

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biologických a lékařských věd

Pokroky v diagnostice a terapii karcinomu děložního čípku

Bakalářská práce

Markéta Pasdiorová

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

Hradec Králové 2011

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Vladimíru Semeckému, Csc., Mgr. Ireně Urbanovské, MUDr. Vladimíru Židlíkovi a RNDr. Davidu Konvalinkovi za odbornou pomoc, ochotu a čas, který mi věnovali.

„Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním autorským dílem a veškeré myšlenky, data a jejich zdroje, z nichž jsem pro zpracování čerpala, řádně cituji. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

datum

podpis

ABSTRAKT

Karcinom děložního čípku je druhým nejčastějším nádorovým onemocněním uváděným ve statistické analýze u žen ve světovém měřítku i v ČR a jeho incidence vzrůstá i v mladších věkových skupinách. Toto závažné onemocnění je mimo jiné etiologické faktory dokladatelně indukováno infekcí viry ze skupin lidských papillomavirů řazených do skupiny HPV.

Předložená bakalářská práce se zabývá současnými poznatky o vzniku a průběhu onemocnění karcinomem děložního čípku, jeho prevencí, diagnostikou a možnostmi účinné terapie.

V praktické části je blíže popsána diagnostická metoda, která se postupně doporučuje ke zpřesnění diagnostiky onemocnění – metoda INNO-LiPA, která je založena na reverzní hybridizaci a slouží k zjištění typu HPV. V práci jsou dále uvedeny výsledky testů souboru pacientek z klinického materiálu pracoviště Oddělení molekulární genetiky laboratoře CGB a.s. Ostrava, které byly vyšetřeny výše uvedenou metodou.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second most frequent cancerous disease presented in the statistical analysis of women in the world as well as in the Czech Republic and its incidence increases also in younger age groups. This serious disease is among other etiological factors induced by virus infection of human papillomavirus from the group of HPV.

The presented thesis deals with current knowledge about the origin and progress of the cervical cancer, its prevention, diagnosis and effective treatment options.

The practical part describes the diagnostic method which is gradually recommended to specify the diagnosis of the disease – the INNO-LIPA method which is based on reverse hybridization and used to determine the type of HPV. The thesis also includes the test results of the group of patients from clinical material of workplace Department of Molecular Genetics Laboratory CGB a.s. Ostrava that were diagnosed by the method.

OBSAH

1	ÚVOD - zadání práce	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Anatomie a fyziologie dělohy	10
2.2	Nemoci děložního čípku	11
2.2.1	Endocervicitis	11
2.2.2	Prekancerózy	12
2.2.3	Karcinom děložního čípku	14
2.2.4	Epidemiologie	16
2.2.5	Klinické příznaky	18
2.2.6	Histopatologie	18
2.3	Prevence	19
2.3.1	Sekundární prevence - screening	20
2.3.2	Primární prevence - vakcinace	20
2.4	Terapie	23
2.4.1	Destrukční metody	24
2.4.2	Ablační metody	24
2.4.3	Radioterapie	25
2.4.4	Chemoterapie	26
2.4.5	Chemické metody	26
2.4.6	Imunomodulační látky a antivirotika	27
2.4.7	Terapeutická vakcína	27
2.5	Diagnostika	28
2.5.1	Kolposkopie	28
2.5.2	Cytologie	29
2.5.3	Histologie	31
2.5.4	Sérologie	31
2.5.5	Metody přímé detekce	32
2.5.6	Speciální metody	33
2.5.7	Detekce p16	34

3	PRAKTICKÁ ČÁST	35
3.1	INNO-LiPA Genotypizace	36
3.1.1	Identifikace HPV genotypu	36
3.1.2	Princip testu	37
3.1.3	Použitý materiál a přístroje	38
3.1.4	Princip postupu	40
3.1.5	Kontrola kvality	41
3.1.6	Interpretace výsledků	42
3.2	Příklad výsledků vyšetření	44
4	DISKUZE	48
5	ZÁVĚR	50
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56

1 ÚVOD - zadání práce

Karcinom děložního čípku je druhé nejčastější maligní onemocnění u žen. Většina maligních nádorů vychází z dlaždicobuněčného epitelu. Tato choroba je ve většině případů přenášena pohlavním stykem.

Včasně zachycení prekancerózních lézí je důležité pro dobrou prognózu pacienta. Primární prevencí je cytologický screening, který je doplněn histologickým vyšetřením. Při pozitivním nálezu se pacientky dále vyšetřují na přítomnost HPV. Určují se také typy HPV – LR (low-risk) a HR (high-risk) HPV. LR HPV 6 a 11 jsou typické pro condylomata accuminata, HR HPV převážně 16 a 18 pro karcinom děložního čípku.

Hlavním problémem je v současné době zvýšená incidence u mladší věkové skupiny, proto je zapotřebí vyvíjet nové prevenční, diagnostické i terapeutické metody.

Cílem bakalářské práce je informovat o velmi extenzivním rozvoji diagnostických a terapeutických přístupů k léčbě pacientek s onemocněním virem HPV, včetně o nejposlednějších poznatcích a doporučeních k prevenci tohoto onemocnění. Zaměřili jsme se na genotypizační metodu INNO-LiPA, která je zavedena jako rutinní test na Oddělení molekulární genetiky laboratoře CGB a.s. Ostrava.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Anatomie a fyziologie dělohy

Děloha (*uterus*) je svalový orgán uložený v malé pánvi (mezi močovým měchýřem a konečníkem). U dospělých žen má tento dutý, silnostěnný orgán tvar zploštělé hrušky. Člení se na dvě části: děložní tělo (*corpus uteri*) a děložní hrdlo (*cervix uteri*). Mezi tělem a hrdlem se nachází malý spojovací můstek (*isthmus uteri*). Obě tyto části se odlišují svou funkcí, stavbou, ale i patologickými procesy, které je provázejí. [1]

Děložní hrdlo je tvořeno:

- *portio supravaginalis cervicis* (nad připojením pochvy, horní úsek hrdla)
- *portio vaginalis cervicis* = děložní čípek (dolní kónický a zaoblený úsek hrdla vyčnívající do poševní dutiny, mezi předním a zadním pyskem je zevní branka děložní - *ostium uteri* - otvor do vaginy) [2]

Děložní tělo tvoří:

- přední stěna (*facies vesicalis*) - přivrácená k močovému měchýři
- zadní stěna (*facies intestinalis*) - obrácená vzhůru proti střevním kličkám
- děložní dno (*fundus uteri*) - nad vstupem vejcovodů, nejširší část těla
- děložní rohy (*cornua uteri*) - výběžky z okrajů dna děložního, ve kterých vejcovody vstupují do dělohy [2]

Děložní stěna je složena ze tří vrstev

- Endometrium (sliznice) – je na povrchu kryta jednovrstevným cylindrickým epitelem a má šedorůžovou barvu. Endometrium obsahuje tubulózní žlázy (*glandulae uterinae*), zasahující do myometria. Děložní hrdlo se skládá ze dvou epitelů - cylindrického epitelu uspořádaného v řasy a tvořeného hlenotvornými buňkami, který vystýlá kanál hrdla, a z epitelu dlaždicového, vrstevnatého, který vystýlá hrdlo obrácené do poševní dutiny a má stejnou výstelku jako pochva. [1]

Sliznice prodělává změny. Tyto změny se nazývají menstruační cyklus. Vzhledem k tomuto cyklu je endometrium složeno ze dvou zón:

- zona basalis – během cyklu se výrazně nemění, je stabilní a srůstá s myometriem
 - zona functionalis – v průběhu cyklu prochází v několika fázích charakteristickými změnami, povrchová vrstva endometria [2]
-
- Myometrium (svalovina) – se skládá ze snopců hladké svaloviny, autonomních nervů, lymfatických a krevních cév. Snopce svaloviny jsou prostoupeny vazivem. V premenstruačním období vazivo zduří a nalézáme v něm zvýšené množství tekutiny. Svalovinu tvoří vrstvy s různě prostorově upravenými snopci: podslizniční, vaskulární, supravaskulární a subserózní. [2]
 - Perimetrium (peritoneum širokého děložního vazů) – je pevně srostlé s povrchem dělohy, tvoří její povrch. Z dělohy na močový měchýř a na rectum přechází dvěma vkleslinami (*excavatio vesicouterina* a *excavatio rectouterina*). [2]

2.2 Nemoci děložního čípku

Mezi patologické nálezy děložního čípku zahrnujeme záněty (cervicitis), endocervikální polypy, endometriózu čípku, prekancerózy (dysplázie) a nádory. Benigní nádory jsou vyvolány lidskými papillomaviry, nejčastěji mezi ně patří bradavice na nohou a rukou (*verruca plana*, *v. plantaris*, *v. vulgaris*) a condylomata accuminata (genitální bradavice), která se nacházejí na vagině, vulvě, děložním hrdle, penisu, v anální oblasti a také v hrtanu. Condylomata accuminata jsou zapříčiněna dvěma typy LR HPV, a to HPV 6 a HPV 11. [3-6]

2.2.1 Endocervicitis

Endocervicitis je nespecifický zánět, který je běžný u žen ve fertilním věku. Klasifikuje se jako neinfekční cervicitis (chemické a mechanické podněty), infekční

cervicitis sexuálně přenosný (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trimononas vaginalis*, *Herpes simplex*) a infekční cervicitis jiného původu (kvasinky, bakterie fekálního původu). Projevuje se výtokem, svěděním a bolestí. [6]

2.2.2 Prekancerózy

Prekancerózy se vyskytují v dlaždicobuněčném a žláзовém epitelu děložního čípku, častěji jsou však zpozorovány dlaždicobuněčné prekancerózy. Takovéto změny jsou definovány jako cervikální intraepiteliální neoplázie – CIN (1-3) a jsou charakterizovány jako alterace dlaždicového epitelu s abnormální buněčnou proliferací, maturací a cytologickými odchylkami. Způsobují je HPV infekce bazálních buněk cervikálního epitelu. Léze nízkého stupně (CIN 1) se transformují v léze vysokého stupně (CIN 2 a 3), předchází tak s největší pravděpodobností začlenění HR HPV DNA (vysoce rizikové) do bazálních buněk epitelu. Číslo CIN 1-3 popisuje, jak velká část sliznice je zasažena abnormálními buňkami. CIN 3 se považuje za prekancerózní stav. Mezi prekancerózy také řadíme condylomata accuminata. [7-9]

Léze můžeme rozdělit podle jejich místa nálezu na vulvální, vaginální a cervikální. Vulvární intraepiteliální neoplázie (VIN 1-3) má dva typy: klasický (bowenoidní) a simplexní (diferenciováný), které se liší makroskopicky, histologicky i chováním.

U bowenoidní formy se často diagnostikuje přítomnost kondylomat a herpes genitalis. Tvoří bělavé až erytematózní plaky a pigmentová ložiska, tvaru může být verukózního, polypoidního nebo papulárního. Nachází se především u mladších pacientek. Důležitý je nález HR HPV 16 (v 90 % případů), který se taktéž nachází v cervikálních lézích.

U simplexního typu se HPV nalézá u malého procenta pacientek a postihuje hlavně starší ženy. Tato forma však přechází v o mnoho větším procentu případů v invazivní dlaždicový karcinom než forma klasická. Vyznačuje se obrovskými bělošedavými ložisky na vulvě, hrubou kůží v místech infekce a hrbolatým povrchem na dotek.

