

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Kateřina Urbánková

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

Kateřina Urbánková

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**CYTOLOGICKÉ VYŠETŘENÍ DĚLOŽNÍHO ČÍPKU A
JEHO KORELACE S HISTOPATOLOGICKÝM NÁLEZEM**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Bc. Natálie Klubičková

PLZEŇ 2023

Na této stránce je vloženo zadání bakalářské práce.

Na této stránce je vloženo zadání bakalářské práce.

Prohlášení

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

V Plzni dne 30.3.2023

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování

Rády bych poděkovala MUDr. Bc. Natálii Klubíčkové za odborné vedení mé bakalářské práce, za milý a trpělivý přístup a praktické rady. Dále bych chtěla poděkovat Bioptické laboratoři s.r.o. za možnost seznámit se s provozem v jednotlivých laboratořích a za poskytnutí všech potřebných dat.

Abstrakt

Příjmení a jméno: Urbánková Kateřina

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Cytologické vyšetření děložního čípku a jeho korelace s histopatologickým nálezem

Vedoucí práce: MUDr. Bc. Natálie Klubíčková

Počet stran – číslované: 65

Počet stran – nečíslované: 23

Počet příloh: 3

Počet titulů použité literatury: 27

Klíčová slova: cytologické vyšetření děložního čípku, klasifikace Bethesda, screening, cytologie, histopatologie

Souhrn:

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou vyšetření děložního čípku pomocí cytologických a histopatologických metod. V teoretické části je popisována děloha, konkrétně její anatomická a histologická stavba a také její fyziologie a mikroflóra. Další kapitoly se věnují onemocněním vagíny, cervixu a endometria. Je zde také zmíněn cervikální gynekologický screening, cytologická klasifikace Bethesda a cytologické metody vyšetření a jedna kapitola je věnována imunohistochemii. V praktické části jsou zpracována data obsahující údaje o počtech cytologických a histologických vyšetření za měsíc únor v letech 2020-2022. Hlavním cílem bylo objasnit korelaci mezi cytologickými a histopatologickými metodami při vyšetření děložního čípku. Z dostupných dat vyplývá, že tyto metody jsou velmi úzce provázané a pro správnou diagnózu je zapotřebí použít nejdříve cytologické vyšetření jako plošný screening a v případě podezření na onemocnění použít histopatologické vyšetření pro upřesnění nálezu.

Abstract

Surname and name: Urbánková Kateřina

Department: Department of paramedical science, medical diagnostics studies and public health

Title of thesis: Cytological examination of the cervix and its correlation with histopathological findings

Consultant: MUDr. Bc. Natálie Klubíčková

Number of pages – numbered: 65

Number of pages – unnumbered: 23

Number of appendices: 3

Number of literature items used: 27

Keywords: cervical cytology, Bethesda classification, screening, cytology, histopathology

Summary:

This bachelor thesis covers the problem of cervical examination by cytological and histopathological methods. The theoretical part describes the uterus, specifically its anatomical and histological structure, as well as its physiology and microflora. The next chapters deal with diseases of the vagina, cervix and endometrium. Cervical screening and the Bethesda cytological classification, cytological methods of examination are also mentioned, and a chapter on histochemistry is included. In the practical part, data containing the numbers of cytological and histological examinations for the month of February 2020-2022 are presented. The main aim was to clarify the correlation between cytological and histopathological methods in cervical examination. The available data show that these methods are very closely interrelated and for a correct diagnosis, cytological examination should be used first as a panel screening and in case of suspected disease, histopathological examination should be used to refine the findings.

Předmluva

Téma této bakalářské práce jsem zvolila na základě své stáže v Biopstické laboratoři s.r.o., kde jsem se seznámila s provozem jak v cytologické, tak histologické laboratoři. Společně se svou vedoucí jsme vybraly téma „Cytologické vyšetření děložního čípku a jeho korelace s histopatologickým nálezem“. Toto téma je zajímavé především proto, že spojuje a porovnává dvě odlišné metody vyšetření a zobrazuje jejich jedinečnost, úzkou provázanost a možnosti využití v co nejefektivnějším a zároveň nejšetrnějším screeningu onemocnění děložního čípku.

OBSAH

SEZNAM GRAFŮ	13
SEZNAM OBRÁZKŮ	14
SEZNAM TABULEK	15
SEZNAM ZKRATEK	16
ÚVOD.....	17
TEORETICKÁ ČÁST	18
1 DĚLOHA	18
1.1 Anatomie a histologie dělohy	18
1.1.1 Děložní hrdlo (cervix uteri)	18
1.1.2 Endometrium	19
1.1.3 Myometrium	19
1.1.4 Parametrium	19
1.1.5 Perimetrium	20
1.2 Fyziologie, mikroflóra, ektopium s metaplázií, atrofie	21
2 PATOLOGIE VAGÍNY	22
2.1 Infekce bakteriální	22
2.1.1 Kapavka	23
2.1.2 Genitální mykoplazmata	24
2.1.3 Syfilis.....	25
2.1.4 Chlamydie.....	26
2.2 Infekce mykotické.....	26
2.2.1 Kandidóza.....	26
2.3 Infekce parazitární	28
2.3.1 Trichomoniáza	28
2.4 Infekce virové	29
2.4.1 Herpes genitalis	29
2.4.2 Lidský papilomavirus	30
3 PATOLOGIE CERVIXU	31
3.1 Záněty	31
3.2 Nádory	32
3.2.1 HPV	32
3.2.2 Prekancerózy	33
3.2.3 Epitelové nádory.....	35
3.2.4 Mezenchymální nádory	36
4 PATOLOGIE ENDOMETRIA	37

4.1	Funkční změny.....	37
4.1.1	Absence cyklu	37
4.1.2	Odchytky cyklu	38
4.2	Endometrióza	38
4.3	Záněty	38
4.4	Hyperplázie endometria.....	39
4.5	Nádory	40
4.5.1	Prekancerózy – atypická hyperplázie, serózní intaepiteliální karcinom.....	40
4.5.2	Adenokarcinomy I. a II. typu.....	41
5	CERVIKÁLNÍ SCREENING A CYTOLOGICKÁ KLASIFIKACE BETHESDA.....	43
5.1	Cervikální screening	43
5.2	Cytologická klasifikace Bethesda	43
6	CYTOLOGICKÉ METODY	46
6.1	Standardní barvení PAP	46
6.2	Liquid based cytologie.....	47
7	IMUNOHISTOCHEMIE.....	48
7.1	Nádorové markery	48
7.1.1	Marker p16	49
8	PANDEMIE COVID-19.....	50
	PRAKTICKÁ ČÁST	51
9	CÍL A ÚKOLY PRÁCE	51
10	VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY	52
11	CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU	53
12	METODIKA PRÁCE	54
13	ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ	55
13.1	Výsledky výzkumných cílů.....	55
13.1.1	Počty a metody vyšetření.....	55
13.1.2	Kritéria cytologického screeningu.....	58
13.1.3	Vztah mezi cytologií a histologií.....	59
13.2	Výsledky výzkumných otázek	62
13.2.1	Spojitosť mezi věkem a závažností nálezu	62
13.2.2	Spojitosť mezi věkem a počtem vyšetření	67
13.2.3	Poměr mezi jednotlivými kategoriemi nálezů.....	68
13.2.4	Určení vztahu mezi kategoriemi nálezů a jednotlivými roky.....	69
	DISKUZE.....	77
	ZÁVĚR.....	80
14	BIBLIOGRAFIE.....	82

SEZNAM PŘÍLOH	84
PŘÍLOHY	85

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: přibližný podíl populace, která během života přijde do styku s HPV a u které se projeví různě závažné příznaky	32
Graf 2: poměr mezi metodami PAP a LBC	55
Graf 3: počty cytologických a histologických vyšetření	56
Graf 4: počty nálezů v závislosti na kategorii nálezů a průměrném věku pacientek.....	62
Graf 5: počet vyšetření v závislosti na věku.....	67
Graf 6: poměr jednotlivých kategorií nálezů	68
Graf 7: χ^2 rozdělení pravděpodobnosti pro právě 6 stupňů volnosti.....	71
Graf 8: vizualizace 95 % intervalu spolehlivosti.....	72
Graf 9: vizualizace χ^2 hodnoty	73
Graf 10: vizualizace χ^2 hodnoty	75

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: cytologický nátěr s podezřelým nálezem.....	47
Obrázek 2: cytologický nátěr.....	60
Obrázek 3: cytologický nátěr.....	60
Obrázek 4: histologický vzorek – knips	60
Obrázek 5: histologický vzorek – konizát	60

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: prognózy onemocnění intraepiteliálními neopláziemi	34
Tabulka 2: počty histologických vyšetření a odpovídající histologický nález.....	57
Tabulka 3: hodnoty kritérií cytologického screeningu	58
Tabulka 4: pozitivní cytologické nálezy v jednotlivých letech	69
Tabulka 5: pozorované hodnoty	70
Tabulka 6: očekávané hodnoty	70
Tabulka 7: dílčí hodnoty χ^2 testu	72
Tabulka 8: pozorované nálezy	74
Tabulka 9: dílčí hodnoty χ^2 testu	74

SEZNAM ZKRATEK

AIS	adenokarcinom in situ
atp	a tak podobně
BV	bakteriální vaginóza
CIN	cervikální intraepiteliální neoplázie
CIS	carcinoma in situ
GIN	glandulární intraepiteliální neoplázie
HPV	lidský papiloma virus (human papillomavirus)
HSIL	skvamózní intraepiteliální léze s dysplázií vysokého stupně
HSV	herpes simplex virus
LBC	cytologie do tekutého média (liquid based cytology)
LSIL	skvamózní intraepiteliální léze s dysplázií nízkého stupně
např	například
NILM	negativní pro intraepiteliální lézi a malignitu (negative for intraepithelial lesion and malignancy)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
pRb	protein Rb
STD	sexuálně přenosné choroby (sexually transmitted diseases)
tzv	takzvaně

ÚVOD

Hlavním motivem k napsání této bakalářské práce byla má stáž v Bioptické laboratoři s.r.o. v Plzni. Při bližším seznámení s cytologickým a histologickým provozem se nabízela otázka, zda jsou tato dvě odvětví nějak propojená, a pokud ano, tak do jaké míry. Jako ideální předmět tohoto výzkumu se jeví vzorky z vyšetření děložního čípku, jelikož se při něm používá jak cytologické, tak histologické vyšetření. Důvodem k napsání této bakalářské práce byl pokus o objasnění problematiky cytologického screeningu a na něj navazujícího histologického vyšetření. Dále zjistit, zda a jak spolu tyto metody souvisí, popřípadě zda se dá jedna metoda plně nahradit druhou.

Momentálně se cytologické vyšetření, díky své neinvazivní povaze, používá jako preventivní screeningová metoda a histopatologické vyšetření se pro svou vysokou specifitu používá cíleně, u pacientek s podezřením na patologický nález.

V teoretické části se věnuji anatomii ženských pohlavních orgánů s hlavním zaměřením na dělohu a děložní čípek. Dále se zaměřuji na jednotlivé kategorie patologií vagíny, jako jsou infekce bakteriální, virové, či výskyt nádorů. Přibližuji zde také patologii cervixu, a to záněty, jejich příčiny a také jednotlivé druhy nádorů, vyskytující se v této oblasti. Zaměřuji se i na patologii endometria, jeho funkční změny, záněty a jejich spouštěče a typy nádorů. Rozebírám informace o cytologické klasifikaci Bethesda, metodách cytologického vyšetření, jako je LBC a PAP test. Krátce přiblížím i problematiku imunohistochemie, a to konkrétně nádorové markery a detailněji do marker p16.

V praktické části používám jako podklady data a záznamy o provedených cytologických a histologických vyšetřeních za měsíc únor, která nasbírala Bioptická laboratoř s.r.o. v letech 2019–2022. Data zpracovávám pomocí grafů a výpočtů proto, abych zjistila, jak moc spolu souvisí jednotlivé faktory, jako je počet vyšetřených žen a četnost jednotlivých nálezů, věk pacientky a počet vyšetření, věk pacientky a závažnost nálezu a určení toho, jak jsou počty vyšetření a závažnosti nálezů propojeny s jednotlivými roky, během kterých sběr dat probíhal, s cílem posoudit, jestli na počet vyšetření a závažnost nálezů měla vliv protipandemická opatření.

TEORETICKÁ ČÁST

1 DĚLOHA

1.1 Anatomie a histologie dělohy

Děloha, latinsky uterus či řecky metra, je nepárový, dutý, reprodukční orgán, nacházející se v malé pánvi mezi močovým měchýřem a konečníkem. Děložní stěna má tloušťku přibližně 1,5 centimetru. U dospělé ženy má tvar předozadně oploštělé hrušky. Plně vyvinutá děloha je obvykle 7-9 cm dlouhá, mezi rohy 4-5 cm široká a předozadním rozměru má 2,5-3,5 cm. U žen, které již rodily, se udávají všechny rozměry přibližně o 1 cm větší. Děloha je v malé pánvi většinou nakloněna dopředu a mezi čípkem a tělem prohnuta vpřed. Toto naklonění nazýváme pojmy anteflexe a anteverse. Celá děloha je ještě mírně natočena doprava, tzv. dextroverse. Anatomicky ji můžeme dělit na jednotlivé části, a to jsou: děložní dno, děložní rohy, děložní tělo, děložní úžina a děložní hrdlo neboli krček. Celá děloha se skládá z několika odlišných vrstev, přičemž každá z nich má svou jedinečnou a nenahraditelnou funkci (Citterbart, 2001).

1.1.1 Děložní hrdlo (cervix uteri)

Děložní hrdlo je úponem pochvy děleno na horní a dolní část, která se také nazývá děložní čípek, který vyčnívá do pochvy. Čípek je dobře přístupný při gynekologickém vyšetření v zrcadlech, což umožňuje provádět vyšetření speciálním optickým přístrojem (kolposkopie) a odebírat vzorky na cytologickou či bioptickou diagnostiku.

Sliznice uvnitř děložního hrdla se nazývá endocervix a je tvořena kolumnárním epitelem vybíhajícím v endocervikální žlázy. Epitel produkuje hlen, jehož charakter se mění během menstruačního cyklu. Sliznice ektocervixu, tedy části čípku vyklenující se do pochvy, je tvořena vícevrstevným dlaždicovým nerohovějícím epitelem, jehož buňky v povrchových částech epitelu hromadí glykogen, kterým se následně živí mikroflóra pochvy. Hranici mezi dlaždicovým epitelem ektocervixu a kolumnárním epitelem endocervixu nazýváme skvamokolumnární juncí. Většinu tkáně děložního čípku však představuje hladká svalovina, která je uspořádána převážně cirkulárně. Na zevní ploše děložního hrdla se nachází řídká vazivová tkáň, která se nazývá paracervix a dále volně přechází v parametrium. Slouží k úponu čípku k okolním strukturám (Hanzlová & Hemza, 2013, Citterbart, 2001).

1.1.2 Endometrium

Vnitřní výstelka dělohy se nazývá endometrium. Tato část dělohy prodělává v době pohlavní zralosti charakteristické cyklické změny, které jsou ukončeny menstruačním krvácením. Tento cyklus dělíme na fáze: proliferační, sekreční, menstruační a regenerační, více viz. kapitola 4.1.

Tkáň endometria se mění v závislosti na věku ženy. Před pubertou je tvořeno jednovrstevným kubickým epitelem. Je také možno zde nalézt základy žlázek, které se nacházejí v lamina propria mucosae. S nástupem plodného období dochází v děloze ke strukturním i funkčním změnám. Z hlediska funkčního se endometrium skládá ze dvou vrstev. První z nich je stratum basale, která srůstá s myometriem, je stálá a při menstruačním krvácení se neodlupuje. V regenerační fázi v ní počíná proliferace buněk a poskytuje tak základ pro obnovu celého endometria. Druhou vrstvou je stratum functionale, což je 1-6 mm silná vrstva endometria. Je závislá na hormonech a prodělává cyklické změny, během kterých proliferuje, vyzrává, degeneruje, a nakonec se odlučuje (Nováková & Blanková, 2018; Citterbart, 2001; Hanzlová & Hemza, 2013).

1.1.3 Myometrium

Myometrium je nejsilnější, fibromuskulární vrstva stěny děložní. Je tvořena z hladkých svalových buněk prostoupených vazivem a směrem k tubám se jeho tloušťka ztenčuje. Je rozděleno do tří až čtyř neostře ohraničených vrstev. Vnitřní vrstva je tvořena cirkulárně uspořádanou svalovinou – stratum submucosum. Tato vrstva má za úkol konstrikci během menstruační fáze nebo po porodu. Střední vrstva – stratum vasculosum, je nejsilnější vrstvou s četnými krevními cévami, má spirálovité uspořádání. V graviditě se přizpůsobuje velikosti plodu množstvím a prodloužením svalových buněk. V důsledku těchto jevů mohou buňky hladké svaloviny, které mají obvykle délku kolem 50 μm , dosáhnout délky 500 μm i více. Zevní vrstva – stratum supravasculosum, je složena ze svalových vláken, která jsou orientována převážně podélně (Praktikum z obecné histologie – E-learningový portál LF UK v Plzni; Hanzlová & Hemza, 2013; Balko, Tonar & Varga, 2016; Hájek, Čech, Maršál, 2014).

1.1.4 Parametrium

Pojmem parametrium, jinými názvy subperitoneální vazivo, nebo také přiděložní vazivo, označujeme pruhy vaziva obklopující dělohu tam, kde není přítomna vrstva perimetria. Nacházíme ho především podél děložních hran a tvoří závěsný aparát dělohy. Fixuje celou dělohu, hlavně tedy krček, zatímco děložní tělo zůstává relativně volné. Toto

uspořádání má význam hlavně v těhotenství. Parametrium probíhají velké děložní cévy a nervy (Balko Tonar & Varga, 2016; Hanzlová & Hemza, 2013; Hájek, Čech, Maršál, 2014).

1.1.5 Perimetrium

Perimetrium je tvořeno tenkou vrstvou kolagenního vaziva, které je kryto jednovrstvným plochým epitelem, který se označuje jako mezotel. Kryje přední stranu dělohy, ze které přechází na močový měchýř a zadní stranu dělohy, ze které odstupuje na poševní klenbu a z ní na konečník. Kryje i děložní hrany, ze kterých odstupuje do stran jako široký děložní vaz (Hájek, Čech, Maršál, 2014).

1.2 Fyziologie, mikroflóra, ektropium s metaplázií, atrofie

Složení mikroflóry pochvy je u každé ženy individuální. Faktorů ovlivňujících složení je mnoho – patří mezi ně například věk a hladina estrogenů, užívání některých léčiv, či užívání hormonální antikoncepce. Všeobecně ale platí, že nejvyšší podíl zastoupení ve vaginální mikroflóře mají laktobacily. Ty produkují kyselinu mléčnou a peroxid vodíku s cílem zabránit růstu nežádoucích bakterií (Špaček, Buchta, Jílek, 2013).

Ektropium – skvamokolumnární junkce se u žen po menarché vysune ven (před tím je uvnitř zevní branky) a kolumnární epitel je najednou vystaven kyselému pH vagíny, což je pro něj nepřírodní. Proto dochází k metaplázii, kdy je tento epitel nahrazen epitelem dlaždicovým, který je těmto podmínkám více odolný. Oblast, kde byl původně kolumnární a nyní tam je dlaždicový epitel, nazýváme transformační zónou. Epitel v transformační zóně je mnohem náchylnější k infekci HPV (Citterbart, 2001).

Atrofie – po menopauze nebo po snížení hladiny estrogenů z jiného důvodu dochází k atrofii celého reprodukčního systému. Děloha se zmenšuje, sliznice pochvy i dělohy se ztenčují. Epitel ektocervixu navíc nevyzrává až do výše popsaných velkých buněk skladujících glykogen, buňky mají menší velikost a jiné barvicí vlastnosti. (Pangarkar MA, 2021; Nayar, Wilbur 2015).

Hormonálně závislé změny poševního epitelu – epitel pochvy se může měnit na základě měnících se hladin pohlavních hormonů. Tyto změny můžeme monitorovat pomocí funkční cytologie. Jedná se o typ cytologie, která umožňuje posouzení funkčnosti poševního epitelu, sleduje stav buněk na základě změn v buněčných organelách a cytoplazmě. Tento druh cytologie nemá vlastní kategorii v klasifikaci Bethesda. V Biopstické laboratoři je však vzhledem k obdobnému způsobu zpracování a do jisté míry i hodnocení řazen k ostatním gynekologickým cytologickým vyšetřením a má kategorii 13.

