

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**  
**Katedra biologických a lékařských věd**



## **Cytopatologická diagnostika cerviko – vaginálního onemocnění**

Diplomová práce

**Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.**

**Konzultant: MUDr. Dalibor Hřebíček**

Hradec Králové, 2016

Bc. Simona Bartoňová, DiS.

„ Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem. Veškeré literární prameny a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou v práci řádně citovány a uvedeny v seznamu použité literatury. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. ”

V Hradci Králové dne 30. 4. 2016

.....  
Simona Bartoňová

Velice ráda bych chtěla poděkovat MUDr. Markétě Trnkové, společnosti AeskuLab Patologie, k.s. za vstřícnost, ochotu a za poskytnutí cenných záznamů z archivu cytologických, histologických a imunohistochemických preparátů.

Děkuji svému konzultantovi MUDr. Daliboru Hřebíčkoví a celému kolektivu v cytologické laboratoři AeskuLab Patologie, k.s. za odborné vedení a poskytnutí informací při vypracování diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Vladimírovi Semeckému, CSc. za odbornou spolupráci v průběhu zpracování diplomové práce na Farmaceutické fakultě v Hradci Králové.

## **OBSAH:**

<b>ABSTRAKT .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE - ZADÁNÍ .....</b>	<b>3</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>4</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>6</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>7</b>
<b>2.1. Anatomie a histologie dělohy a děložního hrdla.....</b>	<b>7</b>
2.1.1. Funkce cervixu .....	9
2.1.2. Metaplazie na cervixu.....	10
<b>2.2. Karcinom děložního hrdla.....</b>	<b>11</b>
2.2.1. Mechanismus HPV infekce a další rizikové faktory .....	12
2.2.2. Patogeneze cervikálního karcinomu.....	14
2.2.2.1. Invazivní dlaždicový karcinom.....	16
2.2.2.2. Adenokarcinom žláзовého epitelu endocervixu.....	17
2.2.3. Klinické projevy prekanceróz a cervikálního karcinomu.....	17
<b>2.3. Diagnostika prekanceróz a karcinomu cervixu.....</b>	<b>18</b>
2.3.1. Kolposkopie.....	18
2.3.2. Cytologie .....	19
2.3.3. Biopsie.....	21
2.3.3.1. Základní histologické vyšetření.....	21
2.3.3.2. Imunohistochemické vyšetření .....	22
2.3.4. HPV typizace.....	23
<b>2.4. Léčba a prevence prekanceróz a karcinomu cervixu .....</b>	<b>24</b>

<b>3.</b>	<b>PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>27</b>
<b>3.1.</b>	<b>Klasifikace podle Bethesda 2014.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.</b>	<b>Přehled barvicích metod v ČR a zahraničí.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.</b>	<b>Stanovení a hodnocení prekanceróz a KDH ve vzorku .....</b>	<b>31</b>
3.3.1.	Zpracování cerviko-vaginálního stěru .....	31
3.3.1.1.	Pomůcky a přístroje .....	31
3.3.1.2.	Chemikálie na fixaci buněk .....	31
3.3.1.3.	Odběr a příprava buněčného materiálu.....	32
3.3.2.	Metoda průkazu prekanceróz a cervikálního karcinomu.....	33
3.3.2.1.	Pomůcky a přístroje .....	33
3.3.2.2.	Barvicí a zásobní roztoky .....	33
3.3.3.	Postup a hodnocení prekanceróz a cervikálního karcinomu.....	33
<b>3.4.</b>	<b>Stanovení a hodnocení průkazu p<sup>16</sup> v bioptickém vzorku .....</b>	<b>35</b>
3.4.1.	Zpracování bioptické tkáně .....	35
3.4.1.1.	Pomůcky a přístroje .....	35
3.4.1.2.	Chemikálie.....	35
3.4.1.3.	Odběr a příprava bioptického vzorku .....	36
3.4.2.	Metoda průkazu p <sup>16</sup> .....	36
3.4.2.1.	Pomůcky a přístroje .....	36
3.4.2.2.	Zásobní roztoky .....	36
3.4.3.	Průkaz a hodnocení p <sup>16</sup> .....	37
3.4.3.1.	Provedení reakce.....	37
<b>4.</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.</b>	<b>Soubor vyšetřovaných patientek .....</b>	<b>38</b>
4.1.1.	Výskyt nově diagnostikovaných případů prekancerózních forem děložního hrdla u patientek nad 30 let .....	40
4.1.2.	Změny na sliznici po léčebném zákroku u patientek nad 30 let .....	42
<b>5.</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>47</b>

## ABSTRAKT

Karcinom děložního čípku patří mezi nejčastější zhoubná nádorová onemocnění v České republice u žen starších 35 let. Vzniká na základě rozvoje patologických změn epitelových buněk neboli tzv. prekanceróz, které se projevují bez příznaků. Včasné je lze odhalit pouze specializovaným kolposkopickým, cytologickým a biotickým vyšetřením. U rozvinutého nádoru jsou přítomny typické projevy: bolest v podbřišku, krvácení po pohlavním styku nebo výtok z pochvy. Hlavní příčinou tohoto onemocnění je infekce vyvolaná vysoce rizikovými typy lidských papilomavirů. Tyto viry mají schopnost perzistence a vyskytují se u 90 % detekovaných případů. Diagnostika nádoru cervixu musí být komplexně vyhodnocena výsledky onkologické cytologie, biotickým vyšetřením a pozitivní typizací HPV.

Diplomová práce se zabývá cytologickým vyšetřením, tzv. Pap testem cervikálních stěrů a jejich mikroskopickou diagnostikou pro rozlišení časných stádií. Alterace buněk byla hodnocena klasifikací dle Bethesda 2014. Dále se zabývá imunohistochemickým vyšetřením cervikálních biopsií, které umožňuje lépe prokázat typ dysplazie. Reakce, prokazující pozitivitu p<sup>16</sup>, byla provedena na řezech, již dříve popsáním imunohistochemickým postupem. Cílem práce bylo zjistit u pacientek starších 30 let ze vzorků přijatých za rok 2014 a 2015 frekvenci výskytu jednotlivých patologických forem a vyhodnotit kompletnost relapsu u pacientek po léčebném zákroku. Dalším úkolem bylo uvést přehled doporučených barvicích postupů cervikální cytologie využívaných v ČR a zahraničí.

V roce 2014 – 2015 bylo přijato na odd. cytologie 421 950 vzorků. Z tohoto počtu bylo 341 pacientek diagnostikováno s cytologickým závěrem HG SIL. V tomto souboru bylo 30 pacientek starší 30 let, u kterých bylo doplněno histologické a imunohistochemické vyšetření. Diagnóza dysplazií byla určena u 21 vzorků. Z toho u 18 nově diagnostikovaných pacientek se jednalo o poškození metaplastického dlaždicového epitelu v různých stupních. U 3 pacientek došlo k progresi i regresi lézí potvrzeným opakovaným léčebným zákrokem. Jedním z nejčastějších důvodů progresu lézí po léčebném zákroku je neúplně provedená konizace nebo přetrvání HPV infekce v těle. Nicméně tedy i po chirurgickém výkonu se u pacientek vyžaduje dlouhodobá dispenzarizace.

## **ABSTRACT**

Cervical cancer is the most common malignant tumors in the Czech Republic in women older than 35 years. Created on the basis of pathological changes of epithelial cells or so called precancer, manifested no symptoms. Timely is, they can only be detected by specialized colposcopy, cytology and biopsy examinations. In advanced cancer, are present typical symptoms: lower abdominal pain, bleeding after sexual intercourse or vaginal discharge. The main cause of this disease is an infection caused by high - risk types of human papillomaviruses. These viruses have the ability and persistence occur in 90 % of cases detected. Diagnosis of cancer of the cervix must be comprehensively evaluated the results of a Pap test, biopsy examination and positive HPV typing.

The thesis deals with cytological examination called Pap test, cervical smears and their microscopic diagnosis to distinguish the early stages. Alteration of the cells was evaluated according to the classification of Bethesda 2014. Further deals with immunohistochemical examination of cervical biopsies, which makes it easier to demonstrate the type of dysplasia. Reactions demonstrating the positivity of p<sup>16</sup> was performed on sections, previously described immunohistochemical procedure. The aim was to identify patients over 30 years of samples taken in 2014 and 2015, the incidence of each pathological forms and evaluate the completeness of relapse in patients after curative surgery. The next task was to provide an overview of the recommended coloring processes cervical cytology used in the country and abroad.

In 2014 - 2015 was adopted at the department 421 950 cytology samples. Of this total, 341 patients diagnosed with HG SIL cytology conclusion. In this group, 30 patients older than 30 years who was accompanied by histology and immunohistochemistry. The diagnosis of dysplasia was determined in 21 samples. Out of the 18 newly diagnosed patients was a damage metaplastic squamous epithelium in various degrees. In 3 patients experienced progression and regression of lesions confirmed by repeated therapeutic intervention. One of the most common reasons lesion progression after curative surgery is performed incompletely conisation or persistence of HPV infection in the body. However, also after surgery to patients requiring long-term follow-up.

## **CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE - ZADÁNÍ**

V teoretické části nejprve popíši jednotlivé prekancerózní formy a typy karcinomů děložního hrdla, diagnostické postupy a léčbu, v praktické části pak použitou cytologickou a imunohistochemickou metodu a charakteristiku vyšetřovaného souboru pacientek.

Cílem práce je vyhodnotit v cervikálních nátěrech u pacientek nad 30 let, přijatých za rok 2014 a 2015, patologické nálezy cytologickou metodou dle Papanicolaoua. Stanovit buněčnou abnormalitu klasifikací dle Bethesda 2014. Dalším cílem je zhodnotit v cervikálních biopsiích u pacientek nad 30 let, přijatých za rok 2014 a 2015, stupeň dysplazie a průkaz onkoproteinu p<sup>16</sup> imunohistochemickou metodou. Ověřit frekventovaný výskyt nově diagnostikovaných případů prekancerózních forem u pacientek nad 30 let a zhodnotit případný relaps po léčebném zákroku za rok 2014 a 2015 z celkového počtu přijatých cytologických vzorků. Dále je cílem uvést přehled doporučených diagnostických barvicích postupů využívaných v ČR a zahraničí.



## SEZNAM ZKRATEK

Ab	protilátka
AGC	atypie žlázových buněk
AGC-NEO	atypie žlázových buněk spíše neoplastického původu
AGC-NOS	atypie žlázových buněk spíše nespecifikovaných
AGUS	atypické žlázové buňky nejasného významu
AIS	adenokarcinoma in situ
APC	antigen – prezentující buňky
ASC-H	atypie dlaždicových buněk, nelze vyloučit HG SIL
ASC-US	atypické dlaždicové buňky nejasné etiologie
bp	páry bází
CGIN	cervikální žlázová intraepiteliální neoplazie
CIN	cervikální intraepiteliální neoplazie
CIS	carcinoma in situ
CMV	cytomegalovirus
DAB	3,3'-diaminobenzidín tetrahydrochlorid
ds DNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
FIGO	mezinárodní federace gynekologie a porodnictví
GIT	gastrointestinální trakt
HAK	hormonální antikoncepce
HC	hybrid capture, hybridizační test pro detekci HPV
HE	hematoxylin – eosin
HG SIL	vysoký stupeň závažnosti intraepiteliálních změn dlaždicových buněk

HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
HPV	lidský papilomavirus
HR	vysoká rizikovost
HSV	herpes simplex virus
Ig	imunoglobulin
IUD	nitroděložní tělísko
KDH	karcinom děložního hrdla
LBC	cytologie z tekutého média
LG SIL	nízký stupeň závažnosti intraepiteliálních změn dlaždicových buněk
LR	nízká rizikovost
MPL	monofosforyl lipid A
m-RNA	mediátorová ribonukleová kyselina
NILM	negativita pro intraepitelovou lézi nebo malignitu
PAP test	Papanicolaouova metoda
PCR	polymerázová řetězová reakce
pRb	retinoblastomový protein
RNA	ribonukleová kyselina
SCJ	skvamokolumnární junkce
STD	pohlavně přenosná choroba
TLR	buněčný receptor schopný rozpoznat antigen
TNM	tumor-nodus-metastáza
TZ	transformační zóna
VLPs	viru podobné částice
WHO	světová zdravotnická organizace

# 1. ÚVOD

Karcinom děložního hrdla patří mezi nejčastější zhoubná onemocnění u žen. Každý rok je nově diagnostikováno v České republice 1000 žen a 400 žen na toto onemocnění zemře. Hlavním etiopatogenetickým činitelem je pohlavně přenosná infekce HPV především vysoce rizikových typů 16 a 18, dále imunosuprese způsobená infekcí HIV, sexuální aktivita, zejména jeho časné zahájení pohlavního života, vitamínové deficity, dlouhodobé užívání HAK a kouření. Prekancerózní formy se nachází obvykle u žen starších 30 let, s invazivním karcinomem nad 44 let. Vývoj prekanceróz bývá v oblasti transformační zóny. Jde o tzv. dlaždicovou metaplazii, kde cylindrický epitel přechází v epitel dlaždicový. Důsledkem mechanických nebo biologických vlivů (např. poranění, infekce) dochází k chybné regeneraci nebo porušené diferenciaci epitelů. Klinický obraz u LG SIL, HG SIL a CIS je spíše asymptomatický. U žen s invazivním karcinomem se objevují poruchy menstruačního krvácení, poševní výtoky, urologické komplikace a pánevní bolesti. <sup>(1)</sup>

Diagnostika je založena na prebioptických metodách, které jsou součástí pravidelných gynekologických prohlídek. Do prebioptických vyšetření patří kolposkopie, která určuje závažnost lézí, a onkologická cytologie, odhaluje závažné atypie LG SIL a HG SIL. V ojedinělých případech (při odběru buněk z nesprávných míst nebo nedostatečně fixovaný nátěr) může vést k mylné diagnóze. Pro definitivní diagnózu je vyžadována biopsie, která je zlatým standardem pro průkaznost dysplastických změn CIN 1 – 3, carcinoma in situ, invazivního dlaždicového karcinomu nebo obtížně diagnostikovaného adenokarcinomu endocervixu. HPV typizace slouží jako doplňující vyšetření. Přesnější způsob hodnocení rozsahu dysplazií a diagnostiky cervikálních karcinomů poskytuje komplexní imunohistochemické vyšetření p<sup>16</sup>, které se provádí na parafinových řezech. Jedinou kauzální léčbou je chirurgický zákrok (konizace, hysterektomie). Nejspolehlivější metodou ochrany proti HPV infekci a vzniku rozvoje prekanceróz a KDH je očkování a pravidelný cytologický screening. <sup>(2)</sup>

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Anatomie a histologie dělohy a děložního hrdla

Děloha (*uterus*) je dutý svalový hruškovitý útvar uložený v centru pánve, dlouhý 8 cm, široký 5 cm o průměru 3 cm. Skládá se z děložního těla (*corpus uteri*), hrdla (*cervix uteri*) a děložní dutiny (*cavum uteri*). Hrdlo a tělo je spojené úsekem tzv. *isthmus uteri*, který je důležitý v těhotenství. Děložní tělo se skládá z přední a zadní stěny, které přechází laterálně hranami, kraniálně dnem a kaudálně v hrdlo. Tělo vybíhá v děložní rohy, ze kterého odstupuje jeden vejcovod a tzv. *chorda uteroinguinalis a uteroovarica*. Děložní dutina trojúhelníkovitého tvaru navazuje kaudálně na kanál hrdla. Stěna dělohy je složena ze tří vrstev: endometrium, myometrium a perimetrium.