Vaginu může postihnout vaginální intraepiteliální neoplázie (VAIN). Jsou diagnostikovány pouze vzácně, ve spojení s intraepiteliální a dlaždicovou metaplazií

vulvy a čípku. Opět je nejčastěji asociována s typem HPV 16. Často se vyskytuje u žen po chirurgickém zákroku lézí cervixu s odstupem více než 5 let. [10]

2.2.2.1 Exofytický kondylom

Špičaté kondylomy (condylomata accuminata) jsou benigním projevem infekce HPV. Jedná se o morfologicky různorodé pohlavní bradavice vyskytující se u žen v mladším dospělém věku, která jsou nejčastěji zapříčiněna dvěma typy LR HPV, a to HPV 6 a HPV 11. V období těhotenství byla zjištěna zvýšená progresse kondylomat. U pacientek s pohlavními kondylomaty je větší pravděpodobnost, že dojde ke vzniku cervikální léze v souvislosti s oslabením imunitního systému, tím pádem ke zvýšené citlivosti k HPV infekci. [8]

2.2.2.2 Cervikální intraepiteliální neoplázie

Dle stupně závažnosti se dělí na:

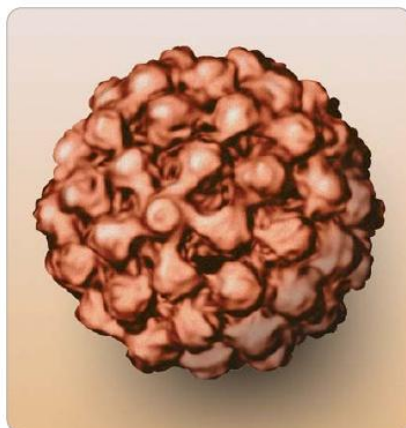
- CIN 1 (nízký stupeň skvamózní intraepiteliální léze) - mírná dysplázie způsobena infekcí HPV, považována za běžný stav zvláště u mladých žen, postihuje spodní třetinu epitelu, je přítomna vícejadernost a koilocytóza (hyperchromázie, karyomegalie), mitotická aktivita
- CIN 2 (vysoký stupeň skvamózní intraepiteliální léze) – středně těžká dysplázie, která může vést ke karcinomu, pokud se neléčí, maturace v horní třetině epitelu, spodní 2/3 pokrývají dysplastické buňky, i atypické mitózy
- CIN 3 (vysoký stupeň skvamózní intraepiteliální léze, *karcinoma in situ*) - těžká dysplázie, kdy se po celé tloušťce epitelu nachází abnormální buňky s vysokou mitotickou aktivitou, i atypickou mitózou, chybí maturace [6,8-9]

Název léze	HPV riziková kategorie	Srovnání klasifikačních systémů		
			Dysplázie/CIS	SIL
Exofytický kondylom- exophytic condyloma	Low-risk	-	-	LGSIL
Dlaždicový papilom- squamous papiloma	Low-risk	-	-	LGSIL
Plochý kondylom- flat condyloma	Low a high-risk	-	-	LGSIL
CIN 1	Low a high-risk	Low-grade CIN	Mírná dysplázie	LGSIL
CIN 2	High-risk	High-grade CIN	Středně těžká dysplázie	HGSIL
CIN 3	High-risk	High-grade CIN	Těžká dysplázie	HGSIL

Tab. č. 1. Klasifikace intraepiteliálních lézí děložního čípku [8]

2.2.3 Karcinom děložního čípku

Karcinom čípku je nádorové onemocnění děložního čípku (dolní části dělohy), které je způsobeno lidskými papillomaviry, resp. HPV. Papillomaviry mohou způsobovat také genitální bradavice (condylomata accuminata) a nádory hlavy a krku. Toto onemocnění může vést až ke smrti. [11-12]



Obr. 1 Lidský papilomavirus.

Obr. 1. Lidský papillomavirus [13]

2.2.3.1 Etiologie

Papillomaviry jsou malé, neobalené DNA viry, které náleží do čeledi Papovaviridae. Jejich viriony jsou veliké 55 nm a obsahují kruhově uspořádanou dvouvláknovou DNA o délce cca 8 000 pb. Virová DNA kóduje geny časně (E1-E8) a geny pozdní (L1-L2) infekce. Dnes je známo více než 100 typů lidských papillomavirů, z nichž se asi 40 typů uplatňuje v anogenitální oblasti (konečník, děložní hrdlo, pochva, penis) a jiné kožní a slizniční oblasti (spojivky, ústa, nos, hrtan). Systém jejich klasifikace je založený na porovnávání podobnosti nukleotidové sekvence genomů izolátů. HPV se vyznačují tkáňovou specificitou (kožní a slizniční) a jsou poměrně rezistentní. Papillomaviry neinfikují pouze lidi, ale také zvířata, proto jsou i druhově specifické. [14-16]

Z hlediska rizikivosti a onkogenního potenciálu se HPV dělí na:

- málo rizikové (LR, low-risk) – 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81
- vysoce rizikové (HR, high-risk) – 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 [16-17]

Vstup těchto virů do organismu se děje nejčastěji mikrotraumaty kůže a sliznic, většinou jako následek pohlavního styku. U infekce může dojít ke spontánnímu ústupu až k úplnému odstranění imunitním systémem, může ovšem přetrvávat a rozvíjet se. Při

perzistující infekci je HPV DNA ve volné formě („koilocyty“), u tumorové buňky je HPV DNA integrovaná na dané místo do hostitelského genomu. Účinkem genů E6 a E7 dochází k onkogenní transformaci infikované buňky na nádorovou buňku, inaktivují totiž proteiny antionkogenů (supresorových genů) p53 a p105Rb. To vede ke ztrátě jejich antiproliferační kontrolní funkce. [15,18]

Na rozvoji se podílejí tyto rizikové faktory:

- vyšší počet sexuálních partnerů (promiskuita)
- kouření
- hormonální antikoncepce
- brzký začátek sexuálního života (před 16. rokem)
- poruchy imunitního systému (imunosuprese, HIV)
- větší množství porodů a potratů
- nízká sociální a ekonomická úroveň
- výskyt jiných infekcí (chlamydie, herpes virus, CMV) [17,19]

2.2.4 Epidemiologie

Infekce HPV je hlavním důvodem vzniku karcinomu děložního čípku. Mezinárodní statistiky vypovídají o tom, že prevalence HPV u pacientek s cervikálním karcinomem činí 99,7 %, kdežto prevalence HPV u běžné populace vychází okolo 10-20 %. Další studie prokázaly, že se každým rokem nakazí asi 6 miliónů lidí. U žen s pozitivním nálezem HPV je poměrné riziko vzniku cervikálního karcinomu 20-70 %. V České republice se každoročně objeví okolo 1000 nových pacientek s karcinomem děložního čípku a zhruba 400 žen tomuto onemocnění podlehnou. Inkubační doba trvá od jednoho měsíce do osmi měsíců. Větší výskyt byl zpozorován u imunosuprimovaných lidí (s AIDS či kolagenozami), gravidních žen a uživatelék hormonální antikoncepce. [15,18]

HPV jsou přenášeny při pohlavním styku. U mladých žen bez předchozí sexuální aktivity nebyly papillomaviry detekovány vůbec. U sexuálně aktivních žen byly HPV nalezeny v 3,5 -33 %, tyto výsledky jsou srovnatelné s prevalencí HPV u zdravých mužů (9-24%). U 53-68 % párů byla nalezena přítomnost HPV DNA

současně u obou partnerů. Nejčastější výskyt HPV byl prokázán u sexuálně aktivních žen i mužů ve věku 20-25 let. S vyšším věkem, tj. 30-35 let, se zvyšuje klinická závažnost, ale snižuje se pravděpodobnost výskytu infekce. U mladých žen se často jedná o přechodnou formu, zatímco u starších žen infekce přetrvává. [14,18]

Přenos HPV perinatálně byl prokázán u dětské formy rekurentní laryngeální papillomatózy (RRP), ke které nejspíše dochází při porodu. Přenos může být proveden kontaktem kůže i transplacentárně. Pomocí velmi citlivých metod detekce HPV se HPV DNA diagnostikovala v 93-100 % biopsií karcinomů a až ve 100 % prekanceróz těchto karcinomů. Nejvíce se vyskytuje HR HPV 16, který je detekován zhruba v polovině vzorků cervikálního karcinomu, ale i v jiných anogenitálních karcinomech u zdravých osob. Dalšími typy HPV, které se často vyskytují u karcinomů, jsou HPV 18, 31, 33, 45 a 51. Různorodost typů HPV se s závažností zmenšuje, to znamená, že je u prekancerózních lézí velké množství typů, kdežto u lézí vyšších stupňů a karcinomů se spektrum snižuje a nalézáme tam pouze vysoce rizikové HPV. Účast HR HPV je nutná k zajištění persistence a progresu.

Infekce se nachází i u mužů, u kterých jsou vyvolány intraepiteliální léze na penisu, v močové trubici, močovém měchýři, prostatě, nadvarleti a ve spermatu. Tyto výsledky však nejsou jednoznačné.

Většina osob s projevy infekce vytváří protilátky specificky reagující s antigeny odvozenými od proteinů virů. Protilátky proti konformačním epitopům umístěných na povrchu viru podobných partikulí (= VLP, pseudoviriony) jsou symbolem infekce i onemocnění, kdežto protilátky proti antigenům odvozených z časných proteinů jsou více symbolem onemocnění. Hladiny protilátek se mohou snížit nebo vymizet při samovolném ústupu, čili při regresi, nebo po úspěšné léčbě. U zdravých lidí se stoupajícím věkem roste prevalence protilátek proti pseudovirionům, u nemocných je tomu však naopak. Zdravé ženy mají málokdy protilátky proti HPV specifickým antigenům než pacientky. V přítomnosti protilátek v brzkých fázích onemocnění se zvyšuje možnost vzniku maligní nemoci. [14]

2.2.5 Klinické příznaky

Klinické projevy HPV infekce jsou poměrně rozmanité. Postiženy bývají anální, genitální a jiné kožní a slizniční oblasti (spojivky, ústa, nos, hrtan). Papillomavirová infekce bývá bezpříznaková nebo s klinickými symptomy. Prvním projevem jsou exofytická kondylomata, která jsou viditelná pouhým okem. Druhým příznakem jsou ploché léze, které se detekují pomocí kolposkopu a zviditelnění léze. Ploché léze převládají na děložním čípku a mohou přetrvávat několik let, poté se mohou transformovat v maligní onemocnění. Tento postup je však obvykle zdoluhavý. [14,18]

Jestliže žena není pravidelně vyšetřována, vzniklý maligní nádor se často projeví až v pokročilejším stádiu. Mezi klinické projevy můžeme zařadit zapáchající krvavý výtok a krvácení po pohlavním styku. Později se dostavuje bolest v podbříšku. Potíže při močení, krvácení z močové trubice a konečníku a otok dolních končetin patří k dalším příznakům vzniklých šířením nádoru do okolních tkání. [20]

2.2.6 Histopatologie

Původní skvamokolumnární junkce se nachází v ústí endocervikálního kanálu. Stýká se tam vrstevnatý dlaždicový epitel exocervixu a cylindrický epitel endocervixu. Při prodlužování rostoucího čípku dochází ke změnám tvaru, kdy se endocervikální epitel vychlípí navenek. Během kolposkopického vyšetření je zřejmý jako ostře ohraničený červený okrsek se sametovým povrchem. Tento nález se z klinického pohledu označuje jako eroze, správně se však jedná o ektropium, protože je zachován povrchový epitel.

Funkční skvamokolumnární junkce vzniká nahrazením cylindrického epitelu, který je vystaven kyselému prostředí pochvy, za odolnější metaplastický dlaždicový epitel. Tato nová junkce se přemísťuje nahoru směrem k ústí endocervikálního kanálu. Vzniklý pás metaplastického epitelu mezi oběma junkcemi se označuje transformační zóna. V této oblasti vznikají cervikální dlaždicobuněčné neoplázie, neboť je senzitivní na rakovinotvorné podněty. [6]

Papillomaviry infikují převážně buňky bazální vrstvy epitelu. Charakteristickými změnami epitelu je výskyt koilocytů a ztráta jader. Koilocyty jsou

buňky s velkým jádrem a průhlednou cytoplazmou nazývanou „halo“. Nepřítomnost těchto buněk neznamená, že není přítomna virová infekce. [14]

V benigních lézích se HPV nachází ve formě zvané epizóm, což značí extrachromozomální cirkulární formu. HR HPV jsou schopny vyvolat neoplastickou transformaci buněk. V takovýchto případech většinou dochází k integraci virového genomu do DNA hostitelské buňky. Může přitom dojít k přerušení sekvence genu E2. Produkt genu E2 pak chybí v buňkách. Jeho funkcí je inhibice přepisu genů E6 a E7. Následné nahromadění produktů genů způsobuje inaktivaci produktů buněčných genů, které mají za úkol správné fungování kontrolních buněčných mechanismů a normální dělení buněk. To má za následek nekontrolovatelné dělení buněk. Také ztrácí schopnost opravovat mutace, tzn. chyby při kopírování vlastního genomu. Ty se kumulují, dojde k selekci buňky, ze které se vyvíjí maligní klon. [3,14]

2.3 Prevence

Možnosti prevence:

- pravidelné gynekologické prohlídky
- vakcinace proti HPV
- bezpečný sex
- další opatření [21]