2 PATOLOGIE VAGÍNY

Různé infekce jsou jedním z nejčastějších problémů v gynekologické praxi. Obvykle se projevují výtokem, svěděním nebo pálením v oblasti rodidel. Dle původce je dělíme do několika základních skupin, které jsou popsány v této kapitole. Abychom mohli zvolit správnou léčbu, musíme původce infekce nejprve diagnostikovat. K tomu máme na výběr z mnoha klasických vyšetřovacích metod – mikroskopické vyšetření (barvené a nebarvené preparáty), cytologie, kultivace, nebo nové, pokročilejší molekulárně-genetické metody – průkaz antigenu, stanovení protilátek, nebo nukleových kyselin (Mašata, 2017).

2.1 Infekce bakteriální

Jako bakteriální vaginózu, (BV) označujeme poruchu mikrobioflóry poševního prostředí. Klesá počet laktobacilů a zvedá se počet jiných anaerobních bakterií, mobilunků, peptostreptokoků a bakteroidů.

Příčiny – mechanika vzniku není prozatím jednoznačně objasněna. BV se dá považovat za dysmikrobii, což je jinými slovy porucha mikroekologie pochvy. Uvádí se několik predispozičních faktorů, kde každý z nich hraje při vzniku BV svou roli a žádný nepřevažuje nad ostatními. Mezi dispoziční faktory patří kouření, obezita, vyšší počet sexuálních partnerů a používání vaginálních výplachů. Mezi rizikové situace pro vznik BV řadíme: menzes, nového sexuálního partnera, styk bez prezervativu, stres nebo deficit železa v krvi. Protektivní účinek byl zaznamenán při užívání hormonální antikoncepce.

Příznaky – postižené pacientky udávají výskyt hojného, vodnatého výtoku a zápachu, který se objevuje především při nechráněném pohlavním styku, naopak chybí bolest, dysurie nebo svědění. Při vaginálním vyšetření nejsou známky tkáňového zánětu. BV se může nicméně podílet na vzniku zánětu dělohy, močových cest i hlubokém pánevním zánětu. Je také rizikovým faktorem předčasného porodu.

Diagnostika – jelikož nemá BV přesně objasněný způsob vzniku a kvůli jejímu polymikrobiálnímu charakteru, může být i její diagnostika velmi složitá. Zakládá se na rozpoznání změn vlastností poševního prostředí. Diagnostiku zakládáme na skupině kritérií, z nichž musí být splněna alespoň tři.

Kritéria znějí následovně:

- homogenní, řídký, ke stěnám přilnavý výtok,
- pH vaginální tekutiny vyšší než 4,5,
- pozitivní aminový test – rybí zápach po alkalizaci,
- přítomnost vaginálních epitelových buněk s adherovanými malými bakteriemi (tzv. klíčové buňky či clue cells).

Jako doplňkové vyšetření se používá kultivační test, který odhalí konkrétní druhy přítomných mikrobů.

Terapie – vhodnou léčbou je podání systémových nebo lokálních antibiotik. Jsou preferovány přípravky s obsahem metronidazolu nebo klindamycinu. Jako podpurná léčba se dá zvolit aplikace probiotik vybraných druhů laktobacilů a tím snížit riziko možné recidivy onemocnění (Špaček, Buchta, Jílek 2013; Mašata, 2017).

2.1.1 Kapavka

Kapavka je čtvrtou nejčastější pohlavně přenosnou chorobou na světě. Nejčastěji postihuje pacienty mezi 15 až 34 lety života, a to bez rozdílu pohlaví. Původcem je gramnegativní bakterie *Neisseria gonorrhoeae*, která napadá povrchy sliznic. Prostupuje do organismu, kde způsobuje hnisavý zánět.

Přenos – k přenosu dochází prostřednictvím pohlavního styku, včetně styku análního a orálního. Může dojít i k vertikálnímu přenosu z matky na dítě při porodu.

Příznaky – inkubační doba onemocnění je obvykle 3-5 dní, ojediněle se příznaky mohou projevit v rozmezí 1-14 dní. Příznaky se u obou pohlaví liší.

U žen probíhá onemocnění mírněji, často asymptomaticky. Běžnými příznaky jsou zánět močové trubice, pálení při močení a časté nutkání k močení. Tyto příznaky jsou ale tak obecné, že mohou být bagatelizovány, či zaměněny s jinými gynekologickými obtížemi. Důležitým příznakem kapavky je výtok, který bývá hnisavý či hlenohnisavý. Může vytékat z děložního hrdla, močové trubice nebo anu. Tento hlen je vhodné odebrat jako vzorek na kultivační vyšetření.

U mužů se projevuje hnisavým zánětem močové trubice, které doprovází pálení a řezání při močení. Objevuje se výtok z močové trubice. Bývá bíložlutě zabarven, je hnisavého charakteru a ústí trubice bývá kvůli zánětu zarudlé.

Diagnostika – nejčastěji se diagnostika provádí za pomoci mikroskopického vyšetření preparátu barveného dle Grama. Diagnóza se pak potvrzuje pomocí kultivace na speciálních půdách, můžeme využít i PCR metod.

Terapie – léčba je povinná, pro všechny nakažené. „*Při zjištění infekce podléhá kapavka povinnému hlášení na tiskopisu „Hlášení pohlavní nemoci“ ÚZIS 0173. Hlášení je povinností každého lékaře, který onemocnění diagnostikuje*“ (Mašata, 2017, s.125). způsob léčby volíme dle formy onemocnění. U nekomplikovaných případů můžeme volit jednorázová antibiotika s intramuskulární aplikací. Pokud má kapavka komplikovanou formu, je třeba pacienta hospitalizovat a podávat mu vysoké dávky antibiotik (Mašata, 2017; Štork, 2008).

2.1.2 Genitální mykoplazmata

Mykoplazmata jsou jednou ze skupin nejmenších a nejjednodušších bakterií, které známe. Většina z nich se v oblasti genitálních sliznic vyskytuje zcela přirozeně. Výjimkou je gramnegativní bakterie – *Mycoplasma hominis*, která způsobuje infekce ženského pohlavního ústrojí.

Přenos – k přenosu dochází nechráněným pohlavním stykem s nakaženou osobou. Možný je také vertikální přenos z matky na dítě, a to buď během těhotenství, nebo během porodu.

Příznaky – tato bakterie způsobuje u žen záněty, a to konkrétně zánět děložní sliznice, vejcovodů a zánět malé pánve. Ty mohou přecházet do chronických zánětů s fibroproduktivními změnami a způsobit neplodnost. Postižené ženy mohou trpět bolestmi v podbřišku a bolestmi při pohlavním styku. V těhotenství může bakterie infikovat plodovou vodu, což může vést k rozvoji septického stavu plodu nebo novorozeneckým infekcím, jako je meningitida či zápal plic.

Diagnostika – k diagnostice používáme vzorek moči, stěr z děložního čípku či vagíny. Vzorky pak zpracováváme pomocí PCR metody, či po staru, pomocí kultivace a mikroskopie.

Terapie – při pozitivním testu nasazujeme antibiotika na 7 dní (Štork, 2008; Vosmík, 1999; Mašata, 2017).

2.1.3 Syfilis

Syfilis je chronické, pohlavně přenosné onemocnění, které je rozšířené po celém světě. Způsobuje ho spirocheta *Treponema pallidum*. Onemocnění má multiorgánový charakter, jelikož může postihovat kůži, svalový a kosterní aparát, oběhový systém i centrální nervový systém. Mívá inkubační dobu 10-90 dní, a pokud se neléčí, může způsobit smrt.

Přenos – k přenosu dochází sexuálním stykem, a to včetně orálního či análního. Možný je i přenos z matky na plod přes placentu, či během kojení (Štork, 2008). Nejrizikovější skupinou jsou lidé s vysokým počtem sexuálních partnerů, drogově závislí, lidé provozující nechráněný styk a homosexuálové.

Příznaky – nemoc se může projevovat velmi širokou škálou příznaků. Hlavní dělení je dle způsobu nákazy na formu vrozenou a získanou. Získaná se poté rozlišuje na několik po sobě následujících stádií. Prvotním příznakem infekce je vznik nebolestivého, tvrdého vředu. Ten přetrvává až pět týdnů a poté většinou samovolně vymizí. Existuje ale i řada dalších příznaků nákazy. Jedná se především o erozivní a vředovité projevy v okolí genitálu či jinde, v závislosti na způsobu přenosu. Následně dochází ke generalizaci onemocnění s rozsevem bakterií po celém těle. Ve třetím stádiu pak pozorujeme většinou protražovaně probíhající poškození různých orgánových systémů, závažné je především poškození kardiovaskulárního systému s častými aneurysmaty ascendentní aorty a dilatací aortální chlopně, a poškození centrálního nervového systému s možným rozvojem progresivní paralýzy s demencí či tabes dorsalis s typickou špatně koordinovanou chůzí.

Průběh – průběh nemoci se liší dle způsobu nákazy a stádia, ve kterém se nemocný právě nachází.

Diagnostika – se zakládá na serologickém vyšetření protilátek, získaných z krve či mozkomíšního moku. Ideální doba pro testy je 4 týdny po rizikovém chování. Další, méně častou, možností je diagnostika pomocí stěru z podezřelého ložiska. Stěr se prohlédne pod mikroskopem, či se použije pro PCR diagnostiku. Tyto metody však mají nižší senzitivitu, oproti serologickému vyšetření.

Terapie – infekce se léčí intramuskulárním podáním vysokých dávek penicilinu. Délka léčby a koncentrace aplikovaných dávek se liší dle závažnosti stavu pacienta. V průběhu léčby se relativně často může objevit tzv. Jarisch-Herxheimerova reakce. Při ní

dochází v důsledku silné aktivace imunitního systému antigenními částmi rozpadajících se bakterií ke vzniku horečky, třesavky, bolesti hlavy, svalů, kloubů a k tachykardii (Mašata, 2017; chůzí, Špaček, Buchta, Jílek, 2013; Resl, 2019; Štork, 2008).

2.1.4 Chlamydie

Infekce chlamydiemi je jednou z nejčastějších pohlavně přenosných nemocí světa. Nejčastěji se vyskytuje u lidí ve věku 15–24 let.

Původce – původcem je bakterie *Chlamydia trachomatis*, která má schopnost pronikat epitelem sliznic urogenitálního traktu. Je známo několik různých sérotypů této bakterie, v České republice se však setkáme většinou se sérotypy D-K. Zbytek sérotypů se vyskytuje hlavně v Africe a Asii, kde vyvolává jiná závažná onemocnění – trachom a lymphogranuloma venereum.

Přenos – k nákaze dochází při nechráněném pohlavním styku, a to při vaginálním, análním i orálním. Je možnost i vertikálního přenosu z matky na dítě během porodu.

Příznaky – u sérotypů D-K je velmi častá latentní infekce. U mužů je až 50 % nakažených bezpříznakových a u žen je to až 80 %. Pokud se příznaky projeví, tak nejčastěji pálením a řezáním při močení, zánětem děložního čípku, vaginálním diskomfortem či bolestí během pohlavního styku. Příznaky se rozvíjí do 3 týdnů od přenosu.

Výjimečně dochází k tzv. Reiterovu syndromu, který se rozvíjí jako imunitní reakce organismu na přítomnost chlamydiových antigenů. Syndrom se projevuje zánětem močové trubice, zánětem oční spojivky, který je většinou jednostranný a zánětem kloubů, který bývá také jednostranný.

Diagnostika – jako vzorek odebíráme moč, stěr z močové trubice nebo děložního čípku. Průkaz provádíme pomocí metody PCR.

Terapie – infekci standardně léčíme pomocí 7 denních antibiotik (Štork, 2008; Vosmík, 1999).

2.2 Infekce mykotické

2.2.1 Kandidóza

Nejčastěji se vyskytující mykotické onemocnění, ať už u mužů, či žen, je kandidóza neboli infekce způsobená kvasinkou *Candida albicans*, či jinými druhy kandid. Samotná *C. albicans* je součástí běžné mikroflóry zažívacího traktu, výjimečně se vyskytne i na kůži,

proto je zdroj nákazy často endogenního charakteru. Po bakteriích jsou kvasinky nejčastějším původcem vaginálních infekcí.

Příčiny – příčiny přispívající k rozvoji kandidózy se dělí do několika skupin. Vznik nemoci může ovlivnit celkový zdravotní stav pacienta, pokud je jeho imunitní systém oslaben. Na závažnější průběh mohou mít vliv i systémová onemocnění, diabetes mellitus, snížená hladina železa v krvi, avitaminóza, malnutrice, věk a velký vliv má i těhotenství. Infekci mohou způsobovat také užívaná léčiva, jako jsou imunosupresiva, steroidy, preparáty obsahující pohlavní hormony či antibiotika. Rovněž hraje roli stav okolní kůže. Riziko vzniku zvyšuje mechanické poškození, jako například popálení, modřiny nebo abraze. Vaginální kandidóza se však vyskytuje často i u žen zcela zdravých.

Přenos – nemoc není přenosná pohlavním stykem, přesto je však riziko výskytu vyšší u sexuálně aktivních žen, jelikož přítomnost ejakulátu zvyšuje pH a tím narušuje přirozený mikrobiom vagíny.

Příznaky – nejvýraznějším příznakem je silné svědění, častý je i výtok, který ale nemusí být ve všech případech. Pokud se vyskytuje, mívá tvarohovitou konzistenci, ale může být i vodnatý či hustý a homogenní. Projevuje se bolestivost pochvy, pálení vulvy, dyspareunie a dysurie, zápach většinou není přítomen. Stydké pysky a vulva jsou oteklé, a na periferiích se někdy tvoří pustuly. Ty nemají folikulární charakter a jsou lokalizovány kolem erodovaných oblastí.

Diagnostika – při podezření na kandidózu se provádí kultivace na Sabouraudově agaru. Tu můžeme doplnit mikroskopickým vyšetřením stěru, kde nátěr obarvíme dle Grama a kvasinky jsou pak grampozitivní.

Terapie – nejčastější a nejvhodnější způsob řešení bakteriální mykózy je používání lokálních antimykotik v podobě krémů nebo tablet. V určitých případech bývá nutné vysadit nebo změnit užívanou hormonální antikoncepci. Doporučuje se nosit prodyšné spodní prádlo a dodržovat správnou hygienu s použitím speciálních intimních mycích gelů (Štork, 2008; Resl, 2019).

2.3 Infekce parazitární

2.3.1 Trichomoniáza

Nejčastější parazitární poševní infekcí je trichomoniáza – onemocnění způsobené prvokem *Trichomonas vaginalis*. Často se vyskytuje v kombinaci s dalšími pohlavními chorobami, jako například s kapavkou či chlamydiemi. Projevuje se záněty urogenitálního traktu s typickým svěděním a výtokem. Velké procento nakažených pacientů však nemá příznaky žádné.

Původce – původcem je bičenka poševní (*Trichomonas vaginalis*), což je pohyblivý parazitický prvok. Jeho výhradním hostitelem je člověk a osidluje primárně urogenitální trakt. U žen je to konkrétně močový měchýř, močová trubice, děložní čípek a vagina. U mužů poté močová trubice, prostata, nadvarlata; mikroorganismus je rovněž přítomen ve spermatu.

Přenos – k přenosu dochází především nechráněným pohlavním stykem a častější je přenos z muže na ženu. Trichomonády jsou schopny po omezenou dobu přežít ve vlhkém prostředí, takže velmi vzácně může dojít k přenosu např. přes toaletní prkénko, v bazénu atp.

Příznaky – se liší v závislosti na pohlaví pacienta. Zhruba polovina žen nemá žádné příznaky a u těhotných žen je bezpříznakových až 80 % infikovaných. Samotná infekce se může projevit až půl roku po nákaze. Většinou se ale symptomy projeví 4.–20. den po nákaze. Rozvíjí se zánět v malé pánvi, který způsobuje zapáchající, pěnivý výtok, který je zabarven buď do bíla, žluta, anebo má zelenou barvu. Spolu s výtokem vzniká i podráždění vnějšího genitálu, kdy dochází k jeho otoku, začervenání a někdy i svědění. Pohlavní styk je bolestivý a může po něm nastat krvácení. Pokud není nákaza dlouhodobě léčena, zvyšuje se riziko nádorových změn na děložním čípku. Pokud k infekci dojde u těhotné ženy, hrozí předčasný porod nebo snížená porodní váha dítěte.

U mužů probíhá infekce většinou asymptomaticky – nemají žádné potíže, ale mohou nakazit své sexuální partnery. Pokud se ale nějaké příznaky vyskytnou, bývá to nejčastěji výtok z močové trubice a začervenání ústí, bolestivé močení a svědění. Výjimečně se objevuje bolest v oblasti šourku, která ukazuje na zánět nadvarlete.

Diagnostika – se nejčastěji provádí pomocí mikroskopie, kultivace či za použití PCR. Jako vzorek se používá moč, výtěr z močové trubice u mužů a stěry z vaginálních stěn u žen.

Terapie – se provádí za použití antibiotik, konkrétně metronidazolu. Důležité je po dobu léčby dodržovat sexuální abstinenci, nebo alespoň používat prezervativ z důvodu zamezení opakované nákazy mezi partnery. Během léčby metronidazolem je také striktně zakázáno pít alkohol (Štork, 2008; Vosmík, 1999; Mašata 2017).

2.4 Infekce virové

Jako původce virové vaginální infekce označujeme většinu virových sexuálně přenosných onemocnění, známých také pod zkratkou STD a infekci poxviru, která může být také přenosná stykem.

2.4.1 Herpes genitalis

Jedná se o pohlavně přenosné onemocnění způsobené virem *Herpes simplex* (HSV). Herpetické nákazy mají tendence vyvolávat spíše subklinické než manifestní nákazy. Virus se dělí na dva sérotypy. První z nich, sérotyp HSV-1, primárně napadá rty, ústa, jazyk, hltan a oči. Druhý sérotyp, HSV-2, způsobuje především infekce genitální a neonatální. HSV infekce velmi často způsobuje vulvární bolesti a je také nejčastější příčinou vzniku bolestivých puchýřků a ulcerací genitálu.

Příznaky – klinický obraz je ovlivněn typem viru a hostitelem. U pacientů s primárním herpesem se velmi často vyskytuje teplota, únava, bolest svalů a zad. Genitální herpes se projevuje typickou herpetickou vyrážkou. První se objevují drobné, nebolestivé puchýřky, které postupně přecházejí v pustulky s rudým okrajem. Ostatní příznaky, jako zarudnutí, svědění a bolestivost se objevují zhruba 1-2 dny před výskytem typické vyrážky. Vylučování viru trvá dva až tři týdny. U více než třetiny postižených pacientů se objevují neurologické příznaky.

Diagnostika – je založena na stěru ze spodiny léze. Je možnost k vyhodnocení použít metodu PCR, průkaz antigenu HSV pomocí fluorescenčních metod či serologické testy z průkazu protilátek.

Terapie – léčba má za následek zkrácení doby hojení a vylučování viru. Obvykle se používají orálně podávaná antivirotika, ve vážnějších případech se přistupuje k podání léčiv intravenózně s možnou hospitalizací pacienta. Virus však přetrvává v hostiteli trvale a onemocnění se může při oslabení hostitele reaktivovat – dochází k opětovnému výsevu bolestivých puchýřů (Mašata, 2017; Špaček, Buchta, Jílek, 2013).

2.4.2 Lidský papilomavirus

Condylomata accuminata, známější pod pojmem genitální bradavice, řadíme mezi nejnakažlivější sexuálně přenosné choroby. Nejvíce jsou tímto onemocněním postiženi jedinci ve věku 20–24 let. Způsobuje je infekce *lidskými papilomaviry* (HPV) a nejčastěji se vyskytují okolo řitního otvoru a v oblasti genitálu.

Původce – za vznikem onemocnění stojí lidský papilomavirus, který napadá keratinocyty, které se nacházejí buď na kůži, nebo na sliznicích. V buňkách se usídluje a dle svého podtypu způsobuje buď vznik maligních nádorů, nebo vznik benigních lézí, konkrétně různých typů bradavic. Dle schopnosti vyvolávat nádorové změny rozdělujeme HPV do dvou hlavních skupin, a to na low-risk HPV, které představují menší riziko pro vznik maligních nádorů a spíše jsou příčinou vzniku různých benigních lézí včetně kondylomat, a high-risk HPV, kde je riziko vzniku zhoubného nádorového onemocnění vysoké.