Vnitřní sliznice se nazývá endometrium (v těle) nebo endocervix (v čípku). Je tvořena jednovrstevným cylindrickým epitelem, slizničním vazivem (*lamina propria mucosae*) s obsahem fibroblastů a zanořenými jednoduchými tubulózními žlázkami (*glandulae uterinae*). Nacházíme zde zejména buňky sekreční, které uvolňují glykoproteiny. Endometrium se skládá z funkčního hlediska ze dvou částí: *zona basalis* a *zona functionalis*. Bazální zóna se využívá k regeneraci odloučené funkční zóny. Ta je rozdělena dle hormonální situace a tvaru děložních žlázek na *pars compacta* a *pars spongiosa*. Vnitřní sliznice je zásobována *arteriae arcuatae*, ze které odstupuje přímá a spirálovitá arteriola.

Myometrium je silná vrstva hladké svaloviny a malého množství kolagenního vaziva. Její zevní část probíhá longitudinálně a vnitřní je uspořádána do spirál.

Kolem dělohy je tenká vrstva kolagenního vaziva, tzv. perimetrium tvořící pruhy, které jsou součástí závěsného aparátu dělohy. Je pokryta mesotelem, obsahuje cévní a nervové zásobení. Cévní zásobení obstarává zejména *a. uterina*, *a. iliaca interna* (kříží se s močovodem), *a. vaginalis* (zásobuje hrdlo a pochvu). Je třeba zmínit děložní přívěsky (vejcovody a vaječníky), které jsou součástí dělohy.

Děložní hrdlo je vazivový svalový orgán pokrytý sliznicí. Jde o úzký dolní segment dělohy o délce 3 cm a o průměru 2,5 cm vyčnívající do pochvy. Součástí děložního čípku je přední pysk, zadní pysk, a zevní branka, která je mezi nimi, směřuje do kanálu hrdla. Endocervikální kanál (*canalis endocervicalis*) je průsvit, který spojuje děložní dutinu s pochvou. Směrem do pochvy je zevní ústí kanálu a vnitřní ústí se otevírá do dutiny děložní (*ostium externum a internum*). Děložní hrdlo se dělí na ektocervix (*portio vaginalis*) a endocervix (*portio supravaginalis uteri*).<sup>(3,4)</sup>

Ektocervix je zevní část hrdla o velikosti vlašského ořechu okrouhlého nebo konvexního tvaru, pokrytý vrstevnatým plochým nerohovatějším epitelem citlivým na hormonální vlivy. Tento epitel hrdla i pochvy se dělí do tří vrstev: bazální/parabazální (*stratum basale a parabasale*), intermediární (*stratum intermediale*) a povrchová/superficiální (*stratum superficiale*) vrstva.

V bazální/parabazální vrstvě jsou zaznamenány známky mitotické aktivity a buněčné regenerace. Nacházejí se zde dva typy buněk: malé bazální buňky (12 – 20  $\mu\text{m}$ ), s velkým kulatým centrálně uloženým jádrem (6 – 10  $\mu\text{m}$ ) a s úzkým lemem cyanofilní cytoplasmy, a větší parabazální buňky (15 – 25  $\mu\text{m}$ ) s jádrem o velikosti (10 – 15  $\mu\text{m}$ ) a cyanofilní cytoplasmou s výběžky. Výběžky jsou zbytky po intracelulárních můstcích.

Intermediární vrstva je bohatá na glykogen. Zde jsou přítomny buňky s vezikulárním jádrem a luteálního typu. Jsou to větší buňky (25 – 60  $\mu\text{m}$ ) variabilního tvaru s velkým jádrem uloženým centrálně až excentricky, chromatin je jemný. Buňky luteálního typu se nachází u žen, kde působí progesteron (v těhotenství) nebo v postmenopauze. Účinkem estrogenů se jádro zmenšuje a objem cytoplasmy narůstá.

Povrchová/superficiální vrstva je vystlána dlaždicovým epitelem. Důležitou funkcí této vrstvy je udržet kyselé pH ve vagíně, a také slouží jako ochranná bariéra. Tyto superficiální buňky nerohovají, i když mohou obsahovat bílkovinu keratohyalin. Buňky jsou dvojího typu: cyanofilní a vyzrálé eosinofilní. O velikosti 35 – 60  $\mu\text{m}$  s malým 3 – 7  $\mu\text{m}$  hutným pyknotickým jádrem, oploštělou cytoplasmou, která zaujímá velký poměr v buňce. Vlivem keratinizace buňky odumírají, zbývají pak bezjaderné útvary, které jsou označeny jako skvamy (šupiny).<sup>(5,6)</sup>

Endocervix je tkáň, která ohraničuje endocervikální kanál, sliznice je vystlána jednovrstevným cylindrickým hlenotvorným epitelem a *lamina propria mucosae*, z neuspořádaného hustého kolagenního vaziva a elastických vláken. Sliznice je složena v tzv. *plicae palmatae* (řasy). Do záhybu řas vyúsťují rozvětvené tubulózní žlázy (*glandulae cervicales*), které tvoří větvené krypty, které se zanořují do endocervikálního stromatu o hloubce 0,5 – 1 cm. Pod sliznicí je *myometrium cervicis uteri* (vrstva svaloviny) společná, jak pro endocervix i ektocervix. Buňky mají variabilní tvar, jádra jsou uspořádána při bazální membráně, cytoplasma obsahuje vakuoly naplněné hlenem. Při aktivní hlenové sekreci mohou být jádra vytlačena na okraj. Naopak deplece hlenu se může objevit při zánětu. Buňky se odlučují ve shlucích (sheet, honey comb).<sup>(5, 6, 7)</sup>

Přechod vrstevnatého dlaždicového nerohovatějícího epitelu v jednoduchý cylindrický epitel nazýváme SCJ – skvamokolumnární junkce. Transformační zóna je různě dlouhý úsek metaplastického epitelu, (viz. kap. 2.1.2.). Vývoj transformační zóny a posunu skvamokolumnární junkce se v různém období života ženy mění (v postpubertálním období, v těhotenství a po menopauze).<sup>(1, 2)</sup>

### **2.1.1. Funkce cervixu**

Důležitou funkcí děložního hrdla je ochranná bariéra, na které se podílí značná část fyziologické bakteriální mikroflóry. Mezi hlavní kompartmenty patří: buňky exocervixu bohaté na glykogen, jsou mechanicky a chemicky odolné, a buňky endocervixu (hlenotvorné, řasinkové a rezervní). Hlenotvorné buňky slouží pro ochranu dělohy před mykotickou a bakteriální infekcí. Řasinkové buňky umístěné v rozhraní endometria a endocervixu, se využívají pro aktivní přenos hlenu po sliznici. A rezervní buňky, ze kterých potom vyrůstá v transformační zóně metaplazie.<sup>(2)</sup>

Endocervikální buňky produkují kyselý a neutrální hlen. Tento hlen tvoří hlenovou zátku, která zabraňuje vniknutí patogenů do dělohy. Díky imunoglobulinům (IgA, IgG), enzymům a leukocytům (cytotoxické lymfocyty, granulocyty a agranulocyty), které jsou obsaženy v zátku, je zvýšena schopnost baktericidní. Cervikální hlen obsahuje elektrolyty: chlorid sodný, glykogen v koloidním roztoku, bílkoviny (albumin, globulin) a enzymy. V průběhu menstruačního cyklu se toto složení mění.

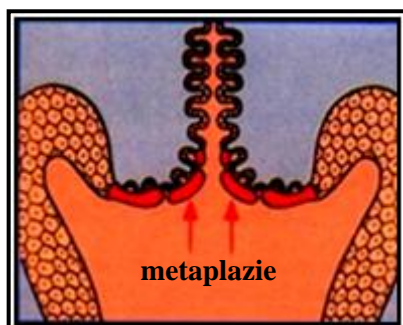
Významná role cervikálního hlenu je v těhotenství, kdy kompaktní hlenová zátka chrání vyvíjející se plod v děloze. Dále při transportu spermií, zejména v období ovulace, kde usnadňuje jejich průnik. Naopak v luteální fázi menstruačního cyklu je hlen tak hustý, že brání průchodu spermií do dělohy a vejcovodů. Hustý hlen v děložních žlázkách může stagnovat a tvořit retenční cysty (ovula Nabothi).

Zásadním úkolem dělohy a děložního hrdla je v průběhu porodu, kdy se cervix musí roztáhnout až o průměru 10 cm pro průchod plodu do poševního vchodu. Při menstruaci dochází k odloučení endometria a myometrium hrdla dilatuje. Příčinou tohoto dyskomfortu je menstruační bolest. Fyziologická vlastnost cervixu je řízena estrogenem a progesteronem z ovarií. <sup>(3, 8)</sup>

### 2.1.2. Metaplazie na cervixu

Metaplazie je adaptivní ložisková změna, u které dochází k nahrazení cylindrického epitelu vrstevnatým dlaždicovým v celém rozsahu, (viz. obr. 1). Vyznačuje se tedy nezralým dlaždicovým epitelem, pod kterým jsou vidět krypty endocervixu, které poté splývají na povrchu s klky. Příčinou může být dlouhodobá chronická iritace (zánět nebo změna pH) a hormonální stimuly (ektomie u novorozenců a v pubertě či ektropium po porodu), které působí vyhřeznutí epitelu endocervixu na exocervix a vystavení žlázkového epitelu drsnému kyselému poševnímu prostředí.

Metaplastické buňky jsou vnímavé na působení karcinogenů (např. HPV). Rozeznáváme je do několika forem: hyperplazie rezervních buněk epitelu endocervixu, nezralá dlaždicová metaplazie, kdy rezervní buňky tvoří vrstvu nezralých parabazálních buněk a nezralá dlaždicová metaplazie, kde dochází k diferenciaci nezralých buněk do zralého dlaždicového epitelu. V kolposkopii se metaplazie prokazuje potřením 3% octové kyseliny za vzniku bělavých míst, puntíčkování nebo mozaiky. <sup>(6)</sup>



**Obr. 1:** Metaplazie epitelu endocervixu v transformační zóně. <sup>(upraveno dle 2)</sup>

## 2.2. Karcinom děložního hrdla

Epidemiologicky se jedná o druhé zhoubné onemocnění rozšířené po celém světě. Každým rokem postihuje až půl milionu žen, z nichž až polovina žen umírá. Cervikální karcinom se považuje za první maligní onemocnění, které je indukované virem. <sup>(9, 10)</sup> V rozvojových zemích se objevuje více než 80 % případů karcinomu děložního hrdla. Incidence karcinomu děložního hrdla vykazuje v ČR kolem 15 – 20 %, v Africe a Latinské Americe dosahuje hodnoty kolem 50 %, a naopak ve Finsku 4,5 %. Nejvyšší morbidita a mortalita je pozorována v zemích se špatnými sociálně-ekonomickými podmínkami, kde chybí organizovaný screeningový program.

Důsledkem patogeneze je jednoznačně infekce vyvolaná lidskými papilomaviry HPV vysoce rizikovými typy (high risk – HR), a jejich perzistence v bazálních a proliferujících epitelových buňkách děložního hrdla. Mechanismus vzniku této patologické reakce byl již popsán. Nezbytně jsou důležité i další kofaktory, které podporují progresi onemocnění, např. sexuální kontakt, porucha imunitního systému a různé toxické vlivy. Je to nemoc odvrátitelná a léčitelná. Její vývoj v podobě prekanceróz trvá řadu let. Karcinom cervixu narůstá s věkem od 35 let a její vrchol je ve věku 45 – 54 let. Onemocnění je vzácné u žen mladších 25 let.