Možností prevence je několik. V první řadě lze karcinomu děložního čípku předcházet pravidelnou docházkou na gynekologické prohlídky, kde je ženám proveden stěr z čípku. Ty umožní objevit prekancerózní stavy, které lze účinně léčit. Endocervikální nádory však mohou vyšetření uniknout, neboť se nalézají mimo dosah stěru sliznice z čípku, a pokud dají vznik nádorovému onemocnění, lze jej pomocí vyšetření zachytit v počátečním stádiu. Přeměna prekancerózních změn na maligní nádor trvá kolem tří let, proto je toto onemocnění ve více jak 95 % případů vyléčitelné. Jako sekundární ochrana se uvádí očkování proti lidským papillomavirům, která je nejnovější a nejspolehlivější. Dalším důležitým opatřením je používání prezervativu a partnerská stálost. Také bychom se měli vyvarovat kouření, nezdravé stravě a dalším prvkům špatného životního stylu. [21]

2.3.1 Sekundární prevence - screening

Na preventivní gynekologickou prohlídku by ženy měly chodit každý rok. Proveďte se jim screening pro prevenci karcinomu děložního čípku mikroskopickým vyšetřením cytologického stěru. Stěr je odebírán gynekologem z děložního čípku pomocí špachtličky nebo kartáčku. Hlavním úkolem screeningu je objevení časných stádií změněných buněk, které lze snadno odstranit. Výsledek screeningu pak může být normální nebo abnormální. Abnormální bývá jen u malého procenta žen. Podle vyhodnocení se provede buď další odběr stěru za 3 až 6 měsíců, nebo se doporučí kolposkopické vyšetření. [22]

V zemích se zavedeným screeningovým programem klesla úmrtnost o 50-70 %. Úspěch programu závisí na efektivitě a kvalitě vyhodnocení stěrů z děložního čípku, které je velmi náročné. Cytologie je velmi specifická (kolem 97 %), avšak poměrně málo senzitivní při jednorázovém provedení (asi 60 %). Citlivost stěrů stoupá až s jejím opakováním. Testování HPV jako doplněk cytologie zvyšuje jeho senzitivitu, snižuje falešnou negativitu a v konečném stádiu vede k poklesu incidence karcinomu. Mnoho žen je však s pozitivním HPV testem cytologicky negativních. Vyšetření HPV je vhodné hlavně u žen s nejasným cytologickým nálezem nebo mírně abnormálními výsledky cytologie (ASCUS – atypické skvamózní buňky s neurčitým významem, LGSIL). Pro detekci lézí CIN 2 a 3 je citlivost HPV testu, tzn. Hybrid Capture 2, více než 90 %. Specifita Hybrid Capture 2 systému je větší než u PCR metody. Negativní výsledek testu je známkou toho, že žena má nízké riziko vzniku karcinomu. Tento test je citlivý pro veškeré hlavní onkogenní typy HPV. Testování je finančně náročné, proto se u nás zatím nezačlenil jako rovnocenná metoda do primárního screeningu karcinomu čípku. [15,23]

Žádný screening ovšem není stoprocentně spolehlivý. Výsledky stěrů mohou být falešně negativní. Proto je důležité pravidelně docházet na preventivní prohlídky. Vyšetřovány by měly být všechny ženy, které zahájily sexuální život. [22]

2.3.2 Primární prevence - vakcinace

Nejspolehlivější metodou ochrany před HPV infekcí je očkování. V České republice byla aplikována první vakcína dne 5. 12. 2006. V ideálním případě by vakcína

měla být podána osobám před zahájením sexuální aktivity, protože je to vakcína preventivní, ne léčebná. Ideální věk se bude lišit v různých společnostech, ale nejvíce budou v cílové věkové skupině dívky ve věku 9 – 15 let. Ovšem i osoby ve věku 16 - 26 let a ženy s abnormálním výsledkem cytologie se mohou nechat očkovat. Dívky a ženy, které již zahájily pohlavní styk, by se měly podle doporučení České gynekologicko-porodnické společnosti před očkovaním nechat podrobit gynekologickému vyšetření. Účinek vakcíny se uvádí okolo 80 %. Očkování během těhotenství je kontraindikováno. Při plánované současné vakcinaci proti jinému onemocnění je vhodné interval očkování odložit alespoň o 1 - 2 týdny. Pokud je nutné podat dvě vakcíny v jeden den, doporučuje se aplikace na rozdílná místa. Aplikace se provádí intramuskulárně do oblasti deltového svalu horní části paže nebo do anterolaterální části stehna. U dětí se doporučuje očkování pediatrem, u dívek a žen gynekologem. [24-25]

Na českém trhu jsou v současnosti registrovány dvě rekombinantní profylaktické vakcíny - Silgard a Cervarix. Vakcíny jsou ovšem typově specifické, chrání pouze proti daným typům HPV. Lze proto odhadovat, že by ochránily jen 60 – 70 % žen. Klíčovou nezodpovězenou otázkou u mladých žen je, zda první očkování zajistí celoživotní ochranu před onemocněním souvisejícím s cílovými HPV typy (předpokládá se 10 – 25 let), nebo zda bude zapotřebí přeočkování. V následujících letech by mělo být k dispozici více informací o očkování u mužů, zralých žen, imunosuprimovaných osob a u mladých žen s předchozí expozicí HPV. [25-26]

2.3.2.1 Mechanismus působení

Klíčovou roli v imunitní odpovědi má L1 kapsidový protein HPV virionu, z něhož je zrekonstruována VLP. Jeho označení L vyplývá z původu vzniku, vytváří se jako pozdní („late“) protein vedle vedlejšího proteinu L2. Seskupením L1 proteinů do multimerního virionového uspořádání podobnému původnímu HPV viru dosahuje vysokého imunogenního účinku. Dochází k tvorbě povrchových, nelineárních, neutralizačních epitopů, které napodobují vlastnosti živých virů, ale bez infekční kapacity (potenciálu). L1 v uspořádání VLP vyvolává vysoce ochranné neutralizační protilátky proti HPV. Samotný L1 protein je schopný indukovat protilátky, ale jejich ochranný účinek je buď žádný, nebo minimální. Uspořádání L1-VLP se připravuje jako

rekombinantní protein, expresí genu na eukaryocytech (na kvasinkách nebo hmyzích buňkách). [13,27]

2.3.2.2 Vakcína Silgard

Vakcína Silgard (kvadrivalentní vakcína), která je po celém světě známá pod názvem Gardasil, je zaměřena proti lidským papillomavirům typu 6, 11, 16 a 18. HPV 16 a 18 jsou zodpovědné zhruba za 70 % případů karcinomu děložního čípku a prekancerózních změn zevního genitálu a pochvy. Za 90 % případů genitálních bradavic jsou zodpovědné typy 6 a 11. Vyrábí se jako injekční suspenze v přeplněné injekční stříkačce, jako vakcína rekombinantní a adsorbovaná. Byla schválena dne 20. 9. 2006, produkuje ji firma Merck a spol. a je určena pro dívky a chlapce od 9 – 15 let a pro mladé ženy ve věku 16 – 26 let. Nechat očkovat se však můžou i ženy do 45 let. Silgard se podává ve třech injekčních dávkách. Druhá dávka je podána po dvou měsících, třetí dávka po šesti měsících od první. Všechny tři dávky nemusí být přesně dodrženy, ale musí být aplikovány do 1 roku. Mezi indikaci patří prevence dysplázií děložního čípku, zevního genitálu a pochvy, prevence karcinomu hrdla a vzniku kondylomat. Jako adjuvans slouží amorfni aluminium hydroxyfosfát sulfát. [12,28-29]

2.3.2.3 Vakcína Cervarix

CervarixTM (bivalentní) chrání proti HPV typu 16 a 18, které jsou vysoce onkogenní. Vyrábí ji firma GlaxoSmithKline a je rekombinantní, adjuvovaná a adsorbovaná. Pro použití v zemích EU byla schválena o rok později než vakcína Silgard, tj. 20. 9. 2007. Očkuje se u žen ve věku 10 – 25 let. Aplikuje se ve třech dávkách v intervalu 0 – 1. – 6. měsíc. Vakcína je určena k prevenci vysokého stupně premaligních cervikálních lézí (CIN 2 a 3) a cervikálního karcinomu. Oproti vakcíně Silgard je aplikace kontraindikována i při kojení, nejen v těhotenství. Jako adjuvans se využívá ASO4 obsahující monofosforyl-lipid adsorbovaný na hydratovaný hydroxid hlinitý, jenž má vyšší titr protilátek. [28-30]

2.3.2.4 Nežádoucí účinky

Mezi nežádoucí účinky u vakcín Silgard a Cervarix patří:

- zarudnutí a krvácení v místě vpichu
- bolest
- otok
- svědění
- navíc u vakcíny Cervarix: bolest hlavy, kloubů, horečka, myalgie, únava, gastrointestinální projevy (zvracení, nauzea, průjemy, bolest břicha). [28]

2.4 Terapie

Terapie se odvíjí podle stupně léze a výsledků diagnostiky. Dělí se na metody ablační a destrukční. Zásadním krokem je odstranění celé patologické tkáně a snaha o co nejmenší poškození děložního čípku, hlavně u žen, které plánují těhotenství. [31]

Ideální léčba léze spojená s HPV by měla být účinná, snadno dostupná a použitelná, dobře snášená, bez dlouhodobých rizik, bezpečná v těhotenství, vhodná pro vaginální použití, levná. Je třeba vzít v úvahu, že genitální HPV infekce je nemoc normálně i abnormálně vyhlížejícího epitelu, která často probíhá v průběhu několika týdnů až 8 měsíců a dochází u ní k spontánní regresi. Proto není chirurgický přístup k léčbě optimální. Odstranění produktů HPV infekce, jako jsou kondylomata nebo dysplázie, vede k remisi zhruba u 85 % pacientek, bez ohledu na to, že léze spojené s HPV jsou mnohdy spojeny s oblastmi subklinické infekce. V důsledku toho by měly být léčebné metody, které mají potenciál ovlivňovat subklinická stádia nemoci (laser, 5-fluorouracil (5-FU) a interferon), vyhrazeny pro pacienty, jejichž léze jsou příliš rozsáhlé pro použití žíravých látek nebo ambulantní odstranění, a pro ty, kteří nereagují na jednodušší léčbu. [25]

Čím dříve se nádor odhalí, tím úspěšnější a méně náročnější bude léčba. U časných stádií nádorů (rozsah do stádia 2a) postačí chirurgická léčba., u prekancerózních stavů a nádorů do 3 mm se většinou jedná o konizaci. U pokročilejších nádorů je třeba odstranit dělohu s okolními tkáněmi a pánevní lymfatické uzliny. Tyto postupy jsou náročné a provádí se na onkogynekologických pracovištích. Karcinomy postihují i ženy ve fertilním věku, kterým operace znemožní těhotenství. U nádorů

šířících se do okolí (stádium 2b a výše) se provádí radioterapie, kdy se její účinek zvyšuje se současným podáváním chemoterapie (chemoradioterapie). [21]

2.4.1 Destrukční metody

Po plánované biopsii se provádí destrukce tkáně pomocí:

- kryoterapie - využívá účinek chladu (tekutý dusík) na živou tkáň. Po přiložení kryosondy, která může dosahovat teploty $-190\text{ }^{\circ}\text{C}$, dochází k nekróze zmražené tkáně do hloubky až 7 mm (destrukcí celulárních proteinů, dehydratací, krystalizací přítomné vody v buňce a zeslabením buněčné membrány). Za 24-36 hodin dojde k vytvoření edému postižené i přilehlé tkáně s následným odloučením nekrotické oblasti a hojením. Výhodou je nízká pořizovací cena a možnost ambulantního ošetření, nevýhodou, že není možné stanovit hloubku destrukce tkáně. Fáze hojení je zdlouhavý proces a je provázena nepříjemným výtokem
- laserová vaporizace - pomocí CO_2 laserového paprsku, který nabízí dva typy režimu – superpulzní a kontinuální, se odpaří patologický epitel do potřebné hloubky (8-10 mm). Výkon se provádí pod kolposkopickým dozorem. Hojení je rychlejší než u kryoterapie. Hlavní nevýhodou je cena laseru a tím i vyšší cena výkonu. V současné době se ošetřují léze přecházející na poševní klenby a do pochvy v kombinaci s ablačním ošetřením léze.

Hlavní nevýhodou destrukčních metod je, že není histopatologicky vyšetřena všechna tkáň. Dnes jsou tyto metody zcela nahrazovány ablačními metodami.