Přenos – k nákaze dochází kontaktem kůží nebo sliznic, které jsou porušené, či oslabené. Ojedinelá však není ani nákaza přes neporušenou tkáň, jelikož genitální bradavice jsou vysoce infekční. K přenosu může dojít i při porodu z rodičky na dítě, při průchodu dítěte porodními cestami. Pokud hrozí riziko nákazy tímto způsobem, je porod veden císařským řezem.

Příznaky a průběh – bradavice se vyskytují v celé anogenitální oblasti. U mužů je můžeme najít na penisu, žaludu, předkožce, ústí močové trubice a vyskytují se i na šourku. U žen se objevují na stydkých pyscích, vulvě, ve vagině i na děložním čípku. Nezávisle na pohlaví je můžeme nalézt v oblasti análního otvoru, dále pak v dutině ústní, pokud došlo k nákaze orálním stykem. Při onemocnění se tvoří narůžovělé flíčky, pupeny až větší květákovité útvary a vyskytují se zásadně ve větším množství. Vzniklé vřídky jsou nebolestivé, ale mohou způsobovat svědění.

Terapie – je možná hned několika způsoby, z nichž žádný ale nezaručuje to, že se kondylomata již neobjeví. Ze studií vyplývá, že u 10-20 % pacientů nastává relaps i přes naprosté odstranění kondylomat. Nejčastěji se využívá kryoterapie, při níž se aplikuje tekutý dusík přímo na bradavici. Ta se vlivem prudké změny teplot samovolně odloučí od kůže. Tento postup je třeba několikrát opakovat pro zvýšení léčebného účinku. Další možnou terapií je využití elektrokauteru a v těžších případech se přistupuje k chirurgickému odstranění (Mašata, 2017; Špaček, Buchta, Jílek, 2013).

3 PATOLOGIE CERVIXU

3.1 Záněty

Zánět děložního hrdla (cervicitis) je časté onemocnění. Může být buď izolované, kdy postihuje pouze děložní krček, nebo může postihovat i pochvu a způsobit tak cervikovaginitidu.

Příčiny – Cervicitis může mít infekční i neinfekční příčinu v závislosti na způsobu vzniku a přítomnosti patogenu. Rozlišení původu na infekční a neinfekční není vždy jednoduché.

Mezi infekční příčiny řadíme původce pohlavně přenosných chorob, například chlamydie (2.1.4), trichomoniázy (2.3.1), HPV virus (2.4.1), mykoplazmata (2.1.2) a kapavku (2.1.3). V těchto případech se riziko nákazy zvyšuje s rizikovým životním stylem, tedy promiskuitou a nepoužíváním bariérových ochranných prostředků při styku.

Mezi neinfekční příčiny řadíme chemické a mechanické podráždění a také alergické reakce. Zánět může způsobit podráždění, vyvolané vaginálními výplachy, či zavedené nitroděložní tělísko. Spouštěčem může být i přítomnost cizího tělesa v pochvě, například zavedený tampon. Z alergií jsou nejčastější alergie na latex nebo spermicidní gely. Počet neinfekčních zánětů je výrazně vyšší u žen po přechodu. V tomto období dochází k poklesu hladiny pohlavních hormonů, a tím ke snížení kvality sliznic genitálu a snadnému vzniku podráždění vedoucího k zánětlivým změnám.

Příznaky – příznaky odpovídají obecným příznakům zánětu v této oblasti. Jedná se o bolesti podbřišku, které se mohou zhoršovat při pohlavním styku. Dochází k výtoku a někdy až ke krvácení. Ve vážných případech se mohou vyskytnout i horečky.

Diagnostika – pro nejednoznačné příznaky je nutné, aby gynekolog provedl klasické vyšetření a zkontroloval stav pochvy a děložního krčku. Odeberou se stěry na mikrobiologické vyšetření a krev pro serologické testy. Zásadní je odběr anamnézy, kvůli zjištění rizikového chování pacientky.

Terapie – dle původce zánětu volíme léčbu vhodnými celkovými antibiotiky nebo antivirotiky. Je důležité také přeléčit sexuálního partnera, aby nedošlo k reinfekci. U neinfekčních příčin zánětu je řešením odstranit iritující agens, při alergické reakci lze kromě vyhýbání se alergenům užít antihistaminika (Pilka, Procházka, 2012).

3.2 Nádory

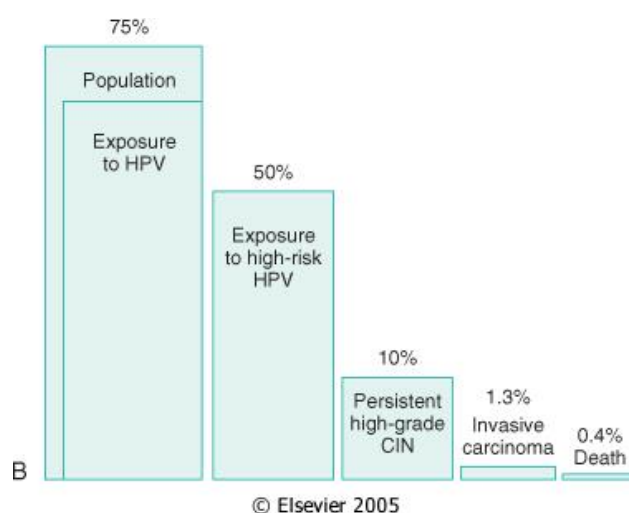
Nádory děložního čípku vznikají především z vícevrstevného nerohovějícího dlaždicového epitelu ektocervixu, o něco vzácnější jsou pak nádory vycházející z kolumnárního cylindrického epitelu endocervixu. Nejvíce rizikovým faktorem pro jejich vznik je infekce HPV (Balko, Tonar, Varga, 2017).

3.2.1 HPV

Virus lidského papilomaviru je nejvýznamnějším etiologickým agens vzniku karcinomu děložního hrdla. Kromě toho způsobuje také celou řadu dalších maligních i benigních lézí na genitálech, ať už ženských či mužských, dále nádory v oblasti dutiny ústní a hrtanu. K dnešnímu dni je známo více než 100 typů viru HPV.

V oblasti čípku děložního virus nejnáze infikuje nezralé hostitelské buňky v oblasti transformační zóny, kde se reprodukuje, ovlivňuje funkce tumor supresorových genů a mění buněčný cyklus. Těmito způsoby ovlivňuje buňky natolik, že nejsou schopny regulovat svůj růstový cyklus, nekontrolovaně proliferují a vzniká nádorové bujení z epitelových buněk. Většina populace se s virem HPV během svého života setká, ale díky obranyschopnosti imunitního systému infekce proběhne bez příznaků – u většiny nakažených infekce samovolně vymizí a jen u malého procenta nakažených se projeví příznaky, či vznikne nádorová proliferace.

Graf 1: přibližný podíl populace, která během života přijde do styku s HPV a u které se projeví různé závažné příznaky



Převzato z: ROBBINS AND COTRAN PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE, 7TH EDITION, Damjanov, 2005

Rizikové faktory – riziko infekce virem HPV zvyšuje brzký začátek sexuálního života, vyšší počet sexuálních partnerů, promiskuita bez užívání bariérových ochranných prostředků, dlouhodobé užívání hormonální antikoncepce, snížená imunita, zhoršený výživový stav.

Přenos – virus HPV se přenáší nechráněným pohlavním stykem s nakaženou osobou.

Příznaky – nákaza je bezpříznaková. Pokud se příznaky vyskytnou, souvisí většinou již s rozvíjejícím se nádorovým procesem, proto má velký význam gynekologický screening, který odhalí premaligní léze či invazivní nádory v počátečních, dobře léčitelných stádiích, které dosud nemají žádné symptomy. I u premaligních lézí či u méně pokročilých invazivních nádorů se však mohou projevovat příznaky jako bolest, vyskytující se během nebo po pohlavním styku, neobvyklý výtok či krvácení mimo cyklus. Pokud je nádor již značně pokročilý, příznaky odpovídají rozsáhlému malignímu procesu, kromě bolestí v podbříšku a krvácení se objevuje i únava, kachexie či anémie.

Očkování – nádory děložního krčku způsobené virem HPV představují nádorové onemocnění, proti kterému je k dispozici účinné očkování. Lze očkovat dívky i chlapce před začátkem pohlavního života, možno je ale očkování i po jeho zahájení (Mašata, 2017; Balko, Tonar, Varga, 2017; Dajmanov 2005).

3.2.2 Prekancerózy

Prekancerózy jsou preinvazivní léze, u nichž existuje riziko přechodu v maligní invazivní nádor. Pojmem CIN označujeme cervikální intraepitelové neoplázie, které jsou prekurzorem dlaždicobuněčných zhoubných nádorů děložního krčku. Prekurzorovou lézí pro vznik adenokarcinomu je adenokarcinom in situ (AIS).

Díky pochopení spojitosti mezi výskytem infekce HPV a výskytem karcinomu děložního hrdla, se způsob detekce intraepiteliálních neoplastických změn výrazně proměnil. Byla zavedena prevence v podobě odběru cytologických stěrů a případně průkazu přítomnosti HPV ve vzorcích z cervixu.

Detekce – virus HPV má více než 100 známých variant. Většinu karcinomů děložního hrdla způsobují vysoce rizikové typy 16 a 18. S lézemi děložního čípku se spojují také níže rizikové typy 6 a 11, které ale nejsou karcinogenní a způsobují pouze benigní léze, jako jsou např. genitální kondylomata.

Intraepiteliální neoplázie mohou vznikat buď v dlaždicovém epitelu, poté je v rámci cytologických vyšetření značíme jako LSIL (low-grade squamous epithelial lesion, intraepiteliální léze s dysplázií nízkého stupně) a HSIL (high-grade squamous epithelial lesion, intraepiteliální léze s dysplázií vysokého stupně), zatímco při histologickém vyšetření se používá kromě výše zmíněné terminologie též označení CIN I-III (cervikální intraepiteliální neoplázie s dysplázií nízkého (I), středního (II) či vysokého (III) stupně), přičemž CIN I odpovídá LSIL a CIN II a III se řadí mezi HSIL, nebo ve žlázovém epitelu endocervixu, a poté je označujeme jako GIN (glandulární intraepiteliální neoplázie) a AIS (adenokarcinom in situ). K detekci se využívají dvě metody, a to kolposkopie a cytologie. Kolposkopie je optická metoda, která se využívá přímo v ordinaci gynekologa. Tato metoda umožňuje zhodnotit, jak vypadá čípek, popřípadě vyskytující se léze. Kolposkopické nálezy dělíme na normální a abnormální. Při tomto vyšetření je možné také odebrat vzorky na histologické vyšetření.

Cervikální intraepiteliální neoplázie s dysplázií nízkého stupně – CIN I

Jako CIN I označujeme lehké jaderné změny, které postihují pouze bazální 1/3 tloušťky dlaždicového epitelu. U většiny nálezů nemá tento stupeň tendence se zhoršovat, naopak může časem samovolně vymizet, a to především u pacientek mladších 23 let. Pouze malá část diagnostikovaných CIN I může v průběhu let přejít do stupně II-III.

Tabulka 1: prognózy onemocnění intraepiteliálními neopláziemi

TABLE 22.2 Natural History of Squamous Intraepithelial Lesions With Approximate 2-Year Follow-Up

Lesion	Regress	Persist	Progress
LSIL	60%	30%	10% to HSIL
HSIL	30%	60%	10% to carcinoma ^a
<i>HSIL, High-grade squamous intraepithelial lesion; LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion.</i>			

Převzato z: Robbins and Contran Pathologic basis of disease, 7th Edition, Damjanov, 2005

Cervikální intraepiteliální neoplázie s dysplázií středního a těžkého stupně – CIN II, CIN III

Jako CIN II a CIN III označujeme neoplázie vyššího stupně, které jsou přímým předstupněm invazivního karcinomu. Při diagnóze CIN II je dysplázií zasažena polovina tloušťky dlaždicového epitelu. Při diagnóze CIN III jsou těžkou dysplázií zasaženy 2/3 až celá tloušťka epitelu.

Léčba – u CIN I se volí nejdříve jen sledování pacientky s častějšími kontrolami, nálezy s dysplázií vysokého stupně jsou již indikované ke konizaci, tedy chirurgickému odstranění části cervixu s neoplastickými změnami. (Pilka, Procházka, 2012; Dajmanov 2005).

3.2.3 Epitelové nádory

Epitelové nádory děložního krčku dělíme na benigní a maligní. Benigní nádory se vyskytují vzácně a řadíme mezi ně například dlaždicobuněčný papilom, fibroepiteliální polyp, condyloma accuminatum a mülleriánský papilom, který se vyskytuje u dětí.

V kategorii maligních nádorů převažují dva druhy nádorů, a to dlaždicobuněčný karcinom a adenokarcinom. Ve státech, kde je prováděn screening onemocnění děložního krčku, je nižší incidence invazivních dlaždicobuněčných karcinomů, ale dochází ke zvýšení incidence adenokarcinomů. Kromě adenokarcinomů a dlaždicobuněčných karcinomů se zde velmi vzácně může vyskytnout adenoidně bazální karcinom, adenoidně cystický karcinom, adenoskvamózní karcinom či nádory s neuroendokrinní diferenciací.

Dlaždicobuněčný karcinom – jedná se o nejčastější nádor děložního krčku, vyskytuje se v přibližně 60–80 % případů. Většina nádorů vzniká v oblasti transformační zóny hrdla. Invazivní dlaždicobuněčný karcinom se vyvíjí z prekursorových lézí (HSIL). V počátečních stádiích se označuje jako mikroinvazivní dlaždicobuněčný karcinom, který je charakteristický pouze několikamilimetrovými rozměry a minimální invazivní komponentou. Dlaždicobuněčný karcinom můžeme rozdělit na několik histologických podtypů. Jedná se např. o rohovějící a nerohovějící varianty karcinomu, které jsou poměrně časté, a dále o verukózní, bazaloidní, papilární, kondylomatózní a jiné varianty, které jsou vzácnější.

Adenokarcinom – může se vyskytovat ve více typech a představuje 10–15 % karcinomů v této oblasti. „Jedná se o heterogenní skupinu nádorů charakterizovaných glandulární diferenciací, které jsou ve většině případů (asi v 85 %) také asociované s HPV

infekcí.“ (Zámečník, 2019. str.619). Adenokarcinomy dělíme podle jejich mikroskopické stavby na několik podtypů. Nejčastěji se vyskytuje tzv. *obvyklý typ endocervikálního adenokarcinomu*, který se vyskytuje až v 90 % případů, a je asociovaný s infekcí high-risk typu HPV. Zbýlých 10 % tvoří ostatní typy karcinomů, jako například gastrický typ adenokarcinomu, který nemá spojitost s HPV infekcí. Další méně časté typy nádorů jsou např. mucinózní karcinom, mucinózní karcinom z prstenčitých buněk a mucinózní karcinom blíže nespecifikovaný. Mohou se také vyskytnout endometroidní, světllobuněčný a serózní karcinom. Tyto typy jsou však velmi vzácné a nejsou spojovány s HPV infekcí (Čepický, 2018; Zámečník, 2019).

3.2.4 Mezenchymální nádory

Nejčastěji se vyskytujícím benigním mezenchymálním nádorem děložního krčku je leiomyom. V cervixu je však, oproti leiomyomům těla děložního, vzácný. Je to benigní měkkotkáňový nádor diferencující směrem do hladké svaloviny. Děložní leiomyomy jsou hormondependentní a mohou se proto zvětšovat během produktivního věku ženy. Jsou-li mnohočetné, mohou výrazně deformovat tvar dělohy, způsobovat bolestivou menstruaci a problémy s početím, udržením těhotenství i porodem. Ostatní druhy benigních nádorů jsou také vzácné, jedná se např. o rhabdomyom, lipom, neurofibrom a schwannom.

Maligní mezenchymální nádory se vyskytují jen velmi vzácně. Nejčastěji se vyskytujícím mezenchymálním nádorem děložního krčku je leiomyosarkom. Dále se může vyskytnout adenosarkom, což je vzácný typ nádoru děložního čípku. Je tvořený benigní epitelovou a maligní mezenchymální složkou. Velmi vzácně se mohou vyskytnout nádory, jako je embryonální rhabdomyosarkom, nediferencovaný endocervikální stromální sarkom a endometriální stromální sarkom. Ostatní typy nádorů, jako je angiosarkom, alveolární sarkom měkkých tkání a ostatní typy nádorů se vyskytují jen ojediněle. Raritní je i výskyt lymfomů, které do oblasti děložního krčku nejčastěji infiltrují z okolí. (Čepický 2018; Cibula, Petruželka, 2019).

4 PATOLOGIE ENDOMETRIA

4.1 Funkční změny

Když žena pohlavně dospěje, objeví se u ní menstruační cyklus. Tímto pojmem označujeme pravidelné změny děložní sliznice, které se opakují každých 28 dní. Nejviditelnější jsou změny na *stratum functionale*. Cyklus dělíme na následující čtyři fáze:

Menstruační fáze – v této části cyklu dochází k odloučení celé funkční vrstvy endometria a nastává krvácení. Ke konci fáze dochází již k zahájení regenerace povrchového epitelu proliferací žlázek ze *stratum basale*. Menstruační fáze trvá obvykle 3–5 dní.

Proliferační fáze – se vyznačuje nárůstem sliznice až do výšky 3 mm. Nachází se zde žlásky, které jsou rovné, s úzkým lumen a jejich buňky mají tmavou cytoplazmu. Tato fáze trvá až do ovulace, tedy do cca 14. dne cyklu.

Sekreční fáze – dochází k nárůstu výšky sliznice, a to až na 6–7 mm. Vrstva *stratum functionale* se rozděluje na dvě další vrstvy. Luminálně je *stratum compactum*, které je úzké a při malém zvětšení v mikroskopu tmavšího vzhledu. Druhá vrstva, *stratum spongiosum*, je široká vrstva s dlouhými žlázkami, které se stáčejí. Žlásky mají široké lumen a světlý epitel, dochází zde k mukózní sekreci. V buňkách endometriálního stromatu se v této fázi ukládá glykogen. Tato fáze trvá přibližně od 15. do 26. dne.

Ischemická fáze – pro tuto fázi je typická krátkodobá kontrakce cév, kterou způsobují hormonální změny. Tato kontrakce vede k nedokrvení, poškození cévních stěn a popraskání přítomných kapilár. Tato fáze probíhá 27.–28. den cyklu.

Pokud je tento pravidelný cyklus nějakým způsobem narušen, je nutno provést vyšetření a odhalit příčinu.

4.1.1 Absence cyklu

Vynechání cyklu může být způsobeno jak fyziologickými, tak patologickými příčinami. Fyziologickými příčinami přerušování cyklu jsou menopauza a těhotenství. Jiné příčiny spontánního vymizení cyklu, jako například absence funkčního endometria nebo hypoestrismus, jsou vzácné. Těhotenství prokážeme pomocí vyšetření moči, krve a za použití ultrazvuku. Pokud se těhotenství neprokáže, volí se hormonální léčba (progesteron injekčně) a menstruace by se pak měla dostavit za 4–14 dní. Při pokračující absenci cyklu je třeba vyšetření opakovat a případně indikovat vyšetření další (Čepický, 2018).

4.1.2 Odchylky cyklu

Cyklus může vykazovat řadu nepravidelností. Poruchy rytmu a intenzity cyklu jsou často způsobené hormonálními poruchami i některými systémovými chorobami. Při krvácení mimo cyklus (metroragii) je nutné vyloučit nehormonální příčiny, jako je například nádor, endometritida či trauma. Vyšetření provádíme pomocí gynekologických zrcadel, palpací a ultrazvukem. Samotné krvácení je třeba zastavit podáváním estrogenů a progesteronu, abychom předešli anémii. Pokud krvácení nepřestane, je příčina nehormonální a vyšetření je třeba opakovat, případně provést další, např. PCR test na chlamydie či kapavku (Čepický, 2018).