Invazivnímu dlaždicovému karcinomu, který se vyskytuje ve velké míře, předcházejí prekursorzy cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN). Za včasné cytologické detekce a léčby, dochází ke značné redukci incidence a mortality. Důležitou roli hraje primární prevence vakcinací a sekundární prevence v podobě neinvazivního screeningového vyšetření cerviko-vaginální cytologie. Tento test je mírně senzitivní a vysoce specifický. Ověřovací metodou k určení specifičtější diagnózy slouží histologické vyšetření, které se získá během operačního zákroku. K detekci prekanceróz a karcinomu děložního hrdla se využívají další metody, např. imunohistochemická nebo enzymatická vyšetření, která jsou však technicky velmi náročná a nákladná. <sup>(11)</sup>



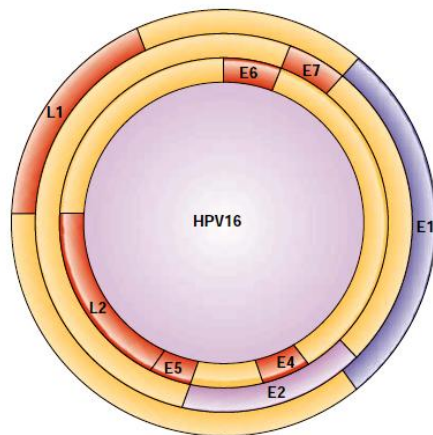
### 2.2.1. Mechanismus HPV infekce a další rizikové faktory

Podstatou karcinomu děložního hrdla je infekce HPV a další rizikové faktory. Celosvětově je celková prevalence lidských papilomavirů v cervikálním karcinomu mezi 85,9 - 90 %. HPV jsou malé neobalené viry z čeledi *Papillomaviridae*, velikosti o průměru 55 nm. Jejich genom se skládá z jedné cirkulární ds DNA, která obsahuje až 8000 bp. Kolem DNA je kapsidový obal, tvořen ze dvou pozdních L1 a L2, a časných proteinů (E1 – E8). Přenos se uskutečňuje pohlavním stykem, většinou mezi 15. – 25. rokem života. Méně častý je přenos infekce na novorozence při porodu nebo transplacentárně. <sup>(12, 13)</sup>

Vstupní branou infekce jsou mikrotraumata kůže a sliznice. Inkubační doba je průměrně mezi 3 měsíci. Virové partikule putují do buněk bazální vrstvy metaplastického dlaždicobuněčného epitelu transformační zóny a v jejich jádrech se replikují. Jestliže nedochází k maligní transformaci, virová DNA není inkorporována do DNA hostitelské buňky, má podobu episomu. <sup>(14)</sup>

V důsledku působení přirozených imunitních mechanismů hostitele, dochází ke spontánnímu očištění infekce HPV v rozsahu 2 let. HPV infekce se projevuje manifestně v podobě genitálních bradavic, subklinicky bez makroskopického obrazu, a v 90 % probíhá latentně bez klinického korelátu. V tomto případě ji lze prokázat pouze molekulárně genetickou metodou. <sup>(15, 16)</sup>

HPV jsou tříděny z klinického hlediska do dvou skupin: na vysoce rizikové (high risk - HR HPV nejčastěji typ 16 a 18, dále se vyskytují 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51 - 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 a 82) a nízké rizikové (low risk - LR HPV sérotypy zejména 6 a 11, omezeně typy 40, 42 - 44, 54, 61, 72 a 81). Vysoce rizikové typy HPV perzistují a doprovází potenciální prekuzory CIN. <sup>(4, 14)</sup> V genomu HPV typu 16 hostitelské buňky jsou virové onkogeny E6 a E7 (viz. obr. 2), které interagují s tumor supresorovými geny (p<sup>53</sup>, pRb), důležitými pro regulaci buněčného cyklu. Tím dochází k přeměně genetického kódu a ke vzniku mutací. Pokud nedochází k vyléčení, vzniká v 90 % karcinom cervixu. Rozvoj nádorového procesu je v rozmezí 10 – 15 let. <sup>(1, 17)</sup>



**Obr. 2:** Schéma genomu HPV typu 16.

(upraveno dle 18, 19)

**Vysvětlivky:** E1 (časný gen pro replikaci), E2 (časný gen pro replikaci a transkripci), E4 (časný gen pro uvolnění viru), E5 (časný gen vyhýbající se imunitě), E6 (časný gen vázající se na p<sup>53</sup>), E7 (časný gen vázající se na p<sup>Rb</sup>), L1 (větší bílkovina kapsidy), L2 (menší bílkovina kapsidy).

LR HPV typy 6 a 11 jsou sdruženy s genitálními bradavicemi (condylomata accuminata). Jde o špičaté kondylomy, pokryté akantotickým dlaždicovým hyperkeratotickým a parakeratotickým epitelem. Podle histologického hlediska je rozeznáváme na papilární, ploché a invertované. Jsou velmi nápadné a makroskopicky rozpoznatelné při kolposkopii. Vyvolávají pouze přechodnou infekci, která podléhá apoptóze.

V buněčném preparátu se projevují ve formě koilocytů. Mají vybledlou cytoplasmu, pyknotické svráštělé jádro, někdy s eosinofilní inkluzí. Kolem jádra je perinukleární projasnění. <sup>(7)</sup> Vzhledem k tomu, že se tato práce nezabývá podkladem HPV infekce, je tato kapitola jen stručným souhrnem.

Mezi další rizikové faktory patří: převážně sexuální aktivita od raného věku, zvýšený počet sexuálních partnerů, kouření, genetika, imunodeficience, imunosuprese, infekce chlamydiemi a další STD, chronický zánět, obezita, časná gravidita, dlouhodobé užívání orálních kontraceptiv nebo IUD, vitamínové deficity a nízké sociálně ekonomické podmínky. <sup>(20)</sup>

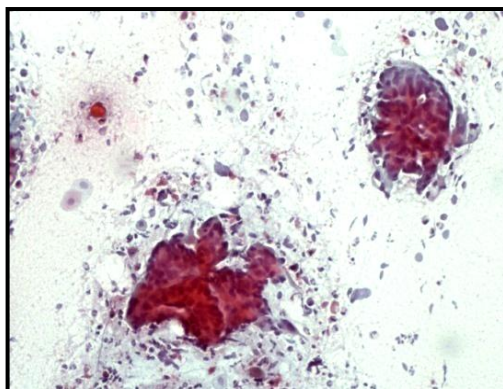


CIN 1 postihuje třetinu epitelu bazální vrstvy. Objevuje se ve zralém i nezralém dlaždicovém epitelu. Má přímý vztah s infekcí HPV. V průběhu 1 roku dochází ke spontánnímu vyhojení u 70 – 90 % lézí. Míra progresu u této dysplazie je 10 – 20 %. Je definována jadernou mnohotvárností a mitotickou aktivitou omezenou ve vrstvě bazální či parabazální s koilocytózou nebo bez ní. Odpovídá LG SIL (low grade intraepithelial lesion) v cytologickém obraze.

CIN 2 narušuje dvě třetiny epitelu děložního hrdla. Jde o intermediární lézi, která je doprovázena infekcí HPV typu 16. Hojí se ze 40 % spontánně a v 57 % je schopná progresu. Je vymezena mitotickou aktivitou ve střední třetině epitelu a jadernou pleomorfii. Odpovídá HG SIL (high grade intraepithelial lesion) v cytologii.

CIN 3 postihuje celý epitel. Vysoce progreduje s HR HPV typy 16 a 33. Míra progresu u tohoto typu je více než 70 %. Vykazuje četnou mitotickou aktivitu v dlaždicovém epitelu a jadernou variabilitu. Charakteristickým znakem jsou parabazální buňky, objevující se v převaze. U rozsáhlého stádia (carcinoma in situ – CIS), invaze nádorových buněk do bazální membrány chybí. Cytologicky odpovídá opět HG SIL, (viz. kap. 3.1.).<sup>(21)</sup>

Prekanceróza adenokarcinoma in situ (AIS) žlázového invazivního karcinomu tvoří pouze 2 % ze všech diagnostikovaných přednádorových změn. Z histologického hlediska buňky mají velké jádro s viditelnými jádérky a hrubým chromatinem. Vykazují četné mitózy. V těžším průběhu buňky ztrácí schopnost tvořit hlen. V cytoplasmě se nachází vakuoly a jemná granule, která se barví modročerveně, viz. obr. 4.<sup>(4, 6, 7)</sup>



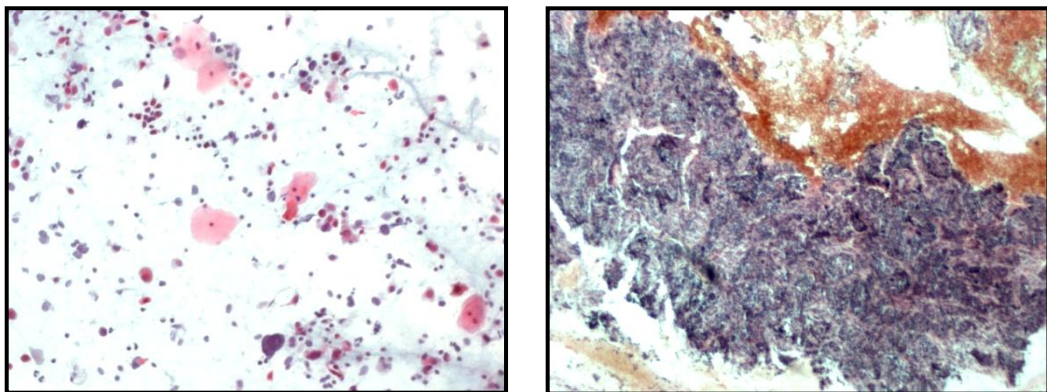
**Obr. 4:** Cytologická diagnostika pacientky s adenokarcinomem in situ (AIS). Barveno

*PAP testem. Zvětšeno 10x.*

### 2.2.2.1. Invazivní dlaždicový karcinom

Dlaždicový karcinom se vyvíjí z CIN 2 – 3 a CIS, tedy na podkladě metaplastického dlaždicového epitelu v transformační zóně. Patogenem je z 50 % HPV typ 16. Je schopen prorůstat do vazivových tkání, a metastazovat mizními cévami do lymfatických uzlin. Ze všech karcinomů cervixu představuje až 85 %.<sup>(23)</sup> Podle WHO klasifikace, se karcinom dělí: na velkobuněčný rohovatějící, velkobuněčný nebo malobuněčný nerohovatějící. U všech typů je přítomna buněčná drť (rozbité erythrocyty) a zánětlivý exsudát. Naopak chybí *Döderleinův laktobacil*, viz. obr. 5.

Velkobuněčný rohovatějící karcinom se liší od velmi častě se vyskytujícího nerohovatějícího karcinomu tím, že u něj dochází ke keratinizaci buněk a k tvorbě, tzv. perel. Buňky mají protáhlý tvar, hrubý chromatin, hyperchromatické jádro a eosinofilní cytoplasmu. U nerohovatějícího malobuněčného typu jsou přítomny vřetenovité stromální buňky s velkým hyperchromatickým jádrem obsahující výrazná jádérka.<sup>(16)</sup>



**Obr. 5:** Cytologická (barveno Pap testem, zvětšeno 10x) a histologická (barveno HE, zvětšeno 20x) diagnostika pacientky s invazivním dlaždicovým karcinomem.

#### **2.2.2.2. Adenokarcinom žlázového epitelu endocervixu**

Je méně častý vysoce agresivní maligní nádor, tvořený z abnormálního žlázového epitelu cervixu. Vzniká uvnitř endocervikálního kanálu. Představuje pouze 20 % ze všech cervikálních karcinomů. Vykazuje v 86 % zejména HPV typ 18. Jeho růst a tvar je variabilní (např. polypoidní nebo ulcerovaný). Šíří se lokálně, postihuje další sousední orgány. Nejčastěji je diagnostikován ve věku 45 – 65 let.

Klinická manifestace je rozdělena do dvou částí. V první části je výskyt lézí o velikosti nad 4 mm do hloubky. Projevuje se intermenstruálním a postmenopauzálním krvácením, hematurií a bolestí zad. V druhé části probíhá asymptomaticky v podobě mikroinvazivního karcinomu, který obsahuje časně stromální invaze, a je zde zvýšené riziko uzlinových metastáz. <sup>(16, 23)</sup>

#### **2.2.3. Klinické projevy prekanceróz a cervikálního karcinomu**

Prekancerózy dlaždicového epitelu se projevují většinou latentně, symptomaticky v podobě cervikálních lézí či kondylomat na zevním genitálu, nebo subklinicky ve formě plochých lézí, které nejsou vidět pouhým okem. Kondylomata jsou makroskopicky drobné, bělavé, bradavičnaté rekurentní papuly nebo květákovité léze, tzv. condylomata gigantea. <sup>(24, 25)</sup>

Mezi příznaky, které doprovází onemocnění děložního hrdla, jsou: bolesti v podbříšku nebo v kříži, spontánní nebo postkoitální krvácení a recidivující fluor. Potíže, které pacientky dále udávají, souvisejí s šířením karcinomu v pánvi, např. urémie, uroinfekce, dysurie, hematurie, krvácení z konečníku, bolestivé defekace, hepatomegalie, zvětšené tříselné uzliny a otoky dolních končetin. <sup>(20)</sup>

## 2.3. Diagnostika prekanceróz a karcinomu cervixu

Důležitou roli k určení diagnostiky hraje rodinná a osobní anamnéza. Diagnostické metody se rozdělují na prebioptické: kolposkopie a onkologická cytologie a bioptické vyšetření cervixu s popsáním typickým nálezem. <sup>(26)</sup> Mezi doporučenou metodiku zahrnujeme detekci HPV vysoce rizikových typů 16 a 18 pomocí PCR. V nejasných případech CIN se používají imunohistochemické metody pro stanovení protilátek proti proteinu Ki-67 (marker buněčné proliferace) a proteinu p<sup>16</sup> (inhibitor cyklin dependentní kinázy), který je pozitivní v buňkách infikovaných HR HPV. <sup>(16)</sup>

U žen s karcinomem děložního hrdla je třeba provést rektální vyšetření. Jako další pomocná vyšetření slouží: biochemie (vyšetření moče, jaterní, hormonální, genetická stanovení nádorových markerů a proteinů akutní fáze zánětu) a hematologie (koagulace, sedimentace erytrocytů). Stanovení titru protilátek není příliš vhodný, v negativním případě onemocnění nelze vyloučit. <sup>(4, 25)</sup>

### 2.3.1. Kolposkopie

Patří mezi prebioptické metody využívané při pravidelných gynekologických prohlídkách. Jde o diagnostickou techniku, založenou na přímém zobrazení za pomoci binokulárního opticky zvětšovacího systému. Slouží ke sledování vývoje či hojení, a posouzení rozsahu poškození dlaždicobuněčných a diagnosticky obtížných žlázových lézí, na základě viditelných barevných změn za použití kolposkopu. Pod kolposkopickou kontrolou se také provádí aspekce cervixu, cytologický buněčný odběr a punch biopsie, za použití zrcadel - *per speculam* (Scherbackovo, Cuzkovo, Trélatovo nebo Koganovo). <sup>(16)</sup>

Kolposkopie je rozdělena z funkčního hlediska na nativní a rozšířenou. Nativní kolposkopie pozoruje oblast bez aplikace roztoku, nebo užívá k setření tampón, navlhčený ve fyziologickém roztoku. <sup>(27)</sup> Provádí se před vyšetřením bimanuálním, aby nedošlo ke krvácení nebo poruše charakteru sekretu. Hodnotí tvar cervixu (kónický u nerodiček, cylindrický u rodících žen), barvu a charakter sekretu, a různé další defekty stěny poševní a útvary vystupující z hrdla (např. polypy nebo myomy). <sup>(1)</sup>

Rozšířená kolposkopie slouží k průkazu lézí. Užívá optických zvýrazňovačů. Používá: NaCl, Lugolův roztok (v jódnegativním případě má patologický epitel žlutobílou barvu, z důvodu produkce velmi malého množství glykogenu), 5% roztok kyseliny octové (v případě pozitivity se objevují zrníčka ve formě hroznů bílé barvy).