[14-15,31]

2.4.2 Ablací metody

Mezi ablační metody řadíme:

- klasická konizace – skalpelem, nůžkami, laserem
- excize vysokofrekvenční kličkou - (LEEP – kličková elektroexcizní metoda, LLETZ – rozsáhlá kličková excize transformované oblasti). Jedná se o nejčastěji

prováděný proces u exocervikálních lézí v dnešní době. Velikost používané kličky volíme podle rozsahu léze a velikosti cervixu. K řezu se využívá vysokých frekvencí (radiofrekvencí), které minimalizuje termické poškození tkáně. Pokud postižená tkáň zasahuje hlouběji do kanálu čípku, lze provést i druhou excizi menší kličkou. Spodina defektu je koagulována. Defekt se nesešívá, to minimalizuje rizika stenóz kanálu děložního čípku

- jehlová konizace - používají se vysokofrekvenční rigidní jehly, stejným režimem jako LEEP. Technika byla převzata z laserové konizace. Výhodou je možnost řešit i endocervikální léze vynětím tkáně a rozlišuje hloubku excize podle hloubky endocervikální léze. Po vynětí je spodina koagulována. Defekty, stejně jako u metody LEEP, nešijeme. [31]

Společným znakem ablačních metod je chirurgické vynětí části hrdla, tzn. vynětí celého patologického epitelu se snahou o zachování stromatu čípku. Tyto výkony se provádí u žen ve fertilním věku. Dobře provedené LEEP a jehlové konizace mohou být rizikovým faktorem pro budoucí graviditu. [31]

Hysterektomie (vaginální, břišní, totální laparoskopická) se provádí u prekanceróz pouze u sdružených indikací a u recidivujících lézí vysokého stupně po skončení reprodukčního věku. [31-32]

2.4.3 Radioterapie

U časných stádií lze s dobře provedenou radioterapií (aktinoterapií) dosáhnout srovnatelných výsledků jako u chirurgické léčby. Radioterapie má ovšem vyšší procento časných i pozdních komplikací, vyšší morbiditu, proto se této metodě dává přednost pouze u žen s vysokým operačním rizikem. Pooperační radioterapie je indikována jen za nepříznivé definitivní histologie (metastázy v uzlinách apod.).

U pozdních stádií je základní metodou, která se většinou vykonává kombinací brachyterapie (vnitřní záření) a teleterapie (vnější záření). Teleterapie využívá fotonového nebo korpuskulárního záření. Nejčastěji jsou pro telegamaterapii používány zářiče ^{60}Co , lineární urychlovače a betatrony. Brachyterapie je zaměřena na léčbu radioaktivními látkami umístěnými do oblasti nádoru. Radiové tuby a jehly byly

nahrazeny umělými radionuklidy ^{137}Cs , ^{60}Co , ^{192}Ir . Oba postupy vyžadují dokonalé plánování terapie, které se provádí podle výpočetní tomografie, magnetické rezonance a nejnověji dle PET-CT (pozitronová emisní tomografie spojená s počítačovou tomografií). Cílem je dosáhnout kompletní regrese nádoru. [31]

2.4.4 Chemoterapie

Chemoterapie (cytostatická léčba) se neřadila ke standardním metodám v primární léčbě. Do standardních postupů se dostala cytostatika k posílení účinku radioterapie. V současnosti se zkouší její účinnost v klinických studiích jako neoadjuvantní léčebná metoda před radikální operační léčbou. Neoadjuvantní chemoterapie před aktinoterapií prozatím nepřinesla očekávaný efekt. Po chirurgickém výkonu nebo radioterapii se využívá jen výjimečně. Přesto zůstává jedinou systémovou léčbou, u které můžeme čekat alespoň dílčí efekt. Mezi cytostatika s nejvyšším účinkem léčby řadíme cisplatinu, ifosfamid, bleomycin a paclitaxel. [31]

2.4.5 Chemické metody

Při léčbě klinicky patrných lézí se uplatňují převážně metody využívající chemické látky, jako podofylin, podofylotoxin a kyselina trichloroctová.

Podofylin je etanolový extrakt z rostliny *Podophyllum peltatum*, nebo jinak řečeno ligand obsažený v podofylinové pryskyřici. Zastavuje buněčné dělení v premitotické fázi G2 a účinkuje antimitoticky. Používá se na vulvární postižení. Dnes se jeho aplikace nedoporučuje, protože některé terapeuticky inaktivní izomery vykazují mutagenní účinky. Ve větším množství dochází k projevům systémové toxicity, jako jsou leukopenie, trombocytopenie, periferní neuropatie, retence moči, respirační insuficience, ileus aj.).

Lepší je aplikace podofylotoxinu, která je biologicky aktivní složkou podofylinu. Neobsahuje mutagenní alkaloidy a jeho místní dráždivost i systémová toxicita je nižší než u samotného podofylinu.

Kyselina trichloroctová v 80-95 % koncentraci se aplikuje na malá condylomata accuminata. Výhodou u této metody je možnost použití v graviditě. Nežádoucí účinky představuje pálení, lokální iritabilita a bolest. [14-15]

2.4.6 Imunomodulační látky a antivirotika

Do imunomodulačních látek a antivirotik řadíme interferon (používaný po chirurgickém výkonu) a 5-fluorouracil (používaný u případů diseminované kondylomatózy uretry, vaginy a anální oblasti, nedoporučuje se pro terapii externích genitálií). Tyto látky však nenašly širší použití, neboť nikdy neobhájily své předpokládané přednosti. Novější imiquimod prokázal dobrý efekt v klinických studiích u pacientů s condylomata accuminata (odhojení až v 70 % případů). Imiquimod je imunomodulátor, který vyvolává produkci interferonu α a jiných cytokinů, tím stimuluje buněčnou složku imunitní odpovědi. Dalším nadějným preparátem se zdá být cidofovir (HPMPC), acyklický nukleosid fosfonát. Jeho mechanismus účinku závisí na inhibici replikace viru. Úspěšně byla tato látka vyzkoušena u HIV infikovaných pacientů s HPV 16 pozitivními kondylomaty a u pacientů s lézemi CIN 3. [14-15]

Vysoce specifické terapie papillomavirových lézí by vycházely ze známých biologických vlastností HPV a mohly by se skládat z cílených onkoproteinů, vyjádřených maligními lézemi spojených s HPV. Pokusy s antisense oligonukleotidy cílených E6 a E7 onkoproteinů, poukazující na inhibici růstu nádorových buněk. V současnosti se vyskytují problémy s buněčným transportem a zaměřením pomocí rekombinantní DNA technologie, která výrazně omezuje jejich klinické využití. [25]

2.4.7 Terapeutická vakcína

Firma Inovio Pharmaceuticals, Inc., lídr v oblasti terapeutických a preventivních vakcín, vyvinula DNA vakcínu VGX-3100 určenou k léčbě cervikálních dysplázií a nádorů čípků způsobených lidskými papillomaviry. Do těla je vpravována pomocí intramuskulární elektroporace. U 7 z 8 hodnocených pacientů byla prokázána i po 2 letech přítomnost imunitní odpovědi T-lymfocytů.

VGX-3100 vakcína je určena ke zvýšení imunitní odpovědi proti E6 a E7 onkogenům společným pro HPV typ 16 a typ 18 (tzn. vakcína obsahuje čtyři antigeny). Tyto onkogeny odpovídají za transformaci buněk infikovaných HPV na přednádorové a nádorové buňky. Cílem je stimulovat buněčnou odpověď T lymfocytů natolik, aby způsobily odmítnutí těchto infikovaných nebo transformovaných buněk. [33]

2.5 Diagnostika

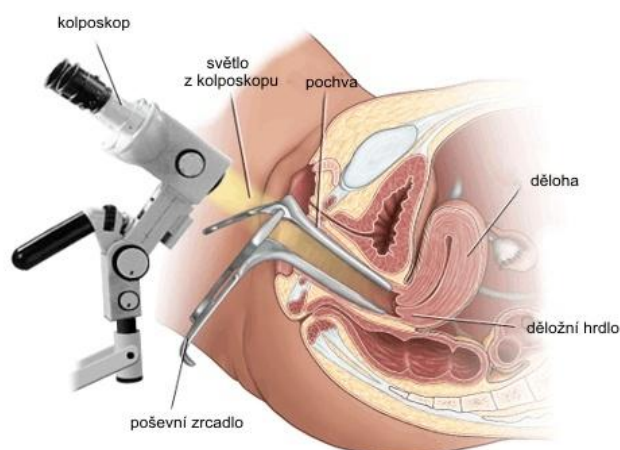
Diagnostiku HPV infekcí můžeme provádět pomocí přímých a nepřímých metod. Do nepřímých metod zahrnujeme kolposkopii, cytologické, histologické a sérologické vyšetření. Tyto metody potvrzují HPV infekci na průkazu přítomnosti charakteristických změn postižených tkání či buněk. Přímá diagnostika se zakládá na průkazu přítomnosti HPV částic či HPV DNA v postižených oblastech. Vedle imunohistochemie a elektronové mikroskopie se k přímé diagnostice řadí molekulárně-biologické metody, u kterých se převážně využívá metody polymerázové řetězové reakce (PCR), amplifikující specifický úsek virového genomu. K nejrozšířenějším přímým metodám detekce virového genomu však patří technologie Hybrid Capture 2, která využívá hybridizace komplementární RNA sondy s virovou DNA. [11,18]

Každá metoda má své výhody a nevýhody, rizika z hlediska senzitivity, specificity, rizika kontaminace, falešně negativních či pozitivních výsledků, atd. Výběr metody závisí na účelu stanovení, možnostech laboratoře a zvážení rizik a výhod každé metody. [11]

2.5.1 Kolposkopie

Odborný lékař provádí preventivní prohlídky, jejichž součástmi jsou prohlídky děložního hrdla, odběr materiálu pro cervovaginální cytologii a základní kolposkopie. Základní kolposkopie doplňuje screeningovou cytologii. Je nezbytná pro diagnostiku po detekování epitelální buněčné abnormality. [34]

Kolposkop je optický nástroj, který poskytuje okamžité informace o proximální hranici epitelů, topografii transformační zóny a složek případné atypie, premaligní léze nebo tumoru děložního čípku, vagíny, vulvy i anogenitální krajiny. Při tomto vyšetření se používají jednorázová plastová zrcadla. [34-35]



Obr. 2. Vyšetření kolposkopem [35]

Rozlišujeme základní (nativní) kolposkopii, kterou se pozoruje vyšetřovaná oblast bez použití jakéhokoli roztoku, a rozšířenou kolposkopií, která se provádí pomocí aplikace 5 % roztoku kyseliny octové. Cílem rozšířené (specializované) kolposkopie je postupně vylučovat faktory zhoršující přehlednost, tím se rozumí hlen a/nebo krev, a zvýraznit případné změny (dochází k bílému zabarvení místa léze). [14,35]

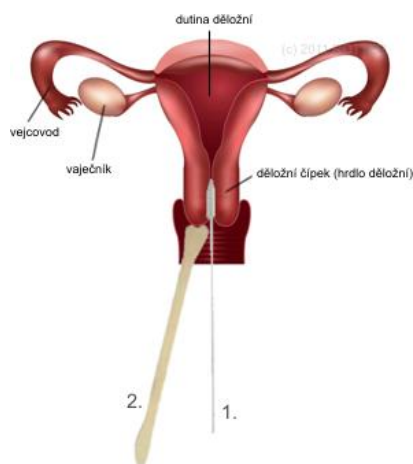
Pro provádění specializovaných kolposkopií je nezbytné, aby měl gynekolog specializovanou licenci k provádění takzvané kolposkopické expertízy. Ta má zajistit, že erudovaný lékař splňuje určité dokladované počty výkonů a odbornou praxi pro udělení licence. Kolposkopická expertíza je vhodná v případech nejasného nálezu cytologie a základní kolposkopie. Kolposkopie s histologickou verifikací se musí provést před jakýmkoli rozhodnutím o ambulantním ošetření benigní epitelální léze děložního hrdla destruktivními metodami. [34-35]

2.5.2 Cytologie

Cytologie je důležitou screeningovou metodou, kterou se hledají atypické buňky. Mnoho prací však ukazuje na některé nedostatky této metody, především je to nízká reprodukovatelnost, falešná negativita (15-50 %) a falešná pozitivita (10 %). Vyšetření

provedené jednou za rok je součástí gynekologické prohlídky v rámci preventivního programu proti rakovině děložního hrdla a je plně hrazeno zdravotními pojišťovnami. [14,26,36]

Cytologický odběr se provádí stěrem z exocervixu (povrchu děložního hrdla) pomocí špachtle a z endocervixu (kanálku děložního čípku) se odebírá speciálním kartáčkem. [36]



Obr. 3. Cytologický odběr stěrem z cervixu [36]

Stěr z transformační zóny povrchu čípku se nanese na sklíčko a fixuje se (nejčastěji alkoholem). Označené sklíčko spolu s průvodkou (měla by obsahovat údaje o pacientce - datum poslední menstruace, antikoncepce, těhotenství,...) se odesílá k vyšetření do specializované laboratoře. Sklíčko se tam obarví a pozoruje se pod mikroskopem. První prohlédnutí materiálu provádí erudované cytologické laborantky, které každý podezřelý nález předají dále ke zhodnocení lékaři. Ten rozhodne, je-li nález abnormální či nikoliv. Do abnormálních nálezů z exocervixu (dlaždicový epitel) patří ASC-US (atypické skvamózní buňky neurčitého významu), ASC-H (atypické skvamózní buňky bez vyloučení léze vysokého stupně), LSIL/HPV a HSIL (nízký a vysoký stupeň skvamózní intraepiteliální léze). Mezi nálezy u endocervixu (cylindrické buňky) řadíme AGC-NOS (atypické glandulární buňky, není-li uvedeno jinak) a AGC-NEO (atypické glandulární buňky spíše neoplastického původu). Cytolog může navrhnout kontrolu, ale zodpovědnost za další postupy nese gynekolog, který prováděl

odběr stěru. Gynekolog by měl v případě abnormálního nálezu sledovat pacientku v intervalu 3 – 6 měsíců, nebo ji odeslat ke specialistovi pro expertní kolposkopii.