4.2 Endometrióza

Endometrióza je onemocnění, při kterém se děložní žlázy a stroma nacházejí mimo děložní sliznici. Není zcela jasné, jak endometrióza vzniká, může se jednat o odchylku vznikající během embryonálního vývoje či změny způsobené retrográdní menstruací tubami do dutiny břišní. Nejčastěji se vyskytuje na vaječnicích, kde způsobuje vznik cyst, dále též ve vejcovodech a děložní svalovině, na povrchu střeva či na pobřišnici, vzácněji i ve vzdálenějších lokalizacích jako lymfatických uzlinách, játrech či plicích. Tato ložiska stejně jako děložní endometrium prochází menstruačním cyklem a způsobují typické cyklické příznaky, jako jsou bolest v pánevní oblasti a silná, bolestivá menstruace (Balko, Tonar, Varga, 2017; Mačák, Mačáková, 2022).

4.3 Záněty

Zánět endometria označujeme termínem endometritida. Jedná se o infekci endometria, která může přejít v infekci myometria a okolních tkání. Endometritidu můžeme dělit na porodnickou a neporodnickou.

Příčiny – endometritida nejčastěji vzniká jako následek ascendentně se šířící infekce genitálu. Často se vyskytuje společně s chlamydiovou infekcí či bakteriální vaginózou. Může se vyskytnout i po porodu, kdy jsou narušeny přirozené imunitní bariéry normálně zabraňující průniku infekce až do dutiny děložní, přičemž častěji se vyskytuje po císařském řezu.

Příznaky – běžnými příznaky jsou silné horečky, které v případě porodnické endometritidy nastupují obvykle 36 hodin po porodu. K horečkám si přidávají ještě bolesti v podbřišku a zapáchající výtok. Při neporodnické endometritidě se vyskytuje také abnormální krvácení, výtok a bolest při pohlavním styku.

Diagnostika – k diagnostice používáme kultivační metody. Dále se používají zobrazovací metody, jako například ultrasonografie, především pokud pacientka nereaguje na antibiotickou léčbu.

Léčba – při mírnějším průběhu onemocnění stačí nasadit perorální antibiotickou léčbu. Pokud je průběh závažnější, je pacientka hospitalizována a podívají se jí antibiotika intravenózně. Zlepšení zdravotního stavu pacientek nastává 48–27 hodin po zahájení léčby. Ve velmi těžkých případech je pro záchranu života pacientky nutné provést hysterektomii (Pilka, Procházka, 2012).

4.4 Hyperplázie endometria

Pojmem hyperplázie označujeme zvýšený růst buněk endometria, kdy dochází ke zmnožení žlázoého epitelu a stromatu. Dochází k poruchám uspořádání žlázek a mohou se vyskytovat cytologické atypie. Tato diagnóza je klinicky významná, jelikož u ní v některých případech hrozí progresse v endometroidní adenokarcinom děložního těla.

Hyperplázii endometria dělíme do dvou hlavních skupin:

- Prostá hyperplázie – reaktivní změna, není prekancerózou. Buňky jsou sice zmnožené, ale nejsou dysplastické.
- Atypická hyperplázie – prekanceróza s možností přechodu v endometroidní endometriální adenokarcinom. V proliferujících buňkách dochází k akumulaci genetických alterací, což vede ke vzniku dysplázie a časem případně i invazivní nádorové léze. *„Riziko vzniku adenokarcinomu u neléčené atypické hyperplázie je kolem 30 %.“ (Byun JM, Jeong DH, Kim YN, Cho EB, Cha JE, Sung MS, Lee KB, Kim KT, 2015).*

Příčiny – ke vzniku hyperplázie vede stimulace endometria estrogeny, která není vyvážená stimulací gestageny. Zvýšená produkce estrogenů může nastat při chronické anovulaci, která se sdružená se syndromem polycystických ovarií, nebo perimenopauzálně. Příčinou může být i obezita, kdy se estrogeny tvoří v tukové tkáni. Další příčinou mohou být ovariální tumory produkující estrogeny. Hyperplázii lze zapříčinit i nevhodným podáváním léků, tedy při podáváním exogenních estrogenů bez progesteronu. Dlouhodobá hormonální léčba karcinomu prsu také zvyšuje riziko hyperplázie a adenokarcinomu endometria.

Příznaky – nejčastěji se vyskytujícím příznakem je abnormální krvácení. Menzes může být buď prodloužená a silnější než obvykle nebo může být nepravidelná. Objevuje se také krvácení mimo cyklus a krvácení po menopauze.

Diagnostika – provádí se ultrasonografické zobrazovací vyšetření, nejvhodnější a nepřesnější diagnostickou metodou je provedení hysteroskopie s kyretáží a oděrem bioptického vzorku z podezřelých míst děložní dutiny.

Terapie – léčebný postup závidí na mnoha faktorech. Musíme vzít v úvahu sílu a typ krvácení, přítomnost cytologických atypií a chirurgická rizika. Hyperplázie bez atypií může být léčena použitím gestagenů (progesteronu). U rizikových nálezů je indikované odstranění dělohy, kdy bereme v potaz vysoké riziko vzniku endometriálního adenokarcinomu (Pilka, Procházka, 2012; Mačák, Mačáková, 2022).

4.5 Nádory

Benigní epitelové nádory se v těle děložním vyskytují jen ojediněle, nejčastějšími epitelovými nádory jsou karcinomy. Benigní mezenchymální nádory v podobě leiomyomu jsou naopak velmi časté. Častou prekurzorovou lézí karcinomu je atypická hyperplázie endometria. Nádory mohou při svém růstu proniknout do děložní stěny a dále se šířit i do okolních orgánů a tkání. (Čepický, 2018; Mačák, Mačáková, 2022).

4.5.1 Prekancerózy – atypická hyperplázie, serózní intaepiteliální karcinom

Četnost nálezu prekancerózy endometria má lehce stoupající tendenci. Nejčastěji toto onemocnění nacházíme u žen ve věku 50–60 let.

Atypická hyperplázie – atypická hyperplázie je prekancerózou pro karcinom endometria I. typu (více viz 4.5.2). Tento nález nejčastěji nacházíme u žen v období perimenopauzy. Podle stavby můžeme hyperplázii dělit na simplexní atypickou hyperplázii s relativně pravidelně uspořádanými žlázkami, a komplexní atypickou hyperplázii se žlázkami výrazně hyperplastickými, desorganizovanými a větvenými. Rizikovým faktorem pro vznik atypické hyperplázie je vysoká hladina estrogenů. Příznaky ukazující na atypickou hyperplázii jsou krvavý výtok a nepravidelné děložní krvácení, vzácně se můžou vyskytnout i křeče. Průběh může být i bezpříznakový, kdy hyperplázii prokazujeme až ultrazvukovým vyšetřením, nebo ji zachytí cytologický nález (atypických) endometriálních buněk (Cibula, Petruželka, 2009).

Serózní intraepiteliální karcinom – jedná se o typ prekancerózy pro serózní adenokarcinom endometria. Typickým morfoloogickým znakem pro serózní intraepiteliální karcinom jsou výrazné jaderné atypie v povrchovém epitelu a žlázkách (Dundr, 2012).

4.5.2 Adenokarcinomy I. a II. typu

Podle biologických, molekulárně genetických a histologických kritérií můžeme karcinomy endometria dělit na dva základní druhy, a to na karcinomy I. a II. typu.

I. typ – do této kategorie spadá asi 80 % všech zhoubných nádorů děložní sliznice. Radíme sem hormonálně dependentní nádory, které bývají asociované s hyperestrinismem. Často vznikají v terénu atypické hyperplázie endometria. Ke karcinomům I. typu se váží některé rizikové faktory, mezi ně patří například věk, pozdní menopauza, obezita, diabetes mellitus, léčba estrogeny a roli mají i genetické faktory. Tento typ adenokarcinomu mívá příznivou prognózu.

II. typ – do této kategorie spadá zbylých 20 % karcinomů endometria. Jedná se většinou o papilární serózní karcinomy, které se vyvíjejí v endometriálních polypech s intraepiteliální hyperplázií, v terénu atrofického endometria. Tato skupina má nejasnou patogenezi, avšak častá je mutace genu *TP53*. Prognóza není příznivá. Nejčastěji se vyskytuje u starších žen, které nemají rizikové faktory pro adenokarcinom I. typu.

Adenokarcinom endometria je častější u žen z rozvinutých zemí. Může se vyskytnout u žen během fertilního období, ale častější je během postmenopauzálního období. Průměrný věk pacientek, u kterých se vyskytne tento typ nádoru je 50–59 let.

Příčiny – jelikož většina adenokarcinomů vychází především z atypické hyperplázie endometria, je většina příčin popsána v kapitole 4.4. Z příčin, které nemají s hyperplázií spojitost, lze uvést kouření, kdy ženy s rakovinou plic, tedy nádorem s kouřením silně asociovaným, mají 2 – 3x vyšší riziko vzniku endometriálního adenokarcinomu. U žen s hereditárním nepolypózním karcinomem tlustého střeva je rovněž riziko adenokarcinomu výrazně vyšší.

Příznaky – jelikož většina pacientek se nachází v postmenopauzálním období, je prvotním příznakem krvácení. Samotné krvácení může mít širokou škálu příčin, ale je nutné vyloučit právě adenokarcinom.

Terapie – po provedení vyšetření a určení závažnosti a rozsahu nádoru je zvolena vhodná léčba. Tou bývá laparotomická či laparoskopická abdominální hysterektomie,

eventuálně s bilaterální salpingo-oophorektomií, appendektomií, omentektomií a peritoneálním výplachem s odběrem materiálu pro cytologické vyšetření. Po chirurgickém zákroku lze použít adjuvantní chemoterapii či radioterapii (Cibula, Petruželka, 2009; Pilka, Procházka, 2016).

5 CERVIKÁLNÍ SCREENING A CYTOLOGICKÁ KLASIFIKACE BETHESDA

5.1 Cervikální screening

Pod pojmem screening rozumíme systematické vyhledávání nemoci u jedinců, kteří nevykazují příznaky. Hlavním cílem je včasné odhalení vznikajícího onemocnění, rychlé nasazení léčby a snížení úmrtnosti. Léčba preinvasivních lézí a časných stádií maligních nádorů je navíc pro pacientky méně mutilující a ve většině případů lze dosáhnout plného vyléčení. V České republice máme zavedený preventivní program screeningu karcinomu děložního hrdla, dále probíhá screening karcinomu prsu a kolorektálního karcinomu.

Plošný screening je hrazen pro všechny ženy starší 15 let. Pacientky jsou pravidelně vyšetřovány při každoroční gynekologické prohlídce, kde se kromě ostatních, běžných vyšetření provede i stěr z děložního hrdla. Vzorky se poté zasílají do specializované certifikované cytologické laboratoře, kde jsou metodicky zpracovány a vyhodnoceny. Pokud je výsledek negativní, je další odběr indikován za rok, při další preventivní prohlídce. V 35 a 45 letech je navíc v rámci screeningu hrazena typizace HPV, která má za cíl zachytit pacientky s přetrvávající infekcí high-risk typu HPV, zatím i bez léze detekovatelné cytologicky a kolposkopicky (Hamplová, 2019; Cibula, Petruželka, 2019).

5.2 Cytologická klasifikace Bethesda

Jedná se o reevaluovanou cytologickou klasifikaci, která se používá pro komplexní zhodnocená preparátů dle pevné metodiky. Hodnotíme kvalitu stěru včetně přítomnosti či absence buněk transformační zóny i jiných ukazatelů kvality, jako je přítomnost krve nebo zánětu, samotný cytologický nález a hormonální stav pacientky, standardní zápis obsahuje i závěr a doporučení od cytopatologa. Všeobecně se dají nálezy kategorizovat následovně:

Do první skupiny spadají vzorky negativní, bez nálezů intraepiteliálních lézí nebo malignit (NILM, negative for intraepithelial lesion and malignancy). Skupinu dále dělíme na několik podkategorií, první z nich jsou nezávažné nenádorové nálezy, které nejsou povinně hlášeny. Jedná se o nálezy jako jsou atrofie, metaplázie, záněty, keratózní změny nebo změny spojené s těhotenstvím. Dále do této kategorie řadíme nálezy mikroorganismů, může se jednat například o kandidy, kokobacily, chlamydie, trichomonády či cytopatický efekt vyvolaný přítomností viru HSV atp. Poslední podkategorií jsou jiné, potenciálně alarmující nálezy, jako jsou endometriální buňky u žen nad 45 let. Tento nález může souviset

s patologickým procesem probíhajícím v endometriu a žena by měla podstoupit další vyšetření cílená na dutinu děložní. Případy spadající do této skupiny mohou po odečtení uzavřít laboranti-screeneři bez konzultace s lékařem.

Do druhé skupiny spadají abnormality epiteliálních buněk, které dělíme podle toho, na kterých buňkách se tyto atypie projeví. Abnormality dlaždicových (skvamózních) buněk dělíme následovně:

- Atypie dlaždicových buněk, tedy nález atypických elementů, které mohou odpovídat pouhým reaktivním změnám (například při zánětu), ale mohou též značit nádorovou transformaci buněk. Nejsou však splněny podmínky pro jistou klasifikaci těchto elementů jako LSIL, HSIL či invazivní nádor.
 - ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance, atypické dlaždicové buňky se změnami nejasného významu)
 - ASC-H (atypical squamous cells – cannot exclude HSIL, atypické dlaždicové buňky – nelze vyloučit high-grade lézi)
- LSIL (skvamózní intraepiteliální léze s dysplázií nízkého stupně), tedy nález atypických dlaždicových buněk z povrchových a středních vrstev epitelu, s atypii jader a jejich zvětšením (průměr jader více než třikrát větší než průměr jader normálních dlaždicových buněk ze střední vrstvy epitelu), typický je též nález tzv. koilocytózy, tedy projasnění cytoplazmy kolem jader způsobené cytopatickým efektem HPV. Tato kategorie odpovídá histologickému nálezu CIN I.
- HSIL (skvamózní intraepiteliální léze s dysplázií vysokého stupně), tedy nález nezralých malých atypických dlaždicových buněk s výraznými jadernými atypii a redukovanou cytoplazmou, průměr jader v takových buňkách představuje minimálně polovinu průměru celé buňky. Tato kategorie odpovídá histologickému nálezu CIN II-III.
- Dlaždicobuněčný karcinom: tento závěr se používá při nálezu těžce dysplastických pleomorfních skvamózních buněk se známkami invaze, jimiž může být například přítomnost tzv. nádorové diatézy na pozadí, tedy nekrotické buněčné debris a rozpadajících se krevních elementů.

Abnormality žlázových buněk lze zachytit na buňkách endocervikálních i endometriálních, jsou-li přítomny. Protože tyto dva typy buněk nelze cytologicky vždy jasně rozlišit, používá se univerzální termín „žlázové buňky“, tedy buňky vykazující žlázovou diferenciaci (hlenové vakuoly, uspořádání skupin buněk do roset, palisádování jader atd.). Klasifikace změn ve žlázových buňkách je následující:

- Atypie žlázových buněk, tedy nález buněk se žlázovou diferenciací a atypiemi, které podobně jako u dlaždicových buněk mohou vznikat jen jako reaktivní změny, ale mohou být také asociovány s nádorovou transformací. Změny však nedosahují takového stupně, aby bylo možné s jistotou říct, že se již jedná o adenokarcinom (in situ či invazivní).
 - AGC-NOS (atypical glandular cells of unknown significance, atypické žlázové buňky se změnami nejasného významu)
 - AGC-NEO (atypical glandular cells – favor neoplastic, atypické žlázové buňky spíše neoplastického charakteru)
- AIS (adenokarcinom in situ), tedy nález těžce dysplastických žlázových buněk, často s tzv. odstřelováním jader ze shluků buněk, s jadernými atypiemi, někdy i s patrnými mitotickými figurami.
- invazivní adenokarcinom, tedy nález podobný jako u kategorie AIS, na pozadí ale s nádorovou diatézou či dalšími jasnými znaky invaze.

Třetí skupinou jsou jiné zhoubné novotvary, vyskytující se v cervixu vzácně primárně, prorůstající do této oblasti z okolí nebo raritně metastazující ze vzdálených primárních lokalizací. Jedná se například o uroteliální karcinom močového měchýře, měkkotkáňové nádory (3.2.4) či lymfomy (Nayar, Wilbur, 2015).

6 CYTOLOGICKÉ METODY

Cytologie je věda zabývající se studiem jednotlivých buněk. Onkologická gynekologická cytologie slouží jako základní screeningová a diagnostická metoda. Hlavním cílem je včasné odhalení prekancerózních změn a rakoviny děložního krčku. Existují dvě základní metody využívané v gynekologické cytologii, a to odběr s následným nátěrem na sklo a odběr do tekutého fixačního média – LBC. V České republice používáme k vyhodnocení nátěrů cytologickou klasifikaci Bethesda z roku 2014 (viz. 5.2).

Korelace mezi cytologií a reálným nálezem závisí na řadě faktorů. Na výsledku vyšetření se odráží správná technika odběru, provedení kvalitního, tenkého nátěru, včasná a dostatečná fixace vhodným médiem, podrobná anamnéza a správné vyhodnocení nálezu (Cibula, Petružalka, 2009; Dvořák, Dvořáková 2008).

6.1 Standardní barvení PAP

Papanicolaouův test je základní cytologická metoda používaná primárně pro barvení gynekologických nátěrů. Slouží jako nástroj pro screening gynekologických nádorů a dysplázií, může také detekovat přítomné mikroorganismy. Nátěr na skle se zafixuje, obarví a eventuálně pokryje krycím sklem. Základní screening provádějí laboranti-screeneri. Pokud při odečítání narazí na místo s podezřelým nálezem, je toho místo označeno pomocí fixu a sklo se předá k odečtení gynekocytopatologovi. Všechna skla jsou skladována po dobu minimálně 5 let a jsou namátkově kontrolně znovu odečítána.

Barvení podle doktora Papanicolaoua je polychromatické barvení. Jádra buněk se barví Harrisovým hematoxylinem, cytoplazmu buněk dle afinity cytoplazmy barví eosin, azur a oranž G. Pro optimální barvení nesmí buňky na skle před fixací vyschnout. Vyschnutí vede k nežádoucím artefaktům. Přestože jsou buňky obarvené, zůstávají transparentní a jsou dobře odečitatelné i pokud je jich více na sobě.

Díky tomuto testu se výrazně snížil počet úmrtí žen ve spojitosti s karcinomem děložního čípku. Test má však své nevýhody, a to poměrně nízkou citlivost (nižší pro nálezy lokalizované v endocervixu), interpersonální rozdíly v hodnocení výsledného preparátu (subjektivita) a neúplnou standardizaci barvicího postupu. Nízká senzitivita je společná všem cytologickým vyšetřením v patologii, lze ji však zvyšovat kombinací s dalšími metodami screeningu, ať už kolposkopií nebo souběžnou HPV typizací, případně i využitím

imunohistochemických metod (Špaček, Buchta, Jílek, 2013; Sladílek, 2012; Dvořák, Dvořáková 2008).

Obrázek 1: cytologický nátěr s podezřelým nálezem



Zdroj: vlastní

6.2 Liquid based cytologie

Liquid based cytologie (LBC) je pokročilá cytologická metoda, která má oproti PAP testu vyšší citlivost a specifitu. Zatím představuje přibližně 10 % všech vzorků, ale její zastoupení stále roste. Vzorek, získaný pomocí speciálního kartáčku, je po odběru přenesen do nádoby s tekutým médiem, které je tvořeno směsí alkoholů, kde se kartáček důkladně propláchne a dojde k fixaci buněk. Takto zpracované buňky se vkládají do speciálního stroje, v něm se stočí na centrifuze a následně jsou přeneseny pomocí jemného filtru na speciální sklička. Dále se obarví, pokryjí ochranným filmem a nechají se odečíst speciálním počítačovým programem. Ten proskenuje celé sklo a označí 22 nejvíce podezřelých míst, která poté zhodnotí laborant. Pokud je sklo bez nálezu abnormalit, je případ uzavřen. Pokud je nález abnormální, podezřelé místo se označí pomocí speciálního programu, který je propojen s mikroskopem a sklo se předá k hodnocení lékaři. Všechna skla se skladují po dobu minimálně 5 let a jsou namátkově kontrolně znovu odečítána.

Výhodou této metody je vysoká kvalita vzorků, jelikož přístroj je schopen zachytit veškeré přítomné buňky, možnost automatizace a speciální programy, které pomáhají s odečítáním nálezu. Nevýhodou je vysoká cena zařízení, které vzorky zpracovává (Rotterová, Nenutil, Hanzelková 2003).

