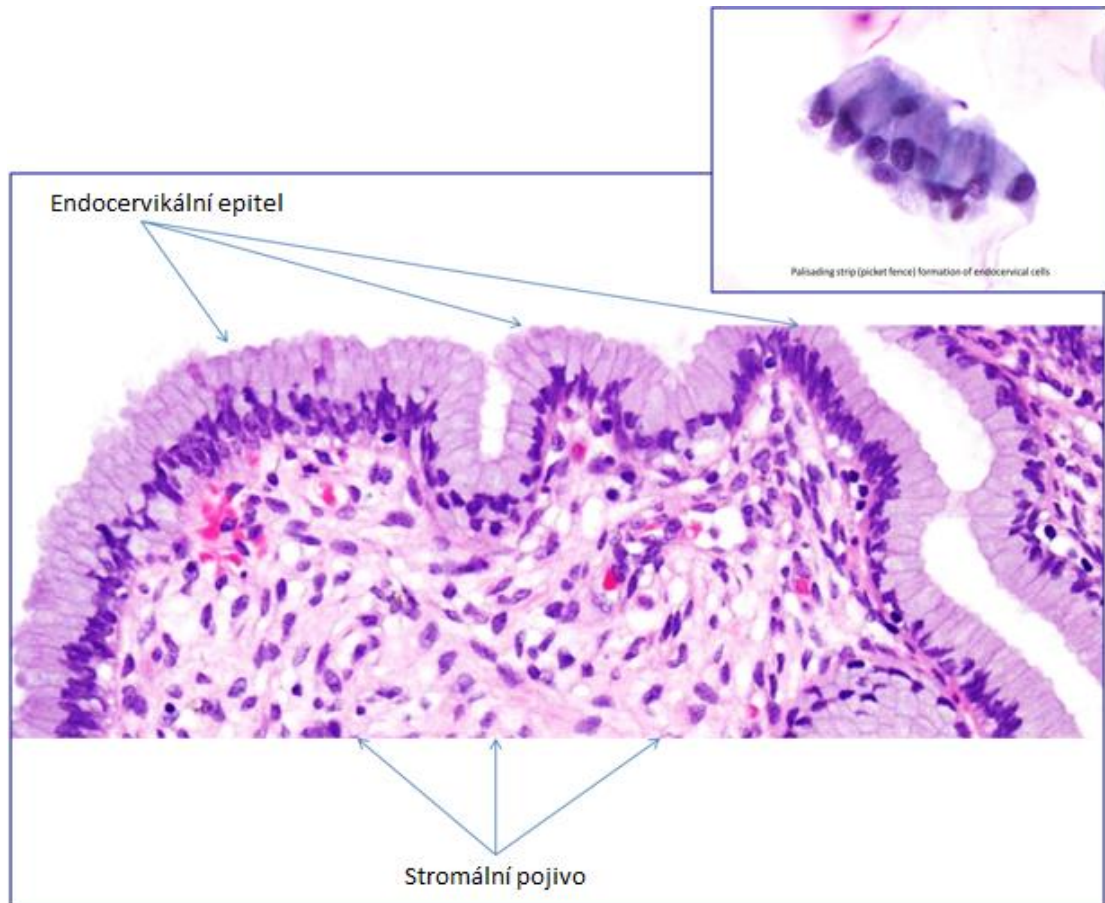
Dlaždicový epitel čípku je shodně s vaginálním nerohovějící, složený z buněk s centrálně uloženými jádry. Tyto buňky se směrem k povrchu oplošťují a odlučují, a tím tvoří odolnou bariéru vůči mechanickému poškození i infekci. Ochranná funkce je významnou měrou podpořena vaginální mikroflorou, která zapříčiňuje kyselé prostředí. Poševní laktobacily totiž vytváří kyselinu mléčnou fermentací glykogenu, jenž se uvolňuje z rozpadajících se epitelů. Z cytologického hlediska se vrstevný dlaždicový epitel dělí na tři vrstvy – povrchovou, intermediární a bazální vrstvu. Povrchová vrstva se skládá ze zralých zcela oploštělých buněk, které nerohová a poměrně snadno se odlučují. Intermediární vrstva obsahuje zrající dlaždicové buňky s poněkud většími jádry. Bazální vrstva, která vychází z jediné vrstvy neustále se dělících buněk ležících na bazální membráně, se skládá z několika vrstev buněk s velkými jádry a s relativně malým množstvím cytoplazmy. Množství cytoplazmy narůstá s vyzáváním buněk, velikost jádra se naproti tomu snižuje. Tento vzájemný vztah se označuje jako nukleocytoplazmatický poměr, který se využívá při cytologickém hodnocení. (20)



Obrázek č. 2: Histologie vrstveného dlaždicového epitelu

Zdroj: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/3>

Epitel vystýlající endocervikální kanál je tvořen jednou vrstvou (ve více řadách) převážně cylindrických buněk, jejichž jádra jsou při bazální membráně, ale při aktivní hlenové sekreci mohou být až vytlačena mimo buňky samotné. Při zánětu se buňky reaktivně snižují a vykazují vyšší procento mitóz, což může vést k diagnostickým komplikacím a záměně za dysplázi nebo nádor. Přesto se o neoplastický proces nejedná. V rámci endocervikálního epitelu rozlišujeme tři populace buněk - sekreční, řasinkové a rezervní. Sekreční buňky začínají na SCJ a tvoří hlenovou zátku, řasinkové buňky zajišťují aktivní přesun hlenu po sliznici a jsou lokalizované hlavně na přechodu sliznice hrdla ve sliznici těla děložního. Rezervní buňky jsou malé kubické buňky ležící pod cylindrickými buňkami převážně v oblasti transformační zóny. Jejich nápadnost prudce roste při metaplázii hlavně proto, že právě z nich vychází. (20)



Obrázek č. 3: Cylindrický epitel endocervixu

Zdroj: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/3>

1.2 *Lidský papilomavirus*

Sexuálně přenosné choroby (ať se již jedná o choroby parazitárního, bakteriálního či virového původu) jsou onemocnění, která se šíří pohlavní cestou. Pouze část však zastávají vlastní nemoci postihující samotné pohlavní ústrojí. Protože jsou původci těchto onemocnění citliví na chemické i zevní fyzikální vlivy, je pro přenos nezbytný blízký kontakt s infikovanou osobou. To zejména platí pro virové původce, mezi které patří například HIV, Herpes Simplex, ale také viry Hepatitid (zejména C, vzácně A a B) a zejména Papilomavirus. Kromě výše zmiňovaného pohlavního styku, zastupuje významnou roli v přenosu rovněž kontakt s infekčními vyrůstkami, puchýřky nebo erozemi, konkrétně s tělesnými tekutinami (krev, poševní sekret, sekret v předkožkovém vaku), ve kterých se také částice virů nacházejí. **(3)**

HPV je z pohlavně přenosných chorob jednoznačně nejběžnější a obvykle relativně málo škodlivou. Nejčastěji se vyskytuje u mladých sexuálně aktivních žen ve věkovém rozmezí 20 až 25 let. V současnosti se pokládá infekce u více než 90 % žen v této kategorii za přechodnou, což znamená, že se tělo zbaví viru do dvou let od prvotního kontaktu bez jakýchkoliv příznaků, změn nebo poškození. **(3, 6)**

Lidský papilomavirus je infekční agens, u kterého se prokázala souvislost se specifickým typem lidského nádorového onemocnění a jedná se proto o onkogenní typ viru. Vstupní branou jsou nejčastěji slizniční mikrotraumata metaplastického epitelu transformační zóny cervixu. Doposud byla prokázána existence více než sta kmenů papilomavirů, jejichž množství se bude nepochybně stále zvyšovat. HPV se dělí podle schopnosti viru včlenit se do genomu napadené buňky jednak na skupinu s nízkým rizikem (lowrisk) projevující se zejména vznikem bradavic (kondylomat). Ty nemusejí být limitovány pouze na genitál, ale mohou se vyskytnout i na jiných místech (kůže horních i dolních končetin, ústní dutina atd.). Přestože se jedná o infekci vysoce nakažlivou, nejedná se o život ohrožující záležitost. Mezi lowrisk podtypy patří zejména 6, 11, 40, 42, 43, 44 a 54. Druhou skupinu pak tvoří HPV s vysokým rizikem (highrisk), které jsou již asociovány se vznikem maligních nádorových onemocnění, nejčastěji v oblasti děložního čípku. Vysoce rizikové typy (HPV 16, 18, 31, 33, 45) způsobují low i high-grade skvamózní léze (HSIL), dále téměř všechny nádory děložního hrdla, podílí se rovněž na vzniku análního karcinomu z 93%, karcinomu pochvy ze 70%, vulvy ze 60%, penisu ze 40% a orofaryngu z 12%. Hlavními onkogenními podtypy jsou 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 a 51. **(8, 30)**

Papilomaviry představují důležitou kapitolu ve vývoji chápání kancerogeneze. U maligních lézí je virová DNA včleněna přímo do genomu buňky, kdežto u benigních lézí je virová DNA přítomna mimo chromozomy. Právě integrace vlastní DNA je důležitým krokem v kancerogenezi indukované HPV. Virus si přivlastní proteosyntetický aparát buňky a následkem chromozomální instability dochází k nadměrné expresi (zvýšenému projevu) onkogenů (v případě HPV zejména E6 a E7). Ty produkují onkoproteiny E6 a E7, které mají při šíření zhoubného bujení nezastupitelnou roli. Onkoproteiny interferují s proteiny supresorových genů, jejichž vyřazení vede ke ztrátě diferenciační a kontrolní antiproliferační funkce. Buňky ztrácejí schopnost apoptózy, čímž vzniká charakteristický znak maligního bujení, nekontrolovaný růst v důsledku „nesmrtelnosti“ nádorových buněk. HPV 16 a 18 jsou nejvíce onkogenními podtypy a jsou tudíž zodpovědné za převážnou většinu případů vzniku karcinomu. **(8, 17, 27)**

Nakažení papilomavirem se rozvíjí velmi často bezpříznakově nebo subklinicky, tedy s příznaky, které nejsou typicky vyvinuty. Imunitní mechanismy jsou schopny infekci do jisté míry potlačit. Významnou měrou se na tom podílí zejména buněčná složka imunitního systému. Při latentním průběhu lze onemocnění prokázat pouze sérologicky přítomností papilomaviru samotného, nevyskytují se kolposkopické ani cytologické změny. Při subklinické infekci jsou již známky onemocnění zjistitelné kolposkopickým vyšetřením, v cytologickém obraze nebo histologicky. **(8)**