Do normálních kolposkopických nálezů patří: originální dlaždicový epitel, ektopie (cylindrický epitel cervixu) a transformační zóna s rozeznatelným stupněm vyžrávání dlaždicové metaplazie.

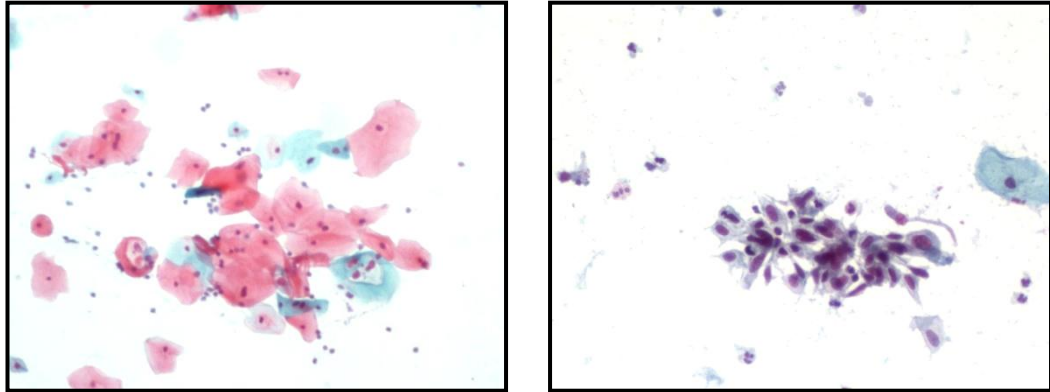
Kolposkopická diagnostika rozděluje abnormální nálezy na cévní znaky - jemná až hrubá mozaika, puntíčkování, atypické cévy, a epiteliální znaky - bílý epitel, jemná nebo tlustá keratóza (leukoplakie) a ulcerace. Mohou se objevit další různé patologické nálezy, např. kondylomata, eroze, zánět, atrofie, polyp a další. Charakteristickými znaky invazivního karcinomu je převážně exofytický květákovitý růst, nebo endofytický kráterovitý defekt, spontánní krvácení a nekróza.<sup>(2)</sup>

Expertní onkogynekologické transvaginální a transrektální ultrazvukové vyšetření se využívá v případech při podezření na invazivní karcinom. Z hlediska diagnózy je nezbytná korelace s cytologií a histologií. Detekované léze musí být ošetřeny a sledovány z důvodu vyloučení perzistence.<sup>(11, 16)</sup>

### **2.3.2. Cytologie**

V současné době jde o jedinou screeningovou metodu pro prevenci, včasné odhalení a léčení nádorového bujení děložního hrdla. Podle charakteru problematiky je členěna na onkologickou a funkční. V této práci se zabýváme onkologickou cytologií, která sleduje a rozpoznává morfologické odchylky buněk. Jako základní polychromatické barvení pro diagnostiku prekancerózních forem a KDH se užívá Papanicolaoua metoda, viz. obr. 6.





**Obr. 6:** Cytologická diagnostika (vlevo) pacientka s LSIL a koilocyty, (vpravo) pacientka s HSIL. Barveno Pap testem, zvětšeno 10x.

Údaj o abnormalitě dlaždicových buněk děložního hrdla dává dohromady cennou informaci o stavu pacientky ve vztahu k léčbě. Abnormalita buněk je hodnocena klasifikací dle Bethesda, (viz. kap. 3.1.).

Papanicolaou metoda zahrnuje Harrisův hematoxylin pro barvení jader, a cytoplasmu Papanicolaou EA 50. EA 50 rozlišuje cytoplasmu dle stupně zralosti: na cyanofilní a eosinofilní. Harrisův hematoxylin nepatrně barví i cytoplasmu, což je důležité. Jedinou výtkou u tohoto barviva je, že ojediněle může vykazovat přebarvená jádra.

Pro cytologické vyšetření je podmínkou správný odběr buněk sterilním kartáčkem (brushem), vatovou tyčinkou či Ayerovou špachtlí z podezřelých lézí. V praxi je buněčný odběr zpracován dvěma způsoby. Klasicky setřením na podložní sklo (konvenční cytologie) nebo liquid based cytologií (LBC), kde je kartáček vyprán v tekutém médiu (ThinPrep Pap test). LBC umožňuje stanovit z jednoho odběru více vyšetření, např. HPV typizaci. Z méně přístupných míst se provede aspirace nebo punkce. Vzhled cytologických komponent závisí na okamžité fixaci nátěru 96 % alkoholem nebo cytofixativem, a na barvicí technice.<sup>(28)</sup>

Cytodiagnostika vychází z hodnocení celého cytologického preparátu. Mezi typické znaky nádorové buňky, patří: změna velikosti buňky (anizocytóza), variabilita tvaru a velikosti jádra (polymorfonukleóza, makronukleóza, anizonukleóza) a změna barvitelnosti jádra (hyperchromázie nebo hypochromázie či anizochromázie). Mohou se vyskytovat abnormální změny jaderné membrány, chromatinu, jadérka a cytoplasmy. Určuje se jaderně-cytoplasmatický poměr, kdy u nádorových buněk zaujímá převážně poměr jádra oproti cytoplasmě. Sleduje se i přítomnost mitózy. <sup>(4)</sup> Pro potvrzení diagnózy je nutné provést biopsii děložního hrdla.

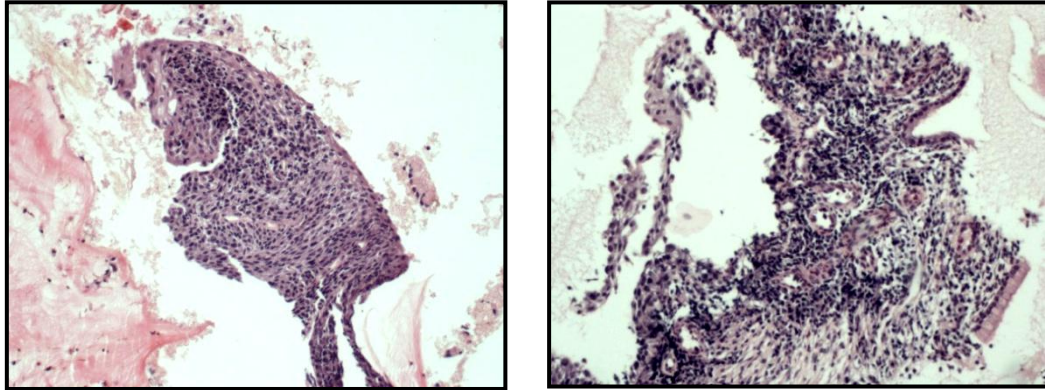
### **2.3.3. Biopsie**

Je zlatým standardem pro určení definitivní diagnózy lézí LG SIL, HG SIL, tedy dysplazií CIN 1 – 3, CIS a dlaždicobuněčného karcinomu. Dále žlázových lézí CGIN, AIS a invazivního adenokarcinomu, a jejich terapie. <sup>(11)</sup>

K metodám, při kterých dochází k odstranění patologické tkáně, patří: konizace, cylindrická disekce, cold knife excize, endocervikální kyretáž a punch biopsie pro malé vzorky. Zhoubný nádor děložního hrdla se klasifikuje podle WHO, TNM a FIGO. <sup>(29)</sup>

#### **2.3.3.1. Základní histologické vyšetření**

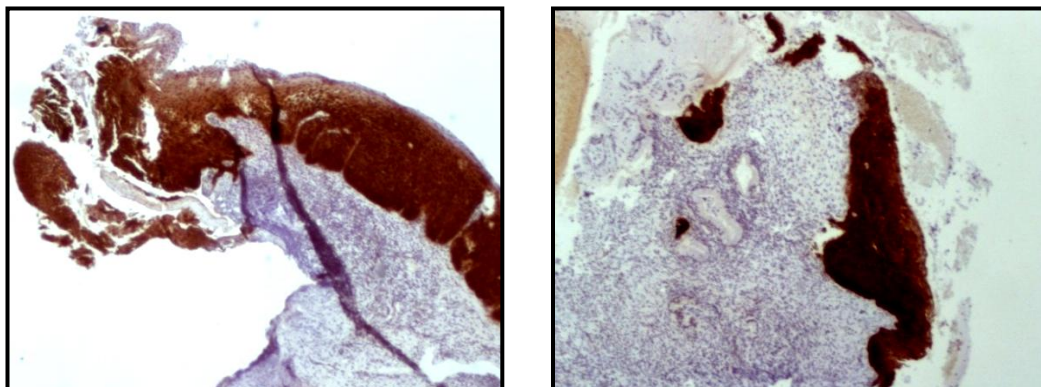
Základním vyšetřením v histologii je tkáň z cervixu fixovaná 10% formalínem, která se po zalití do parafínu krájí na tenké řezy a barví základní metodou hematoxylin – eosin (HE) nebo speciálním barvením, např. alciánovou modří či PAS reakcí pro průkaz glykogenu. Z barvení HE se hodnotí abnormalita buněk (koilocyty, dyskeratocyty), a hlavně poměr poškození dlaždicového epitelu, tedy stupeň dysplazie, viz. obr. 7.



**Obr. 7:** Histologická diagnostika (zleva) pacientka s CIN 2 a pacientka s CIN 3.

### 2.3.3.2. Imunohistochemické vyšetření

Tato práce se také zabývá průkazem onkoproteinu  $p^{16}$ , která je vhodnou doplňující metodou pro určení diagnózy u klinicky složitých případů při diagnostice prekanceróz nebo KDH. Jde o produkt tumor-supresorového genu. Účinkem virových genů E6 a E7 dochází k zástavě replikace buněk. V tomto případě vznikají dysplastické buňky, které vylučují tento protein  $p^{16}$  v souvislosti s HR HPV infekcí. <sup>(30)</sup> Imunohistochemický průkaz nevyžaduje mnoho materiálu. Slouží k posouzení morfologického obrazu a lokalizaci  $p^{16}$  na intracelulární úrovni. V pozitivním případě se  $p^{16}$  prokáže hnědým zbarvením v atypickém epitelu, viz. obr. 8.



**Obr. 8:** Mikroskopické hodnocení positivity  $p^{16}$  ve vzorcích atypického dlaždicového epitelu cervixu. Zleva: pacientka s CIN II a s CIN III.

V cytologických nátěrech se může obarvit i nezralá metaplazie, proto tato metoda je většinou užívána pouze pro potvrzení histologických diagnóz u nejasných lézí. <sup>(5)</sup> K průkazu p<sup>16</sup> jsem využila diagnostického testu CINTec p<sup>16</sup> na přístroji VENTANA BenchmarkUltra. Tento test představuje vysokou senzitivitu a specifitu pro detekci cervikálních neoplazií. Metoda je založena na průkazu onkoproteinu E6, který je exprimován v infikovaných keratinocytech. <sup>(31)</sup>

### 2.3.4. HPV typizace

Za vhodné doplňující vyšetření se považuje HPV typizace. Detekce lidských papilomavirů se provádí u žen starších 30 let s cytologickým nálezem. Prevalence této HPV infekce stoupá v korelaci s abnormálními Pap stěry (ASC-US 56 %, LG SIL 78 % a HG SIL 80 %). <sup>(32)</sup> Jako screeningová metoda se použít nedá, protože je velice nákladná. HPV typizace je doporučena pro sledování nerozhodných cytologických stěrů (ASC-US) a chirurgicky odstraněných lézí na cervixu. LR HPV typy 6 a 11 nejsou klinicky přínosné. Metoda není vhodná k detekci typů HPV u mladých dívek, u stavů s imunosupresí nebo po hysterektomii. <sup>(2, 33)</sup>

Odběr virové DNA z epitelových buněk cervixu, se provádí brush technikou z proximální oblasti transformační zóny. Buněčný materiál s kartáčkem je zalomen nebo vyprán v transportním médiu (COBAS, LBC) a zaslán spolu s řádně vyplněnou průvodkou do laboratoře.

Existuje několik technik ke stanovení typů HPV, např. in situ hybridizace RNA/DNA s amplifikací (HC II, hybrid capture), a velmi spolehlivá polymerázová řetězová reakce (PCR). Pro detekci rizikových typů HR HPV 16 a 18 se užívá nejčastěji metoda COBAS 4800 HPV test od společnosti Roche, AMPLICOR HPV, INNO-LiPA, MULTIGENE, MULTISENS a APTIMA HPV Assay (pro diagnostiku m-RNA).