V současnosti je jediná platná klasifikace Bethesda systém (z r. 2001). Od Papanicolaouvy klasifikace stěrů (PAP 1-5) z děložního čípku, jenž roku 1943 navrhl zakladatel gynekologické cytologie Papanicolau, se upustilo. [36]

2.5.3 Histologie

Při histologickém vyšetření se zkoumá celistvý vzorek tkáně - biopsie. Malý vzorek tkáně se následně nařeže, obarví a prohlíží se pod mikroskopem. Vyšetření umožňuje zjistit, zda se jedná o nádor a do jaké míry nádor vytváří struktury podobné původní tkáni. Histologie klasifikuje biopsie jako cervikální intraepiteliální neoplázie (CIN 1-3) a invazivní karcinom (INCA). Novější klasifikační systém z roku 1988 hodnotí nález jako léze nízkého stupně (LSIL), léze vysokého stupně (HSIL), invazivní karcinom a atypické buňky (atypické skvamózní buňky neznámého významu – ASCUS/ atypické glandulární buňky neznámého významu - AGUS). Do histopatologie řadíme také exofytická, dlaždicová a plochá kondylomata, která patří do kategorie LGSIL nálezů. U pozitivních nálezů se nachází koilocyty, papillomatóza, akantóza, hyperkeratóza a parakeratóza. Histopatologické vyšetření tkáně definitivně potvrdí závažnost nálezu zjištěných kolposkopií a cytologií. [14-15,26,36]

2.5.4 Sérologie

Využití sérologických metod pro detekci HPV infekce je limitované z toho důvodu, že papillomaviry neprocházejí viremickou fází, jejich kultivace ve tkáňových kulturách je velmi obtížná, mají menší antigenicitu HPV infekce a pouze částečnou typovou specifitu. Negativní titry protilátek ovšem nevylučují infekci HPV. [11,15]

HPV specifické bílkoviny produkované bakteriemi se používají k vyhledávání protilátek proti HPV. Zjištěné protilátky proti HPV E7 proteinům byly nalezeny asi u poloviny žen s karcinomem čípku, ale vůbec ne u žen s prekurzorovými lézemi nebo subklinickými HPV infekcemi. Proto protilátky proti E7 proteinům nejsou vhodné pro vyšetření žen vystavených vysoce rizikovým typům HPV. [25]

Odlišný přístup k rozvojovým specifickým sérologickým markerům infekce HPV se skládá ze shromáždění HPV kapsid v hmyzích buňkách vystavených L1 proteinu. L1 protein kóduje vývoj virové kapsidy, ale nikoli virovou DNA jádra. Specifické protilátky proti „prázdným“ kapsidám nebo virovým částicím byly zjištěny u 59 % žen s HPV 16 a u 92 % žen s condylomata accuminata. Viro podobné částičky jsou studovány jako podklad pro vakcíny HPV a očekává se, že budou mít velký význam do budoucnosti. [25]

2.5.5 Metody přímé detekce

Mezi přímé metody patří již zmiňovaná elektronová mikroskopie, která je omezená nejenom díky náročnosti jejího provedení, a imunohistochemie, která využívá reakci monoklonálních a polyklonálních protilátek s časnými nebo pozdními papillomavirovými proteiny. [11]

Přímá detekce využívá hybridizačních metod na extrahované DNA či *in situ* (tzv. HPV testování). Předpokladem je vysoká senzitivita a specificita. Pro rutinní diagnostiku se využívá polymerázová řetězová reakce (PCR) a Hybrid Capture. [15]

PCR je *in vitro* technika k amplifikaci DNA vzorku a určení typu HPV. Komerčně dostupná je reverzní hybridizace na tzv. stripech (proužky membrány, na kterých jsou fixovány próby pro jednotlivé typy HPV, které hybridizují s produkty PCR a jsou vizualizovány kolorimetrickou detekcí), dnes se využívá INNO-LiPA firmy Innogenetics. Zmnožením HPV DNA se dosáhne značné citlivosti metody (1-10 kopií virové DNA). Používá mimo jiné typově specifické primery, např. proti E6 a E7 genům, DNA polymerázu a deoxyribonukleotid trifosfáty (dNTP). Určitý úsek se cyklicky geometrickou řadou amplifikuje, poté je detekován a vizualizován. Pomocí PCR byla HPV DNA zjištěna až u 100 % biopsií INCA a CIN 3. Metoda je rychlá a poměrně jednoduchá. Díky PCR je možno vyšetřovat různý materiál, jako jsou stěry štětečkem, buňky vypláchnuté solným roztokem (laváže), biopsie, PAP stěry, tkáň zalitou v parafinových bločcích. [11,14-15]

Požadavky na citlivou metodu nejlépe splňují technologie Hybrid Capture firmy Digene/Qiagen. První z nich, Hybrid Capture I (HC I), je založena na hybridizaci specifických RNA sond s DNA vyšetřovaného vzorku a zkuškové reakci výsledného

RNA-DNA hybridu s anti-RNA-DNA protilátkou. Po přidání chemoluminiscenčního substrátu dochází k emisi světla, jehož množství je přímo úměrné obsahu stanovené specifické DNA ve vzorku. Metoda je poněkud méně citlivá než PCR a neumožňuje přímou typovou diagnostiku papillomavirů. Nový vylepšený Hybrid Capture 2 HPV DNA test (HC 2) je dnes pro snadnou reprodukovatelnost, jednoduchost a vysokou senzitivitu jednoznačně preferován pro rutinní testování vzorků. Oproti HC I se provádí na mikrotitračních destičkách (HCM), místo zkumavek (HCT). Využívá rovněž chemoluminiscence a je založena na hybridizaci s amplifikací. Detekuje 13 HR HPV a 5 LR HPV typů. HC 2 systém přinesl zlepšení citlivosti: u HCT pro HSIL 74 – 94 %, u HCM pro HSIL 95 %. Podle některých publikací lze detekovat přítomnost papillomavirů s citlivostí už od 1 pg HPV DNA/ml. Studie ukazují, že kombinací HC s PAP stěry je možné dosáhnout senzitivity 91 – 100 % pro detekci HSIL. [11,14-15,37]

HPV testování je tak další metodikou k doplnění stávajících screeningových metod. HPV test by měl zvětšit validitu cytologického vyšetření zvýšením jeho specificity. [15]

2.5.6 Speciální metody

V případech atypických nálezů, kde lze uvažovat o souvislosti s HPV a kde nejsou rutinní metody vhodné, se pro jejich detekci využívají speciální metody, ve většině případů amplifikační na základě použití PCR. V případě pozitivního výsledku kontrolní amplifikace lze následně užít stanovení typu HPV pomocí:

- PCR s typově specifickými primery
- metodu RFLP (délkový polymorfismus restrikčních fragmentů) – založená na rozlišení specifické délky restrikčních fragmentů
- metodu hybridizace dot-blotu s typově specifickými oligopróbami
- metodu reverzní hybridizace – v současnosti více využívána
- kapilární sekvenaci (eventuálně s předchozím klonováním amplikonů)
- metodu SSCP (jednovláknový konformační polymorfismus) [11]

2.5.7 Detekce p16

Za fyziologických okolností je produkt antionkogenu p16INK4a inhibítozem cyklin-dependentních kináz a reguluje buněčný cyklus na přechodu G0 fáze do G1 fáze. Protein Rb (pRb), který je produktem retinoblastomového genu, inhibuje v aktivní formě transkripci p16. V dyspláziích a karcinomech děložního hrdla papillomaviry transformují epitel mimo jiné inaktivací pRb onkoproteinem E7. V důsledku blokády proteinu Rb se neefektivně zvedá hladina p16.

Studie potvrdila zvýšenou expresi p16INK4a u prekanceróz a karcinomu čípku. Detekce p16 pravděpodobně nalezne uplatnění v bioptickém vyšetření pro stanovení okrajů konizátů a CIN. Je perspektivní i v onkocytologické diagnostice pro diagnózu ASCUS, popř. i automatizovaný screening nebo kontroly kvality. [38]

3 PRAKTICKÁ ČÁST

V bakalářské práci chceme podrobněji sledovat možnosti laboratorní diagnostiky HPV používané v současné praxi na pracovišti CGB laboratoře a.s.. Na tomto pracovišti se využívají dvě metody detekce infekce HPV, jsou to INNO-LiPA HPV Genotyping Extra CE kit (Innogenetics) a Hybrid Capture 2 – HR HPV DNA test (Digene/Quiagen). Cílem testu INNO-LiPA je genotypizace HPV typů. Za účelem Hybrid Capture 2 systému se skýtá stanovení přítomnosti vysoce rizikové HPV DNA.

Do praktické části jsme zahrnuli výsledky pacientů, které byly diagnostikovány na typizaci HPV pomocí metody INNO-LiPA v CGB laboratoři a.s..

Materiál pro vyšetření

Vzorky pro diagnostiku HPV DNA se musí označit štítkem s údaji o pacientovi – jméno, příjmení, datum narození či rodné číslo, případně datum odběru. U žen se detekuje cervikální stěr, jenž je proveden sterilní odběrovou soupravou DNA PAP Cervical Sampler firmy Digene a do transportu se ukládá při teplotě +4 až +25 °C. U mužů se provádí výtěr z uretry (1 ml média/stěr), který se ukládá do odběrové soustavy DNA PAP Cervical Sampler STM (Specimen Transport Medium), do transportu se vzorek ukládá při teplotě +4 až +25 °C. Tyto odběrové soustavy jsou primárně určeny pro testování HPV DNA metodou Hybrid Capture. K tomuto se přidává požadovaná dokumentace, která zahrnuje přiloženou žádanku specifikující druh požadovaného vyšetření a obsahuje nezbytné informace o pacientovi.