Jednou z nejlepších možných prevencí, jak snížit riziko onemocnění, je udržovat sexuální vztah pouze s jedním partnerem, ovšem i partner může být nosičem infekce, aniž by se u něj vyvinuly příznaky. Užívání kondomu je sice možné, avšak není dostatečnou prevencí. Vakcinace, zejména v době před začátkem pohlavního života představuje zásadní a velmi dobrou ochranu proti nejčastějším sérotypům. V ČR jsou k dispozici tři odlišné vakcíny, které dokáží zabránit až 92% karcinomu děložního hrdla a dále významně snížit výskyt benigních, premaligních a maligních změn v jiných lokalitách. Problémem však zůstává existence více než 20 onkogenních druhů HPV a toto spektrum nedokáže žádná z vakcín pokrýt kompletně. Nezanedbatelné preventivní opatření představují pravidelné návštěvy gynekologa k provedení screeningového kolposkopického a cytologického vyšetření. Onemocnění je tak možno zachytit již v raných stádiích, kdy jsou možnosti úspěšné léčby znatelně vyšší. Na druhé straně riziko zvyšují např.: probíhající imunosupresivní léčba, užívání hormonální

antikoncepce, těhotenství, ale i všeobecné rizikové faktory, jakými jsou kouření nebo konzumace alkoholu. **(8, 24)**

Možnosti léčby jsou relativně rozmanité, primárně však závisí na tom, zda bylo onemocnění vyvoláno lowrisk nebo highrisk kmenem papilomaviru. Metodou první volby obvykle je chemická léčba, zejména lokální aplikace podofylinu. Tato možnost je však vyloučena během těhotenství. Dalšími relativně účinnými způsoby léčby představuje užití virostatických a imunomodulačních látek. Do této kategorie se řadí např. interferon podávaný jak lokálně, tak u rozvinutých lézí i systémově. V případě větších ložisek je zapotřebí sáhnout již k razantnější invazivní metodě, jakou je chirurgický zákrok. V naprosté většině případů postačuje lokální výkon v podobě ošetření elektrickou kličkou či jehlou, případně již obsolentní metoda ošetření studeným nožem. **(7)**

Projevem lowrisk HPV infekce jsou nejčastěji bradavice (v případě oblasti genitálu nazývané též kondylomata), což jsou měkké výstupky na kůži nebo sliznici. Ty se mohou vyskytnout na všech částech těla, kde se přirozeně vyskytuje vícevrstevný dlaždicový epitel (ať již rohovější nebo nerohovější). Typickými oblastmi výskytu jsou dlaně a plosky nohou. Inkubační doba se pohybuje od 6 týdnů až po 6 měsíců. Makroskopický obraz výrůstků může být značně rozmanitý od klasických, ostře zakončených a dobře viditelných až po tak malé, že nemusejí být pouhým okem viditelné. Vzácněji se mohou vyskytovat v podobě plochých či vystouplých skvrn tělové barvy, jindy nabírají tvar květákovitého výstupku. Oblast genitálu je druhou nejčastější lokalizací. U žen se kondylomata typicky nacházejí uvnitř vaginy, v oblasti velkých i malých stydkých pysků a na děložním čípku. U mužů je můžeme nalézt na penisu (zejména v oblasti předkožky), šourku či přilehlé tříselné oblasti. Dalšími z míst výskytu jsou jednak oblast hráze, okolí anu, ale také rty, jazyk, ústní dutina či první polovina jícnu. Výskyt v těchto lokalizacích velice často poukazuje u infikovaných na praktikování orálního či análního sexu, což je jev pozorovatelný také u jiných pohlavně přenosných chorob. Samotné bradavice jsou spíše obtěžující lézí, než aby byly nějakým způsobem nebezpečné, i když jejich opakované recidivy či hojení jizvami není neobvyklé. Často jsou citlivější než okolní tkáň, proto je jejich průvodním jevem nepohodlí doprovázené bolestivostí nebo svěděním. Jiné příznaky nejsou tak časté, ale řadí mezi ně zvýšená vlhkost v okolí kondylomat, výtoky (hlavně vaginální u žen) případně krvácení během styku nebo po něm. **(30)**

Genitální bradavice musí být léčeny lékařem, který provede prvotní ošetření kůže v ordinaci. Následně je pak nezbytná aplikace lokálních léčiv např.: Imiquimod,

Podophylotoxin nebo Synekatechin. Tato varianta trvá sice delší dobu, ale méně dráždí kůži. Rychlejší možností je odstranění výrůstků pomocí kryochirurgie. Úspěšnost kryochirurgie činí 70-80 %, ale je při ní vyšší riziko návratnosti. Naproti tomu je vhodná i pro těhotné ženy. Další možností je použití kyseliny trichloroctové, která je limitovaná pouze na zevní povrchy kůže a není vhodná k ošetření vaginální stěny ani cervixu. U velkých kondylomů se všeobecně preferuje prostá chirurgická excize (vyříznutí). Elektrokauterizace či laserová ablace představují metody sice efektivní, avšak vzhledem ke své finanční nákladnosti bývají často užívány až jako poslední možnosti. Vesměs stejné limitace má i léčba za pomoci interferonů. **(30)**

1.3 Neoplastické léze děložního čípku

Za cervikální neoplázií se považuje dysplastická změna buněk dlaždicového epitelu v dolní třetině dělohy. Vzhledem k anatomické blízkosti může primárně postihovat endocervikální kanál děložního hrdla stejně jako dolní část cervixu, která vyčnívá do pochvy. Raná stádia se většinou dají dobře rozpoznat při preventivním gynekologickém vyšetření, proto je potřeba nepodceňovat screeningová opatření. V současné době žije s nádorem děložního čípku v České republice asi 18 000 žen a ročně nově onemocní okolo tisíce dalších. **(11, 26)**

Vznik neoplázií děložního čípku prokazatelně souvisí se sexuálním chováním (počet partnerů, časný začátek sexuálního života). Mezi další rizikové faktory patří kouření, užívání drog a alkoholu, stav imunitního systému, genetická predispozice, brzký věk prvního těhotenství či vysoký počet porodů a potratů. V průběhu času bylo prokázáno, že stěžejní vliv na vznik těchto lézí lze spojit s infekcí lidským papilomavirem, hlavně s jeho sérotypy 16 a 18. **(10, 12)**

Časná stádia zhoubných nádorů děložního hrdla jsou bez symptomů. Mezi známky pokročilého onemocnění patří vodnatý až krvavý výtok, krvácení, ke kterému může dojít mimo menstruační cyklus nebo po menopauze, krvácení po pohlavním styku, krev v moči, pálení při močení, bolest v podbřišku nebo nepravidelná menstruace. Od určité velikosti může tumor zúžit nebo zcela komprimovat močovou a způsobit poruchy vyprazdňování, vzácně i ztrátu funkčnosti ledvin. **(10,11,12)**

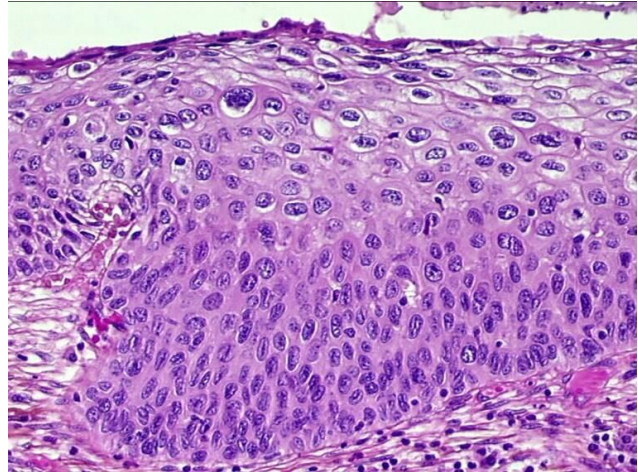
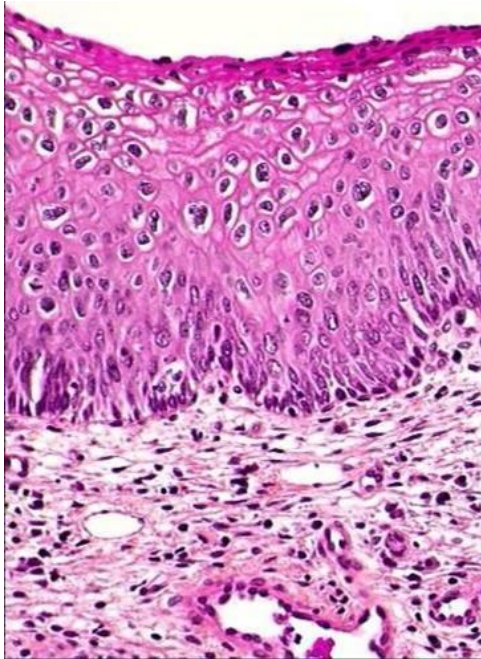
Nádory děložního hrdla se z histologického hlediska dělí na spinocelulární (vycházející z dlaždicových epitelialních buněk) tvořících 80–90 % a na adenokarcinomy (odvozené ze žlázových buněk děložního kanálu), které se vyskytují v 10–15 %, převážně u mladších žen. Jako prekanceróza (předstupěň malignity) je označována ve starší terminologii cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN I – III) nebo nověji pojmenovaná skvamózní intraepiteliální léze (SIL – low-grade, high-grade). Většina LG lézí je pouze dipenzarizována (sledována). Pouze pokud dlouhodobě přetrvávají či dojde k progresi, přistupuje se k ošetření. Skvamózní intraepiteliální léze vyššího stupně by se měly vždy chirurgicky odstranit. U této skupiny se v 99,5 % vyšetřených vzorků dá prokázat onkogenní typ HPV. Prekancerózy jsou ve většině případů asymptotické nebo jen s minimálními projevy a k jejich léčbě se užívají různé typy konizací (seříznutí děložního čípku). **(1, 12, 17)**

Ve všech případech CIN je normální epitel děložního čípku nahrazen abnormálními epiteliálními buňkami, které vykazují různý stupeň dysplastických změn. Jádra dediferencovaných buněk jsou větší než obvykle, jsou nepravidelná a mají různé velikosti a tvar dokonce i vůči sobě navzájem. Jelikož obsahují více chromatinu, který je abnormálně strukturován, dochází ke zvýšení poměru jádra vůči cytoplazmě. S dediferenciací nádorových buněk se snižuje objem cytoplazmy. Mitotická aktivita již není omezena pouze na bazální vrstvy epitelu, může se vyskytovat ve všech postižených úrovních. Jednotlivé stupně cervikální intraepitelální neoplázie nesou relativně charakteristické rysy, přesto se jejich rozdělení mnohdy překrývá a může tak vyvolávat diagnostické obtíže. **(20)**