Doplňené vyšetření o HPV typizaci upřesní výsledek cytologického screeningového vyšetření. Negativní prediktivní hodnota v tomto případě u této kombinace je 99 %. <sup>(11, 16)</sup>

## 2.4. Léčba a prevence prekanceróz a karcinomu cervixu

Léčba cervikálních lézí závisí na diagnóze. U anatomického defektu se provádí plastická chirurgická úprava děložního hrdla. Pokud je přítomna hyperkeratóza či parakeratóza s atrofií u žen v menopauze, podává se hormonální substituce. Na genitální bradavice se aplikují lokálně antimykotika: 25% Podophylin (účinná látka z pryskyřice, antimitotický účinek), 50% trichloroctová kyselina, cytostatický krém 5 – fluorouracilu, cidofir nebo interferon –  $\alpha$ .<sup>(25, 34)</sup>

Léčebné metody se rozdělují na výhodnější excizní pro získání tkáně, a destrukční. Příkladem excizní metody je punch biopsie, konizace nebo kyretáž. Tyto zákroky slouží k získání konizátu za pomoci bioptických kleští nebo tkáňových ložisek na cervixu za pomoci kyrety. Konizace je prováděna skalpelem, nůžkami nebo vysokofrekvenční elektrickou kličkou, jehlou či laserem. Příkladem destrukčních metod je: elektrokoagulace, kryoterapie (za užití tekutého dusíku) nebo laserová vaporizace (pomocí CO<sub>2</sub>). Tyto metody jsou utlačené do ústraní. Indikují se spíše k ošetření LG lézí.<sup>(16)</sup>

K hodnocení velikosti, tvaru, morfologie a deformace dělohy a hrdla slouží hysteroskopie.<sup>(35)</sup> U těžkých stádií, pro odstranění celé transformační zóny u mikroinvazivních karcinomů, se jako léčba využívá chirurgická nebo radikální hysterektomie. Poslední volbou je chemoterapie (cisplatina, karboplatina, vincristin, kyselina listová a další) nebo radioterapie. Pro recidivující nálezy se užívá interferon a retinoidy.<sup>(20)</sup>

Po skončení léčby je nutné komplexní gynekologické vyšetření. Zahrnuje kolposkopii, cytologii, HPV typizaci, sonografii malé pánve, jater, ledvin, hematologické a biochemické vyšetření, mammografii, CT, RTG srdce a plic. Kontrola je nutná v intervalu 6 – 24 měsíců. V tomto období může totiž docházet k návratu prekancerózních forem.<sup>(17)</sup>

U onemocnění, které je zachyceno včas, je prognóza výrazně lepší, než u pokročilých nádorů. Nádor je rozdělen do několika stádií: 1. – je omezen pouze na děložní hrdlo, 2. – přechází do vazivové tkáně, 3. – přechází do vazivové tkáně, ale neproniká do okolních orgánů (konečník, močový měchýř), a 4. – proniká do okolních orgánů a metastazuje. Přežití v rámci 5 let je vztaženo v % zastoupení, (viz. tab. 1).

**Tab. 1: Prognóza cervikálního karcinomu v procentuálním zastoupení.** (upraveno dle 34)

STÁDIUM	ZASTOUPENÍ V %
1.	> 90
2.	60 – 80
3.	50
4.	< 30

Prevence se rozděluje na primární, sekundární, terciární a kvartérní. Do primární prevence patří: vakcinace proti HPV, ochrana rizikového sexuálního chování, profylaktické chirurgické zákroky a zdravý životní styl. Slouží ke snížení výskytu choroby a eliminaci rizikových faktorů (přenos HPV infekce) na vznik malignit. Sekundární prevencí je cytologický screening. Využívá se k zachycení prekanceróz během gynekologických preventivních prohlídek. Zlepšuje léčbu onemocnění. Terciární prevence časně zachycuje recidivu a zahájení léčby cervikálního karcinomu. Prevence kvartérní předchází důsledkům progresu nevléčitelných chorob. <sup>(17)</sup>

Prevence proti lidským papilomavirům typu 6, 11, 16 a 18 je významným přínosem ve zdravotnictví za úplné úhrady ze zdravotního pojištění pro dívky ve věku 13 let. HPV vakcíny jsou téměř 100 % účinné v prevenci prekancerózních lézí cervixu, genitálních bradavic a cervikálního karcinomu, a to nejlépe u dívek či žen, které jsou před nebo během očkování HPV DNA negativní. Nevýhodami těchto vakcín je, že nepůsobí proti všem typům HPV a jejich doba účinnosti dosud není známa. <sup>(11, 14, 16)</sup>

Mezi nejčastější očkovací vakcínu patří Cervarix. Je bivalentní vakcína proti HR HPV typům 16 a 18, pro dívky ve věku 10 – 25 let. Obsahuje látku ASO4, která je kombinována s  $\text{Al}(\text{OH})_3$  a další detoxikační bakteriální látku, monofosforyl lipid A (MPL). Detoxikační složka spouští uvolňování prozánětlivých cytokinů z APC prostřednictvím vazby na receptory TLR-4. Výsledkem je výrazná humorální a buněčná odpověď.<sup>(36)</sup>

Gardasil 9 je vakcína proti 9 typům HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 a 58), a Silgard je kvadrivalentní vakcína proti HR (16, 18) a LR (6, 11) HPV typům, pro dívky mezi 9. – 26. rokem života a chlapce ve věku 9 – 15 let. Využívají se k prevenci dalších premaligních genitálních lézí (vulvárních, vaginálních a análních).<sup>(34, 37)</sup>

Základem všech vakcín jsou viru podobné částice (virus like particles - VLPs), tvořené hlavním kapsidovým proteinem L1, který je nositelem imunitních epitopů. L1 protein (v případě Gardasil 9 a Silgard) je vyroben z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* rekombinantní DNA technologií, adsorbovaný na amorfním aluminium-hydroxyfosfát-sulfátu. Tyto částice (VLPs) jsou neinfekční, neobsahují virovou DNA.

Vakcíny nejsou léčebné. Aplikují se intramuskulárně do deltového svalu horní paže, a to ve třech dávkách. Jsou dobře tolerovány s minimálními nežádoucími účinky: bolest hlavy, GIT příznaky, svalové bolesti a otoky, zarudnutí, svědění, vyrážka a kopřivka v místě aplikace. Důraz na opatrnost se klade u pacientů s poruchou koagulace. Tyto vakcíny nesmí být podány u těhotných, u pacientů s přecitlivělostí na jakoukoli obsahovou složku, a u stavů křečových, kolapsových nebo hyperpyretických.<sup>(23, 36)</sup>

### 3. PRAKTICKÁ ČÁST

#### 3.1. Klasifikace podle Bethesda 2014

Organizovaný screening v ČR byl zahájen v roce 2008 a je využíván celosvětově pro včasnou detekci a léčbu prekursorů karcinomu cervixu. <sup>(38)</sup> V rozvinutých zemích prokazuje sníženou incidenci a mortalitu na cervikální karcinom. Preventivní cytologie se provádí u žen nad 15 let v průběhu každého roku. Každý buněčný preparát je komplexně barven metodou dle Papanicolaou, (viz. kap. 2.3.2.).

Sleduje se kvalita nátěru (odebrané buňky z exocervixu, endocervixu a TZ), hormonální stav pacientky, dlaždicové a žlázné buňky, přítomnost vaginální a endocervikální flóry - *Döderleinův laktobacil*, *Trichomonas urogenitalis*, *Gardnerella vaginalis*, aktinomyces, a další mikroorganismy, pokud jsou v preparátu přítomny: kvasinky, *Trichomonas vaginalis*, virové infekce (HSV, CMV), bakteriální vaginóza nebo *Chlamydia trachomatis*. Dále se sledují nenádorové změny (dlaždicová metaplazie, hyperkeratóza, parakeratóza, tubární metaplazie, atrofie, změny spojené s těhotenstvím, žlázné buňky po hysterektomii, endometriální buňky u žen nad 40 let) a reaktivní změny (spojené se zánětem, po radiaci nebo při IUD). <sup>(16, 39)</sup> Souhrnný závěr poukazuje na doporučené postupy o budoucím zákroku u pacientky a její případné léčbě. Pro účely této práce byly hodnoceny již hotové diagnostické preparáty pacientek.



## **Klasifikace abnormálních dlaždicových buněk**

Dlaždicové buňky se hodnotí typicky (NILM – negativita pro lézi či malignitu) nebo atypicky (ASC-US, ASC-H, LG SIL, HG SIL a invazivní dlaždicový karcinom), jsou definovány:

- **ASC-US** – atypické dlaždicové buňky nejasného původu (atypical squamous cells of undetermined significance). Jde o případ neurčených buněčných atypií buněk intermediálních a povrchových. Má charakter perzistence nebo regrese. Nesplňuje kritéria LG SIL a vylučuje přítomnost HG SIL léze. Může zahrnovat dysplastické změny, a také reaktivní změny. Představuje až 90 % všech ASC nálezů. Tento typ vyžaduje screeningovou kontrolu za 3 - 6 měsíců a doplnění o HPV detekci u pacientek nad 30 let.
- **ASC-H** – atypie nezralých bazálních/parabazálních buněk, které nevylučují přítomnost HG SIL lézí (atypical squamous cells can not exclude HG SIL). Nemá charakter reaktivních změn. Tato forma představuje až 5 % všech ASC nálezů. Vyžaduje kontrolu po 3 měsících, provedení expertní kolposkopie a bioptický odběr.
- **LG SIL** – nízký stupeň dlaždicové intraepiteliální léze (low grade squamous intraepithelial lesion). Koreluje s kolposkopií, histologicky odpovídá mírné dysplazii (CIN 1) a HPV, (viz. kap. 2.2.2.).
- **HG SIL** – vysoký stupeň dlaždicové intraepiteliální léze (high grade intraepithelial lesion). Opět koreluje s kolposkopickým nálezem a histologicky odpovídá střední až těžké dysplazii (CIN 2, 3) nebo neinvazivnímu karcinomu (CIS). V tomto případě je nutno provést bioptické ověření a expertní onkogynekologické ultrazvukové vyšetření.
- **Invazivní dlaždicový karcinom** – (carcinoma spinocelulare), je důvodem k okamžitému prebioptickému a bioptickému vyšetření, (viz. kap. 2.2.2.1).

## **Klasifikace abnormálních žlázových buněk**

Žlázové buňky jsou interpretovány specificky podle původu na endocervikální, endometriální nebo obecně žlázové. Negativní nález je hodnocen opět jako NILM. Atypické buňky (AGC/AIS) představují pouze < 2,5 % všech diagnóz. Řadí se do podtypů (AGC-NOS a AGC-NEO), které jsou popisovány:

- **AGUS** – jde o atypie žlázových buněk nejasného významu (atypical glandular cells of undetermined significance). V nátěru se jeví jako holá jádra, nebo jako shluky jader.

- **AGC-NOS** – nespecifická atypie žlázových buněk (atypical glandular cells not otherwise specified). Buňky tvoří shluky vedle sebe a jejich jádra se překrývají. Příčinou jsou opakované reaktivní změny. Až u 41 % případů se může diagnostikovat AIS. Vhodná je kontrola po 3 měsících, případná léčba zánětu, expertní kolpo a doplnění HPV typizace.

- **AGC-NEO** – atypie žlázových buněk neoplastického původu (atypical glandular cells favor neoplastic). Buňky jsou uspořádány ve formě palisád nebo rozet. Pravděpodobná diagnóza AIS je u 27 – 96 % případů. Vyžaduje expertní kolpo a biopsii.

- **AIS** – neinvazivní adenokarcinoma in situ, endocervikální nebo endometriální, (viz. kap. 2.2.2).

- **Invazivní adenokarcinom** – je třeba provést okamžitou biopsii i kolposkopií.

Pro přesnou diagnózu se vyžadují klinické údaje na průvodce. Ženy nebo dívky, které se preventivně neúčastní screeningového vyšetření, jsou vystavené vysokému riziku vývoje cervikálního karcinomu. <sup>(6, 11, 40)</sup>

## 3.2. Přehled barvicích metod v ČR a zahraničí

V ČR a zahraničí se výjimečně využívají modifikované metody, které se odvíjí od Papanicolaoua barvení. Patří sem metoda podle Szepanika, Pekárka nebo Shorra.

### Metoda podle Szepanika (Cytocolor)

Spočívá v odlišnosti barviv za využití modifikovaného hematoxylinu a polychromu, 80 % 2 - propanolu, xylenu, tekoucí a destilované vody. Jádra buněk se barví modrofialově, cytoplazma bazofilní – modrozeleně a eosinofilní – růžově.

### Metoda podle Pekárka

K barvení buněčných jader se používá Mayerův železitý hematoxylin. Technika je založena na alkoholové řadě, opláchnutí ve vodě destilované i tekoucí. Využívá kyselý fuchsin v 96 % alkoholu a 1 % kyselinu fosfomolybdenovou. Polychrom k barvení cytoplasmy je složen ze směsi: 2 % světlé zeleně v 96 % alkoholu a 1 % žlutého eosinu v 96 % alkoholu v poměru 2:1. Metoda je zakončena opláchnutím v 96 % alkoholu a xylenu. Jádra buněk se barví modrofialově, cytoplazma bazofilní – modrozeleně a eosinofilní – višňově červeně.

### Metoda podle Shorra

Je zaměřena zejména na diagnostiku hormonálních změn poševního epitelu. Obsahuje Shorr barvivo „SIII“, složené ze směsi: 50 % alkoholu, vodného roztoku Biebrichovy červeně, oranže G, zeleně FCF, kyseliny fosfowolframové a fosfomolybdenové a ledové kyseliny octové. Preparáty se oplachují v alkoholu, a xylenu. Jádra buněk se barví červenohnědě, cytoplazma bazofilní – modrozeleně a eosinofilní – jasně červeně. <sup>(41)</sup>

### 3.3. Stanovení a hodnocení prekanceróz a KDH ve vzorku

Úkolem cytologického vyšetření je odhalit morfologické změny v jádře a cytoplasmě, a tím detekovat jednotlivé typy lézí nebo karcinom cervixu. Pro správnou aplikaci metodiky dle Papanicolaou je třeba celkového dodržování laboratorního postupu od buněčného odběru až po zamontování preparátu.

Mezi hlavní preanalytické faktory, které ovlivňují proces zpracování, jsou: buněčné odběry z nesprávných míst, krvavé husté nátěry, špatně fixované nátěry (nezaschlé nebo naopak suché - tyto preparáty nelze interpretovat, ovlivňují totiž barevnou reakci), nepopsané podložní sklo nebo nesprávně vyplněná průvodka.