7 IMUNOHISTOCHEMIE

Imunohistochemie je relativně moderní metoda, jejíž význam v patologii stále roste. Jelikož je finančně náročná, nepoužívá se plošně pro vyšetření všech bioptických vzorků a má pouze specifické využití. Tyto metody využívají speciálně upravené mono – či polyklonální protilátky, které na sobě mají přes různě složitý komplex navázaný enzym schopný z přidané bezbarvé molekuly tvořit barevný produkt, který zůstává v místě navázané protilátky. Ty se vážou na antigeny, které se touto metodou vizualizujeme.

Imunohistochemické vyšetření lze provést dvěma hlavními metodami, a to:

Přímá metoda – jedná se o nejjednodušší možný způsob detekce antigenu ve tkáních. Využívá se primární značená protilátka, která se naváže na specifický antigen, který chceme detekovat. Pro použití této metody musí být hladina antigenu ve tkáni vysoká. Vhodné je použití na nativní řezy, jelikož na parafinových řezech není metoda dostatečně citlivá.

Nepřímá dvoustupňová metoda – nepřímé metody jsou oproti metodám přímým o poznání komplikovanější, mají však vyšší citlivost a jsou tak vhodné i pro vzorky s nižší koncentrací antigenu. Na vzorek se nejprve nanese neznačená, primární protilátka, která se specificky váže na detekovaný antigen. V druhém kroku se přidá sekundární protilátka s navázaným enzymem, která má silnou afinitu pro primární protilátku. Po přidání substrátu navázaný enzym tvoří barevný produkt a celý komplex jsme tedy schopni opticky detekovat (Beranová, Tonar, 2002).

7.1 Nádorové markery

Nádorové markery jsou molekuly, jejichž přítomnost a množství prokazujeme ve vzorcích pacientů trpících nádorovým onemocněním. Dělíme je podle několika charakteristik.

Dle místa jejich nálezu je můžeme dělit na markery celulární, které se nacházejí přímo ve tkáních zhoubného nádoru a na markery humorální, které nacházíme cirkulující v tělesných tekutinách (klinicky relevantní jsou především markery detekovatelné v plazmě). Nádorové markery mohou být produkovány přímo nádorem, ty značíme jako markery asociované s nádorem. Jiné nádorové markery mohou být produkovány ostatními tkáněmi v reakci na přítomnost maligního procesu, a ty značíme jako indukované markery. Podle chemické struktury můžeme markery dělit na glykoproteiny, glykolipidy a polypeptidy (Citterbart, 2001; Cibula, Petruželka, 2009).

7.1.1 Marker p16

Protein p16 je spojený s regulací buněčného cyklu prostřednictvím proteinu Rb (pRb). *RBI* gen pro pRb je tumor supresorový gen (antionkogen), jehož somatické mutace jsou velmi časté v různých maligních nádorech a jehož mutace podmiňují již v dětském věku vznikající retinoblastomy, nádory mozku a sarkomy. pRb je jaderný fosfoprotein, který přes příslušnou signální kaskádu reguluje buněčný cyklus (zastavuje přechod z G1 do S fáze buněčného cyklu), díky čemuž zabráňuje nekontrolovatelnému množení buněk. Protein p16, jinak označovaný jako p16^{INK4a}, inhibuje degradaci pRb a tím tedy také působí jako tumor supresor. Aktivní forma pRb inhibuje transkripci p16, je-li však pRb degradován, což se děje při infekci buněk virem HPV, je p16 zvýšeně exprimován. Přítomnost proteinu p16 je tedy ukazatelem rakovinných změn v buňkách cervikální sliznice. Expresi p16 lze stanovit pomocí imunohistochemických metod. Běžně se toto vyšetření používá u histologických vzorků, v experimentálním režimu ho však lze upravit i pro použití v cytologii.

Imunohistochemická detekce p16 probíhá v Bioptické laboratoři v přístroji OMNIS, což je automatizovaný imunohistochemický barvicí stroj. Vzorek vyšetřované tkáně se ukrojí na pozitivně nabitě sklo a dá se vysušit do termostatu. Po vložení do OMNISu vzorek projde procesem odparafinování a odmaskování antigenu, kdy je třeba zbavit se chaotických vazeb, které vznikly při fixaci formolem a maskují přítomnost p16 tím, že neumožňují protilátkám se na něj navázat. Takto zpracovaný vzorek je připravený na samotné barvení, které začíná přidáním primární protilátky P*16, která se používá v koncentraci 1:100 a je prvním krokem ve třístupňové imunochemické reakci. Všechny kroky postupu jsou popsány v příložených protokolech.

Další možností detekce p16 je mnohem levnější ELISA test, který se v České republice nepoužívá. Vzorek od pacienta se vyšetřuje sendvičovou metodou za použití dvou monoklonálních protilátek se specifickou afinitou pro p16. Jedna z nich je natažena na povrchu mikrotitrační destičky, druhá přidaná protilátka je konjugovaná s křenovou peroxidázou, která po přidání příslušného substrátu tvoří barevný produkt. Pro vyhodnocení výsledků je sestavena kalibrační křivka dle protokolu výrobce (protokoly DB BIOTECH Anti – p16, Rotterová, Nenutil, Hanzelková 2003; Wu TJ, Smith-mcCune, Reuschenchach, 2016; Pešek, Kinkorová, Ferko, 2013).

8 PANDEMIE COVID-19

Onemocnění covid-19 je způsobeno koronavirem SARS-CoV-2 a má značně variabilní průběh a projevy, u některých pacientů probíhá nákaza bezpříznakově, zatímco v jiných případech je rychle letální. Je to primárně onemocnění respiračního systému extrémně snadno se šířící kapénkami. Kromě kašle, (sub)febrílie a pneumonie však může způsobit také gastrointestinální symptomy zahrnující zvracení, nevolnost a průjem, pacienti mají také vyšší tendenci k trombotickým tromboembolickým komplikacím. Kvůli velmi snadnému šíření viru se od začátku roku 2020 nákaza rozšířila po celé planetě a způsobila značnou, v některých regionech nezvladatelnou, zátěž zdravotnického systému, vyžadující uplatnění přísných opatření, která měla za cíl šíření infekce omezit či zpomalit.

V České republice byly první případy potvrzeny 1. března 2020, postupně pak byla relativně rychle přijatá přísná protipandemická opatření. Průběh pandemie nebyl však zpočátku příliš kritický. Během podzimu a zimy 2020-2021 však začaly případy onemocnění exponenciální rychlostí přibývat. V únoru 2021 byl ukazatel závažnosti pandemie PES na úrovni 4-5 a platila četná omezení, včetně zákazu prezenční výuky ve školách, byly zavřeny mnohé obchody, zákazu nočního vycházení atd. Byla povinná izolace nakažených osob i jejich kontaktů. Na konci února 2021 byl omezen pohyb mezi některými okresy a od 26.2.2021 platil tzv. tvrdý lockdown. V zdravotnických zařízeních docházelo k přeměně mnohých oddělení na oddělení starající se o pacienty s covid-19, na tato oddělení byl alokován personál z jiných, často značně nesouvisejících oddělení. V únoru 2022 už platilo jen minimum omezení, týkajících se hlavně návratu ze zahraničních cest. Stále platila izolace při pozitivním testu, nicméně kontakty pozitivních lidí už nemusely do karantény. Celkem zemřelo na covid-19 v České republice více než 40 000 osob (Komenda, 2020).

PRAKTICKÁ ČÁST

9 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

Hlavním cílem práce je zjistit provázanost mezi cytologickým a histologickým vyšetřením.

Dílčí cíle jsou:

1. Porovnat počty a použité metody vyšetření.
2. Objasnit kritéria cytologického screeningu
3. Zjistit, zda je cytologie schopna plně zastoupit histologii či naopak.

10 VÝZKUMNÉ PROBLÉMY/OTÁZKY

1. Existuje vztah mezi závažností nálezu a věkem patientek?
2. Jaká věková skupina je nejčastěji vyšetřovaná?
3. Jaký je poměr mezi jednotlivými kategoriemi nálezů?
4. Existuje vztah mezi kategoriemi nálezů a jednotlivými roky?

11 CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

V rámci své bakalářské práce jsem analyzovala data, která mi byla poskytnuta Bioptickou laboratoří s.r.o. v Plzni. Jedná se o soubory dat obsahující informace o počtu vyšetření, cytologickém nálezů, následně provedené histologii a věku pacientek v letech 2020-2022, které byly sbírány v únoru každého z uvedených roků. V souboru se vyskytují vzorky zpracované přímo v Bioptické laboratoři, které jsou odebrány od žen všech věkových kategorií z celé republiky a tvoří tak reprezentativní vzorek.

12 METODIKA PRÁCE

Praktická část mé bakalářské práce je zpracována pomocí statistických výpočtů. Data byla shromážděna laboratorním systémem WinZis a jsou naprosto anonymní. Získaná data byla zpracována do grafů a tabulek pomocí programu Microsoft Excel.

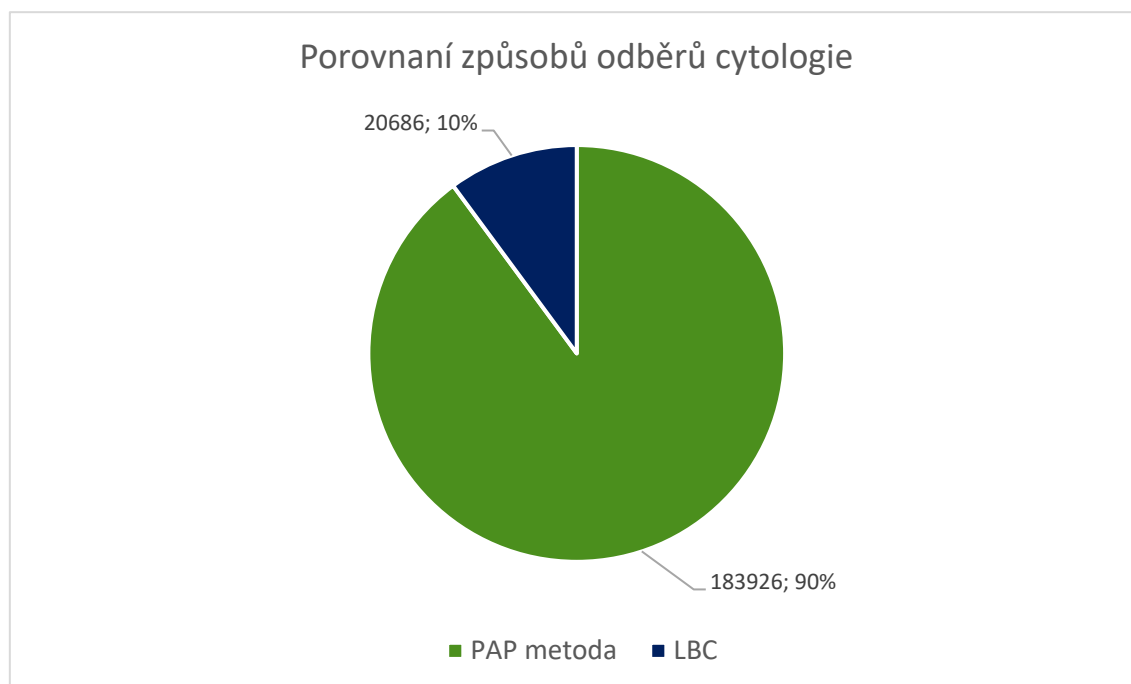
13 ANALÝZA A INTERPRETACE VÝSLEDKŮ

13.1 Výsledky výzkumných cílů

13.1.1 Počty a metody vyšetření

Mezi lety 2020 a 2022 bylo v Bioptické laboratoři provedeno celkem 204 612 cytologických vyšetření. Z tohoto počtu bylo provedeno 183 926 klasických cytologií metodou PAP (viz. 6.1) a 20 686 LBC metodou (viz 6.2).

Graf 2: poměr mezi metodami PAP a LBC

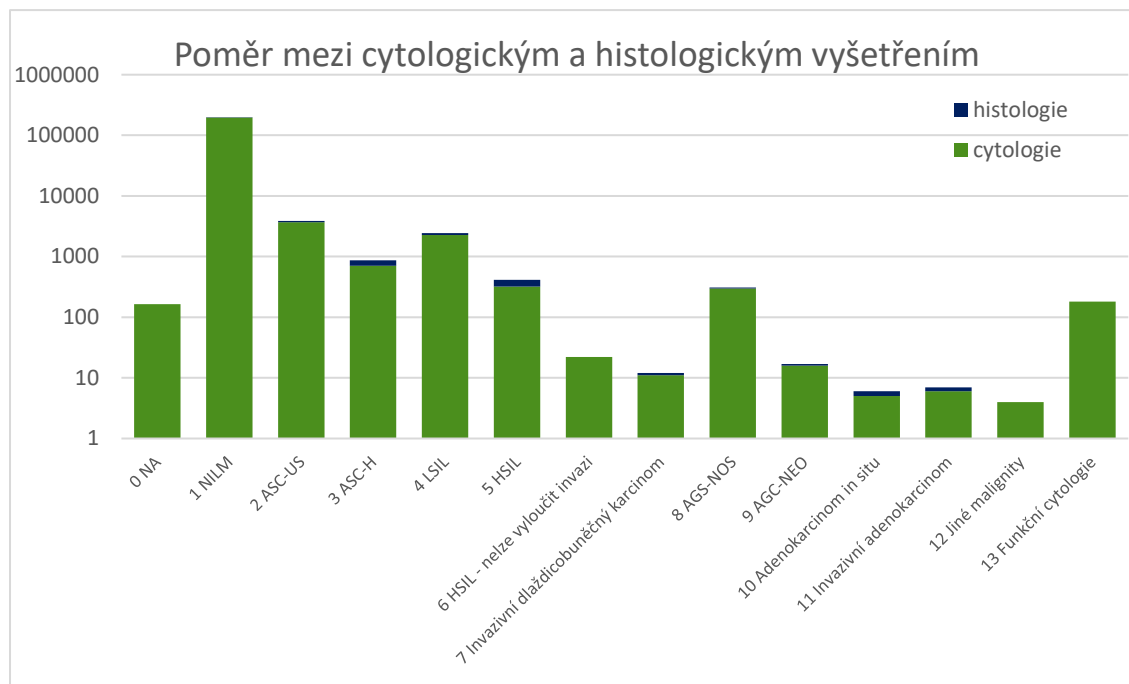


Zdroj: vlastní

Přesto, že je metoda LBC výrazně senzitivnější, tvoří pouhých 10 % z celkového počtu cytologických vyšetření. Důvodem je, že PAP test je brán jako základní screeningová metoda, která je hrazena pojišťovnou. Na druhou stranu vyšetření pomocí LBC metody doporučují gynekologové pacientkám, u kterých mají při vyšetření podezření na možnost patologického nálezu. Toto vyšetření pojišťovnou hrazeno není a pacientky za něj platí zhruba 500 korun.

Z provedených 204 612 cytologických vyšetření bylo na základě výsledku následně provedeno 665 histologických vyšetření. O provedení histologického vyšetření se rozhoduje na základě gynekologického vyšetření a závažnosti výsledku cytologického vyšetření.

Graf 3: počty cytologických a histologických vyšetření



Zdroj: vlastní

Z grafu vyplývá, že k histologickému vyšetření se přistupuje jen v malém množství případů. Počty histologických vyšetření nejsou úplně přesné, jelikož v několika případech, kde byl po cytologii indikován odběr histologického materiálu, nemáme o provedení vyšetření žádnou zmínku. To je způsobeno tím, že histologické vyšetření mohlo být provedeno na jiném pracovišti. Hodnoty jsou v grafu zobrazeny pomocí logaritmického měřítka, protože počet nálezů v kategorii 2 je výrazně vyšší, než nálezy v ostatních kategoriích.

Celkem bylo provedeno 665 histologických vyšetření, jejichž detailní výsledky jsou přiloženy v následující tabulce. V tabulce jsou zobrazeny počty provedených histologických vyšetření na základě předchozích cytologických odběrů mezi lety 2020 a 2022.

Tabulka 2: počty histologických vyšetření a odpovídající histologický nález

kategorie nálezu	H	H neg.	CIN I	CIN II	CIN III	AIS	invazivní nádor
0 NA	0	0	0	0	0	0	0
1 NILM	29	20	2	1	6	0	0
2 ASC-US	177	43	33	35	66	0	1
3 ASC-H	159	20	8	25	102	1	3
4 LSIL	190	48	42	44	57	0	0
5 HSIL	95	3	1	14	72	3	3
6 HSIL - nelze vyloučit invazi	0	0	0	0	0	0	0
7 Invazivní dlaždicobuněčný karcinom	1	0	0	0	0	0	1
8 AGS-NOS	11	4	1	2	4	0	0
9 AGC-NEO	1	0	0	0	0	1	0
10 Adenokarcinom in situ	1	0	0	0	1	0	0
11 Invazivní adenokarcinom	1	0	0	0	0	0	1
12 Jiné malignity	0	0	0	0	0	0	0
13 Funkční cytologie	0	0	0	0	0	0	0
celkem	665	138	87	121	308	5	9

Zdroj: vlastní

Z celkového počtu provedených histologických vyšetření bylo 138 nálezů negativních, 87 vyšetření odhalilo nález CIN I, 121 vyšetření odhalilo nález CIN II, 308 vyšetření spadá do kategorie CIN III, 5 vyšetření spadá do kategorie AIS a 9 vyšetření odhalilo invazivní nádor. Kromě kategorie 0, 12 a 13 se tyto nálezy nacházejí napříč všemi kategoriemi. To znamená, že odběr histologického materiálu, s následným pozitivním nálezem, byl proveden i tam, kde z cytologického hlediska nebyl důvod k provedení. Důvodem k odběru mohlo být to, že cytologie není 100% senzitivní a lékař měl pochyby ohledně negativního výsledku vyšetření. Proto se odběrové metody vždy kombinují s vyšetřením v zrcadlech, které dává klinikovi ucelenější přehled o zdravotním stavu pacientky. Histologie byla nejčastěji indikovaná v případech závažných preinvazivních cytologických nálezů – nejvyšší podíly byly u kategorií 3 – ASC-H (22.5 %), 5 – HSIL (29,8 %) a 10 – Adenokarcinom in situ (20 %).

13.1.2 Kritéria cytologického screeningu

Každá vyšetřovací metoda musí splňovat určitá kritéria. Jedná se o soubor vlastností, které jsou důležité pro hodnocení účinnosti laboratorních metod. Naprosto ideální laboratorní metoda má vysokou senzitivitu a specifitu, jinými slovy je schopna naprosto spolehlivě rozpoznat a označit nemocného pacienta a zároveň neoznačit jako falešně pozitivního pacienta, který je zdravý. Ideálního stavu, tedy úplné specifity a senzitivity, nelze v reálném světě dosáhnout, lze se k nim ale podstatně přiblížit.

Prevalence – epidemiologický pojem, ukazující počet jedinců s daným onemocněním ve sledované populaci v určitý čas. Zahrnujeme sem nejen nově vzniklá onemocnění, ale i onemocnění, které v době sledování již probíhají.

$$\text{Výpočet: bodová prevalence} = \frac{\text{počet existujících případů v daný okamžik}}{\text{velikost ohrožené populace v daný okamžik}}$$

Senzitivita – tato veličina popisuje schopnost laboratorní metody rozpoznat ve vzorku detekovaný analyt. Vyjadřuje tedy s jakou pravděpodobností bude testovaná osoba opravdu nemocná

$$\text{Výpočet: senzitivita testu} = \frac{\text{správně pozitivní}}{\text{správně pozitivní} + \text{falešně negativní}}$$

Specifita – tato veličina popisuje schopnost laboratorní metody rozpoznat zdravé pacienty. Vyjadřuje tedy míru pravděpodobnosti, že osoba s negativním testem je doopravdy zdravá.

$$\text{Výpočet: specifita testu} = \frac{\text{správně negativní}}{\text{správně negativní} + \text{falešně pozitivní}}$$

Tabulka 3: hodnoty kritérií cytologického screeningu

prevalence dysplázie a nádorů cervixu	10%
senzitivita	98,31%
specifita	14,49%
pozitivní prediktivní hodnota	11,33%
negativní prediktivní hodnota	98,72%

Zdroj: vlastní

V našem případě by ideální cytologický screening byl schopen zachytit všechny pacientky s dyspláziemi a malignitami, a zároveň neoznačit jako pozitivní žádnou zdravou pacientku.