CIN I (LSIL, mírná dysplazie) má tři nebo vícekrát zvětšené jádro oproti intermediární buňce. Objevuje se mírná variace tvaru a velikosti jader, může se vyskytnout i vícejadernost. Dalším znakem je hyperchromázie (zvýraznění jaderné membrány). Abnormální buňky se mohou vyskytnout ve zralém i nezralém dlaždicovém epitelu, avšak vždy dosahují do výšky 1/3 tloušťky epitelu. CIN I odpovídá akutní HPV infekci, která se většinou do 24 měsíců samovolně vyhojí. Z toho důvodu není nutné provádět invazivní zákrok a pacientka je pouze sledována. **(20)**

CIN II (HSIL, střední dysplazie) má buňky jednotlivě nebo v plachtách s natěsnanými jádry. Cytoplazma je jemná, jádra jsou tři a vícekrát zvětšena oproti jádrům intermediárních buněk. Bývá však snížen objem cytoplazmy, takže buňky s vysokým poměrem jádra a cytoplazmy mohou mít jádro dokonce menší než u LSIL. Mitotická aktivita dosahuje do dvou třetin epitelu od bazální membrány stejně jako zmíněné cytologické změny. K samovolnému vyhojení dochází přibližně u 40 % případů, ovšem jedná-li se o infekci typem HPV16, je šance výrazně nižší. **(15, 20)**

CIN III (HSIL, těžká dysplazie, carcinoma in situ) má změněnou velikost i tvar jader a zvýrazněný chromatin v celé šířce epiteliální vrstvy. Dochází zde ke ztrátě polaritě i k vzájemnému překrývání jednotlivých buněk. U CIN III je nejvyšší riziko progresu. Přejít do invazivního karcinomu však výrazně závisí na typu HPV, kterým byl epitel infikován. Podstupuje-li žena adekvátní léčbu, je pravděpodobnost progresu velmi nízká. Současná přítomnost ložisek CIN I, II a III na tomtéž cervixu není všeobecně obvyklá. **(20)**

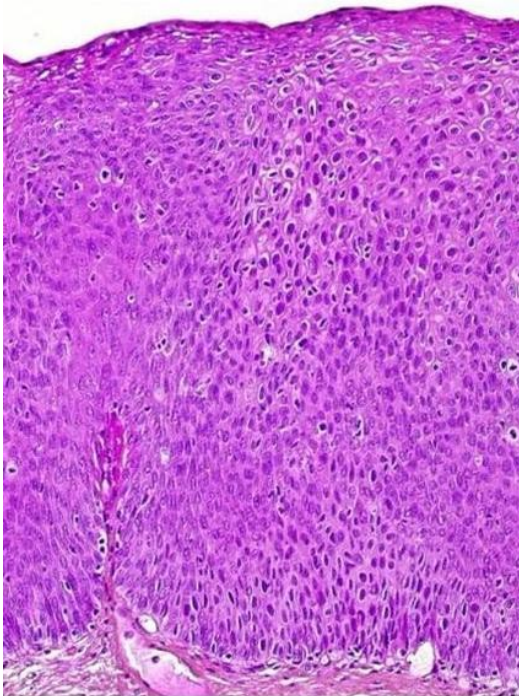


Obrázek č. 5: CIN II – střední dysplazie

Zdroj: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/3>

Obrázek č. 4: CIN I – mírná dysplazie

Zdroj: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/3>



Obrázek č. 6: CIN III – těžká dysplazie, carcinoma in situ

Zdroj: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/3>

1.4 Karcinom indukovaný HPV

HPV je karcinogenní virus, se kterým se během života setká asi 80 % sexuálně aktivních jedinců. Nejrozšířenější highrisk HPV podtypy jsou 16 a 18, které jsou prokazatelné přibližně u 70 % karcinomů cervixu. Invazivní karcinom na rozdíl od cervikálních intraepiteliálních neoplázií již představuje závažné onemocnění, jehož incidence roste zejména ve věkové skupině nad 35 let. Každý rok je jen v České republice nahlášeno přibližně 1000 nových případů a zhruba 350 žen s touto diagnózou ročně umírá. Celosvětově je karcinom cervixu třetím nejčastějším nádorovým onemocněním u žen a čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění vůbec. V rozvojových zemích, kde neexistuje screeningový program, který by poskytl včasné rozpoznání prekanceróz nebo časných stádií karcinomu, dochází až u 85 % případů k úmrtí s ním spojeným. **(6, 12, 16)**

Screening karcinomu děložního hrdla je v České republice upravován věstníkem ministerstva zdravotnictví 07/2007. Jde o organizované úsilí časného zachytu karcinomu děložního hrdla a jeho prekanceróz. Cílem je tedy snížení úmrtnosti na rakovinu děložního hrdla v České republice. Screeningové vyšetření by mělo být prováděno dospělým ženám jednou ročně při pravidelné gynekologické prohlídce a plně hrazeno veřejným zdravotním pojištěním. Pro vyšetření se používá cervikální cytologie, což je metoda, při které se za pomoci světelného mikroskopu hodnotí buňky, které byly při gynekologickém vyšetření naneseny z odběrového kartáčku na sklo. Následně se preparát barví obvyklým způsobem podle Papanicolaoua (Pap test) nebo jeho modifikací, nanese se montážní médium, překryje se a je připraven k mikroskopickému hodnocení v základním zvětšení. Zdokonalením tohoto testu je Liquid-based cytology (LBC), kdy jsou buňky převedeny do tekutého media, kde jsou rovnoměrně rozptýleny, což zvyšuje senzitivitu vyšetření. Nově se může provádět test na přítomnost samotného papilomaviru, který také pomáhá zachytit nádor v časném stadiu. Každá laboratoř si vede evidenci screeningových vyšetření samostatně, přičemž by měla obsahovat celkový počet jednotlivých cervikovaginálních vyšetření za 1 rok, jméno pacientky, její identifikační číslo, číslo zdravotní pojišťovny, pořadové číslo průvodky, jméno odesílajícího gynekologa a cytologickou diagnózu. **(10, 12, 15, 32)**

Karcinom děložního čípku vzniká na povrchu čípku nebo v cervikálním kanále. Na povrchu obvykle vytváří květákovité hmoty, které kontaktně krvácejí. Naproti tomu v cervikálním kanále je karcinom dlouhou dobu bez příznaků, kde invazivně roste

a rychle se šíří do okolí. Hlavní cestou šíření jsou lymfatické cévy, ale není zcela neobvyklý ani rozsev hematogenní. Prorůstání per continuitatem do okolí dělohy je již známkou pokročilého onemocnění. **(12)**

Děložní hrdlo je snadno přístupné gynekologickému vyšetření. V dnešní době je možné prekancerózy i počínající nádory včas diagnostikovat a spolehlivě léčit. Ke stanovení správné diagnózy, od níž se právě léčba odvíjí, je zapotřebí úzké spolupráce mezi patologem, gynekologem a později i onkologem. Nález je předběžně gynekologem řazen za pomoci expertního ultrazvukového vyšetření dle tzv. TNM klasifikace, kterou následně zpřesňuje patolog pečlivým vyšetřením odebrané tkáně. V tomto schématu, odpovídajícímu stagingu nádoru (nejdůležitější ze všech prognostických faktorů), se hodnotí jednak nádor samotný (T = tumor; zejména velikost a vztah k okolním orgánům), regionální lymfatické uzliny (N = nodes; zdali jsou či nejsou infiltrovány) a vzdálené metastázy (M = metastases; zdali jsou či nejsou vytvořeny). Tato TNM klasifikace je následně korelována s klinickými stádii systému FIGO, podle kterých se rozhoduje o léčbě. Třebaže se oba systémy v některých drobných detailech odlišují, jsou základní skupiny shodné a vzájemně si odpovídají. **(5, 12,20)**

Diagnostika HPV lézí se provádí několika metodami. Jednou z nich je onkologická cytologie. Pap test neboli cervikální nátěr je obvyklé screeningové vyšetření, kdy jsou buňky z odběrového kartáčku nanесeny na sklo, obarveny a hodnoceny pod mikroskopem. Je to jednoduchý, levný a citlivý test, který se užívá celosvětově více než 50 let. Odběr cytologického materiálu z děložního hrdla provádí gynekolog. Montování pod sklo zlepšuje optické vlastnosti a zároveň představuje ochranu nátěru. Následné polychromatické barvení zviditelní cytologický preparát. Kromě subklinických stádií lze prvotní diagnózu provést za pomoci kolposkopie, což je přímé vyšetření děložního čípku mikroskopem in vivo (bez nutnosti odběru biopsie). Při tomto vyšetření se nejprve aplikuje kyselina octová k rozpuštění hlenu a gynekolog následně pozoruje sliznici čípku, její barvu, přítomnost bílých ložisek a jiné změny. V případě pozitivního kolposkopického nálezu je již biopsie nutná, stejně jako následné histologické ověření. Samotný odběr se provádí ambulantně, bez použití narkózy a není bolestivý. Za pomoci bioptických klíštěk se odštipnou zhruba 2-4 mm tkáně. Variaci tohoto zákroku pak představuje rozšířená biopsie, která se provádí v krátké anestezii, což umožňuje získat větší množství tkáně pro histologické vyšetření. **(16, 17, 20, 25)**

Jak již bylo zmíněno, léčba závisí zejména na stupni pokročilosti nádoru, ale také na celkovém stavu pacientky. V zásadě se používají tři metody, a to chirurgická léčba,

radioterapie a chemoterapie. U časných stádií je karcinom omezen pouze na děložní hrdlo, kdežto pro pokročilá stádia je typické prorůstání nádoru do okolí. Proto je u časných stádií uplatňována hlavně chirurgická léčba. Je-li léze zachycena opravdu brzy a žena plánuje těhotenství, je metodou volby konizace hrdla neboli odstranění části děložního čípku zasaženého nádorem. Konizaci děložního čípku podstoupí ambulantně okolo 16 000 žen ročně. Rozšířenou variantu tohoto výkonu zastupuje méně používaná trachelektomie (ať již prostá nebo radikální). Při této metodě je odstraněno celé děložní hrdlo, popřípadě včetně odebrání lymfatických uzlin, přičemž je zachováno děložní tělo. Pokud žena těhotenství neplánuje, přejde se k prosté hysterektomii, což znamená odstranění dělohy, často doprovázené lymfadenektomií (odstranění lymfatických uzlin). U pokročilých stádií je nutné většinou kromě dělohy odstranit i část pochvy a závěsného aparátu. Není neobvyklým krokem doplňovat operační zákrok radioterapií. Možnosti ozařování jsou dvě. Jednak může být zářič mimo tělo ženy, což se označuje jako teleterapie. Druhou možností je brachyterapie, tedy umístění zářiče přímo do děložního těla nebo pochvy, co možná nejbližší k samotnému nádoru. Obě metody mají své přednosti i rizika a jejich použití je výhradně v rukou onkologa. V případě příliš vysokého operačního rizika či u značně pokročilých stádií představuje ozařování metodu první volby, často samostatně provedenou, ale jindy doplnitelnou o další metodu léčby, chemoterapii. Při chemoterapii se celkově podávají do těla protinádorové látky, např. cisplatina. Ty zastavují růst nádorových buněk, což je obzvlášť užitečné při zvýšeném riziku vzniku metastáz. Chemoterapie se nepoužívá jako samostatný terapeutický postup, podobně jako je tomu i u cílené biologické léčby (reprezentované hlavně bevacizumabem). Souhrnně se míra vyléčení u všech stádií karcinomu děložního čípku odhaduje asi na 50 %. **(9, 11, 12, 22,26)**