Odběrové soupravy s podrobným návodem k použití poskytuje laboratoř CGB a.s. na požádání zdarma. Transport je zajištěn svozem CGB laboratoří do 72 hodin po odběru při teplotě +4 až +25 °C. [39]

Délka vyšetření a způsob zveřejnění závěrečné zprávy

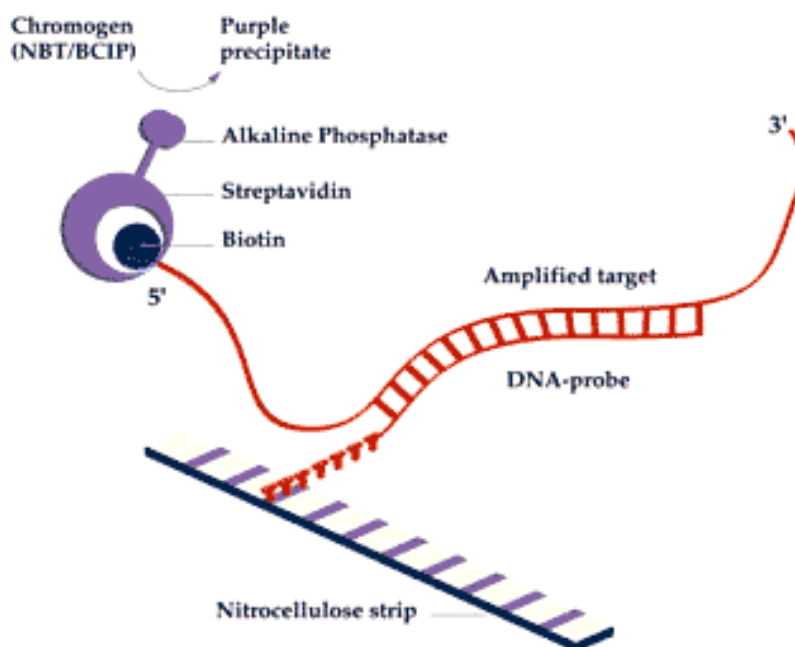
Délka vyšetření od převzetí vzorku se uvádí okolo 1 měsíce, v závislosti na počtu přijatých vzorků za dané období. V případě vzorku, který je označen jako STATIM, je vyšetření a vydání zprávy uskutečněno do 2 - 3 pracovních dnů od převzetí vzorků. Závěrečné zprávy o výsledku diagnostiky jsou písemně zaslány z laboratoře

pouze zadavateli vyšetření, tj. lékaři oprávněnému indikovat molekulárně genetické vyšetření. [39]

3.1 INNO-LiPA Genotypizace

3.1.1 Identifikace HPV genotypu

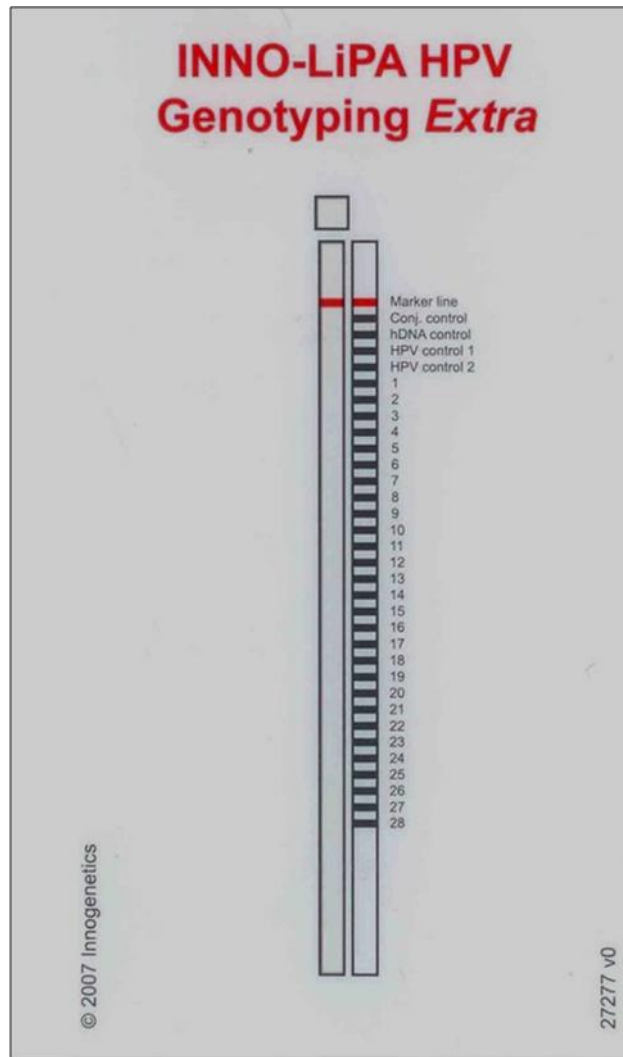
Vzhledem k tomu, že HPV zahrnuje vysoce rizikové a nízko rizikové typy, genotypizace je velmi důležitá při posuzování rizika vzniku cervikální neoplázie. Za druhé, analýza sledovaných vzorků poskytuje důležité informace o perzistenci infekce a infekce s více genotypy. Bylo prokázáno, že přetrvávání vysoce rizikových HPV infekcí je spojeno s vyšším rizikem vzniku karcinomu čípku. Molekulárně (geno)typizační metody stanovují, zda je pacient opakovaně infikován stejným (sub)typem HPV, a může poukazovat na významné klinické důsledky. Za třetí, dřívější studie ukázaly, že infekce s vysokou virovou zátěží mají také zvýšené riziko karcinomu hrdla. Stanovení virového zatížení může být provedeno různými metodami, které jsou typově specifické. Proto je stanovení HPV genotypu bezpodmínečné před použitím kvantitativní metody. [40]



Obr. 4. Princip reverzní hybridizace se sondou pevně navázanou na stripu [41]

3.1.2 Princip testu

INNO-LiPA HPV genotypizace je založena na principu reverzní hybridizace. Metoda je schopna detekovat 25 HR i LR HPV typů, vyskytující se nejčastěji v anogenitálním traktu. Část L1 proteinu HPV genomu je amplifikována (65 pb dlouhý fragment) a denaturována, biotinylované amplikony jsou hybridizovány se specifickými oligonukleotidovými sondami („próby“) navázaných na „stripech“. Po hybridizaci a důkladném promytí je přidán streptavidin konjugovaný s alkalickou fosfatázou a navázán na dříve vytvořený biotinylovaný hybrid. Inkubace s BCIP/NBT chromogenem (5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitrotetrazoliová modř, substrát vytvářející zbarvení) dává fialovou/hnědou sraženinu a výsledky jsou interpretovány vizuálně, určují se typy HPV, jako pomůcka slouží „porovnávací kartička“. [40-41]



Obr. 5. Kartačka pro odečítání výsledků – lokace specifických prób (součást kitu)

3.1.3 Použitý materiál a přístroje

Byly použity tyto materiály a přístroje:

- stripy
- denaturační roztok
- hybridizační roztok
- promývací roztok
- konjugát
- roztok pro naředění konjugátu
- substrátový pufr
- substrát BCIP/NBT

- proplachovací roztok
- inkubační vanička
- kartička pro odečítání výsledků
- přehled dat
- interpretační tabulka [42,vybavení CGB laboratoře]

Materiály potřebné, ale nedodané v soupravě:

- INNO-LiPA HPV genotyping Extra – amplifikace
- destilovaná nebo deionizovaná voda
- jednorázové rukavice
- jednorázové (bez DNA/neobsahující DNázu) špičky pro pipety (aerosol rezistentní)
- pinzeta pro manipulování se stripy
- odměrné válce (10, 25, 50, 100 ml)
- nastavitelné pipety v rozsahu 1-20 μ l, 20-200 μ l, 200-1000 μ l
- Vortex mixer nebo ekvivalentní
- mikrocentrifuga [42,vybavení CGB laboratoře]

Požadované materiály pouze pro manuální postupy:

- vodní lázeň s třepačkou (80 rpm, nastavitelná teplota $49\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, se šikmým víkem)
- aspirační přístroj
- kalibrovaný teploměr
- třepačka
- dávkovací multipipeta (Eppendorf, nastavitelná)
- stopky [42,vybavení CGB laboratoře]

Materiál pro amplifikaci:

- amplifikační mix
- enzymový mix
- pozitivní kontrola (HPV6)
- materiál pro DNA extrakci:

- Proteináza K (Roche diagnostics, číslo šarže 3115836)
- Triton[®] X-100 (VWR, číslo šarže 1.08603.1000)
- DNAZap[™] (Ambion, č. š. 9890)
- DNA termální cyklér
- minerální olej, silikonová vazelína (je-li požadována)
- další výše zmíněné [42,vybavení CGB laboratoře]

3.1.4 Princip postupu

Princip postupu je následující:

- amplifikace metodou multiplex PCR (polymerázová řetězová reakce) pomocí enzymu termostabilní polymerázy
- agarózová elektroforéza PCR produktu a fotodokumentace pro ověření přítomnosti PCR produktu
- denaturace a hybridizace PCR produktu na nitrocelulózkové membráně (komerční stripy)
- promytí stripů a vyvolání barevné reakce
- interpretace výsledků – zjištění přítomnosti/nepřítomnosti infekčního agens [40]

Pořadí operací je doporučováno:

- příprava a alikvotace PCR mixu
- příprava vzorků (DNA izolace)
- PCR
- analýza biotinylovaných PCR produktů reverzní hybridizací [40]

PCR program:

- dekontaminace (37 °C, 10 min)
- denaturace (94 °C, 9 min)
- denaturace (94 °C, 30 s)
- přisedání primerů (52 °C, 45 s)
- prodlužování primerů (72 °C, 45 s)
- udržování při teplotě 72 °C

(40 cyklů pro kroky 3 až 5) [40]

Souhrnný postup testu po amplifikaci:

- 10 µl denaturačního roztoku (DR) se vloží do každé vaničky
- 10 µl amplifikovaného produktu k DR
- inkubace při teplotě 20 - 25 °C po dobu 5 min
- 2 ml předehřátého hybridizačního roztoku do každé vaničky
- přidání INNO-LiPA stripu do každé vaničky
- inkubace při 49 °C v třepací vodní lázni se zavřeným víkem po dobu 60 min
- 2x promýt stripy s 2 ml promývacího roztoku po 10 - 20 s
- přidání 2 ml promývacího roztoku do každé vaničky
- inkubace při 49 °C v třepací vodní lázni se zavřeným víkem po dobu 30 min
- připravit si proplachovací roztok a roztok konjugátu
- 2x proplachovat stripy s 2 ml po dobu 1 min při 20 - 25 °C na třepáče
- přidání 2 ml roztoku konjugátu do každé vaničky
- inkubace při 20 - 25 °C po dobu 30 min na třepáče
- příprava substrátového roztoku
- 2x proplachovat stripy s 2 ml po dobu 1 min při 20 - 25 °C na třepáče
- jednou propláchnout stripy s 2 ml substrátového pufru
- přidání 2 ml substrátového roztoku do každé vaničky
- inkubace při 20 - 25 °C po dobu 30 min na třepáče
- 2x proplachovat 2 ml destilované vody po dobu 3 min [40]

3.1.5 Kontrola kvality

- Konjugátová kontrola – potvrzuje přidání reaktivního konjugátu a substrátu, měla by vždy vycházet pozitivně a mít stejnou intenzitu zbarvení u všech stripů ve stejném běhu
- Humánní kontrola (hDNA) – primery, amplifikující fragment lidského HLA-DPB1 genu, jsou přidány k HPV amplifikačnímu kitu sloužící pro kontrolu kvality vzorku a účinnosti extrakce. Tato linie by měla být vždy pozitivní kromě

případů, kdy amplifikace lidské DNA je potlačena přítomností velkého množství HPV DNA ve vzorku (tzn., že při masivní amplifikaci HPV je hDNA negativní).

- Pozitivní kontrola – vždy by měla být zahrnuta např. pozitivní amplifikační kontrola obsahující HPV 6 a měla by reagovat s konjugátovou kontrolou, HPV kontrolou 1 a linií 1
- Negativní kontrola – měla by být zahrnuta v každém běhu metody, např. PBS (fosfátový pufr) zpracovaný současně se vzorky pacientů při DNA extrakci a PCR
- Vzorek – je považován za pozitivní, pokud alespoň jedna z typově specifických linií nebo jedna z HPV kontrol je pozitivní, všechny dobře viditelné linie by se měly hodnotit jako pozitivní a poloha linií se porovnává s interpretační tabulkou [40]