#### 3.3.1. Zpracování cerviko-vaginálního stěru

##### 3.3.1.1. Pomůcky a přístroje

Ochranné rukavice, poševní zrcadla, Ayerova dřevěná špachtle, sterilní kartáčky (brushe), malé a velké vatové tyčinky, žádanky, podložní skla zabroušená nebo skla předtíštěná s QR – kódem (připravená v laboratoři tiskárnou Signature), kyvety na fixační roztok a transportní krabice nebo pouzdra na skla.

##### 3.3.1.2. Chemikálie na fixaci buněk

Fixační sprej (180 ml, alkohol s metanolem, polyetylenglykol a propanol) nebo 96 % alkohol.



**Obr. 9:** Pomůcky a chemikálie pro zpracování cerviko - vaginálního stěru.

### 3.3.1.3. Odběr a příprava buněčného materiálu

Na gynekologickém oddělení se odběr provádí mezi 12. – 14. dnem děložního cyklu u žen, i bez klinických obtíží. Před provedením stěru je vhodná pohlavní abstinence 48 hod. Pro zajištění dostatečného odběru z transformační zóny za pomoci zrcadel, je třeba nejprve odstranit hlen z exocervixu navlhčeným tampónem. Poté se setře obsah z podezřelých lézí několikanásobným pootočením o 360 ° z exocervixu Ayerovou dřevěnou špachtlí, a z endocervixu sterilním kartáčkem (brushem) na podložní sklo.

Čerstvé nátěry se do 30 s fixují fixačním sprejem nebo ve fixační lázni 96 % alkoholem. Fixace zabraňuje vyschnutí preparátu, zachovává morfologickou strukturu buňky a brání její případné lýze. Po fixaci, se podložní sklo s nátěrem nechá zaschnout a transportuje se v pouzdře nebo v krabici spolu s řádně vyplněnou žádankou v boxu do akreditované cytologické laboratoře.

Kromě klasického odběru na podložní sklo, lze využít LBC (liquid based cytologii).<sup>(42)</sup> V tomto případě se odběr buněk provádí opět pomocí kartáčku ve tvaru metličky, který je vyprán v transportní nádobě ThinPrep Pap test s tekutým médiem. Médium PreservCyt slouží jako fixativum buněk. Obsahuje mukolytické a hemolytické agens pro rozpouštění hlenu. Díky tomu je pozadí na skle čistší. Tato metoda je plně automatizovaná. Pracuje na principu sedimentace buněk za pomoci filtru s jemnými póry, při kterém se odstraňuje zánětlivý exsudát a příměs krve. Buňky jsou pak rozprostřeny do tenké vrstvy s buněčným terčíkem o průměru 20 mm na podložním skle. Ze zbytkového buněčného materiálu lze stanovit HPV testaci, imunocytochemii nebo PCR detekci *Chlamydia trachomatis*.<sup>(11, 28)</sup> Metoda je velmi nákladná. Nebyla u ní prokázána vyšší senzitivita, tím se z těchto důvodů v naší laboratoři zatím od ní upouští.

Žádanka musí být kompletně vyplněna: jménem, rodným číslem, kódem zdravotní pojišťovny, označením skla, klinickou diagnózou, datem odběru a poslední menstruace, typem hormonální antikoncepce, případnou aplikací IUD, graviditou, laktací, záznamem předchozí léčby, lokalizací a popisem z místa stěru, přítomností genitálních kondylomat, typem očkování proti HPV, razítkem oddělení a podpisem lékaře.

### **3.3.2. Metoda průkazu prekanceróz a cervikálního karcinomu**

V ČR a ve většině zahraničí pro cytodiagnostiku prekancerózních forem a karcinomu děložního hrdla z gynekologických nátěrů se využívá Pap metoda, kterou založil americký cytolog řeckého původu George Nicholas Papanicolaou v roce 1947. (43, 44) Jde o polychromní barvení, které vyžaduje v průběhu procesu fixáž. K barvení jader se používá Harrisův hematoxylin a k barvení cytoplasmy Papanicolaou EA 50. Toto barvení sleduje vyžívání dlaždicového epitelu, takže slouží i pro sledování funkčních změn cervixu.

#### **3.3.2.1. Pomůcky a přístroje**

Stojan na podložní skla, lineární barvicí automat COT 20.400, umělohmotné kyvety (250 ml) průtokové i neprůtokové, montovací přístroj Tissue-Tek Film Coverslipper, krycí folie a světelný mikroskop.

#### **3.3.2.2. Barvicí a zásobní roztoky**

Harrisův hematoxylin, Papanicolaou EA 50, 96 % alkohol, xylen, destilovaná a tekoucí voda. Barvicí roztoky jsou dodány od firmy Bamed.

Chemikálie v barvicích roztocích: hematoxylin, síran hlinito – amonný dodekahydrát  $\text{NH}_4\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ , jodičnan sodný, kyselina octová, etanol, světlá zeleň, eosin Y, kyselina fosfowolframová, metanol a destilovaná voda.

### **3.3.3. Postup a hodnocení prekanceróz a cervikálního karcinomu**

Fixované zaschlé buněčné stěry na podložním skle získané z cervixu se barví standardní polychromatickou Papanicolaouovou metodou (viz. tab. 2). Doba barvení v jednotlivých lázních je v rámci 2 min. Ačkoli je v poslední lázni 96 % alkohol, je třeba cervikální nátěry nechat zaschnout. Poté se montují v montovacím přístroji do xyleny a pokryjí krycí fólií.

**Tab. 2: Papanicolaoua metoda pro barvení cerviko-vaginálních stěrů.**

<b>Lázeň č.</b>	<b>Barvicí a zásobní roztoky</b>
1.	96 % alkohol
2.	96 % alkohol
3.	96 % alkohol
4.	96 % alkohol
5.	96 % alkohol
6.	96 % alkohol + destilovaná voda (2:1)
7.	96 % alkohol + destilovaná voda (1:1)
8.	destilovaná voda
9.	destilovaná voda
10.	Harrisův hematoxylin
11.	tekoucí voda
12.	tekoucí voda
13.	96 % alkohol
14.	96 % alkohol
15.	Papanicolaou EA 50
16.	96 % alkohol
17.	96 % alkohol
18.	96 % alkohol
19.	96 % alkohol

Barvicí technika cerviko-vaginálních stěrů byla pro tyto účely stanovena v AeskuLab Patologie, Laboratoř Praha.

Nátěry se hodnotí klasifikací dle Bethesda 2014, (viz. kap. 3.1.). Prohlížíme meandrovitým způsobem pod světelným mikroskopem při zvětšení 200 – 800x.

Výsledek: buněčná jádra jsou barvena modře až tmavě fialově, cytoplasma cyanofilní modrozeleně (u nezralých buněk) a eosinofilní růžovočerveně (u zralých buněk).

### **3.4. Stanovení a hodnocení průkazu p<sup>16</sup> v bioptickém vzorku**

Úkolem imunohistochemického vyšetření je potvrdit diagnózu prekanceróz ověřením positivity onkoproteinu p<sup>16</sup> na parafinových tkáňových řezech. Metoda je založena na technice, která využívá myší monoklonální protilátku anti-p16<sup>INK4a</sup> (primární) pro lokalizaci a navázání příslušného antigenu v tkáni, a sekundární značenou protilátku, proti Fc fragmentu primární protilátky. Vizualizace komplexu probíhá za pomoci substrátu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3,3'-diaminobenzidinu tetrahydrochloridu (DAB).

Pro správnou aplikaci imunohistochemické metodiky je třeba celkového dodržování laboratorního postupu. Mezi faktory, které ovlivňují průběh imunohistochemické reakce, jsou: fixace tkáně, doba sušení a inkubace řezů s protilátkou. Vizualizace komplexu antigenu s protilátkou prostřednictvím chromogenu je podmíněna vhodnou optimální teplotou, pH, iontovou silou roztoku, poměrem enzym x substrát a nepřítomností inhibitorů.

#### **3.4.1. Zpracování bioptické tkáně**

##### **3.4.1.1. Pomůcky a přístroje**

Mikrotom, speciální potahovaná silanizovaná podložní skla, vodní lázeň, vyhřívaná ploténka a termostat.

##### **3.4.1.2. Chemikálie**

Destilovaná voda.



### **3.4.1.3. Odběr a příprava bioptického vzorku**

Odběr probíhá na gynekologickém oddělení za kolposkopického vyšetření technikou punch biopsie, konizace nebo kyretáže. Bioptická tkáň – konus cervixu se odebírá kleštěmi o velikosti 20 x 15 x 12 mm a částky tkání o velikosti 6 x 4 x 3 mm za pomoci úzké ostré kyrety.

Pro zachování morfologické struktury, je tkáň vložena do odběrové nádoby a fixována neutrálním formalínem. Bioptický materiál se transportuje v transportních boxech do akreditované histologické laboratoře, kde dochází k jeho prosycení a zalití do parafínu. V imunohistochemické laboratoři se tkáň v parafínových blocích krájí na mikrotomu na řezy o síle 3  $\mu\text{m}$  na speciální potahovaná silanizovaná podložní skla. Nakrájené řezy se suší 10 min na vyhřívané ploténce, poté se vloží do termostatu na 60 min při 58 °C.

## **3.4.2. Metoda průkazu p<sup>16</sup>**

### **3.4.2.1. Pomůcky a přístroje**

Přístroj VENTANA BenchmarkUltra, montovací přístroj Tissue-Tek Film Coverslipper, krycí folie a světelný mikroskop.

### **3.4.2.2. Zásobní roztoky**

Monoklonální Ab (anti p16<sup>INK4a</sup>, klon E6H4); detekční kit: sekundární Ab značené biotinem (HRP multimer), substráty H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB); pufrý na kondicionování buněk, tzv. pretreatment (CC1), pufr pro odstranění parafínu z řezu (EZ Prep), olej používaný k zabránění vypařování roztoků (ULTRA LCS – liquid coverslip), reaction buffer (TRIS pufr) s neutrálním pH na promytí; Gillův hematoxylin; roztok detergentu; 96 % alkohol a xylen. Zásobní roztoky jsou dodány od firmy Roche a barvicí roztok je dodán firmou Bamed.

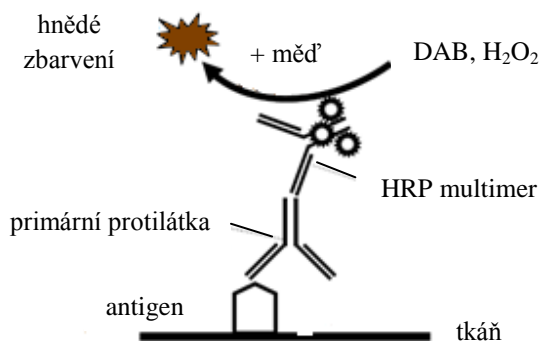
### 3.4.3. Průkaz a hodnocení p<sup>16</sup>

Inhibitor cyklin dependentní kinázy p<sup>16</sup> reguluje buněčný cyklus na přechodu z G1 fáze do S fáze. Produkt retinoblastomového genu, protein pRb, inhibuje v aktivní formě transkripci p<sup>16</sup>. Působením papilomavirů (onkoproteinu E7), je protein pRb inaktivován, tudíž nevyvolá transkripci p<sup>16</sup>, a tím dochází k transformaci dlaždicového epitelu v dysplaziích cervixu. <sup>(45, 46)</sup> In vivo protein p<sup>16</sup> v tkáni, se prokazuje monoklonální protilátkou anti-p16<sup>INK4a</sup>. Jako substrát je použit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB). Nadměrná exprese p<sup>16</sup> v dysplaziích je znázorněna hnědým zbarvením. V případě, že dochází ke snížení exprese p<sup>16</sup>, je v dysplaziích omezena sytost barviva. Pokud dysplazie v bioptickém vzorku není, k obarvení nedojde vůbec.

Hodnocení se provádí pod světelným mikroskopem, při zvětšení 20x. Exprese proteinu se hodnotí pozitivně nebo negativně vůči kontrolnímu vzorku s pozitivní reakcí.

#### 3.4.3.1. Provedení reakce

Při 37 °C skla s řezy se vloží do přístroje VENTANA BenchmarkUltra, kde proběhne imunohistochemická reakce: odparafinování řezů v EZ Prep roztoku, kondicionování buněk CC1 pufrem, aplikace 1 kapky primární monoklonální Ab (anti-p16<sup>INK4a</sup>), která je inkubována po dobu 30 min, aplikace sekundární Ab (DAB) a detekčního systému. Po ukončení reakce se skla odmastí v roztoku detergentu. Řezy se dobarví Gillovým hematoxylinem po dobu 2 min a opláchnou v tekoucí vodě. Následně se projasní v alkoholu a xyleny. Z xyleny se ihned montují v montovacím přístroji, kde se pokryjí krycí fólií.