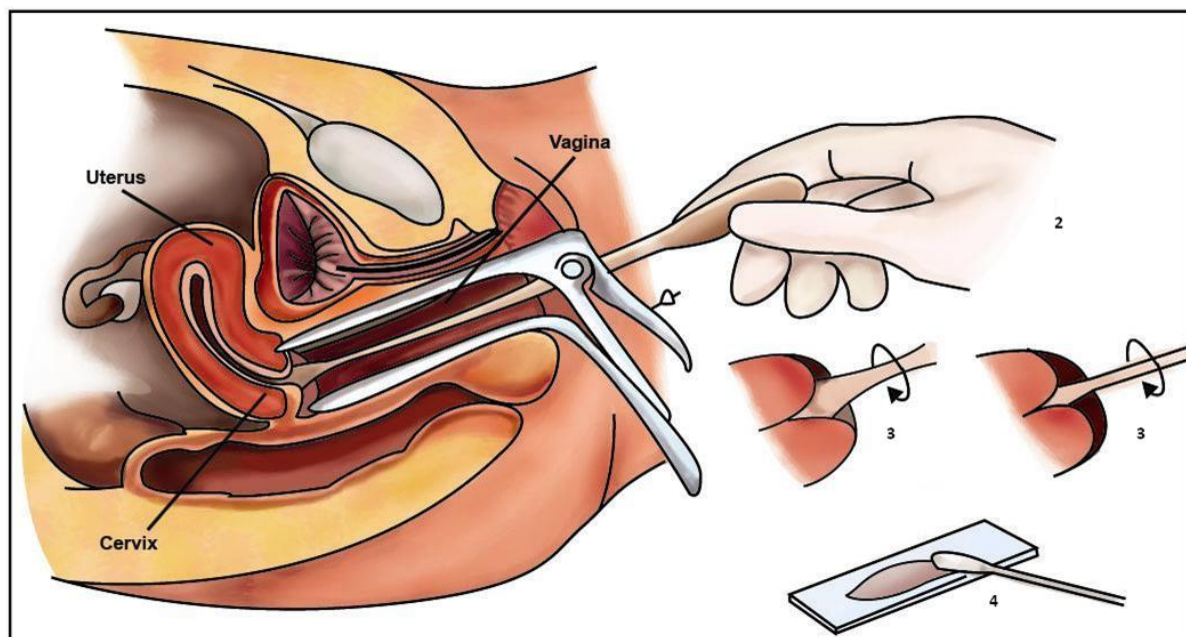
Mezi nejčastější komplikace operační léčby se řadí inkontinence a sexuální dysfunkce. Radioterapie může způsobovat celou řadu vedlejších účinků. Častose objevuje zarudlá a suchá kůže v místě ozáření. Dále jsou přítomny průjmy, únava, nevolnost či zánět močového měchýře nebo konečníku. Rovněž může být negativně ovlivněna plodnost působením radiačního záření na vaječníky a/nebo pokles v počtu krevních buněk působením na kostní dřeň. V případě chemoterapie jsou příznaky obdobné společně se známou ztrátou vlasů. Pokud jsou odstraněny i vaječníky (u pokročilých stádií), dochází ke snížení hladiny pohlavních hormonů a rychlému nástupu příznaků klimakteria, jako jsou např. návaly horka, pocení, zvyšuje se rovněž i riziko řídnutí kostí a onemocnění cév a srdce. **(22, 26)**

1.5 Cytologické vyšetřovací metody

Obor cytologie, kde se hodnotí jednotlivé buňky oddělené z tkání, založil americký gynekolog Papanicolaou, který popsal změny buněk v průběhu menstruačního cyklu na nátěrech z cervixu. Navrhl speciální barvení nátěrů připravených ze stěrů děložního čípku. Tato metoda je podle něj pojmenována a dodnes se používá. Cytologické laboratoře se zaměřují na hodnocení buněčných suspenzí získaných z výpotků, ze sekretů, z moči a dalších tělních tekutin. Některé materiály je však třeba zalít do parafínu a vyšetřovat jako histologické preparáty. **(17)**

Jelikož je děložní čípek snadno přístupný, lze jej vyšetřit během preventivních kontrol u gynekologa. Cílem pravidelných prohlídek je zjistit přednádorové změny dříve, než dojde k rozvoji malignity. Cytologický stěr slouží k časnému odhalení a léčbě poškozené tkáně. Toto vyšetření by měla jednou ročně podstoupit každá žena, která zahájila pohlavní život. Materiál z povrchu děložního čípku a z kanálu děložního hrdla by měl být odebrán uprostřed menstruačního cyklu, kdy je vzorek nejreprezentativnější. **(1, 20)**

Do pochvy se zavedou gynekologická zrcadla, přičemž zevní ústí děložního čípku musí být lokalizováno a osvětleno. Hlenová zátka se jemně odstraní naředěným roztokem kyseliny octové, aby odběrová pomůcka (vatové štětičky, malé kartáčky nebo špátle) přišla do přímého kontaktu s povrchem, jinak by vzorek mohl být málo buněčný s příliš výraznou příměsí hlenu. Nástroj je třeba otočit o 360° více než jednou, čímž dojde k odebrání dostatečného množství materiálu. Ten musí být okamžitě přenesen na označené podložní sklo nebo do nádobky s tekutým médiem. Pro obvyklou cytologii je nutné nátěr ihned zafixován v 95% alkoholu. Při odběru na LBC se vrchol odběrového nástroje odlomí do transportního média nebo se nástroj v médiu pouze vypere. Tím dojde k odstranění rušivých vlivů (krve, hlenu) a zvýší se tak senzitivita testu. LBC zajišťuje následné rovnoměrné rozprostření buněk na podložní sklo, dobré obarvení a uchování pro vyhodnocení. Vzorek je v obou případech nutno transportovat do laboratoře co nejdříve. **(16, 20)**



Obrázek č. 7: Odběr materiálu

Zdroj: <http://www.soc.ucsb.edu/sexinfo/article/pap-smear>

Zpracování cytologických vzorků v laboratoři zahrnuje příjem vzorku a žádanky, přípravu preparátu, barvení, vyhodnocení a podání zprávy. Nejdříve se musí zkontrolovat shoda vzorku se žádankou, tedy jméno, příjmení, datum narození, číslo pojištěnce a nemocnice. Poté se přidělí laboratorní číslo, načež následuje samotná příprava vzorku. Papanicolaouva barvicí metoda kombinuje jedno jaderné barvení hematoxylinem a dvě cytoplazmatická barviva OG-6 a EA-50. OG-6 barví keratin a EA-50 cytoplazmu dlaždicových buněk, nukleoly a erytrocyty. Při použití progresivního barvení je intenzita obarvení jader kontrolována ponořením do „modřícího“ roztoku poté, kdy byla jádra obarvena hematoxylinem. Toto barvení zbarví cytoplazmu velmi slabě. Při regresivní metodě je jádro přebarveno neokyseleným hematoxylinem. Poté je přebytek barvení odstraněn naředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Proces je pak zastaven ponořením do tekoucí vody. Mezi další základní barvení v cytologii patří barvení podle May Grünwald Giemsky. Jedná se o základní jednoduchou monochromatickou metodu používající roztok May Grünwald a poté ředěný roztok Giemsky. Buněčné struktury, ale i nebuněčné, jako jsou bakterie nebo plísňe, se nabarví do různých odstínů modré až modrofialové barvy. Po přípravě vzorku následuje vyhodnocení. Negativní výsledky jsou uvolňovány, kdežto abnormální cytologie se předávají patologovi pro ověření a upřesnění nálezu. Výsledek je podepsán,

zaznamenán a odeslán zpět k zadavateli vyšetření, který následně seznámí pacientku s diagnostickým závěrem. **(17, 20)**

Cytologická vyšetření lze rozdělit na několik druhů. Exfoliativní cytologie hodnotí buňky, které byly odděleny z epiteliálních povrchů. Řadíme sem gynekologickou cytologii, tedy stěry z cervixu, cervikálního kanálu a endometria. Stěry z jiných epiteliálních povrchů se od gynekologických v ničem zásadním neliší. Rovněž pneumologická a urologická cytologie, prováděné výplachy z bronchů, plic, močového měchýře či vyšetření sputa nebo moči, patří do kategorie exfoliativních cytologií. Dalším druhem cytologických vyšetření je cytologie z punktátů. Řadí se sem jednak aspiráty z preformovaných tělních dutin, např. mozkomíšní mok, kloubní tekutina, fluidothorax (tekutina v pohrudniční dutině) nebo ascites (tekutina v dutině břišní). Punkcí lze získat také obsah novotvořených dutin, jakými jsou cysty a pseudocysty. Další způsob představují otisky řezných ploch nádorů, pseudotumorů či orgánů odebraných k histologickému vyšetření a punkční cytologie tkání tenkou jehlou. Všechny punkční metody se provádí ambulantně a představují závažnější invazi do organismu než stěry. Celkově však jsou cytologie jednoduchými, rychlými a relativně nenákladnými způsoby vyšetřování. **(17, 31)**

1.6 *Histologické vyšetřovací metody*

Histologie je obor studující tkáň, za jehož duchovního otce je považován Jan Evangelista Purkyně. Na rozdíl od cytologie se histologie zabývá složitějšími soustavami, než jsou samostatné buňky, díky čemuž se do hodnocení promítá další prvek, vztah tkání k sobě navzájem i k okolí. Bioptické vyšetření, mikroskopické vyšetření tkáně odebrané od živého pacienta, je hlavní náplní práce patologa. Každý chirurgicky odebraný vzorek (ať již přímé odnětí, odběr za pomoci endoskopu nebo za pomoci jehel), bez ohledu na závažnost výkonu nebo oddělení, na kterém k výkonu došlo, by měl být podroben histologickému vyšetření. Není výjimkou, aby se takto zachytily i neočekávané patologické změny, které potřebují další terapii. Stejně tak není neobvyklé, aby již samotný odběr byl zároveň i terapeutickým výkonem, ovšem většina biopsií se provádí primárně z diagnostických důvodů. Ve většině případů je nezbytné tkáň neprodleně fixovat kompletním ponořením do 10% formolu, jednak aby nedošlo k její degradaci, jednak se tímto krokem tkáň již předpřipravuje ke zpracování. (19)