V tabulce jsou zaznamenány hodnoty kritérií cytologického screeningu. Hodnota prevalence je 10 %, což znamená, že dysplazie, či nádor cervixu se vyskytuje u 10 % populace (Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C., 2017). Hodnota senzitivity je 98,31 %, což znamená, že test je vysoce citlivý a zachytí skoro všechny pacientky s prekancerózami a maligními nádory. Ideální hodnota testu by byla 100 %. Hodnota specifity je 14,49 %, což ukazuje na nízkou specifitu testu. To znamená, že test označí jako pozitivní na onemocnění děložního čípku i pacientky, které žádnou dysplázií, ani malignitu nemají. Pozitivní predikce má hodnotu 11,33 %. Tento údaj značí pravděpodobnost, že je pacientka v případě pozitivního testu opravdu nemocná. Hodnota testu je poměrně nízká, což znamená, že velké množství žen je při histologickém vyšetření bez nálezu. Negativní predikce má hodnotu 98,72 %. Tento údaj značí pravděpodobnost, že v případě negativního testu je pacientka opravdu zdravá. Ideální hodnota testu by byla 100 %.

Tyto údaje vychází z dat, která máme k dispozici, ta jsou ale limitována a výsledek je tak zkreslený. Ve skutečnosti má specifita gynekologického screeningu vyšší hodnotu. Abychom dostali přesnější čísla, bylo by třeba provádět více histologických vyšetření. Ta se provádí pouze u pacientek s podezřelým cytologickým nálezem, a tak nám chybí histologie u pacientek s negativní cytologií.

13.1.3 Vztah mezi cytologií a histologií

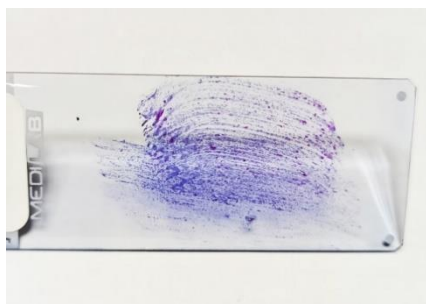
Cytologie byla popsána v teoretické kapitole č. 6., nyní se zaměříme na histologii. Histologie je laboratorní věda, která se zabývá studiem tkání. Konkrétně zkoumá mikroskopickou stavbu tkání až na buněčné úrovni. K tomu využívá tzv. histologické preparáty, což jsou na tenko nakrájené vzorky tkáně. Tyto preparáty je možné barvit mnoha metodami, přičemž každá z nich je vhodná pro zobrazení jiných struktur. Základní barvicí metodou je tzv. barvení hematoxylin-eozin. Rozdíl mezi histologií a histopatologií je ten, že histopatologie se zaměřuje na tkáně, v kterých probíhají patologické procesy.

Při cytologickém vyšetření přijde do laboratoře vzorek, který má buď podobu již hotového nátěru na skle, nebo lahvičky s tekutinou, kdy je třeba vzorek stočit a přenést na sklo. Takto zhotovený preparát se zafixuje, obarví a přikryje horní krycí vrstvou, aby nedošlo k jeho znehodnocení.

Postup histologického vyšetření je komplikovanější a časově náročnější. Vzorky v patologii děložního cervixu mohou mít podobu drobných částí tkáně, které se odebírají biopsií jehlou (viz. obrázek 4) nebo mít podobu konizátu, což je odstraněná větší část

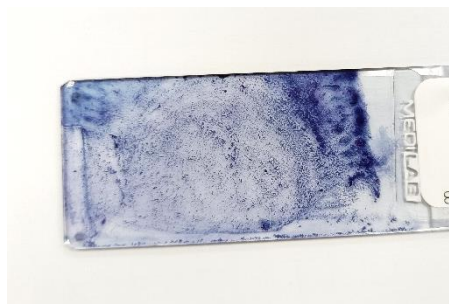
děložního čípku (viz obrázek 5). V některých případech je k vyšetření dodána celá děloha po provedené hysterektomii. Tyto vzorky vyžadují dostatečnou dobu fixace, a i jejich další zpracování a barvení trvá déle než zpracování cytologických preparátů.

Obrázek 2: cytologický nátěr



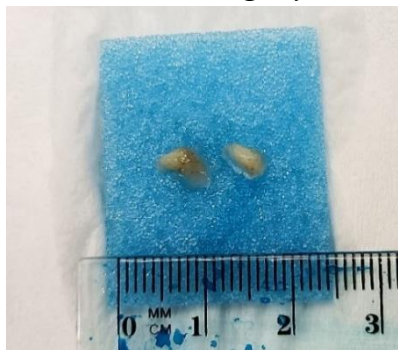
Zdroj: vlastní

Obrázek 3: cytologický nátěr



Zdroj: vlastní

Obrázek 4: histologický vzorek – knips



Zdroj: vlastní

Obrázek 5: histologický vzorek – konizát



Zdroj: vlastní

Při cytologickém vyšetření je zpracováno a prohlédnuto několikanásobně méně materiálu než při vyšetření histologickém. Zároveň cytologie umožňuje pouze hodnocení jednotlivých buněk nebo jejich menších skupin, bez kontextu jejich zapojení do okolní tkáně. To dělá z histologie specifitější metodu, jejíž závěr bereme jako platný a směrodatný při dalším postupu léčby.

Je třeba však brát v potaz také invazivitu metody. Cytologický vzorek se odebírá pomocí speciálního kartáčku, kterým se provede stěr z děložního čípku. Odběr je rychlý, relativně bezbolestný a provádí ho ošetřující gynekolog. Postup odběru histologického vzorku se odvíjí od toho, jaký typ vzorku lékař požaduje a jakou diagnózu pacientka má. Může se jednat o kontrolní biopsii, která se provádí tzv. punch biopsií, kdy ošetřující gynekolog odebere vzorky pomocí bioptické jehly. Další možností je odběr konizátu, který

se provádí na chirurgickém sále, stejně tak jako hysterektomie. Cytologie je tak méně invazivní a pro pacientky přívětivější metoda.

Z Tabulka 3: hodnoty kritérií cytologického screeningu je patrné, že cytologické vyšetření nemá vysokou specifitu, a pokud by se výsledky cytologického testu braly jako definitivní bez dalšího testování, velké procento žen by se dále léčilo zbytečně.

Zatímco cytologický vzorek jsou náhodně odebrané buňky, histologický vzorek je odebrán z přesně cílené, podezřelé oblasti a jedná se tak o reprezentativní vzorek tkáně. Spolehlivost histologie zvyšuje také fakt, že pokud je diagnóza z jednoho zpracovaného skla nejistá, má lékař možnost si ze zbývajících materiálů nechat vypracovat řezy nové a diagnózu si tak potvrdit.

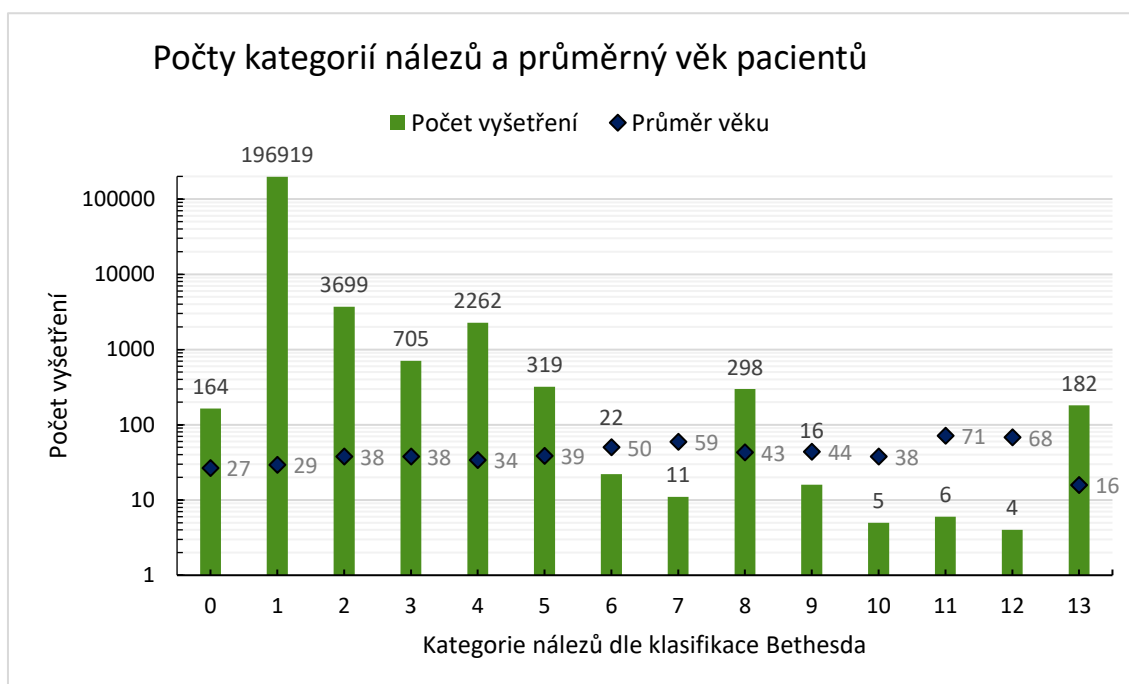
Pokud tyto dvě metody porovnáme, tak ze všech dostupných údajů vyplývá, že je každá z metod funkční a svůj účel plní. Jakmile je ale podezření na závažnější nález v oblasti děložního krčku, ať už na základě cytologického vyšetření, nebo gynekologické prohlídky, je vhodné doplnit histologické vyšetření. Díky tomu získáme ucelený pohled na případ a přesnou diagnózu.

13.2 Výsledky výzkumných otázek

13.2.1 Spojitost mezi věkem a závažností nálezu

Má hypotéza byla, že se zvyšujícím se věkem pacientek přibývá množství závažnějších nálezů. Aby bylo možno porovnat závažnost nálezů u jednotlivých věkových kategorií a hypotézu ověřit, bylo třeba vytvořit graf, který zobrazuje vztahy mezi počtem vyšetření, kategoriemi nálezů dle klasifikace Bethesda a průměrným věkem pacientek v dané kategorii.

Graf 4: počty nálezů v závislosti na kategorii nálezů a průměrném věku pacientek



Zdroj: vlastní

Pro výzkum bylo použito celkem 204 612 cytologických vzorků, které byly sbírány v průběhu let 2020 až 2022. V grafu jsou znázorněny vztahy mezi počtem vyšetření, závažností nálezu a průměrným věkem pacientek s těmito nálezy. Kvůli výrazně rozdílným hodnotám v jednotlivých kategoriích jsou počty vyšetření zobrazeny pomocí logaritmického měřítka. Závěry histologických vyšetření jsou zobrazeny v: Tabulka 2.

Kategorie 0 – nehodnotitelné nálezy

- Do této kategorie spadají vzorky, které byly špatně odebrané nebo zafixované. Kvůli tomu je na skle málo hodnotitelných buněk, a tak není možno stanovit žádnou diagnózu. Spadá sem 164 vzorků a průměrný věk pacientek je 27 let. V této kategorii nebyla provedeno žádné histologické vyšetření. V případě tohoto závěru by mělo být cytologické vyšetření zopakováno.

Kategorie 1 – bez intraepiteliálních změn a malignit

- Do této kategorie řadíme nálezy, které jsou fyziologické, bez dysplastických či potencionálně dysplastických změn. Ve výzkumu se jich objevilo celkem 196 919 a několikanásobně tak převyšují ostatní kategorie, z čehož vyplývá, že převážná část vyšetřovaných žen je nádorového onemocnění či prekancerózy čípku prostá. Do této kategorie patří také veškeré zánětlivé a hormonálně-dependentní změny, které mohou mít pro pacientku značný význam. Průměrný věk žen v této kategorii je 29 let.

Kategorie 2 – ASC-US

- Nálezy, které se vyskytují v této kategorii nejsou většinou závažné, a proto se standardně nepřistupuje k provedení histologického vyšetření, ale pacientka podstupuje častější kontrolu za pomoci kolposkopického a cytologického vyšetření. V rámci mého průzkumu sem spadá 3 699 vyšetření, což je druhý nejvyšší počet nálezů. Může to být způsobeno tím, že se jedná o první stupeň atypických změn, které zároveň ve velké míře samovolně vymizí a pacientčin nález bude opět spadat do kategorie 1. Do této kategorie navíc spadá morfologický obraz subtilních atypií suspektních z dysplázie, ve skutečnosti ale odpovídajících pouze reaktivním změnám vznikajícím například při zánětu, přičemž tyto rozdíly nelze vždy spolehlivě rozlišit. Na žádosti gynekologů bylo provedeno 177 histologických vyšetření. Průměrný věk v této kategorii je 38 let.

Kategorie 3 – ASC-H

- Do této kategorie řadíme již závažnější nálezy, u kterých nelze vyloučit výskyt HSIL. Jedná se o rizikový nález, u kterého se velmi často přistupuje k doprovodnému histologickému vyšetření. Z celkových 705 cytologických vyšetření bylo provedeno 159 histologických vyšetření. Průměrný věk žen v této kategorii je 38 let.

Kategorie 4 – LSIL

- Do této kategorie řadíme nálezy, které nejsou závažné a u kterých není nutné neprodleně provést histologické vyšetření, ale je vhodné zvýšit četnost gynekologických kontrol s odběrem cytologie. Do této kategorie spadá 2 262 vyšetření a na žádosti gynekologů bylo provedeno 190 histologických vyšetření. Do této kategorie řadíme histologické nálezy kategorie CIN I, tedy mírnou dysplázií a projevy infekce HPV. Průměrný věk v této kategorii je 34 let.

Kategorie 5 – HSIL

- Do této kategorie řadíme již závažné nálezy typu HSIL. Jedná se o rizikový cytologický závěr, u kterého je třeba udělat histologické vyšetření. Spadají sem histologické nálezy kategorie CIN II a CIN III včetně CIS. Z celkových 319 cytologických vyšetření bylo následně provedeno 95 histologických vyšetření. Průměrný věk v této kategorii je 39 let.

Kategorie 6 – HSIL – nelze vyloučit invazi

- Do této kategorie řadíme závažné nálezy, u kterých je rovněž vhodné provést histologické vyšetření. V rámci výzkumu bylo zaznamenáno 22 cytologií a 0 histologií. Vzhledem k závažnosti diagnózy byla histologie nejspíš provedena, ale zpracována na jiném pracovišti. Průměrný věk v této kategorii je 50 let.

Kategorie 7 – Dlačdicobuněčný karcinom

- Do této kategorie řadíme vzorky, u kterých byl nalezen invazivní dlačdicobuněčný karcinom. Jedná se o druh epitelového nádoru, podrobněji v kapitole 3.2.3. Jde o závažný nález, takže je vhodné doplnit ho histologickým vyšetřením. Jelikož průměrný věk pacientek byl 59 let, je také možno zvážit rovnou provedení hysterektomie neboli odstranění dělohy. V rámci výzkumu cytologie zachytila

celkem 11 případů, přičemž máme pouze 1 záznam o provedení odběru histologického vzorku, nebo případně rovnou hysterektomie. Dle povahy nálezu lze očekávat, že dodatečná vyšetření proběhla na jiném pracovišti.

Kategorie 8 – AGC-NOS

- Do této kategorie řadíme nálezy, které nejsou příliš závažné, a kromě provedení histologického vyšetření lze u některých pacientek zvolit i přístup s častějšími kontrolami s cytologickým vyšetřením. Bylo zaznamenáno 289 cytologických nálezů a na žádosti gynekologů bylo provedeno 11 histologických vyšetření. Průměrný věk v této kategorii je 43 let.

Kategorie 9 – AGC-NEO

- Do této kategorie řadíme závažné nálezy, které je vhodné doplnit o histologické vyšetření. V rámci výzkumu se objevilo 16 cytologických vyšetření, ale pouze 1 histologie. Vzhledem k prognóze je nejpravděpodobnější, že odběr histologického materiálu, popřípadě rovnou hysterektomie proběhly, ale materiál byl zpracován na jiném pracovišti. Průměrný věk v této kategorii je 44 let.

Kategorie 10 – AIS

- Do této kategorie řadíme adenokarcinom in situ, jedná se o závažný nález, kdy je doporučeno histologické vyšetření. V rámci výzkumu bylo v této kategorii objeveno 5 cytologií a 1 histologie. S ohledem na prognózu nálezu byly nejspíš provedeny i ostatní histologická vyšetření, ale materiál byl zpracován na jiném pracovišti. Průměrný věk pacientek v této kategorii je 38 let.

Kategorie 11 – Invazivní adenokarcinom

- Do této kategorie řadíme invazivní adenokarcinom. Jedná se o závažný nález, kdy je doporučeno histologické vyšetření, popřípadě vzhledem k věku pacientky i hysterektomie. V rámci výzkumu bylo zaznamenáno 6 cytologií a 1 histologie. Vzhledem k prognóze nálezu byly nejspíš provedeny i ostatní histologická vyšetření, ale materiál byl zpracován na jiném pracovišti. Průměrný věk pacientek v této kategorii je 71 let.

Kategorie 12 – Jiné malignity

- Do této kategorie řadíme vzorky, kde se vyskytnou malignity, které nelze zařadit do ostatních kategorií. Jedná se o závažný nález, kdy je doporučeno provést histologické vyšetření, popřípadě s ohledem na věk pacientky i hysterektomie. V rámci výzkumu byly zaznamenány 4 cytologie, ale žádná histologie. Často se jedná o vzácnější případy s komplikovanější onkologickou anamnézou u pacientek ve vyšším věku, terapeutický přístup tak bývá individuální. U pacientek v dobrém stavu a s operovatelnými nádory mohl být resekát zpracován na jiném pracovišti. Průměrný věk žen v této kategorii je 68 let.

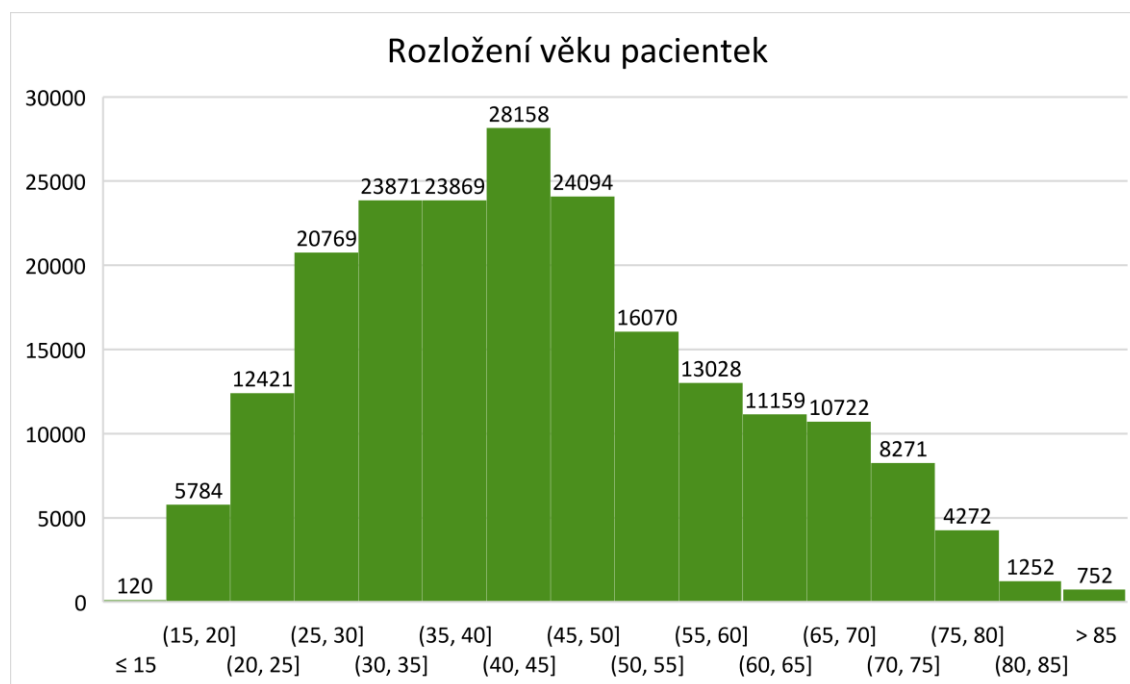
Kategorie 13 – Funkční cytologie

- Do této kategorie řadíme nálezy buněčných změn, které zobrazují reakci sliznice na měnící se hladiny hormonů v průběhu cyklu. Histologické vyšetření zde není indikováno, jedná se o vyšetření zcela mimo klasifikaci Bethesda a program gynekologického screeningu. V Bioptické laboratoři však je vzhledem k obdobné metodice zpracování a do jisté míry i hodnocení k ostatním gynekologickým cytologickým vyšetřením přiřazeno. V rámci výzkumu se objevilo 182 cytologických vzorků a nebylo provedeno žádné histologické vyšetření. Průměrný věk pacientek byl 16 let, což je nejnižší věkový průměr.