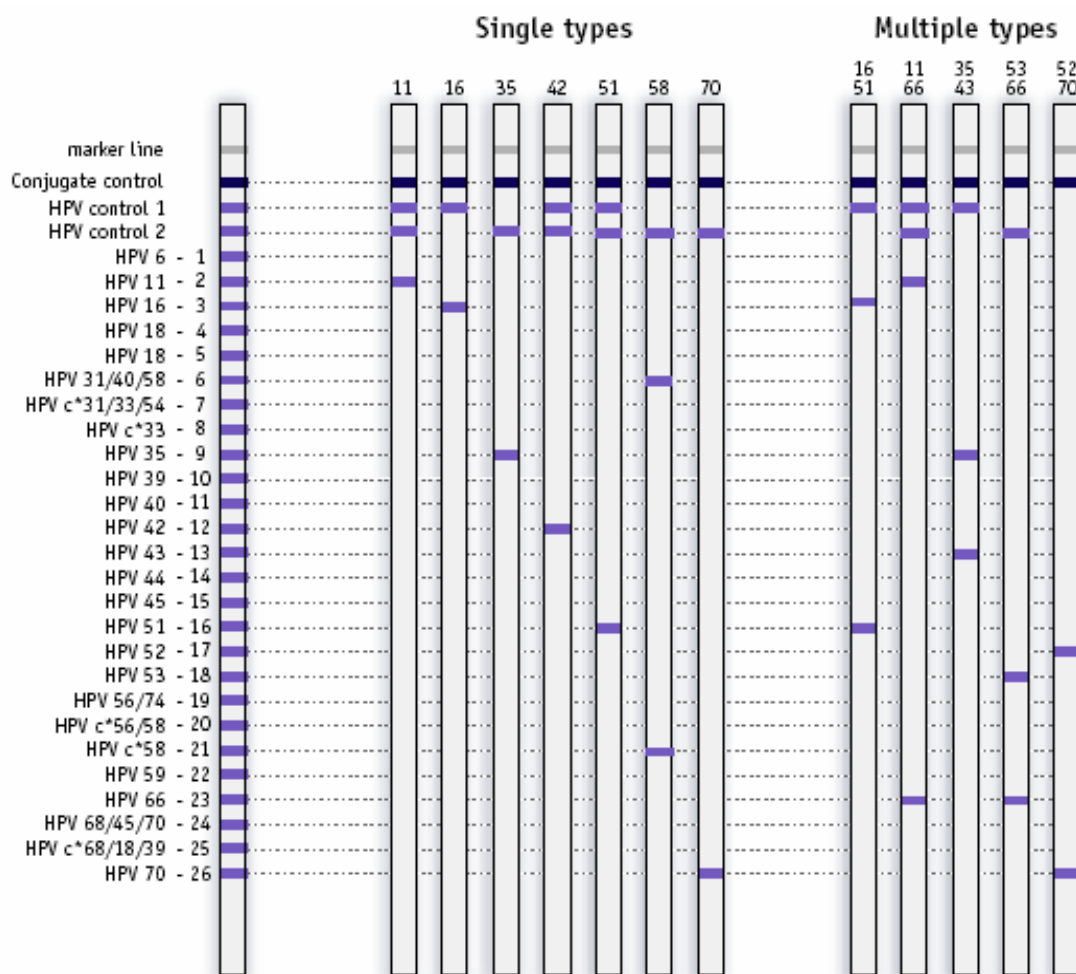
3.1.6 Interpretace výsledků

Stripy by se měly číst až po úplném zaschnutí.

Vzorek je považován za pozitivní, jestliže je alespoň jedna typově specifická linie nebo jedna z HPV kontrol pozitivní. Všechny jasně viditelné linie by měly být vyhodnoceny použitím INNO-LiPA HPV Genotypizace Extra kartičky pro odečítání výsledků. Polohy linií by měly být srovnány s INNO-LiPA HPV Genotyping Extra interpretační tabulkou dodávanou s kitem. Tato tabulka klasifikuje pozitivní linie pro různé HPV typy (sloupce) znakem „X“.

Všechny HPV typy (sloupce interpretační tabulky), které jsou podmnožinou souboru pozitivních linií pozorovaných na stripu, musí být vyhodnoceny jako přítomné nebo možná přítomné ve vzorku. HPV typ je možná přítomný ve vzorku, jestliže všechny linie jsou již součástí jedné nebo několika specifických hybridizačních vzorů jiných typů HPV.

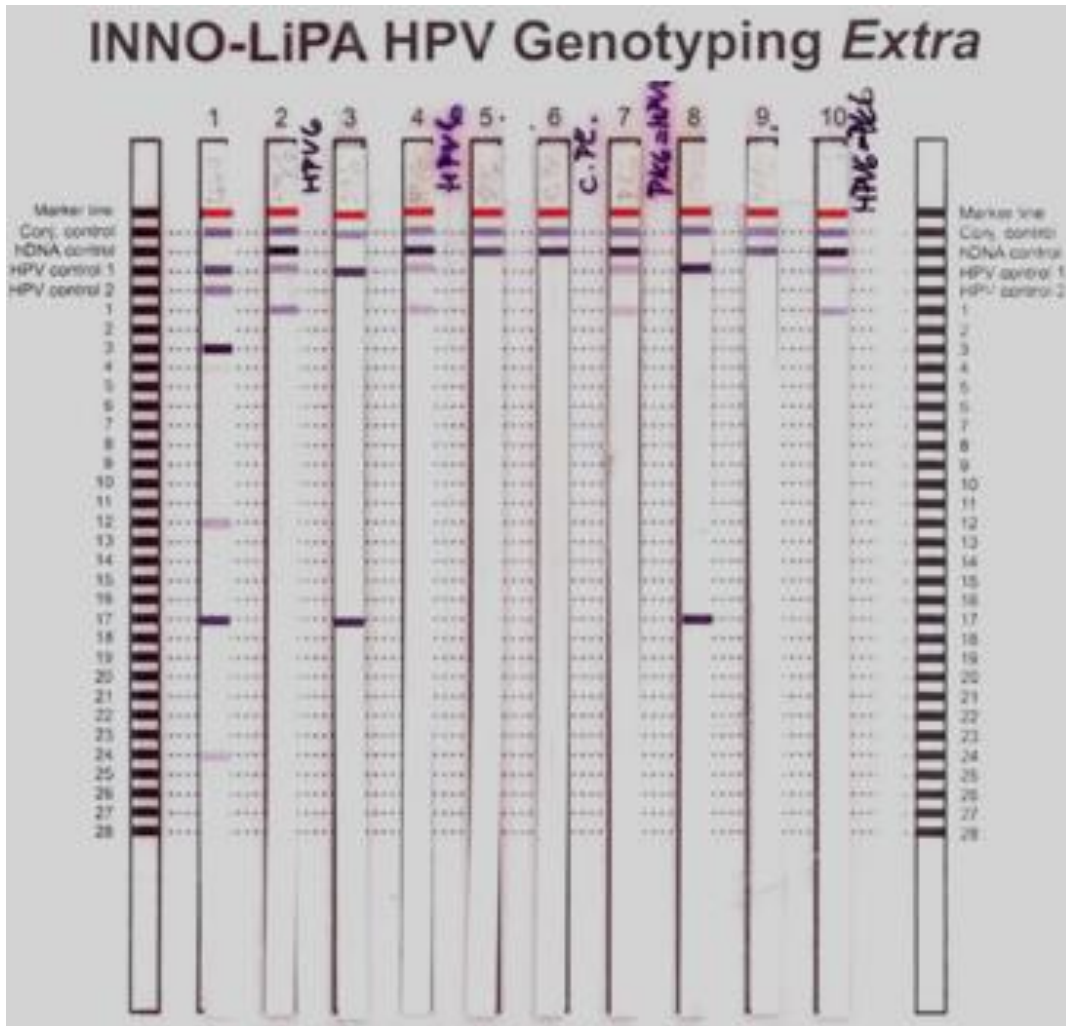
Vzorky, u kterých soubor pozitivních linií nebyl přidělen k žádnému genotypu, nebo který neměl typově specifické řádky (linie 1-28), ale měl alespoň jednu HPV kontrolu pozitivní, musí být vyhodnocen jako HPV pozitivní, ale bez zhodnocení typu, viz návod ke kitu.



Obr. 6. Identifikace jednotlivých a vícenásobných HPV genotypů v klinických vzorcích [40]

3.2 Příklad výsledků vyšetření

Hybridizované stripy vyšetřovaných pacientů a kontrol:



Obr. 7. Hybridizované stripy vyšetřovaných pacientů a kontrol


Výsledková tabulka:

LiPA STRIP	REAKTIVNÍ ŘÁDKY			VÝSLEDEK GENOTYPIZACE
	hDNA k.	HPV k.1	HPV k.2	
1	N	P	P	HR-HPV 16, 18, 51; pHR 66
2	P	P	N	LR-HPV 6
3	N	P	N	HR-HPV 51
4	P	P	N	LR-HPV 6
5	P	N	N	negativní, HPV DNA neprokázána
6	P	N	N	negativní, HPV DNA neprokázána
7	P	P	N	LR-HPV 6
8	N	P	N	HR-HPV 51
9	P	N	N	negativní, HPV DNA neprokázána
10	P	P	N	LR-HPV 6

Tab. 2. Výsledková tabulka pacientů vyšetřených metodou INNO-LiPA

Poznámky: P – pozitivní, N - negativní, hDNA k. – hDNA kontrola, HPV k.1 – HPV kontrola 1, HPV k.2 – HPV kontrola 2

Výsledky pacientů jsme hodnotili pomocí interpretační tabulky:



INNOGENETICS®
POVYŠOVANÝ TEST KVALITY

INNO-LIPA HPV Genotyping Extra
Interpretation Chart

HPV genotypes

Probe #	6	11	16	18	18	18	26*	31	33	35	39	40	43	44	45	45	51	52	53*	53*	54	56	58	58	58	58	58	58	58	58	59	59	66*	68	68	69/71**	70	70	70	73	74**	82	Probe #															
1	X																																																1									
2			X																																																2							
3				X																																																3						
4					X																																																4					
5						X																																															5					
6							X																																														6					
7																																																						7				
8								X																																														8				
9								X																																															9			
10								(X)***	X																																														10			
11										X																																													11			
12						X																																																	12			
13												X																																											13			
14													X																																											14		
15														X																																										15		
16															X		X																																							16		
17																X																																								17		
18																		X																																						18		
19																			X																																					19		
20																																																									20	
21																																																									21	
22																																																									22	
23																																																									23	
24																																																									24	
25																																																										25
26																																																									26	
27																																																									27	
28																																																										28

** : 26, 53 and 66 are considered probable high-risk (pHR) genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.
 *** : 69, 71 and 74 are not classified as high-risk, probable high-risk or low risk genotypes according to Munoz et al. N Engl J Med 2003;348:518-27.
 **** : probe 10 may show weak reactivity when probe lines 8 and 9 are positive; in this case the sample should be interpreted as genotype 31

© 2008 InnoGenetics

27279 v2
2008-04-03
p.1/1

Obr. 8. Interpretační tabulka (součást kitu)

Výsledky jednotlivých pacientů

U **pacienta č. 1** jsme zaznamenali vybarvení linií č.: 3, 12, 17, 24. Podle interpretační tabulky jsme vyhledali, které typy HPV se u pacienta vyskytují, tj.: HR-HPV 16, 18, 51; pHR66 (možný je výskyt HPV HR-HPV 39).

U **pacienta č. 3** jsme shledali vybarvení linie č.: 17. To znamená, že se jedná o HPV typ HR-HPV 51. Díky intenzivní amplifikaci HPV DNA došlo k potlačení amplifikace kontrolního úseku humánní DNA (hDNA kontroly), který nejeví žádné známky zbarvení.

U **pacienta č. 5** jsme nenalezli žádné vybarvení linií, tzn. negativní výsledek, kdy HPV DNA nebyla prokázána.

U **pacienta č. 8** jsme objevili vybarvení linie na řádku č. 17, jedná se tedy o typ HR-HPV 51.

U **pacienta č. 9** jsme nezaznamenali vybarvení žádné z linií, pacient má negativní výsledek, HPV DNA nebyla prokázána.

Čísla 2, 4, 7, 10 jsou pozitivní kontroly na LR-HPV 6.