V histologické laboratoři musí tkáňový materiál, podobně jako cytologický, nejprve projít příjmem, kde se registruje a třídí. Variabilita tkáňových vzorků je opravdu široká od milimetrových excizií po celé orgány. Prakticky veškeré přikrajování (příprava k vyšetření) se musí provádět ve speciálních ventilovaných boxech, které zamezí vdechnutí jedovatých par z fixačních roztoků. Tkáň se makroskopicky popíše, zaznamenají se nalezené změny, rozměry (případně i váha) a některé další údaje pro TNM klasifikaci (např. vyhledání a odběr lymfatických uzlin, nebo měření vzdáleností nádorů od resekcčních linií). V případě nutnosti je možné preparáty také vyfotografovat. Následně se vyberou reprezentativní vzorky, které většinou lékař vyřízne a upraví k dalšímu zpracování. Vložením tkání do kazetek a jejich umístěním do autotechnikonu (přístroje, kde se tkáň odvodňuje) se začíná samotný laboratorní proces. Další krok představuje zalití do parafinových bločků. Je nezbytně nutné dávat pozor na přesné uložení tkáně, aby byla zajištěna správná orientace vzorku při následném krájení. K tomu se využívá mikrotomu. Velmi ostrou ocelovou čepelí jsou zhotoveny řezy silné jen několik tisícín mm (zhruba 3-5 μm). Kdyby nebyla tkáň zalita do parafínu, docházelo by při krájení k jejímu kroucení, čímž by byl vzorek znehodnocen. Zhotovené řezy se napnou na teplé vodní hladině, umístí na podložní skla a vysuší v termostatu. Takto připravené nativní preparáty je třeba obarvit. V minulosti (ne tolik vzdálené) bylo nutné vše provádět ručně, avšak v současnosti se hojně využívá barvicího automatu, který celý proces výrazně urychluje. Ruční barvení v kyvetách je

však stále nezastupitelné u náročnějších, často vysoce speciálních metod. Na výsledné tkáňové řezy se nanese medium připomínající lepidlo a poté se překryjí krycím sklem. Celý tento proces trvá přibližně 24 hodin, na jehož konci vznikne trvalý histologický preparát, který je předán k mikroskopické diagnostice. **(4, 18)**

Základním histologickým barvením je jednoznačně barvení Hematoxylinem-eozinem. Hematoxylin je bazické barvivo, které barví modře jádra buněk. Eozin je naproti tomu barvivo kyselé zbarvující cytoplazmu červeně. Specializovaná barvení jsou užívána k ozřejmění zcela konkrétních struktur. Jako dobré příklady mohou sloužit barvení dle Wiegert van Gieson, které se používá u kolagenu, nebo trichromy (modrý a zelený) sloužící k diferenciaci vaziv. Paleta jednotlivých metod je nesmírně bohatá, aby dokázala pokrýt naprostou většinu nálezů, jako jsou elastická a retikulární vlákna, polysacharidy, lipidy, bakterie, anorganické látek a mnoho dalších. **(18)**

Standardní histologické vyšetření zahrnuje zalití tkáně do parafinu nebo nověji do plastické pryskyřice, krájení bločků a podle zvolené barvicí metody jsou zhotoveny mikroskopické preparáty. Nejméně u 65 % případů lze uzavřít bioptickou diagnózu bez dalších doplňujících vyšetření. Jednou ze speciálních histologických technik je vyšetření ve zmrazených řezech. Tato metoda se obvykle využívá při peroperačních biopsiích, ale také při zpracování vzorků na průkaz enzymů, tuků a látek rozpustných v tucích, které by byly při klasické metodě rozpuštěny, díky čemuž by byl výsledek vždy negativní. Nefixovaná tkáň se rychle zamrazí položením na předem zmražený kovový stolek nebo ponořením do kapalného propan-butanu. Bloky se nakrájí v kryostatech na předchlazeném mikrotomu, poté se řezy zachytí na podložní skla, vloží do fixační tekutiny, načež se obarví nebo zpracují jinými metodami a použijí k diagnostice onemocnění. Specifickou roli hraje zmiňovaná peroperační biopsie neboli odběr během operace bez jejího ukončení. Dává chirurgovi rychlou informaci nezbytně důležitou pro rozhodování u právě probíhající operace. Velmi vzácně z ní lze určit i konečnou diagnózu, ale to jsou případy spíše raritní. Při provádění peroperační biopsie je stěžejním faktorem rychlost. Pacient je po odběru tkáně stále anestetizovaný na operačním sále a operatér vyčkává na zprávu od patologa, který má přibližně 30 minut na odečtení. Po předání materiálu probíhá úprava vzorku a technické zpracování kryostatovou metodou, což zabere přibližně 10-15 minut. Následné zhodnocení vzorku se pak pohybuje podle složitosti nálezu od 1 minuty po 15 minut. Dalším ze specifických druhů biopsií zasílaných do histologické laboratoře představují punkční biopsie. Speciální punkční bioptickou jehlou jsou odebrány velmi malé tkáňové vzorky,

kteře jsou uloženy do fixačního roztoku. Těto techniky se využívá v prvotních fázích diagnostiky zejména u onemocnění jater, ledvin, mléčné žlázy, štítné žlázy, prostaty, ale i některých dalších orgánů. Jelikož se při práci využívá jen malého množství tkáně, je výtěžnost tohoto vyšetření v jistých ohledech limitována, např. nelze posoudit vztah k okolním strukturám. Zvláštním druhem punkční biopsie je tzv. trepanobiopsie, což je vyšetření kostní dřene. Jelikož se týká hlavně chorob krvetvorby, lymfatických tkání a také solidních nádorů především v dětském věku, je součástí diagnostiky v hematologii a ortopedické onkologii. Ke zhodnocení se posílá váleček houbovitě kosti, která obsahuje dřevné prostory, ale mohou se vyšetřit i částice dřene vyplavené krví z rány. Důležitá je zde velikost válečku, která ovlivňuje kvalitu výsledku. Minimální požadovaná délka při síle 2 mm je alespoň 15 mm. Punkční biopsie nikdy není metodou terapeutickou. Tou se relativně často může stát jiný z typů odběru, endoskopická biopsie. Využívá se jako součást většiny endoskopických vyšetření, tedy zavedení kamerového systému do dutých orgánů např. bronchoskopie, gastrokopie, kolonoskopie atd. Postupy technického zpracování dodaných tkání se nepatrně liší pro jednotlivé orgány. **(4, 18)**

1.6.1 Imunohistochemie (IHC)

Imunohistochemie je vysoce specializovanou histologickou technikou, která se vzhledem ke své nákladnosti nedá využívat jako doplňkové vyšetření u všech biopsií. Přesto se jedná o metodu nadmíru užitečnou a v mnohých případech i klíčovou při řešení diagnostických rozpaků (zejména při odlišování jednotlivých druhů maligních tumorů). Celá imunohistochemie stojí na principu detekce specifických determinant (znaků vyskytujících se na površích jednoduchých proteinů, přes infekční agens až po specifické buněčné populace) na vazby antigenu a protilátky. Endogenní antigeny jsou vlastní součástí buněk a tkání, kdežto exogenní antigeny se do buněk nejčastěji dostávají prostřednictvím infekcí nebo apoptózy. Imunohistochemické metody sestávají ze dvou fází. **(18, 21, 23, 29)**

V první se provádí příprava sklíčka, která zahrnuje fixaci vzorku a zpracování tkáně. Odběr tkáně a základní kroky se provádí shodně jako v případě jiných odběrů pro histologické vyšetření, tedy jde hlavně o přípravu parafinových řezů, méně se využívá kryostatové metody, vzácně pak nátěrů (tkáňové, krevní nebo cytologické). Tloušťka mikrotomových řezů je výhodnější lehce silnější než v případě klasického zpracování,

optimálně 5 μm . Napínání na podložní skla pomocí štětečku nebo jehly probíhá zcela standardně, avšak nyní preferujeme tkáňové řezy ošetřit pomocí proteáz nebo mikrovlnného záření za účelem zmírnění nepříznivých vlivů fixace. **(18, 23, 29)**

Druhá část představuje ozřejnění antigenu reakcí s protilátkou. Jelikož samotná vazba probíhá bez viditelné odpovědi, je zapotřebí použít speciální zviditelňující látky tzv. chromogeny. Z hlediska lokalizace chromogenu lze imunohistochemické metody rozdělit do dvou skupin na přímé a nepřímé. Přímá metoda je z hlediska provedení jednodušší, jelikož se značená protilátka váže rovnou na antigen ve zkoumané tkáni. Nativní řezy jsou díky vysokému zastoupení antigenu typicky vyšetřovány právě touto technikou. Nepřímá metoda je o něco komplikovanější, což vynahrazuje svou vyšší citlivostí i variabilitou. Na tkáňové řezy (zejména parafínové, na kterých je přímá málo citlivá) se nanese neoznačená primární protilátka, která je zaměřena na prokazovaný antigen. V druhé vrstvě se aplikuje sekundární značená protilátka, která se naváže na protilátku primární, a tedy nepřímo na požadovaný antigen. Principiálně nehraje roli, zdali je chromogenem enzym nebo kov, protože výsledkem těchto metod je viditelný barevný produkt, který prokazuje pozitivní reakci protilátky, a tím i přítomnost hledaného antigenu. Při použití fluorochromu je nutné k vizualizaci využít fluorescenční mikroskop. **(18, 23, 29)**

2 Cíl práce

Cíl1:

Porovnat pozitivitu markeru p16 u jednotlivých histologických skupin cervikálních neoplázií.

Cíl 2:

Potvrdit znatelně nižší výskyt positivity markeru p16 u low-grade lézí oproti high-grade lézím.

3 Metodika

Praktická část bakalářské práce byla prováděna na Oddělení patologie Nemocnice Písek, a.s. Vyšetřovaný soubor obsahoval vzorky posouzené patologem na základě předešlého histologického vyšetření, a které byli dále určeny k imunohistochemickému vyšetření protilátkou p16. U těchto vzorků byl použit CINtec p16 INK4a Histology Kit od společnosti Roche mtm laboratories AG určený pro kvalitativní detekci antigenu p16^{INK4a} na tkáňových řezech in vitro. Specifické antigenní determinanty se detekují využitím imunohistochemické vazby, tedy na principu vazby antigen a protilátka, s cílem zvýšení diagnostické přesnosti, shody při stanovení diagnózy high-grade cervikální intraepiteliální neoplázie a cervikálního karcinomu. Tato souprava je určena k provádění IHC barvení ve dvou krocích vzorků tkání fixovaných ve formalínu a zalitých v parafínu získaných při cervikálních biopsiích. Vyšetření se provádělo pomocí myší monoklonální protilátky (klon E6H4) zaměřené proti lidskému protein p16^{INK4a}.