**Obr. 10:** Detekce cílového antigenu DAB detekčním systémem za vzniku hnědého zbarvení.

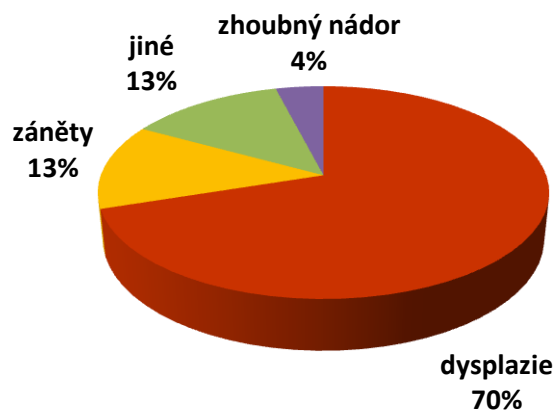
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Soubor vyšetřovaných pacientek

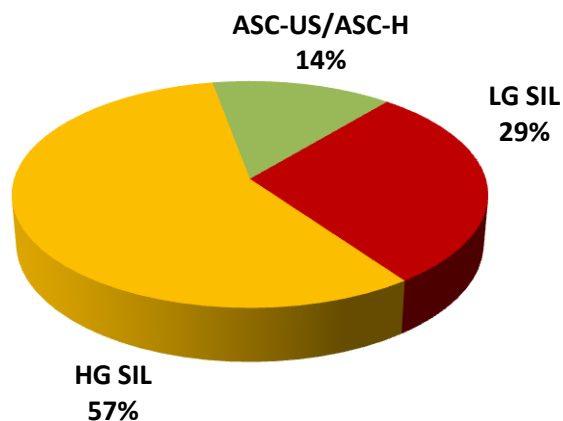
Retrospektivní analýza výsledků cytologických vzorků z cervixu přijatých za rok 2014 – 2015 k cytologickému vyšetření do laboratoře AeskuLab Patologie, zahrnovala 421 950 cytologických vzorků. Z těchto vzorků bylo 341 pacientek v cytologickém závěru HG SIL. Tato práce se zaměřuje na pacientky starší 30 let, kterých bylo z celkového počtu 30, u nichž byly k dispozici výsledky cytologie, histologie a imunohistochemie. U tohoto souboru byla mikroskopická diagnóza prekancerózních forem určena u 21 pacientek (70 %). Tyto pacientky byly nadále podle získaných dat rozděleny na skupinu pacientek, u kterých byl proveden léčebný operační zákrok – u 18 pacientek (60 %) a opakovaný chirurgický výkon (rekonizace) – u 3 pacientek (10 %).

Celkově bylo přijato 21 pacientek (70 %) se závěrem dysplastických změn, 4 pacientky (13 %) byly uzavřeny jako zánětlivé onemocnění děložního hrdla, 1 pacientka (4 %) byla uzavřena jako zhoubný dlaždicový nádor cervixu. Do jednotky „jiná diagnóza“ jsou zahrnuty 4 pacientky (13 %) s abnormálním děložním a vaginálním krvácením. V grafu 1 je uvedeno rozložení diagnóz onemocnění děložního hrdla.

U 21 pacientek (70 %) se závěrem dysplazií bylo uzavřeno 6 pacientek (29 %) s LG SIL, 12 pacientek (57 %) s HG SIL a 3 pacientky (14 %) s ASC-US/ASC-H. V grafu 2 je uvedeno rozložení diagnóz prekancerózních forem cervixu.



**Graf 1:** Rozložení diagnóz onemocnění děložního hrdla u pacientek nad 30 let za rok 2014 - 2015 v cytologické laboratoři AeskuLab Patologie, Laboratoř Praha za období leden - prosinec 2014 - 2015 (70 % dysplazie, 13 % záněty, 4 % se zhoubným nádorem a 13 % s ostatní diagnózou).



**Graf 2:** Rozložení diagnóz prekancerózních forem cervixu u pacientek nad 30 let za rok 2014 - 2015 v cytologické laboratoři AeskuLab Patologie, Laboratoř Praha za období leden - prosinec 2014 - 2015 (29 % s LG SIL, 57 % s HG SIL a 14 % s ASC-US/ASC-H).

#### **4.1.1. Výskyt nově diagnostikovaných případů prekancerózních forem děložního hrdla u pacientek nad 30 let**

Z celkového počtu 30 pacientek nad 30 let, které byly vyšetřeny cytologicky, histologicky a imunohistochemicky, bylo nově diagnostikováno 18 pacientek (60 %) s prekancerózními formami děložního hrdla. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny v tab. 3a a 3b. U všech pacientek byla zjevná abnormalita buněk v cytologickém nátěru a typická dysplazie metaplastického dlaždicobuněčného nerohovatějícího epitelu v histologickém řezu. U většiny případů byla zastižena koilocytóza, která je projevem HPV infekce. Žlázová endocervikální sliznice u pacientek byla bez atypií, spíše byla asociována s výraznými zánětlivými reaktivními změnami (endocervicitis). Širší anamnézy u těchto pacientek chyběly. U takových nálezů je třeba posoudit další parametry imunohistochemického vyšetření (Ki-67), které nejsou ale součástí této práce. Mírné, střední až těžké dysplazie byly potvrzeny průkazem p<sup>16</sup>.

U vzorku č. 3, mírný stupeň dysplazie nebyl průkazem onkoproteinu p<sup>16</sup> diagnostikován. U vzorku č. 8 se imunohistochemicky potvrdila mírná dysplazie v dolní třetině metaplastického dlaždicového epitelu. U vzorku č. 14 a 16 nebylo možné se k závěru vyjádřit, z důvodu minimálního množství odebraného biologického materiálu. V tomto případě je třeba znovu ověřit nález bioptickým odběrem, vzhledem k tomu, že ve vzorku č. 14 byl předchozí cytologický závěr ASC-H a pozitivita onkoproteinu p<sup>16</sup> v proužku dlaždicového epitelu, a u vzorku č. 16 kvůli přítomné koilocytóze a lehce pozitivní p<sup>16</sup>. U vzorku č. 15 byl hůře diagnostikovaný metaplastický epitel z důvodu chronické zánětlivé celulizace, a tudíž byl průkaz p<sup>16</sup> slabě pozitivní.

**Tab. 3a:** Hodnocení cytologických nálezů klasifikací dle Bethesda 2014 (LG SIL, HG SIL, ASC-US/ASC-H), dysplastických změn (CIN 1 – 3), průkazu onkoproteinu p<sup>16</sup> a reaktivních změn u pacientek nad 30 let s nově diagnostikovanými prekancerózami děložního hrdla. Hodnocení probíhalo na souboru 30 pacientek nad 30 let věku po chirurgické léčbě.

Vzorek	Klasifikace dle Bethesda	Stupeň dysplazie	Průkaz p <sup>16</sup>	Reaktivní změny	Chirurgická léčba
vzorek č. 1	LG SIL	CIN 1	pozitivní	koilocytóza	kyretáž
vzorek č. 2	HG SIL	CIN 2	pozitivní	bez změn	kyretáž
vzorek č. 3	LG SIL	CIN 1	negativní	koilocytóza, zánět	kyretáž
vzorek č. 4	HG SIL	CIN 2	silně pozitivní	zánět	konizace
vzorek č. 5	HG SIL	CIN 2	pozitivní	koilocytóza	kyretáž
vzorek č. 6	HG SIL	CIN 2	pozitivní	bez změn	punch biopsie
vzorek č. 7	HG SIL	CIN 2	pozitivní	koilocytóza, zánět	punch biopsie
vzorek č. 8	LG SIL	CIN 1-2	slabě pozitivní	koilocytóza, zánět	konizace
vzorek č. 9	LG SIL	CIN 1	pozitivní	zánět	punch biopsie
vzorek č. 10	HG SIL	CIN 2	pozitivní	mírný zánět	konizace

**Tab. 3b:** Hodnocení cytologických nálezů klasifikací dle Bethesda 2014 (LG SIL, HG SIL, ASC-US/ASC-H), dysplastických změn (CIN 1 – 3), průkazu onkoproteinu p<sup>16</sup> a reaktivních změn u pacientek nad 30 let s nově diagnostikovanými prekancerózami děložního hrdla. Hodnocení probíhalo na souboru 30 pacientek nad 30 let věku po chirurgické léčbě.

Vzorek	Klasifikace dle Bethesda	Stupeň dysplazie	Průkaz p <sup>16</sup>	Reaktivní změny	Chirurgická léčba
vzorek č. 11	HG SIL	CIN 3	silně pozitivní	koilocytóza, zánět	punch biopsie
vzorek č. 12	HG SIL	CIN 2	pozitivní	koilocytóza	kyretáž
vzorek č. 13	HG SIL	CIN 1	slabě pozitivní	koilocytóza, zánět	konizace
vzorek č. 14	ASC-H	nelze se vyjádřit	pozitivní	bez změn	kyretáž
vzorek č. 15	ASC-US	CIN 2	slabě pozitivní	koilocytóza, zánět	konizace
vzorek č. 16	LG SIL	nelze se vyjádřit	slabě pozitivní	koilocytóza, zánět	kyretáž
vzorek č. 17	HG SIL	CIN 2	pozitivní	koilocytóza,	konizace
vzorek č. 18	LG SIL	CIN 1	pozitivní	koilocytóza, zánět	kyretáž

#### 4.1.2. Změny na sliznici po léčebném zákroku u pacientek nad 30 let

Z celkového počtu 30 pacientek nad 30 let, byl proveden opakovaný léčebný zákrok u 3 pacientek (10 %), ke kontrole relapsu po předchozí diagnóze prekancerózních forem. Jednotlivé výsledky jsou uvedeny v tab. 4.

**Tab. 4:** Hodnocení cytologických nálezů klasifikací dle Bethesda 2014 (LG SIL, HG SIL, ASC-US/ASC-H), dysplastických změn (CIN 1 – 3), průkazu onkoproteinu p<sup>16</sup> a reaktivních změn u pacientek nad 30 let s již dříve diagnostikovanými prekancerózami děložního hrdla a hodnocení cytologických nálezů klasifikací dle Bethesda 2014 (LG SIL, HG SIL, ASC-H) po opakovaném léčebném zákroku. Hodnocení probíhalo na souboru 30 pacientek nad 30 let věku.

Vzorek	Klasifikace dle Bethesda	Klasifikace dle Bethesda	Stupeň dysplazie	Průkaz p <sup>16</sup>	Reaktivní změny	Chirurgická léčba
	předchozí nález	nález po rekonizaci				
vzorek č. 19	HG SIL	HG SIL	CIN 3	pozitivní	zánět	rekonizace
vzorek č. 20	ASC-H	HG SIL	CIN 3	pozitivní	zánět	rekonizace
vzorek č. 21	HG SIL	ASC-H	CIN 1	slabě pozitivní	koilocytóza, zánět	rekonizace

U vzorku č. 19 došlo k progresi HG SIL, nález byl kompletně potvrzen v exocervikálním a hlavně endocervikálním okraji konizátu. Je zde možná souvislost s přítomností chronického zánětu v transformační zóně. U vzorku č. 20 byl pouze předchozí cytologický nález ASC-H, bioptický odběr v minulých letech v naší laboratoři nebyl proveden. Po operačním zákroku (rekonizaci) byla potvrzena progresse nálezu těžké dysplazie (CIN 3) v metaplastickém dlaždicovém epitelu v transformační zóně s výrazným chronickým zánětem. V případě, že se vyskytuje i nadále stupeň těžké dysplazie u vzorků 19 a 20, je důležitá dlouhodobá dispenzarizace u těchto pacientek. V budoucnosti by bylo vhodné indikovat chirurgický výkon se zachovanou fertilitou s přihlédnutím na věk pacientek.

U vzorku č. 21 byl předchozí nález těžké dysplazie. Po opakovaném zákroku došlo k regresi, která se potvrdila mírnými dysplastickými změnami s koilocytózou v metaplastickém dlaždicovém epitelu v oblasti transformační zóny. Bohužel není vyloučena přítomnost HG SIL lézí, a proto je velmi nutná 3 měsíční kontrola u této pacientky.



## 5. DISKUZE

Diplomová práce se zabývá cytologickým vyšetřením cervikálních nátěrů, histologickým a imunohistochemickým vyšetřením biopsií z děložního hrdla u pacientek nad 30 let s diagnostikovanou dysplazií. Gynekologická cerviko-vaginální cytologie slouží jako sekundární prevence pro záchyt přednádorových forem a KDH. <sup>(47)</sup> Pro potvrzení diagnózy u vyšetřovaných pacientek se preferuje vyšetření histologické za použití přehledného barvení hematoxylin-eosin, a imunohistochemické vyšetření, které je velmi výhodné v tom, že určí včasné přesnou diagnózu onemocnění, a tím zajistí následné rychlé zahájení a nasazení cílené léčebné strategie, což má značný vliv na průběh prognózy u pacientek.

Vyšetření je založeno na průkazu prekanceróz (buněčná abnormalita) cytologickou metodou podle Papanicolaou, na bioptickém průkazu jednotlivých stupňů dysplazií (poškození dlaždicobuněčného epitelu v 1/3, ve 2/3 nebo celé výši) a na imunohistochemickém průkazu onkoproteinu p<sup>16</sup> (pozitivita v metaplastickém dlaždicovém epitelu byla znázorněna hnědě, u slabé positivity se ojediněle vyskytovalo hnědé zbarvení, většinou ve žlázkách cervixu, a v případě negativity nedošlo k zbarvení).

Byla provedena retrospektivní analýza výsledků cytologických a bioptických vzorků cervixu přijatých za rok 2014 – 2015 k cytologickému, histologickému a imunohistochemickému vyšetření do laboratoře AeskuLab Patologie. Celkový počet cytologických vzorků byl 421 950, z tohoto počtu bylo uzavřeno jako závěr „HG SIL“ 341 vzorků, a z tohoto souboru bylo vyšetřeno dále histologicky a imunohistochemicky 30 pacientek starších 30 let. U těchto pacientek bylo vysloveno klinickým lékařem podezření na dysplazii, zánětlivé onemocnění děložního hrdla, zhoubný dlaždicový nádor a abnormální děložní a vaginální krvácení. Některé cytologické žádanky nebyly dostatečně vyplněny, a proto se uvedené cytologické nálezy s doplněným vyšetřením někdy neshodují.

Zaměřila jsem se na vyšetřované pacientky s diagnózou dysplazie děložního hrdla, kterých bylo celkem 21 (70 %). Soubor zahrnoval pacientky s nově diagnostikovanými prekancerózami – 18 pacientek (60 %) a pacientky po opakovaném léčebném zákroku, u kterých se potvrdil převážně relaps onemocnění – 3 pacientky (10 %). U všech pacientek byla hodnocena abnormalita dlaždicových buněk klasifikací dle Bethesda 2014. Histologické vyšetření přesněji prokázalo poškození metaplastického dlaždicového nerohovatějícího epitelu v různých stupních. A imunohistochemické vyšetření ověřilo dysplazii v jednotlivých vrstvách epitelu. Věková skupina pacientek starší 30 let byla vybrána z důvodu vyššího rizika na rozvoj dlaždicobuněčného karcinomu, a s ohledem na fertilitu.