4 DISKUZE

Hlavní příčinou vzniku karcinomu děložního čípku je infekce HPV. Každoročně se nakazí okolo 6 miliónů osob, v ČR se objeví na 1000 nových pacientek s rakovinou děložního čípku a okolo 400 žen na toto onemocnění zemře. Onemocnění je latentní, nebo s klinickými příznaky. Nejběžnějším projevem LR HPV jsou genitální bradavice, tzv. condylomata accuminata, infekce HR HPV způsobuje vývin neoplázií (VIN, CIN) až na cervikální karcinom. [39]

Důležité jsou pro včasný záchyt změn epitelu preventivní gynekologické prohlídky. Provádí se na nich cytologický stěr z čípku, tzv. sekundární prevence, a základní kolposkopické vyšetření. Cytologie a kolposkopie může být doplněna histologickým vyšetřením – biopsií, která definitivně potvrdí závažnost nálezu. Včasný záchyt změněných buněk má přívětivější vliv na další léčbu než u pokročilých nálezů. Proto je nezbytná správná diagnostika časných pozitivních nálezů a také prevence. [1,22]

Jak již bylo zmíněno, sekundární prevencí je cytologický screening. V současnosti jsou na českém trhu dvě profylaktické vakcíny – Silgard a Cervarix, tzv. primární prevence. Silgard se vyznačuje tím, že očkuje proti HPV typu 6, 11, 16, 18 aj., tedy proti typům, které způsobují condylomata accuminata, prekancerózní léze a cervikální karcinom. Cervarix sice neobsahuje HPV typy 6 a 11, původce genitálních bradavic, ale typy 16 a 18 aj., tedy nejdůležitější původce vzniku karcinomu děložního čípku. Tyto vakcíny mají největší smysl u dívek či mladých žen, které ještě nezahájily sexuální život. Očkovat se však mohou nechat i ženy do 45 let, s již zahájenou sexuální aktivitou. [27]

Jako doplněk cytologie slouží testování HPV. To je výhodné hlavně u žen s nejasným cytologickým nálezem nebo s mírně abnormálním výsledkem screeningu. Pro rutinní diagnostiku se využívá PCR a metoda Hybrid Capture 2, prováděná na mikrotitračních destičkách. Hybrid Capture 2 je založena na průkazu přítomnosti HPV. Na zjištění typu HPV se používá metoda INNO-LiPA, založená na reverzní hybridizaci. HPV testování je tak dalším doplňkovým vyšetřením cytologického screeningu. [15]

Po zjištění změněných buněk a dalších vyšetřeních dále postupujeme terapií. Ta se odvíjí od stupně léze a výsledků diagnostiky. U časných stádií nádorů postačí

chirurgická léčba. U pokročilejších karcinomů se provádí radioterapie, její účinek je zvýšen podáním cytostatik (chemoterapie). V klinických zkouškách je terapeutická vakcína VGX-3100 firmy Inovio Pharmaceuticals, Inc. [1,33]

V dnešní době je třeba vytvářet stále nové, modernější metody, neboť incidence u mladší věkové skupiny neustále roste. Probíhá mnoho studií zaměřených na diagnostiku, terapii či prevenci. Ve vývoji jsou cytostatika a další terapeutické látky, např. interferony, terapeutické vakcíny. V diagnostice jsou nejnovějšími metodami Test HPV Cobas 4800 a Test Aptima HPV. Test HPV Cobas 4800 je kvalitativní test *in vitro* pro detekci 14 HR HPV. Test Aptima HPV je amplifikační test cílové sondy nukleové kyseliny pro *in vitro* kvalitativní detekci E6/E7 virové messengerové RNA (mRNA) z 14 vysoce rizikových typů HPV.

5 ZÁVĚR

Účelem bakalářské práce bylo shrnutí základních informací o vzniku a průběhu onemocnění karcinomu děložního čípku a jeho prekancerózních lézí vyvolaných viry ze skupiny lidských papillomavirů – HPV. Hlavním smyslem této práce však bylo podat současný přehled poznatků o nejrecentnějších metodách současné diagnostiky onemocnění, možnostech prevence a účinné terapie.

Jako moderní metoda byla vybrána a blíže popsána metoda INNO-LiPA Genotyping Extra, která se provádí již rutinně v laboratoři CGB a. s., Ostrava. Tato metoda je důležitá pro určení míry rizika onemocnění vyvolaného viry typů HPV a lépe dovoluje indikovat účinnou léčbu. Nevýhodou zmíněné metody, která se prozatím v širším měřítku u nás běžně nepoužívá, je finanční náročnost, která nedovoluje její zavedení již v průběhu preventivních gynekologických prohlídek.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Rob L., Martan A., Citterbart K. et al.: Gynekologie 2008, 2. vydání, Galén, Praha, s. 5-277.
2. Čihák R.: Anatomie (2) 2002, 2. vydání, Grada Publishing, Praha, s. 347-356.
3. Tachezy R.: Papillomaviry - věrní průvodci lidstva. *Živa*, 2004, roč. 52, č. 4, s. 146-149.
4. *Bethesda* [online]. [cit. 2011-06-20]. Dostupné z: <http://www.cipek.cz/cytologie/bethesda.php>.
5. MedlinePlus. *Cervicitis* [online]. 2010 [cit. 2011-06-20]. Dostupné z: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/001495.htm>.
6. Atlases – Pathology images. *Patologie čípku děložního* [online]. 2010 [cit. 2011-06-21]. Dostupné z: http://atlases.muni.cz/atlases/stud/atl_cz/main+gynpat+cipek.html.
7. Cibula D., Petruželka L. et al.: Onkogynekologie 2009, Grada Publishing, Praha, str. 311-335.
8. HPV asociované cervikální léze. *Cervikální intraepiteliální neoplázie - CIN* [online]. 2006 [cit. 2011-06-20]. Dostupné z: <http://www.hpv.cervix.cz/cervikalni-patologie.html>.
9. National Cancer Institute Fact Sheet. *Human Papillomaviruses and Cancer: Questions and Answers* [online]. 2005 [cit. 2011-06-21]. Dostupné z: <http://www.cancernews.com/data/Article/310.asp>.
10. Mikyšková I., Dvořák V., Michal M.: Lidské papilomaviry jako příčina vzniku gynekologických onemocnění. *Praktická gynekologie*, 2003, č. 4, s. 33-36.

11. HPV asociované cervikální léze. *Přehled metod* [online]. 2006 [cit. 2011-06-01]. Dostupné z: <http://www.hpv.cervix.cz>.
12. *Údaje o přípravku Silgard* [online]. [cit. 2011-06-07]. Dostupné z: <http://www.vsecomuzu.cz>.
13. Prymula R.: Bivalentní vakcína proti lidským papilomavirům. *Remedia*, 2007, roč. 17, č. 4, s. 409-411.
14. Tachezy R. et. al.: *Virové infekce genitálu* [online]. [cit. 2011-06-15]. Dostupné z: <http://www.papillomavirus.cz/odborna/anogenitalni.pdf>.
15. Sosna O., Matouš B.: Papillomavirové infekce v gynekologii a porodnictví. *Gynekolog*, 2001, roč. 10, č. 2, s. 71-74.
16. *Human Papillomaviruses and Cancer* [online]. [cit. 2011-06-15]. Dostupné z: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/HPV>.
17. Baseman J. G., Koutsky L. A.: The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, 2005, roč. 32, s. 16-24.
18. *Laboratoře klinické genetiky* [online]. [cit. 2011-06-15]. Dostupné z: <http://www.cgb-laborator.cz/obsah/oddeleni/genetika/art-21-.aspx>.
19. Sdružení soukromých gynekologů ČR-Klacina K., Skřivánek A., Malík T.: Problematika karcinomu hrdla děložního. In *Sborník přednášek*. 1. část. 2008, s. 76.
20. *Čípek děložní - edukační materiál* [online]. [cit. 2011-06-21]. Dostupné z: <http://www.anamneza.cz/moduly/clanek.php3?id=603&sekce=6>.
21. *Rakovina děložního čípku* [online]. [cit. 2011-06-22]. Dostupné z: <http://www.cervix.cz/index.php?pg=pro-verejnost--rakovina-delozniho-cipku>.

22. Ústav hematologie a krevní transfuze. *Screening pro prevenci karcinomu děložního čípku (cervixu)* [online]. [cit. 2011-06-22]. Dostupné z: http://www.papillomavirus.cz/laicka/ECCA_SCREENING_CZ4.pdf.
23. Sláma J.: Prevence karcinomu děložního hrdla: kdy můžeme očekávat vliv na populační data?. *Aktuální gynekologie a porodnictví*, 2009, roč. 1, s. 8-10.
24. Mouková L., Feranec R., Chovanec J.: HPV a vakcinace v prevenci karcinomu děložního hrdla. *Jihočeské onkologické dny* [České Budějovice: Nemocnice České Budějovice, 199-], 2010, s. 4-5.
25. Krebs H., Denny L.: *Global library of women's medicine* [online]. 2008 [cit. 2011-06-20]. Dostupné z: http://www.glowm.com/?p=glowm.cml/section_view&articleid=226#11771.
26. Materiál CGB laboratoře a. s.: *Diagnostika a vakcíny*, s. 2.
27. Petráš M., Lesná I. K.: *Manuál očkování*, 3. vydání. 2010, s. 377-406.
28. Mouková L.: *Prevence karcinomu děložního čípku* [online]. 2010 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <http://www.mou.cz/cz/prevence-karcinomu-delozniho-cipku/article.html?id=168>.
29. *HPV vakcína* [online]. 2007 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <http://www.hpvinfos.cz/index.html#kondylomy1>.
30. *Cervarix* [online]. 2011 [cit. 2011-06-23]. Dostupné z: <http://www.cervikalnikarcinom.cz/Cervarix.aspx>.
31. Citterbart K. et. al.: *Gynekologie 2001*, Galén, Praha, s. 277.

32. *Treatment Option Overview* [online]. 2011 [cit. 2011-06-25]. Dostupné z: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/cervical/Patient/page4>.
33. *Inovio Pharmaceuticals Demonstrates T Cell Immune Response Durability with Fourth Dose of Therapeutic Cervical Dysplasia and Cancer DNA Vaccine* [online]. 2011 [cit. 2011-06-26]. Dostupné z: http://www.drugs.com/clinical_trials/inovio-pharmaceuticals-demonstrates-t-cell-immune-response-durability-fourth-therapeutic-cervical-12117.html.
34. Ondruš J.: *Preamble kolposkopie* [online]. 2009 [cit. 2011-06-24]. Dostupné z: <http://www.kolposkopie.cz/dokumenty/doc/Preamble%20kolposkopie.pdf>.
35. *Kolposkopie* [online]. 2011 [cit. 2011-06-24]. Dostupné z: <http://www.konizace.info/kolposkopie>.
36. *Onkologická cytologie* [online]. 2011 [cit. 2011-06-24]. Dostupné z: <http://www.konizace.info/onkologicka-cytologie>.
37. *Digene HC2 HPV DNA Test* [online]. 2011 [cit. 2011-06-25]. Dostupné z: <http://www.qiagen.com/products/digenehpvtsthc2.aspx>.
38. Rotterová P., Nenutil R., Hanzelková Z.: Expres P16INK4A v dyspláziích a nádorech děložního čípku. *Klinická onkologie*, 2003, roč. 16, č. 6, s. 249-252.
39. *Vyšetření – Humánní papilomaviry* [online]. 2010 [cit. 2011-06-25]. Dostupné z: <http://www.pathology.cz/laboratore/molekularni-genetika/vysetreni>.
40. HPV Genotyping by INNO-LiPA. *Microgen Bioproducts Newsletter*, 2005, č. 19, s. 1-4.

41. *DNA hybridizační test firmy INNOGENETICS INNO-LiPA* [online].
[cit. 2011-06-27]. Dostupné z:
http://www.papillomavirus.cz/diagnostika_sety_innolipa.html.

42. *Uživatelská příručka 2010* [online]. [cit. 2011-06-27]. Dostupné z:
http://www.innogenetics.be/userfiles/msds/81063_GBEN.pdf.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

5-FU	5-fluorouracil
AGC-NEO	atypické glandulární buňky spíše neoplastického původu
AGC-NOS	atypické glandulární buňky, není-li uvedeno jinak
AGUS	atypické glandulární buňky neznámého významu
AIDS	syndrom získané imunodeficiencie
ASC-H	atypické skvamózní buňky bez vyloučení léze vysokého stupně
ASCUS	atypické skvamózní buňky neurčitého významu
ASO4	skvalen, adjuvantní systém
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát/nitrotetrazoliová modř
CIN	cervikální intraepiteliální neoplázie
CMV	cytomegalovirové onemocnění
CO ₂	oxid uhličitý
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
DR	denaturační roztok
HCM	metoda Hybrid Capture 2 na mikrotitračních destičkách
HCT	metoda Hybrid Capture 1 prováděná ve zkumavkách
hDNA	lidská deoxyribonukleotidová kyselina
HGSIL	vysoký stupeň skvamózní intraepiteliální léze
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPMPC	cidofovir
HPV	lidský papillomavirus
HR HPV	vysoce rizikové (high-risk) HPV
INCA	invazivní karcinom
INNO-LiPA	genotypizační metoda
LEEP	kličková elektroexcizní metoda
LGSIL	nízký stupeň skvamózní intraepiteliální léze
LLETZ	rozsáhlá kličková excize transformované oblasti
LR HPV	nízko rizikové (low-risk) HPV
PAP	Papanicolaouův test
pb	páry bází

PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PET-CT	pozitronová emisní tomografie spojená s počítačovou tomografií
pHR HPV	pravděpodobně vysoce rizikové HPV
pRb	protein Rb
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	relativní odstředivá síla
RRP	rekurentní laryngeální papillomatóza
SSCP	jednovláknový konformační polymorfismus
VAIN	vaginální intraepiteliální neoplázie
VIN	vulvární intraepiteliální neoplázie
VLP	viru podobné částice, pseudoviriony