3.1 Příprava vzorku

Podmínky správného odběru materiálu jsou uvedeny v Laboratorní příručce Oddělení patologie, Nemocnice Písek, a.s.

Odběr tkáně provádí specializovaný lékař do vhodné nádoby. Ta musí být z části naplněna fixační tekutinou, v tomto případě 10% formolem, a tkáň v ní musí být zcela ponořena, aby se zachoval stav materiálu. Konizáty děložního čípku se před vložením do nádoby musí rozstříhnout a napnout na destičku. Vzorky z biopsie, tedy tkáně odebrané od živého pacienta, by měly být fixovány po dobu 18-24 hodin, aby nedošlo k degradaci tkáně. Označený materiál s příslušnou průvodkou se poté transportuje na oddělení patologie, kde vzorek projde příjmem, což znamená, že se zkontroluje správnost údajů, přiřadí se laboratorní číslo a vzorky se roztrídí. Patolog makroskopicky zhodnotí zaslanou tkáň (popíše změny, rozměry, váhu), vybere reprezentativní vzorek, materiál upraví a vloží jej do kazetky. Ty mají nejrůznější velikosti podle objemu materiálu a poté se tkáně uloží do autotechnikonu, kde se vzorky odvodní. Následuje proces zalévání materiálu do parafinových bločků a krájení tkáně mikrotomem. Každý blok tkáně se rozřeže na řezy o velikosti 4-5 μm . Takto připravené tkáňové řezy se na teplé vodní hladině roztáhnou a umístí na podložní sklíčko.

Imunohistochemickému vyšetření předchází nejdříve histologické vyšetření a diagnostika. Lékař poté vybere vhodný parafinový bloček, který se přikrojí a dále zpracovává. V SOP-PAT-201 Imunohistochemickém vyšetření antigenů je uveden postup vyšetření. Na speciální podložní skla se natáhne vybraný parafinový řez a ten se při 60 °C suší 20 minut v sušárně Z/16 nebo v termostatu, aby se zlepšila přilnavost tkáně ke sklíčku. Následuje deparafinace xylenem, opláchnutí skla v sestupné řadě etanolu (96 %, 80 % a 70 %) a v destilované vodě. Tento krok je určen k odstranění fixačního média a rehydrataci. Za pomoci Epitop Retrieval Solution, který byl naředěn 1:10 za použití destilované vody, dochází v kalibrované digitální vodní lázni Z/1, kde je možné roztok udržovat při teplotě 95-99 °C, ke zpřístupnění epitopu (konkrétní část na antigenu). Tento proces trvá 10 minut. Po tepelně indukovaném zpřístupnění epitopu se tkáňové řezy musí zchladit na pokojovou teplotu nejméně na 20 minut a teprve poté se mohou dále zpracovávat. Řezy se promývají 1-5 minut v promývacím pufru naředěném destilovanou vodou 1:10 s pH 7,4-7,8. Všechny další inkubace se provádějí ve vlhké komoře při pokojové teplotě. Před nanášením detekčního systému je zapotřebí udělat kolem tkáně kroužek tužkou PAP-PEN, aby se zabránilo plýtvání a roztékání chemikálií. K zakrytí vzorku se za pomoci pipety nanese 200 µl blokátoru endogenní peroxidázy na 5-10 minut a přebytečná tekutina se odstraní promývacím pufrem 1-5 minut. Pufr se odstraní, na vzorek se pomocí pipety nanese 200 µl primární protilátky p16, následuje inkubace po dobu 30 minut a sklíčko se opláchne promývacím pufrem stejně jako v předešlém kroku. Přidá se 200 µl značeného polymeru (Dako EnVision + Dual Link System – HRP) a 30 minut se podložní sklo inkubuje. Opět proběhne opláchnutí promývacím pufrem a inkubuje se 5-10 minut se substrátovým chromogenním roztokem DAB (DAB + Substráte Buffer a DAB Chromogen). Sklíčko se musí opláchnout destilovanou vodou, poté krátce, asi na 30 vteřin, na něj nalít Harrisův hematoxylin, jemně opláchnout pod tekoucí vodou, v 96% etanolu, acetonu, aceton-xylenu v poměru 1:1 a xylenu. Sklo se vytáhne z kyvety a okolí tkáně oťreme filtračním papírem, buničinou, popřípadě hadříkem. Na podložní sklíčko se kápne skleněnou tyčinkou kapka montovacího média Entellanu NEU a řez se zakryje krycím sklíčkem příslušné velikosti. Bubliny jemně vytlačíme preparační jehlou. Na obarvených preparátech se zvýrazní laboratorní číslo a sklíčka se vloží do příslušného nosiče. Výsledkem je namodralý preparát se zlatohnědými až hnědými reakcemi.

3.2 Hodnocení preparátů

Předpřipravené preparáty byly hodnoceny pomocí světelného mikroskopu NIKON Eclipse E400. Po zapnutí síťového vypínače, nastavení vhodného jasu a umístění sklíčka na stolek mikroskopu do držáku preparátu, jsme hodnocení začínali vždy na nejmenším zvětšení, kdy jsme si našli epitel cervixu, zaostřili pozici hrubým a jemným zaostřováním. Poté jsme postupně přidávali zvětšení a porovnávali změny nacházející se ve tkáních. Vzorky jsme hodnotili podle tří základních parametrů.

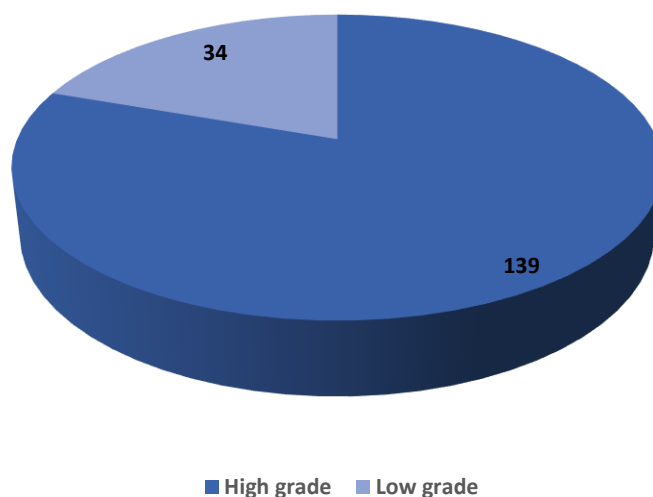
Jednak jsme určovali pozitivitu či negativitu vyšetření jako takového. Pozitivní hodnocení bylo přiřazeno, objevila-li se zlatohnědé až hnědé reakce primárně v bazální a parabazální vrstvě dlaždicového cervikální epitelu. Za negativní výsledek byly označeny případy, u nichž zůstal vzorek v neutrálním, modrém zbarvení.

Dále jsme sklíčka rozdělovali na tkáně s difúzní pozitivitou a blokovou. Difúzní pozitivita byla užitá, vyskytovala-li se reakce nepřerušovaně v daném rozsahu epitelu. Blokovaná pozitivita byla reprezentována přerušovanými, avšak dostatečně intenzivně zbarvenými, oblastmi epitelu. V obou případech jsme vzorky hodnotili jako pozitivní.

Posledním kritériem korelovalo s hodnocením CIN, tedy jsme hodnotili, do kolika třetin výšky epitelu od bazální membrány se objeví pozitivita barvení. Hodnoty odpovídali 1/3 pro CIN I, 2/3 pro CIN II a 3/3 pro CIN III a invazivní karcinomy.

4 Výsledky

Za rok 2016 a 2017 bylo na Oddělení patologie Nemocnice Písek, a.s. imunohistochemicky vyšetřeno 173 vzorků tkáně cervixu na pozitivitu markeru p16. Podle předstupně malignity se jednalo o 34 low-grade a 139 high-grade lézí.



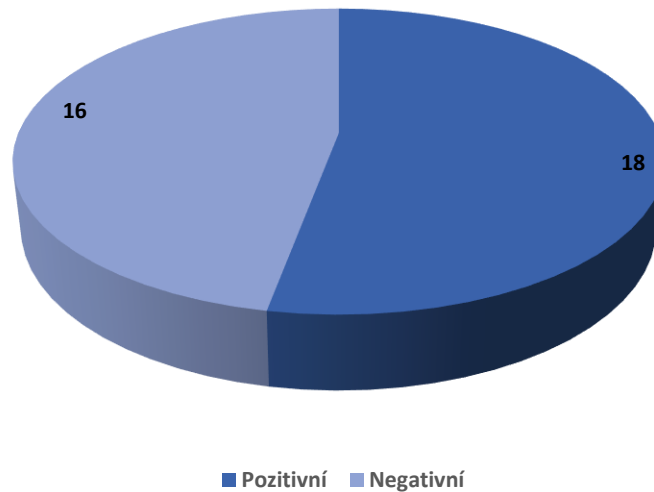
Graf č. 1: Rozdělení vyšetřených vzorků podle předstupně malignity

Marker p16 je využíván v diagnostice lézí asociovaných s HPV infekcí, zejména se jedná o vzorky z děložního čípku, dutiny ústní, hrtanu a kůže. Nejčastěji je toto imunohistochemické vyšetření indikováno právě u první jmenované lokalizace.

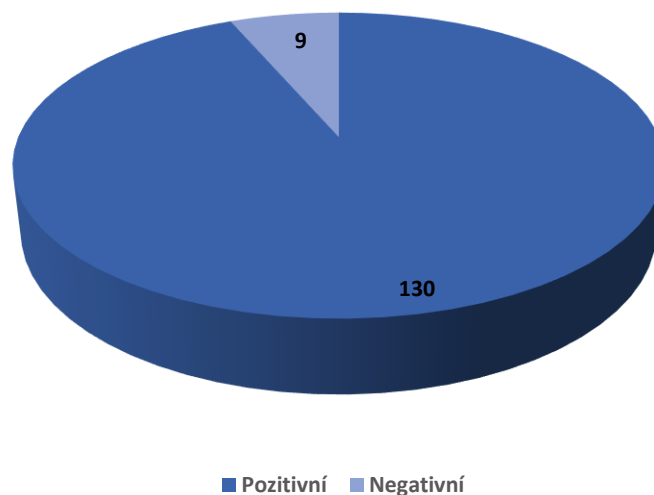
Tabulka č.1: Přehled diagnóz za roky 2016 a 2017 s indikovaným vyšetřením na pozitivitu markeru p16

	CIN I	CIN II	CIN III	Invazivní karcinom
2016	20	33	37	6
2017	14	16	44	3

Protein p16 bývá exprimován v buňkách infikovaných vysoce rizikovými podtypy HPV téměř vždy. U nízké rizikových subtypů HPV již výskyt není tak častý, což potvrzuje následující dvojice grafů. V grafu č. 2 je zaznamenána pozitivita markeru p16 u 18 z celkového počtu 44 vyšetřených vzorků tkáně cervixu s diagnostikovanou LG lézí a 16 vzorků vyšlo negativně na expresi tohoto proteinu. Z grafu č. 3 vyplývá, že ze 139 high-grade lézí vyšlo 130 pozitivně a jen 9 negativně.