13.2.2 Spojitost mezi věkem a počtem vyšetření

Na grafu vidíme zobrazený počet vyšetřených pacientek v závislosti na jejich věku. Pro lepší hodnotitelnost a orientaci byly ženy rozděleny do kategorií v rozmezí 5 let.

Graf 5: počet vyšetření v závislosti na věku



Zdroj: vlastní

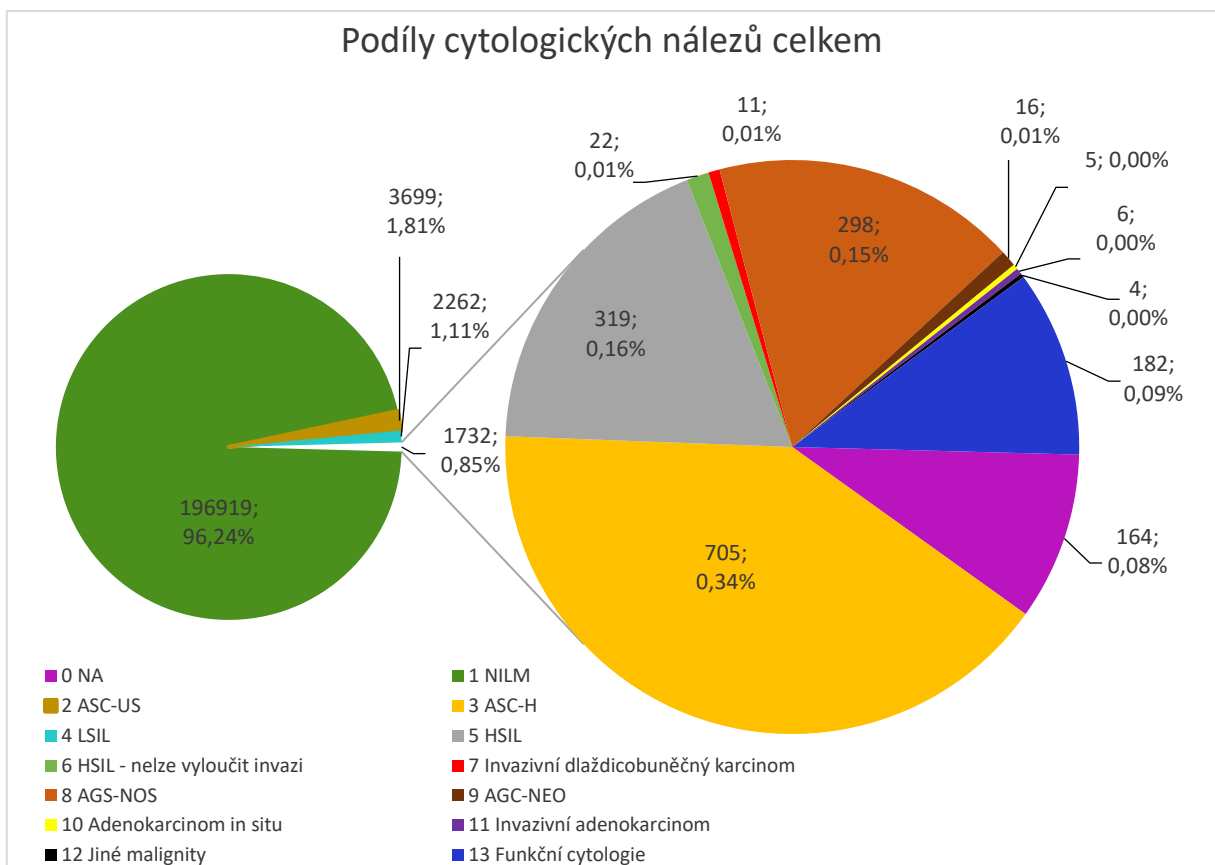
Z grafu vyplývá, že množství pacientek chodících na screeningové vyšetření přibývá od kategorie žen mladších 15 let až do kategorie žen ve věku 34-50 let. Nejpočetněji zastoupenou kategorií je kategorie pacientek ve věku 40-45 let. To je způsobeno nejen nejpočetnějším zastoupením této věkové kategorie v populaci (Sčítání lidu 2021), ale také tím, že společně s věkovou kategorií 35-40 se zde nejčastěji vyskytují nálezy, které vyžadují opakované cytologické vyšetření (viz 12.2.1).

Od věkové kategorie 50-55 let až po kategorii pacientek starších 85 let počty vyšetřených žen ubývají, což není z lékařského hlediska v pořádku. S rostoucím věkem přibývá závažnějších nálezů, někdy i život ohrožujících stavů, které nejsou, kvůli nižší účasti na screeningu, zachyceny včas.

13.2.3 Poměr mezi jednotlivými kategoriemi nálezů

Má hypotéza byla, že nejpočetnější zastoupení bude mít kategorie 1, tedy kategorie beználezových pacientek. Z poskytnutých dat byl vypracován graf, který zobrazuje zastoupení jednotlivých kategorií nálezů.

Graf 6: poměr jednotlivých kategorií nálezů



Zdroj: vlastní

Z grafu vyplývá, že má hypotéza byla správná a beználezové pacientky tvoří 96 % vyšetřované populace. Druhou nejpočetnější kategorií jsou nálezy kategorie ASC-US, které tvoří necelé 2 % z celkové vyšetřované populace. Na třetím místě jsou pak nálezy spadající do kategorie LSIL, které tvoří 1 %. Zbývající jedno procento je rozděleno mezi ostatní kategorie nálezů.

13.2.4 Určení vztahu mezi kategoriemi nálezů a jednotlivými roky

Hlavním úkolem praktické části této bakalářské práce bylo zjistit, zda existuje závislost mezi kategoriemi onemocnění a jednotlivými roky. Tuto otázku můžeme ověřit za pomoci χ^2 testu dobré shody. Tento test vychází z pozorovaných hodnot, které jsou zachyceny v následující tabulce:

Tabulka 4: pozitivní cytologické nálezy v jednotlivých letech

Cyto nálezy	2020	2021	2022
Atypie	1632	1499	1587
LG léze	834	734	694
HG léze	115	123	108
Invazivní nádory	5	9	7

Zdroj: vlastní

Tabulka zobrazuje počet vyšetření s pozitivními nálezy v jednotlivých kategoriích za roky 2020, 2021 a 2022. Tyto tři kategorie byly vytvořeny sloučením několika ostatních kategorií kvůli tomu, že χ^2 test je spolehlivě použitelný, pouze pokud se počítá s hodnotami 5 a více. Kategorie byly vytvořeny následovně:

Atypie

- ASC-US
- ASC-H
- AGS-NOS
- AGS-NEO

LG léze

- LSIL

HG léze

- HSIL
- HSIL – nelze vyloučit invazi

Invazivní nádory

- Dlaždicobuněčný karcinom
- Adenokarcinom
- Jiné malignity

Jako další krok bylo třeba určit očekávané hodnoty dat. K tomu potřebujeme součty jednotlivých řádků, sloupců a celé tabulky.

Tabulka 5: pozorované hodnoty

Pozorované hodnoty	2020	2021	2022	Součty řádků
Atypie	1632	1499	1587	4718
LG léze	834	734	694	2262
HG léze	115	123	108	346
Invazivní nádory	5	9	7	21
Součty sloupců	2586	2365	2396	7347

Zdroj: vlastní

Dalším krokem je výpočet očekávané hodnoty $E_{i,j}$ pomocí následujícího vzorce:

$$E_{i,j} = \frac{(\text{součet } i - \text{tého řádku}) \times (\text{součet } j - \text{tého sloupce})}{\text{součet tabulky}}$$

Pro očekávanou hodnotu $E_{1,1}$ dostaneme:

$$E_{1,1} = \frac{(\text{součet 1. řádku (Atypie)}) \times (\text{součet 1. sloupce (2020)})}{\text{součet tabulky}} = \frac{4718 \times 2586}{7347} \doteq 1661$$

Ostatní potřebné hodnoty získáme stejným způsobem a dostaneme tak následující výsledky:

Tabulka 6: očekávané hodnoty

Očekávané hodnoty	2020	2021	2022
Atypie	1661	1519	1539
LG léze	796	728	738
HG léze	122	111	113
Invazivní nádory	7	7	7

Zdroj: vlastní

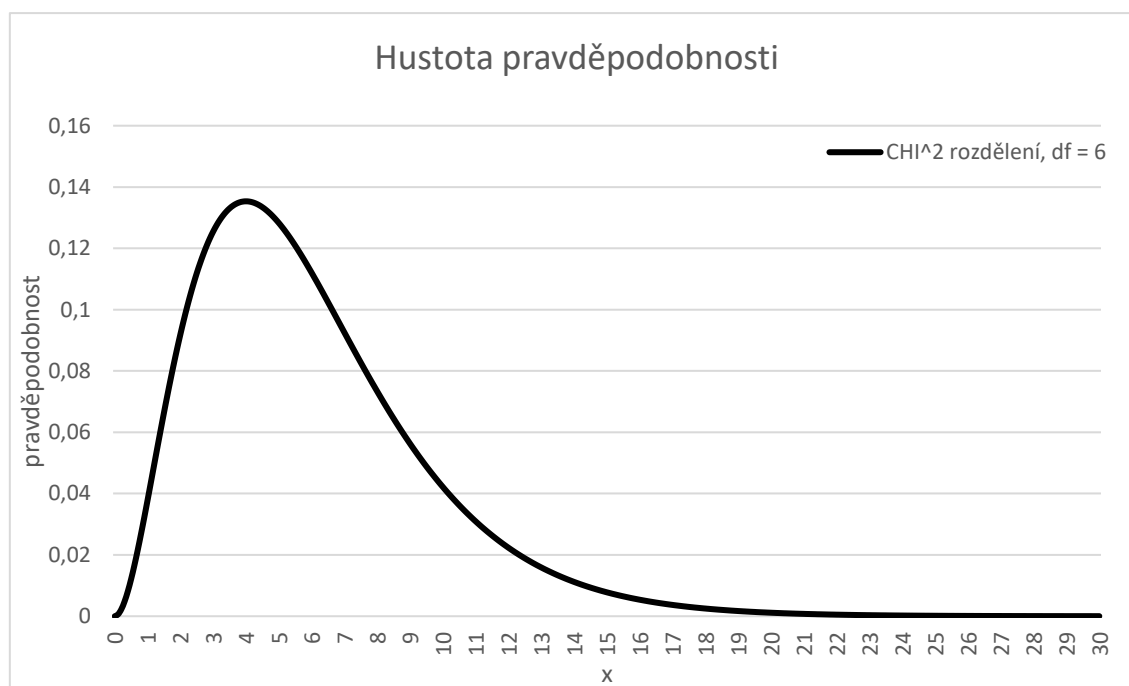
V této tabulce jsou očekávané hodnoty zaokrouhleny na celá čísla.

Pro další krok je třeba určit počet stupňů volnosti d_f . Počet stupňů volnosti d_f se počítá pomocí následujícího vzorce:

$$d_f = (\text{počet řádků} - 1) \times (\text{počet sloupců} - 1) = (4 - 1) \times (3 - 1) = 6$$

Když známe počet stupňů volnosti d_f , můžeme data použít k vykreslení grafu, zobrazující χ^2 rozdělení s právě 6 stupni volnosti:

Graf 7: χ^2 rozdělení pravděpodobnosti pro právě 6 stupňů volnosti



Zdroj: vlastní

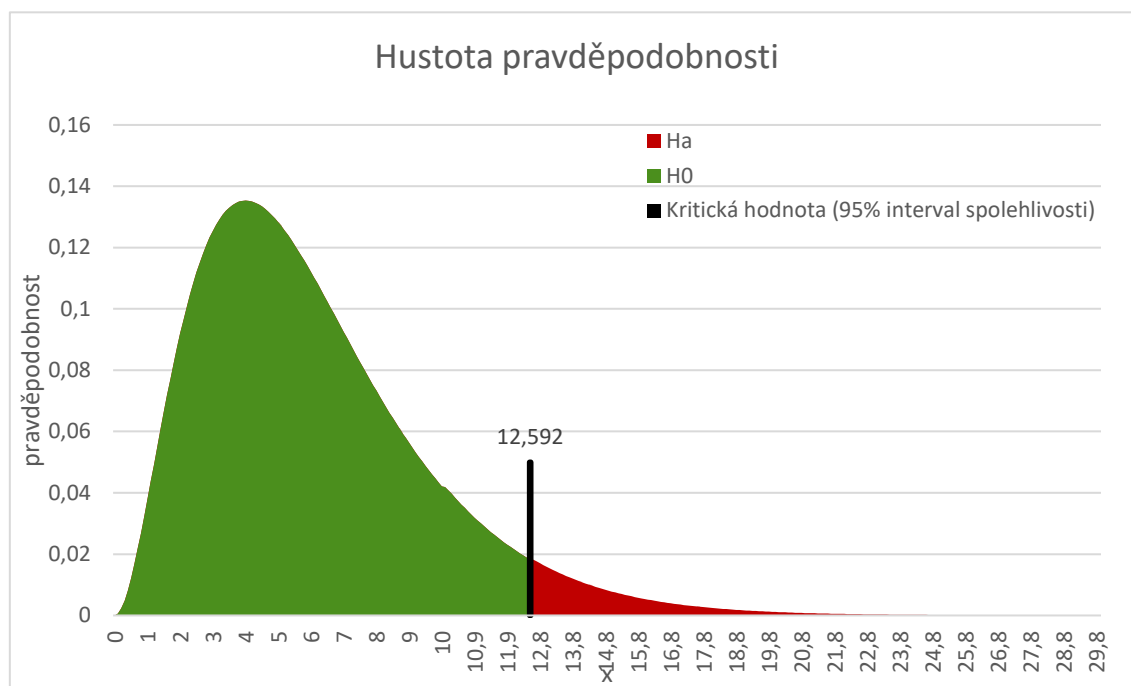
Před samotným výpočtem χ^2 hodnoty je nutné určit si testované hypotézy a interval spolehlivosti. Cílem je zjistit, jestli existuje nějaký vztah mezi kategoriemi nálezů a jednotlivými roky. Stanovíme si tak následující nulovou a alternativní hypotézu:

H_0 : Data se mezi jednotlivými roky výrazně nemění (neexistuje mezi nimi žádný vztah)

H_a : Data se mezi jednotlivými roky výrazně mění (existuje mezi nimi nějaký vztah)

Budeme počítat s 95 % intervalem spolehlivosti. Z tabulky zjistíme kritickou hodnotu, kdy už zamítáme nulovou hypotézu H_0 a uvažujeme alternativní hypotézu H_a jako pravdivou. Tato hodnota je pro $d_f = 6$ a interval spolehlivosti 95 % rovna přibližně 12,592. Tuto tabulku naleznete v přílohách.

Graf 8: vizualizace 95 % intervalu spolehlivosti



Zdroj: vlastní

Nyní je možné přejít k samotnému výpočtu. K tomu je potřeba následující vzorec:

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^r \sum_{j=0}^c \frac{(O_{i,j} - E_{i,j})^2}{E_{i,j}}$$

kde r odpovídá počtu řádků tabulky, c odpovídá počtu sloupců tabulky, $O_{i,j}$ odpovídá jednotlivým pozorovaným hodnotám a $E_{i,j}$ odpovídá jednotlivým očekávaným hodnotám. Nyní je možné spočítat další tabulku, ve které budou zanesené dílčí hodnoty χ^2 testu:

Tabulka 7: dílčí hodnoty χ^2 testu

χ^2	2020	2021	2022
Atypie	0,494	0,256	1,520
LG léze	1,797	0,047	2,587
HG léze	0,378	1,213	0,207
Invazivní nádory	0,774	0,742	0,003

Zdroj: vlastní

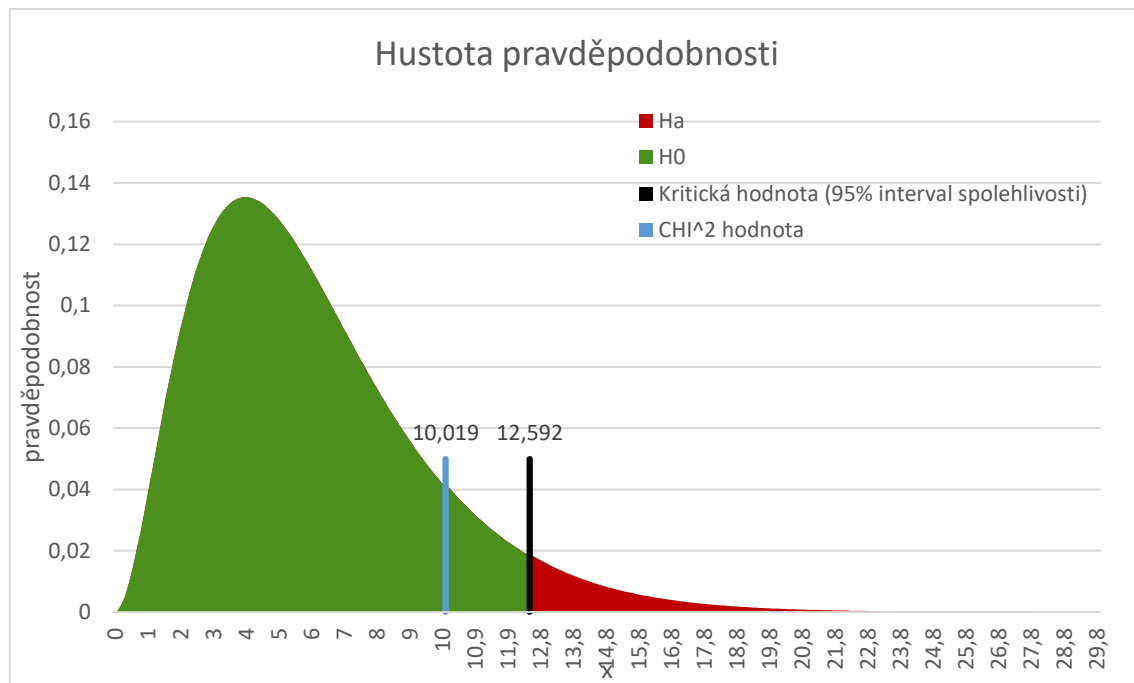
Tyto dílčí hodnoty naznačují, jak moc se pozorované hodnoty liší od očekávané hodnoty. Pokud je číslo blízké nule, znamená to, že pozorovaná i očekávaná hodnota jsou stejné a není mezi nimi žádný rozdíl. Naopak čím větší číslo, tím větší rozdíl, mezi

pozorovanou a očekávanou hodnotou. Po nasčítání všech dílčích hodnot dostaneme celkovou hodnotu χ^2 testu, která určí náš postoj k nulové hypotéze, zda ji potvrzujeme, nebo zamítáme. Dostaneme tedy:

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^4 \sum_{j=0}^3 \frac{(O_{i,j} - E_{i,j})^2}{E_{i,j}} \doteq 10,019$$

Vidíme, že hodnota χ^2 testu, která je 10,019, je menší, než tabulková hodnota 12,592. Tímto výsledkem nezamítáme nulovou hypotézu a můžeme říct, že mezi jednotlivými roky není výrazný rozdíl. Mezi kategoriemi závažnosti onemocnění a jednotlivými roky tedy neexistuje vztah.

Graf 9: vizualizace χ^2 hodnoty



Zdroj: vlastní

Hodnotě $\chi^2 = 10,019$ odpovídá p-hodnota rovna 12,386 %. Toto číslo nám říká, jak moc extrémní naše hodnota χ^2 je. V našem případě to znamená, že pokud bychom dostali

další, nová data stejných kategorií, ale například z jiných let nebo z jiného regionu, je šance 12,386 %, že dostaneme hodnotu $\chi^2 \geq 10,019$ z nově analyzovaných dat.

Byl proveden ještě jeden výpočet χ^2 testu, který v sobě kromě kategorií nálezů, se kterými bylo počítáno v prvním výpočtu, obsahuje i kategorii negativních nálezů. Pozorované hodnoty pro tento test vypadají následovně:

Tabulka 8: pozorované nálezy

Cyto nálezy	2020	2021	2022
Negativní	65101	66870	64948
Atypie	1632	1499	1587
LG léze	834	734	694
HG léze	115	123	108
Invazivní nádory	5	9	7

Zdroj: vlastní

Tabulka zobrazuje počet jednotlivých kategorií v letech 2020, 2021 a 2022. Kategorie pozitivních nálezů byly stejně jako v předchozím výpočtu vytvořeny sloučením několika kategorií, kvůli citlivosti testu na čísla menší než 5.