## 6. ZÁVĚR

Karcinom děložního hrdla patří mezi nejčastější zhoubná onemocnění v ČR i ve světě. Hlavní příčinou tohoto onemocnění je infekce vysoce rizikových lidských papilomavirů HR HPV typu 16 a 18 a dalších sdružených faktorů, zejména promiskuity. Klinický obraz u prekancerózních forem probíhá manifestně v podobě genitálních bradavic nebo lézí, subklinicky bez makroskopického obrazu a převážně v latentní formě, kde dochází většinou ke spontánnímu očištění přirozenými imunitními mechanizmy. Vyšší stádium karcinomu děložního hrdla se projevuje spontánním nebo postkoitálním krvácením, poševním fluorem a pánevními bolestmi.

Tato práce byla zaměřena na průkazu prekanceróz metodou dle Papanicolaou v cerviko-vaginálních stěrech, hodnocených klasifikací dle Bethesda 2014. Dále v této práci byl v biopsiích stanoven stupeň dysplazie a průkaz onkoproteinu p<sup>16</sup> v metaplastickém dlaždicovém epitelu. Vyhodnocen byl soubor pacientek nad 30 let za rok 2014 – 2015 s diagnózou prekancerózních forem v rámci terapeutického výkonu.

V kombinaci cytologického, histologického a imunohistochemického vyšetření se přesněji diagnostikovaly dysplastické nálezy od ostatních onemocnění (záněty, abnormální děložní a vaginální krvácení a zhoubný nádor děložního hrdla). Většina testovaných pacientek vykazovala cytologicky vysoký stupeň intraepiteliálních lézí s koilocyty (HG SIL/HPV), biopticky středně - těžkou dysplazii (CIN 2 – 3) doprovázenou zánětem (chronická cervicitis), a imunohistochemicky pozitivitu onkoproteinu p<sup>16</sup> v bioptickém vzorku. U 3 pacientek z 18 byl stav po rekonizaci. U 2 ze 3 pacientek se potvrdila progresse dlaždicových intraepiteliálních lézí.

Imunohistochemické vyšetření je přínosným doplňujícím vyšetřením pro verifikaci diferenciální diagnózy dysplazií a nejasných lézí (ASC-US/ASC-H), kontrolu recidivy prekanceróz po opakovaném léčebném zákroku, a k odlišení dalších nemocí (záněty děložního hrdla, abnormální krvácení).

## 7. SEZNAM LITERATURY

- 1) ROZTOČIL, A. *Vyšetřovací metody v gynekologii a porodnictví*. 1. vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1998. 179 s. ISBN 80-7013-255-8.
- 2) TURYNA, R. – SLÁMA, J. *Kolposkopie děložního hrdla*. 1. vyd. Praha: Galén, c2010. 173 s. ISBN 978-80-7262-679-3.
- 3) VAJNER, L. – UHLÍK, J. – NOVOTNÝ, T. – KONRÁDOVÁ, V. *Lékařská histologie II: mikroskopická anatomie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2012. 173 s. ISBN 978-80-246-2165-4.
- 4) CITTERBART, K. *Gynekologie*. 1. vyd. Praha: Galén: Karolinum, 2001. 277 s. ISBN 80-7262-094-0.
- 5) HORÁČEK, J. – KOBILKOVÁ, J. *Gynekologická cytodiagnostika: atlas cytohistologických korelací*. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2013. 136 s. ISBN 978-80-7345-327-5.
- 6) KOBILKOVÁ, J. – DUŠKOVÁ, J. a kol. *Základy cytopatologie. Část 1. - Gynekologie a porodnictví*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003. 197 s. ISBN 80-246-0608-9.
- 7) JIRÁSEK, J. E. *Patologie děložního hrdla*. 1.vyd. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1992. 44 s. ISBN 80-7013-074-1.
- 8) MAŠATA, J. a kol. *Infekce v gynekologii*. 2. rozš. vyd. Praha: Maxdorf, c2014. 245 s. ISBN 978-80-7345-380-0.
- 9) REŠLOVÁ, T. Cervikální karcinom – možnosti prevence. *Postgraduální medicína*, 2008, roč. 10, č. 5, s. 63 – 66. ISSN 1212-4184.
- 10) ŠEVČÍK, L. – KOLIBA, P. – GRÁF, P. – KONDERLA, M. HPV infekce u pacientek s cervikální intraepiteliální neoplazií: Celostátní konference ČGPS ČLS JEP a SSG ČR, Hradec Králové, 14. – 16. 11. 2002. Přednes oceněných prací a diskuse k sekci posterů. *Praktická gynekologie*, 2002, č. 5, s. 45 – 46. ISSN 1211-6645.
- 11) ONDRUŠ, J. – DVOŘÁK, V. a kol. *Screening karcinomu děložního hrdla*. 1. vyd. Praha: Maxdorf, 2013. 77 s. ISBN 978-80-7345-322-0.

- 12) MIKYŠKOVÁ, I. – DVOŘÁK, V. – MICHAL, M. Lidské papilomaviry jako příčina vzniku gynekologických onemocnění. *Praktická gynekologie*, 2003, č. 4, s. 33 – 36. ISSN 1211-6645.
- 13) KJAER, S.K. – VAN DEN BRULE, A. J.C. – PAULL, G. – SVARE, E.I. – SHERMAN, M.E. – THOMSEN, B.L. – SUNTUM, M. – BOCK, J.E. – POLL, P.A. – MEIJER, CH.J. L.M. Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *Papers*, 2002, č. 325, s. 1 – 7.
- 14) KAHN, J.A. Očkování proti HPV v rámci prevence cervikální intraepiteliální neoplazie. *Gynekologie po promoci*, 2009, roč. 9, č. 5, s. 4 – 10. ISSN 1213-2578.
- 15) KIM, JW. – SONG, SH. – JIN, CH. – LEE, JK. – LEE, NW. – LEE, KW. Factors Affecting the Clearance of High-risk Human Papillomavirus Infection and the Progression of Cervical Intraepithelial Neoplasia. *The Journal of International Medical Research*, 2012, roč. 40, s. 486 – 496.
- 16) CIBULA, D. – PETRUŽELKA, L. a kol. *Onkogynekologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2009. 614 s. ISBN 978-80-247-2665-6.
- 17) EGGOVÁ, P. – GRÜNVALDOVÁ, I. Prekancerózy děložního hrdla. *Florence*, 2012, roč. 8, č. 10, s. 23 – 25. ISSN 1801-464X.
- 18) FRAZER, I.H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Reviews*, january 2014, č. 4, s. 46 – 54.
- 19) STANLEY, M.A. Genital human papillomavirus infection: current and prospective therapies. *Journal of General Virology*, 2012, č. 93, s. 681 – 691.
- 20) FREITAG, P. *Onkogynekologie: minimum pro praxi*. 1. vyd. Praha: Triton, 2001. 106 s. ISBN 80-7254-196-X.
- 21) DVOŘÁK, V. – ONDRUŠ, J. High – grade intraepiteliální dlaždicové léze. *Problematika karcinomu hrdla děložního: Sdružení soukromých gynekologů České republiky*, 2008, I. část, s. 18 – 26. ISBN 978-80-254-4674-4.

- 22) KELLOFF, G.J. – SIGMAN, C.C. Assessing intraepithelial neoplasia and drug safety in cancer – preventative drug development. *Nature Reviews Cancer*, 2007, č. 7, s. 508 – 518.
- 23) SMETANA, J. – BOŠTÍKOVÁ, V. – BOŠTÍK, P. – CHLÍBEK, R. HPV infekce, cervikální karcinom a vakcinace. *Postgraduální medicína*, 2011, roč. 13, č. 9, s. 968 – 971. ISSN 1212-4184.
- 24) JUCKETT, G. – HARTMAN-ADAMS, H. Infekce lidským papilomavirem: klinické projevy a prevence. *Gynekologie po promoci*, 2011, roč. 11, č. 1, s. 38 – 43. ISSN 1213-2578.
- 25) DROZENOVÁ, H. Genitální bradavice. Condylomata accuminata. *Referátový výběr z dermatovenerologie*, 2009, roč. 51, č. 1, s. 11 – 16. ISSN 1213-9106.
- 26) ROKYTA, Z. Diagnostic reliability of prebioptic methods in the prediction of a histological basis of cervical lesion and its correlation with accuracy of colposcopically directed biopsy in patients with cervical neoplasia. *European journal of gynaecological oncology*, 2000, roč. 21, č. 5, s. 484 – 486. ISSN 0392-2936.
- 27) ROTTER, L. – ROTTEROVÁ, P. – KINKOROVÁ LUŇÁČKOVÁ, I – KAŠPÍRKOVÁ, J. – MICHAL, M. – HUDEČEK, R. Současné možnosti diagnostiky prekanceróz a karcinomu děložního hrdla. *Česká gynekologie*, 2014, roč. 79, č. 4, s. 314 – 320. ISSN 1210-7832.
- 28) KINKOROVÁ LUŇÁČKOVÁ, I. Nové možnosti ve screeningu karcinomu děložního hrdla (ThinPrep Pap test). *Praktická gynekologie*, 2013, roč. 17, č. 2, s. 157 – 160. ISSN 1211-6645.
- 29) ROKYTA, Z. Low – grade intraepiteliální dlaždicové léze. *Problematika karcinomu hrdla děložního: Sdružení soukromých gynekologů České republiky*, 2008, I. část, s. 12 – 17. ISBN 978-80-254-4674-4.
- 30) VACULOVÁ, J – HORÁČEK, J. Contribution immunochemical methods in diagnosis and prevention of cervical dysplastic changes. *Journal of nursing, social studies and public health*, 2015, roč. 6, č. 1 – 2, s. 15 – 23. ISSN 1804-1868.

- 31) TRNKOVÁ, M. – JULIŠOVÁ, I. – JULIŠ, I. Imunohistochemický průkaz human papilloma viru v bioptické praxi: Onkopatologie. Základna pro diagnostiku i výzkum nádorů. *Edukační sborník, Brno: Masarykův onkologický ústav, 2001, s. 27.*
- 32) STŘEDA, R. – ŠTIPL, S. – ŠTĚPÁNOVÁ, V. – PLÍŠKOVÁ, L. Prevalence HPV infekce u abnormálních PAP stěrů. *Gynekolog, 1998, roč. 7, č. 1, s. 20 – 21. ISSN 1210-1133.*
- 33) TACHEZY, R. – ROB, L. Skrínink pro prevenci karcinomu děložního hrdla v České republice. *Časopis lékařů českých, 2007, roč. 146, č. 12, s. 939 – 944.*
- 34) PILKA, R. – PROCHÁZKA, M. *Gynecology. 2. vyd. Olomouc, 2012. 225 s. ISBN 978-80-244-3020-1.*
- 35) KUŽEL, D. *Gynekologická endoskopie. 1. vyd. Praha: Galén, 1996. 188 s. ISBN 80-85824-40-X.*
- 36) CIBULA, D. Cervarix – další krok v primární prevenci cervikálního karcinomu. *Moderní gynekologie a porodnictví, 2007, roč. 16, č. 4, s. 805 – 815. ISSN 1211-1058.*
- 37) BOŠTÍKOVÁ, V. – PRÁŠIL, P. – BOŠTÍK, P. Novinky ve vakcinologii. *Vakcinologie, 2015, roč. 9, č. 3, s. 153 – 155. ISSN 1802-3150.*
- 38) BANSAL, N. – WRIGHT, J. D. – COHEN, C. J. – HERZOG, T. J. Natural History of Established Low Grade Cervical Intraepithelial (CIN 1) Lesions. *Anticancer research, 2008, č. 28, s. 1763 – 1766.*
- 39) KOBILKOVÁ, J. – LOJDA, Z. *Gynekologická cytodiagnostika. 1. vyd. Praha: Galén, 2000. 109 s. ISBN 80-7262-044-4.*
- 40) SOLOMON, D. – NAYAR, R. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: definitions, criteria, and explanatory notes. 2. vyd. New York: Springer, c2004. 191 s. ISBN 978-0-387-40358-8.*
- 41) LUKSCH, F. *Úvod do poševní cytologie. 1. vyd. Praha: Státní zdravotnické nakladatelství, 1953. 118 s.*

- 42) DUŠKOVÁ, J. Co je nového v cytodiagnostice cervikálních prekanceróz? *Česko - slovenská patologie a Soudní lékařství*, 2012, roč. 48 – 57, č. 1, s. 22 – 29. ISSN 1210-7875.
- 43) DUŠKOVÁ, J. Cytologické vyšetření v diagnostice patologických stavů děložního hrdla a jeho limity. *Moderní gynekologie a porodnictví*, 2010, roč. 19, č. 3, s. 266 – 275. ISSN 1211-1058.
- 44) TACHEZY, R. – ROB, L. Cervical cancer screening in the Czech Republic. *Collegium antropologicum*, 2007, roč. 31, suppl. 2, s. 27 – 29. ISSN 0350-6134.
- 45) ROTTEROVÁ, P. – NENUTIL, R. – HANZELKOVÁ, Z. – HELÁNOVÁ, Š. – KŘEN, L. – CHOVANEC, J. – ROTTER, L. Exprese p16INK4A v dyspláziích a nádorech děložního čípku. *Klinická onkologie*, 2003, roč. 16, č. 6, s. 249 – 252. ISSN 0862-495X.
- 46) NENUTIL, R. – ROTTER, L. – HANZELKOVÁ, Z. – DVOŘÁKOVÁ, Z. – CHOVANEC, J. – KYCLOVÁ, J. – KŘEN, L. – ROTTEROVÁ, P. Stanovení proteinu p16 u lézí děložního hrdla. *Česká gynekologie*, 2005, roč. 70, č. 4, s. 295 – 298. ISSN 1210-7832.
- 47) ASOTIC, A. – TARIC, S. – ASOTIC, J. Correlation of Cervical Smear and Pathohistological Findings. *Medical Archives*, 2014, roč. 68, č. 2, s. 106 – 109.