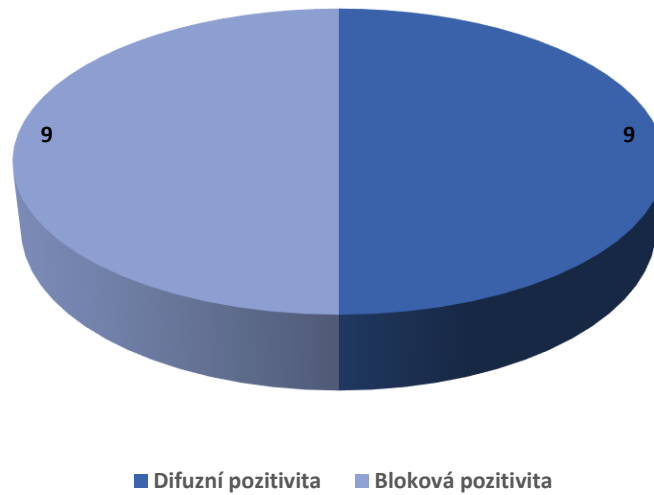


Graf č. 2: Expres markeru p16 u low-grade lézí



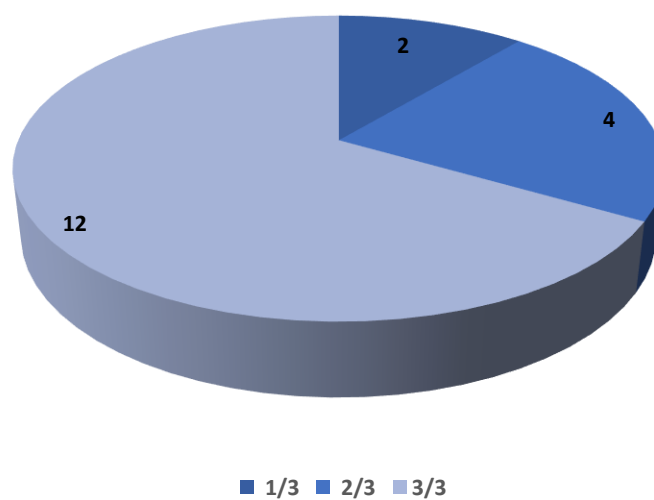
Graf č. 3: Expres markeru p 16 u high-grade lézí

Pozitivní vzorky jsme dále rozdělovali podle difúzní a blokové pozitivity. V tomto případě bylo u low-grade lézí 9 s difúzní pozitivitou. 9 vzorků cervixu mělo pozitivitu blokovou.



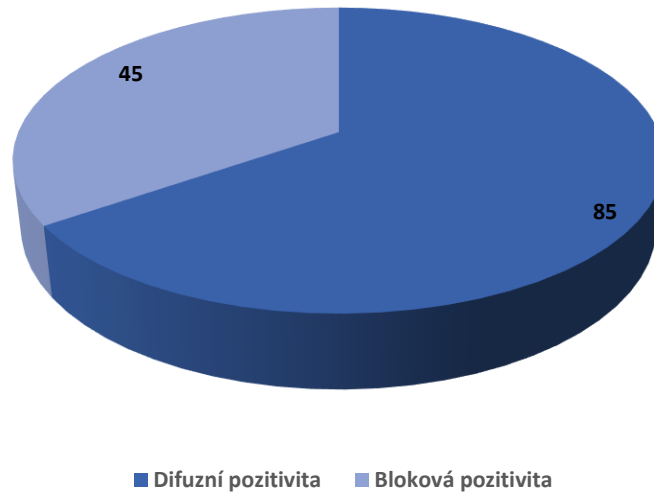
Graf č. 4: Výskyt proteinu p16 u low-grade lézí

Dále jsme pozitivní vzorky rozlišovali podle výšky, do které je protein p16 v lézích pozitivní. U low-grade lézí se marker p16 vyskytoval u 2 vzorků do jedné třetiny, u 4 vzorků do dvou třetin a u 12 se protein nacházel v celé výši epitelu.



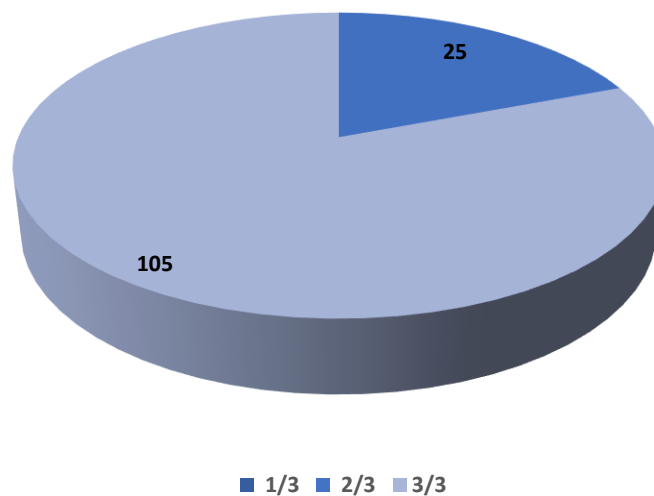
Graf č. 5: Plocha rozšíření markeru p16 u low-grade lézí

Ze 130 pozitivních vzorků s diagnostikovanou high-grade lézí mělo 45 blokovou pozitivitu. Naopak v 85 případech byla pozitivita difúzní.



Graf č. 6: Výskyt proteinu p16 u high-grade lézí

Protein p16 se u high-grade lézí pouze do jedné třetiny epitelu vůbec nenacházel, v 25 případech se nacházel tento marker ve spodních dvou třetinách a ve 105 případech byl pozitivní v celém rozsahu výšky epitelu.



Graf č. 7: Plocha rozšíření markeru p16 u high-grade lézí

5 Diskuze

Na Oddělení patologie Nemocnice Písek, a.s bylo za rok 2016 a 2017 imunohistochemicky vyšetřeno na pozitivitu markeru p16 173 vzorků tkání cervixu, z nichž 80 % mělo diagnostikovanu HG lézi děložního čípku a u zbylých 20 % vzorků se jednalo o léze typu low-grade. Tomuto specifickému vyšetření předcházelo standardní histologické vyšetření preparátů barvených hematoxylinem-eozinem, díky kterému byla určena předběžná diagnóza, což vedlo právě k imunohistochemickému vyšetření na přítomnost antigenu p16. Všeobecně se imunohistochemické metody využívají ke zvýšení diagnostické přesnosti a shody při stanovení diagnózy, zejména v případech high-grade lézí (u p16 jde o cervikální intraepiteliální neoplázie a cervikální karcinom).

V tabulce č. 1 je uveden přehled posuzovaných diagnóz za rok 2016 a 2017. Za tyto dva roky byl CIN I diagnostikován u 34 vyšetřovaných případů, CIN II se vyskytoval v 49 případech, CIN III se nacházel u 81 případů a v 9 případech byl potvrzen nálezní invazivního karcinomu. Raná stádia se většinou dají dobře rozpoznat při preventivním vyšetření u gynekologa, a proto je zapotřebí nepodceňovat screeningová opatření. Ty se bohužel v naší republice diagnostikují jen v 50 % případů. Čím později se nemoc odhalí, tím je léčebný zákrok rozsáhlejší a pro ženu náročnější. V současné době žije v České republice přibližně 18 000 žen s nádorem děložního čípku a ročně nově onemocní okolo tisíce dalších.

Cílem práce bylo potvrdit znatelně nižší výskyt positivity markeru p16 u low-grade lézí oproti high-grade lézím, což je zřejmé z grafů č. 2 a 3. V případě low-grade lézí byl protein p16 pozitivní v 53 %, kdežto u high-grade lézí byl tento marker exprimován u 94 % vzorků. Protein p16 se vyskytuje v buňkách infikovaných vysoce rizikovými podtypy (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 a 51) téměř vždy oproti nízko rizikovým subtypům (6, 11, 40, 42, 43, 44 a 54), kde je jeho výskyt značně variabilní.

Dalším posuzovaným aspektem byla pozitivita markeru p16 u jednotlivých histologických skupin cervikálních neoplázií. Tu jsme porovnávali ve dvou parametrech. V grafu č. 4 můžeme vidět, že z 18 pozitivních tkání s low-grade lézí mělo 50 % difúzní pozitivitu, takže protein p16 se nacházel bez přerušování v celé délce epitelu a v 50 % případů se vyskytovala pozitivita bloková. To znamená, že se epitel barví jen v některých částech, barvení je přerušované, ale i přes to jsou tyto vzorky pozitivní na marker p16. Těchto 18 vzorků jsme také rozlišovali podle toho, do jaké výšky se již

zmiňovaný protein p16 vyskytoval (graf č. 5). U 11 % vzorků se pozitivita nacházela pouze do jedné třetiny, rozšíření do dvou třetin bylo patrné u 22 % vzorků a u zbylých 67 % vzorků se marker vyskytoval v celé šíři epitelu, tedy ve třech třetinách.

U high-grade lézí byla exprese markeru p16 pozitivní ve 130 ze 139 případů, z toho mělo 35 % vzorků pozitivitu blokovou a 65 % vzorků pozitivitu difúzní (graf č. 6). V tomto případě se protein do výšky jedné třetiny epitelu vůbec nenalézal, do dvou třetin byl přítomen v 19 %. Nejvíce se tedy p16 u těchto lézí vyskytovala v celém rozsahu epitelu (81 %), což je znázorněno v grafu č. 7.

6 Závěr

Lidský papilomavirus je infekční agens, u kterého se prokázala souvislost se specifickým typem lidského nádorového onemocnění a vyskytuje se u 99,7 % všech nádorů děložního čípku, jejichž původcem jsou vysokorizikové subtypy papilomavirů (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 a 51). Tyto karcinomy jsou celosvětově třetím nejčastějším nádorovým onemocněním u žen a čtvrtou nejčastější příčinou úmrtí na nádorová onemocnění. Z toho důvodu bylo zavedeno od sedmdesátých let minulého století ve vyspělých zemích k zachycení abnormálních změn na děložním hrdle screeningové cytologické vyšetření a dá se říct, že je velmi úspěšné. Výskyt pokročilých stádií rakoviny děložního čípku díky němu výrazně poklesl (např. Finsko, Nizozemsko, ...). Oproti těmto zemím je incidence v České republice několikanásobně vyšší, a právě z tohoto důvodu má provádění cytologického screeningu smysl. Na druhou stranu v rozvojových zemích, kde neexistuje screeningový program poskytující včasné rozpoznání prekanceróz nebo časných stádií karcinomu, dochází až u 85 % případů k úmrtí s ním spojeným.

Využívání imunologicky barvené tkáně na p16 je výhodné jednak v celkovém zpřesnění diagnostiky, a také ke zvýšení záchytu high-grade neoplázií a invazivních karcinomů. Toto vyšetření se dá pokládat za tzv. pomocné, stanovuje totiž výslednou diagnózu na základě předběžné diagnózy, zjištěné z histologických preparátů barvených hematoxylinem eozinem.

Vyšetřovaný soubor obsahoval 173 pacientek různého věku, které jsme shromáždily za 2 roky (2016 a 2017), z nichž mělo 139 diagnostikováno high-grade léze a 34 low-grade léze. Je popsáno mnoho studií, které dokládají, že exprese proteinu p16 byla z imunohistochemického hlediska pozorována ve velmi vysokém počtu případů prekancerózní cervikální dysplazie. V našem případě byl marker p16 pozitivní u 130 HG lézí a u 18 LG lézí. Stanovené cíle, tedy pozorovat odezvu markeru p16 u jednotlivých stádií dysplastických změn a potvrdit pozorováním výrazně vyšší výskyt pozitivivity p16 u high-grade lézí oproti low-grade lézím, lze vzhledem k výše popisovaným datům hodnotit jako splněné s výsledky potvrzujícími původní předpoklady.

7 Seznam zdrojů

1. BENDOVIÁ, Marie. *Co by měly ženy znát o rakovině (karcinomu) děložního čípku: rady nejen pro pacientky*. Praha: Liga proti rakovině, 2008.
2. ČIHÁK, Radomír. *Anatomie*. Třetí, upravené a doplněné vydání. Ilustroval Ivan HELEKAL, ilustroval Jan KACVINSKÝ, ilustroval Stanislav MACHÁČEK. Praha: Grada, 2016. ISBN 978-80-247-4788-0.
3. HORAŽDOVSKÝ, Jiří. *Přenosné choroby*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 2001. ISBN 8070404965.
4. JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchôa, José CARNEIRO a Robert O. KELLEY. *Základy histologie*. Jinočany: H & H, 1997. ISBN 80-85787-37-7.
5. KURMAN, Robert J., Maria L. CARCANGIU, C. Simon HERRINGTON a Robert H. YOUNG, ed. *WHO classification of tumours of female reproductive organs*. 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014. World Health Organization classification of tumours. ISBN 978-92-832-2435-8.
6. LIVOTI, Carol a Elizabeth TOPP. *Vagina: manuál pro majitelky*. Praha: Smart Press, 2005. ISBN 80-239-4113-5.
7. MAŠATA, Jaromír a Anna JEDLIČKOVÁ. *Infekce v gynekologii*. Praha: Maxdorf, c2006. Farmakoterapie pro praxi. ISBN 8073451077.
8. MAŠATA, Jaromír a Anna JEDLIČKOVÁ. *Infekce v gynekologii a porodnictví a základy jejich antiinfekční léčby*. Praha: Maxdorf, c2004. ISBN 80-7345-038-0.
9. MCKINNELL, Robert Gilmore. *The biological basis of cancer*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 2006. ISBN 978-0-521-84458-1.
10. ŘIHÁČKOVÁ, Petra. *Osudové příznaky*. Brno: David Židlický, 2009. ISBN 978-80-254-4332-3.

11. SCHAEENZLER, Nicole a Ulf RIKER. *Malý lékařský lexikon*. Praha: Ikar, 2014. ISBN 978-80-249-2473-1.
12. ŠLAMPA, Pavel a Jiří PETERA. *Radiační onkologie*. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-469-0.
13. VOKURKA, Martin a Jan HUGO. *Velký lékařský slovník*. 10. aktualizované vydání. Praha: Maxdorf, 2015. Jessenius. ISBN 978-80-7345-456-2.

Internetové zdroje

14. ARRINGTON, Cheyenne. *Endometrium, Myometrium, Dysmenorrhea, Hydrosalpinx, Meno* ... [online]. ©2003 [cit. 04-12-2017]. Dostupné z: <http://www.thinglink.com/scene/788394854651527170>
15. CASTLE, Philip E., SCHIFFMAN, Mark, WHEELER, Cosette M., SOLOMON, Diane. *Evidence for frequent regression of cervical intraepithelial neoplasia-grade 2* [online]. 2009 [cit. 21-11-2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2694845/>
16. *Česká gynekologie*. Karcinom cervixu – možnosti detekce lidského papilomaviru [online]. 2013, č. 3 [cit. 21-11-2017]. Dostupné z: <http://kramerius.medvik.cz/search/pdf/web/viewer.html?pid=uid:7a596e71-0611-11e5-b183-d485646517a0>
17. *Česko-slovenská patologie*. Co je nového v cytodiagnostice cervikálních prekanceróz? [online]. 2012, č. 1 [cit. 21-11-2017]. ISSN 1210-7875. Dostupné z: <http://kramerius.medvik.cz/search/pdf/web/viewer.html?pid=uid:e6029e5e-0611-11e5-b183-d485646517a0>
18. DVOŘÁK, Karel, DVOŘÁKOVÁ, Zdeňka, FEIT, Josef, LUKÁŠ, Zdeněk, ŠMARDOVÁ, Jana. *Základy histopatologických vyšetřovacích metod* [online]. 2008 [cit. 04-12-2017]. Dostupné z: <https://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histmet.pdf>
19. FEIT, Josef. *Vyšetřovací metody v patologii* [online]. [cit. 04-12-2017]. Dostupné z: https://atlases.muni.cz/atlases/stud/atlas_cz/main+metody+vysmet.html
20. HERBERT, Amanda. *Cervikální cytologie* [online]. ©2014. Poslední změna 2015 [cit. 21-11-2017]. Dostupné z: <https://www.eurocytology.eu/cs/course/3>

21. IDIKIO, Halliday A. *Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology: contributions of protein life-cycle, use of evidence-based methods and data normalization on interpretation of immunohistochemical stains*[online]. 2009 [cit. 04-12-2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2809997/>
22. *Léčba karcinomu děložního čípku* [online]. ©2017. Medixa s.r.o. [cit. 21-11-2017]. Dostupné z: <http://cs.medixa.org/lecba/lecba-karcinomu-delozniho-cipku>
23. MATOS, L. L., TRUFELLI, D. C., MATOS, M. G. L., SILVA PINHAL, M. A. *Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice* [online]. 2010 [cit. 04-12-2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2832341/>
24. MCCREDIE, M. et al. *Natural history of cervical neoplasia and risk of invasive cancer in women with cervical intraepithelial neoplasia 3: a retrospective cohort study* [online]. 2008 [cit. 21-11-2017]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18407790>
25. ROTTER, Leopold. *HPVinfo.cz* [online]. [cit. 04-12-2017]. Dostupné z: <http://hpvinfo.cz/>
26. *Rozšíříme screening o HPV testování?* [online]. 2017. Poslední změna 03.03.2017 08:11 [cit. 06-12-2017]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz>
27. SEHNAL, Borek. et al. *Očkování proti HPV infekci – pohled gynekologa* [online]. 2012 [cit. 21-11-2017]. Dostupné z: <http://kramerius.medvik.cz/search/pdf/web/viewer.html?pid=uuid:2270d973-69cd-11e3-93fe-d485646517a0>
28. *The Pap Smear* [online]. ©2017. Poslední změna 16.8.2015 [cit. 04-12-2017]. Dostupné z: <http://www.soc.ucsb.edu/sexinfo/article/pap-smear>
29. TONAR, Zbyněk, BERANOVÁ, Milena. *Principy a příklady imunohistochemie* [online]. 2002 [cit. 24-11-2017]. Dostupné z: http://www.lfp.cuni.cz/histologie/education/guides/ihc_hi_res.pdf

30. VILÍMOVSKÝ, Michal. *Genitální bradavice (kondylomy): příčiny, příznaky, diagnostika a léčba* [online]. 2014. Poslední změna 26.09.2015 10:40 [cit. 23-11-2017]. Dostupné z: <https://sites.google.com/site/novaiso690/schema-a-priklady/elektronick-zdroje>
31. *Vitalion*. Voda v břiše [online].©2017. [cit. 04-12-2017]. Dostupné z: <https://priznaky.vitalion.cz/voda-v-brise/>
32. *Věstník ministerstva zdravotnictví České republiky* [online].2007[cit. 04-12-2017]. Dostupné z: file:///C:/Users/LENOVO/Downloads/V%C4%9Bstn%C3%ADk_7-2007.pdf

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Anatomie vnitřních ženských pohlavních orgánů (14)	11
Obrázek č. 2: Histologie vrstveného dlaždicového epitelu (20)	13
Obrázek č. 3: Cylindrický epitel endocervixu (20)	14
Obrázek č. 4: CIN I – mírná dysplazie (20)	20
Obrázek č. 5: CIN II – střední dysplazie (20)	20
Obrázek č. 6: CIN III – těžká dysplazie, carcinoma in situ (20)	20
Obrázek č. 7: Odběr materiálu (28)	25

Seznam použitých zkratk

µm – mikrometr

Atd. – a tak dále

CIN – cervikální intraepiteliální neoplázie

Cm – centimetr

Č. – číslo

DNA (Deoxyribonucleic acid) – deoxyribonukleová kyselina

EA-50 – eozin A-50

HG (high-grade) – vysoko rizikové

HIV (Human immunodeficiency virus) – virus imunitní nedostatečnosti

HPV (Human papilloma virus) – lidský papiloma virus

HSIL (high-grade skvamózní intraepiteliální léze) – intraepiteliální změny dlaždicových buněk vysokého stupně závažnosti

IHC – imunohistochemické/á/ý

LBC (Liquid-based cytology) – cytologie v tekutém mediu

LG (low-grade) – nízko rizikové

LSIL (low-grade skvamózní intraepiteliální léze) – intraepiteliální změny dlaždicových buněk nízkého stupně závažnosti

Mm – milimetr

Např. – například

OG-6 – oranž G-6

Pap test – Papanicolaouův test

SCJ – skvamokolumnární junkce

SIL – skvamózní intraepiteliální léze

SOP – standardní operační postup

TNM (Classification of malignant tumours) – klasifikace rozsahu nádorového šíření

Tzv.– takzvaný