Pro další krok χ^2 testu je třeba určit očekávané hodnoty dat. K tomu je nutné vypočítat součty jednotlivých řádků, sloupců a celé tabulky. Od tohoto kroku je postup výpočtu identický s předchozím. Proto jsou dílčí kroky přeskočeny a pokračuje se výpočtem χ^2 .

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^r \sum_{j=0}^c \frac{(O_{i,j} - E_{i,j})^2}{E_{i,j}}$$

kde r je rovno počtu řádků tabulky, c je rovno počtu sloupců tabulky, $O_{i,j}$ jsou jednotlivé pozorované hodnoty a $E_{i,j}$ jsou jednotlivé očekávané hodnoty. Můžeme spočítat další tabulku, kde budou zaneseny dílčí hodnoty χ^2 testu:

Tabulka 9: dílčí hodnoty χ^2 testu

χ^2	2020	2021	2022
Negativní	0,351	0,235	0,011
Atypie	3,011	6,271	0,639
LG léze	9,514	1,394	3,592
HG léze	0,001	0,279	0,323
Invazivní nádory	0,551	0,498	0,001

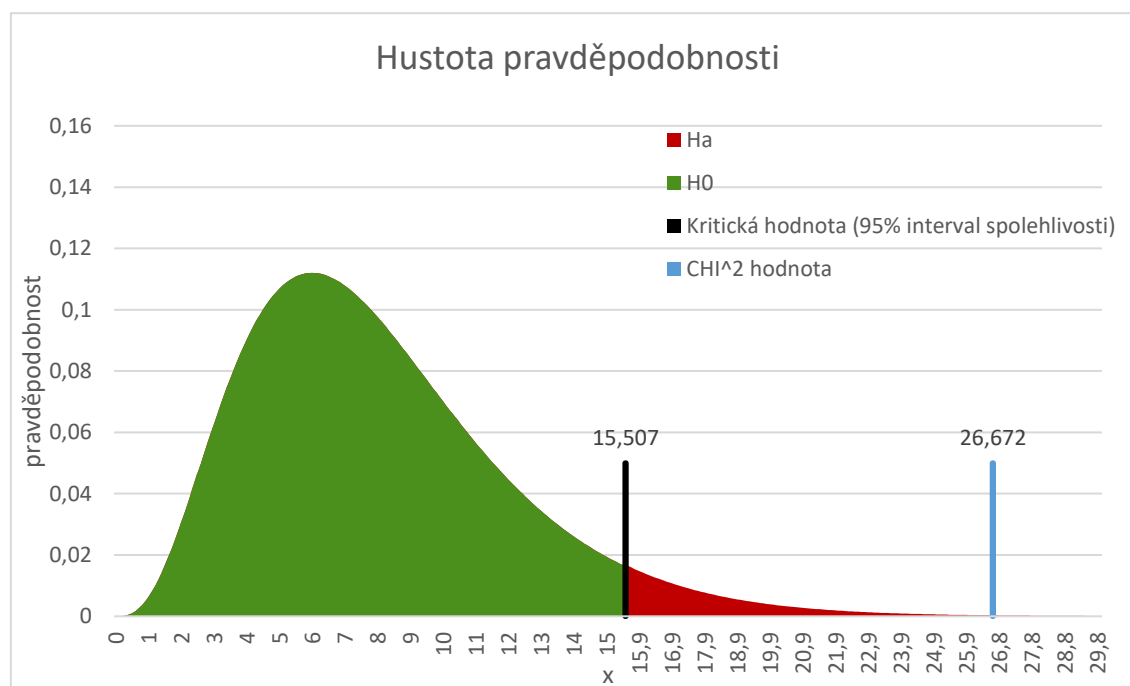
Zdroj: vlastní

Tyto dílčí hodnoty naznačují, jak moc se pozorované hodnoty liší od očekávané hodnoty. Pokud je číslo blízké nule, znamená to, že pozorovaná i očekávaná hodnota jsou stejné a není mezi nimi žádný rozdíl. Naopak čím větší číslo, tím větší rozdíl, mezi pozorovanou a očekávanou hodnotou. Po nasčítání všech dílčích hodnot dostaneme celkovou hodnotu χ^2 testu, která určí náš postoj k nulové hypotéze: zda ji potvrzujeme, nebo zamítáme. Dostaneme tedy:

$$\chi^2 = \sum_{i=0}^5 \sum_{j=0}^3 \frac{(O_{i,j} - E_{i,j})^2}{E_{i,j}} \doteq 26,672$$

Vidíme, že hodnota χ^2 testu 26,672 je vyšší, než tabulková hodnota 15,507. Zamítáme tedy nulovou hypotézu a potvrzujeme hypotézu alternativní. Můžeme říct, že po přidání negativních nálezů do výpočtu se rozdíly mezi jednotlivými roky zvýšily a mezi kategoriemi onemocnění a jednotlivými roky existuje vztah. V grafu vypadá tento jev následovně:

Graf 10: vizualizace χ^2 hodnoty



Zdroj: vlastní

Hodnotě $\chi^2 = 26,672$ odpovídá p-hodnota, která je přibližně rovna 0,08052 %. Toto číslo nám říká, jak moc extrémní hodnota χ^2 z těchto dat je. V našem případě to znamená, že pokud bychom dostali další, nová data stejných kategorií, ale jiných 3 let, je šance

0,08052 %, že dostaneme hodnotu $\chi^2 \geq 26,672$ z nově pozorovaných dat, pokud uvažujeme nulovou hypotézu jako pravdivou.

Vidíme tedy, že po zakomponování negativních nálezů do vzorku jsou hodnoty velice extrémní a šance, že by znovu byla získána taková data, za předpokladu, že uvažujeme, že nulová hypotéza je pravdivá, je naprosto mizivá. Proto tedy zamítáme nulovou hypotézu a přikláníme se k té alternativní.

Pokud se podíváme na tabulku pozorovaných hodnot (Tabulka 8) a dílčích hodnot (Tabulka 9) je možno vyvodit, že v únoru 2020 bylo nadměrně velké množství LG lézí oproti rokům 2021 a 2022. V roce 2021 bylo neobvykle malé množství Atypií, zatímco počet vyšetření s negativním nálezem byl z těchto tří let v roce 2021 nejvyšší. Celkový počet vyšetření provedených v rámci gynekologického screeningu byl v roce 2021, kdy byla platná nejprísnejší protipandemická opatření, vyšší než v předchozím i následujícím roce. Je tedy možné, že tyto nálezy a covid-19 mají mezi sebou nějakou souvislost, k výsledku této statistiky však především přispívá velmi vysoký počet pozorování.

DISKUZE

V každém souboru dat, která jsou k dispozici, je několikanásobně vyšší počet cytologických než histologických vyšetření. Data byla zpracovávána několika způsoby a bylo objasněno několik dílčích cílů a výzkumných otázek.

Prvním dílčím cílem bylo zhodnotit počty a metody vyšetření. K dispozici bylo celkem 204 612 cytologických vyšetření, kdy 90 % z nich bylo zpracováno PAP metodou a pouze 10 % bylo zpracováno metodou LBC. Tento nepoměr je způsoben nejspíše přístupem k jednotlivým metodám, jelikož PAP metoda se považuje za základní vyšetření hrazené pojišťovnou a metoda LBC je brána jako rozšířená metoda vyšetření, kterou si pacientky hradí samy. Na základě těchto cytologických vyšetření bylo odebráno 665 histologických vzorků, z nichž u 390 byl nález pozitivní. Tyto pozitivní nálezy se však objevují napříč všemi kategoriemi, výjimečně i u vyšetření, která byla z cytologického hlediska v pořádku. Důvodem může být suboptimální provedení odběru cytologického materiálu, či podhodnocení nálezu cytologickým screenerem.

Druhým dílčím cílem bylo objasnit kritéria cytologického screeningu. Každá vyšetřovací metoda má svá specifika a určitou specifitu a senzitivitu. Bylo zjištěno, že cytologický screening děložního krčku má 98 % senzitivitu a 14,5 % specifitu. Hodnota specifity je nízká, jelikož je zkreslená omezenými daty. Pro správný výpočet by bylo třeba mít mnohem více histologických vyšetření na zdravých pacientkách, aby se dal potvrdit negativní výsledek cytologie.

Třetím dílčím cílem bylo objasnit vztah mezi cytologií a histologií a zjistit, zda by bylo možné jednu metodu plně nahradit druhou. Při vyšetření děložního čípku se tyto metody běžně používají společně, což je více než vhodné, jelikož každá z nich má své nesporné výhody. K výhodám cytologie patří její neinvazivnost a s tím spojené vysoké množství otestovaných žen, zatímco k výhodám histologie se dá počítat její vysoká přesnost při stanovení diagnózy.

První výzkumnou otázkou bylo, zda spolu souvisí věk a závažnost nálezu. Mou hypotézou bylo, že se stoupajícím věkem pacientek stoupá i četnost výskytu závažnějších nálezů. Nálezy byly rozděleny do 13 skupin dle klasifikace Bethesda, u každé byl zaznamenán počet cytologických a histologických vyšetření a průměrný věk pacientek v dané kategorii. Z takto zpracovaných dat vyšlo najevo, že má hypotéza byla správná.

V kategoriích závažnějších nálezů byl vyšší průměrný věk, než u kategorií beználezových nebo v kategoriích s méně závažným nálezem. To může být způsobeno nejen přirozeným stárnutím buněk, ale i tím, že tyto pacientky častěji zanedbávají pravidelné prohlídky a onemocnění je zachyceno až v pozdější fázi.

Druhou výzkumnou otázkou bylo, zda spolu nějak souvisí věk a počet vyšetřených pacientek. Cytologický screening provádí u žen skoro všech věkových kategorií. Pro účely výzkumu byly ženy rozřazeny do věkových kategorií po 5 letech a vznikly tak kategorie od žen mladších 15 let do žen starších 85 let věku. Od kategorie žen mladších 15 let, do kategorie žen ve věku 45-50 počty vyšetřovaných žen rostou a od kategorie 50-55 let počty vyšetřovaných žen ubývají. Nejvíce zastoupenou vyšetřovanou skupinou jsou ženy ve věku 40-45 let, což má souvislost s tím, že je to nejvíce zastoupená skupina žen v populaci.

Třetí výzkumnou otázkou bylo, jaký je poměr mezi kategoriemi jednotlivých nálezů. Počítáme celkem se 13 kategoriemi dle klasifikace užívané v Bioptické laboratoři, který vychází z klasifikace Bethesda. Mou hypotézou bylo, že nejčastější kategorií kategorie 1 – NILM. Tato hypotéza byla potvrzena a do kategorie 1 spadá 96 % všech vyšetřených vzorků. Zbylá procenta jsou rozložena mezi ostatní kategorie, kdy druhé nejvyšší zastoupení má kategorie 2 – ASC-US, do které spadají přibližně 2 % všech vyšetřených vzorků a třetí nejvyšší zastoupení má kategorie 4 – LSIS, kam spadá 1 % všech vzorků. Zbylé procento je rozděleno mezi zbývající kategorie, včetně kategorií s nejvíce závažnými nálezy.

Čtvrtou výzkumnou otázkou bylo, zda existuje vztah mezi kategoriemi nálezů a jednotlivými lety. K zodpovězení této výzkumné otázky byl použit výpočet pomocí χ^2 testu nezávislosti. Jsou provedeny dva samostatné výpočty, kdy do prvního jsou zahrnuty 3 kategorie pozitivních nálezů, které jsou utvořeny pro účely χ^2 testu z jednotlivých kategorií nálezů dle klasifikace Bethesda, jelikož χ^2 test není schopen spolehlivě počítat s hodnotami, které jsou menší než 5. Výsledek v rámci tohoto výpočtu spadá do 95 % intervalu spolehlivosti a jeho p-hodnota odpovídá zhruba 12,4 %. To znamená, že je zhruba 12,4 % šance, že dostaneme stejné hodnoty, pokud bychom měli jiný vzorek dat. Počty různě závažných nálezů se tedy v únoru v letech 2020-2022 významně neměnily a nebyl tak prokázán vliv protipandemických opatření. V druhém výpočtu byla zahrnuta i 4. kategorie, a to kategorie beználezových pacientek. Výsledek v rámci tohoto výpočtu nespadá do 95 % intervalu spolehlivosti a má hodnotu necelého 1 %. To znamená, že je extrémně nízká šance, že by se souborem dat stejných kategorií byl zopakován tento výsledek. Vzhledem k velmi

nízké hodnotě pravděpodobnosti zopakování lze usuzovat, že jsou data nějakým způsobem závislá. V porovnání se zbylými lety byl počet vyšetření v roce 2021, kdy byla platná nejprísnější protipandemická opatření, překvapivě nejvyšší.

Hlavním cílem bylo zjistit provázanost cytologických a histopatologických metod používaných při vyšetření děložního čípku. K objasnění tohoto cíle jsou zapotřebí odpovědi na všechny předchozí cíle a otázky, kdy z odpovědí vyplývá, že tyto dvě metody na sebe velmi úzce navazují. Již zavedený systém screeningu pomocí cytologického vyšetření a na něj navazující rozšířené vyšetření pomocí histopatologického vyšetření je plně funkční a díky kombinaci těchto metod je zachycena naprostá většina žen s onemocněním děložního čípku. Cytologie díky své vysoké senzitivitě zachytí všechny podezřelé nálezy a histologie díky své vysoké specifitě potvrdí či vyvrátí cytologický nález.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce s názvem „Cytologické vyšetření děložního čípku a jeho korelace s histopatologickým nálezem“ je rozdělena na dvě části, a to teoretickou a praktickou.

Teoretická část je zaměřena především na anatomii a patologii ženských pohlavních orgánů. Je zde popsána děloha, její anatomická a histologická stavba a také její fyziologické fungování a mikroflóra. Dále je zde popisována vagína a její patologie, jako jsou bakteriální, mykotická, parazitární či virová onemocnění. Pozornost je zde věnována i děložnímu krčku, a to především jeho zánětlivým a nádorovým onemocněním. Popsáno je zde i endometrium, jeho funkční změny, zánětlivé onemocnění, hyperplázie, nádory a ve zkratce také endometrióza. Věnuji se zde také cervikálnímu screeningu a cytologické klasifikaci Bethesda, cytologickým metodám jako jsou PAP a LBC a imunohistochemii, především nádorovému markeru p16.

Praktická část je zaměřena na zpracování poskytnutých dat a zodpovězení výzkumných cílů a otázek.

Prvním cílem bylo porovnat počty a metody vyšetření. Z dat vyplývá, že v cytologických vyšetření převládá metoda PAP nad metodou LBC a celkově je cytologií několikanásobně více než následných histologických vyšetření. Druhým cílem bylo objasnit kritéria cytologického screeningu. Ten má jako každá jiná laboratorní metoda své přednosti a svá úskalí. Data ukazují, že má vysokou senzitivitu (přibližně 98 %), ale poměrně nízkou specifitu (přibližně 14,5 %). Tato nízká hodnota je ale zkreslená, jelikož nemáme data např. o histologických vyšetřeních provedených na jiných pracovištích. Třetím cílem bylo objasnit vztah mezi cytologií a histologií. I když je každá z těchto metod samostatně funkční, předností cytologie je její malá invazivnost a rychlost, zatímco histopatologické vyšetření vykazuje vyšší přesnost. Je vhodné v případě podezření na závažnější nález doplnit základní cytologii o histopatologické vyšetření.

První otázkou bylo, zda existuje spojitost mezi věkem a závažností nálezů. Z dat vyplývá, že se zvyšujícím se věkem pacientek se častěji objevují závažnější nálezy. Druhou otázkou bylo, zda existuje spojitost mezi věkem a počtem vyšetření, kdy je jasně vidět, že od věkové kategorie 15 a méně let do věkové kategorie 45-50 let počty vyšetřených žen stoupají a od kategorie 50-55 do kategorie žen starších 85 let počty vyšetření klesají. Třetí

otázkou bylo, jaký je poměr mezi jednotlivými kategoriemi. Nejzastoupenější kategorií je kategorie 1 – NILM, kdy do této kategorie spadá 96 % všech vyšetření. Čtvrtou otázkou bylo, zda existuje vztah mezi jednotlivými roky, během kterých byla data sbírána. Proběhly dva výpočty, ze kterých vyplývá, že pokud bereme v potaz pouze kategorie pozitivních nálezů, mezi jednotlivými roky není výrazný rozdíl. Pokud ale bereme v potaz kromě kategorií nálezů i kategorii NILM, zjistíme, že mezi jednotlivými roky existuje statistická závislost.

14 BIBLIOGRAFIE

1. BALKO, Jan, TONAR Zbyněk a VARGA Ivan. Memorix histologie. 1. Praha: Triton, 2016. ISBN 978-80-7553-009-7.
2. Byun JM, Jeong DH, Kim YN, Cho EB, Cha JE, Sung MS, Lee KB, Kim KT. Endometrial cancer arising from atypical complex hyperplasia: The significance in an endometrial biopsy and a diagnostic challenge. National Library of Medicine. [Online] 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4663224/>.
3. CIBULA, David a PETRUŽELKA, Luboš. Onkogynekologie. Praha : Grada, 2009. 978-80-247-2665-6.
4. CITTERBART, Karel. Gynekologie. Praha: Galén, 2001. 80-7262-094-0.
5. ČEPICKÝ, Pavel. Kapitoly z diferenciální diagnostiky v gynekologii a porodnictví. Praha : Grada Publishing, 2018. 978-80-247-5604-2.
6. DAMJANOV, Ivan. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, Seventh Edition. Shock. 23, květen 2005, Sv. 5.
7. DVOŘÁK, Karel, DVOŘÁKOVÁ, Zdeňka, FEIT, Josef, LUKÁŠ, Zdeněk a ŠMARDOVÁ, Jana. Základy histopatologických vyšetřovacích metod. [Online] 2008. [Citace: 24. 01 2023.] <https://atlases.muni.cz/atlases/stud/pdf/histmet>.
8. E-learningový portál LF UK v Plzni. [Online] 7. květen 2021. <https://lms.lfp.cuni.cz/mod/page/view.php?id=4322>.
9. HÁJEK, Zdeněk, ČECH Evžen a MARŠÁL Karel. Porodnictví 3., zcela přepracované a dopl. vyd. Praha: Grada, 2014. 978-80-247-4529-9.
10. HAMPLOVÁ, Lidmila. Veřejné zdravotnictví a výchova ke zdraví: pro zdravotnické obory. Praha: Grada Publishing, 2019. 978-80-271-0568-7.
11. Komenda M., Panoška P., Bulhart V., Žofka J., Brauner T., Hak J., Jarkovský J., Mužík J., Blaha M., Kubát J., Klimeš D., Langhammer P., Daňková Š., Májek O., Bartůňková M., Dušek L. COVID-19: Přehled aktuální situace v ČR. Onemocnění aktuálně [online]. Praha: Ministerstvo zdravotnictví ČR, 2020 [cit. 30.03.2023]. Dostupné z: <https://onemocneni-aktualne.mzcr.cz/covid-19>.
12. Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2017). Robbins Basic Pathology (10th ed.). Elsevier – Health Sciences Division.
13. MA., Pangarkar. The Bethesda System for reporting cervical cytology. Cytojournal. Apr 30, 2022, Sv. 9:28. doi: 10.25259/CMAS_03_07_2021 PMID: 35673697; PMCID: PMC9168399.

14. MAČÁK, Jirka a MAČÁKOVÁ Jana. Patologie. 3., doplněné a přepracované vydání. Praha : Grada Publishing, 2022. 978-80-271-3507-3.
15. MAŠATA, Jaromír. Infekce v gynekologii. 3. rozšířené vydání. Praha : Maxdorf, 2017. 978-80-7345-531-6.
16. Nayar, Ritu a Wilbur, David C. The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Springer, 2015. ISBN: 978-3-319-11074-5.
17. NOVÁKOVÁ, Lucie, BLANKOVÁ, Bětko. Ženská rozmnožovací soustava, těhotenství a porod. Funkce buněk lidského těla. [Online] <http://fbt.cz/skripta/viii-rozmnozovaci-soustavy/1-zenske-pohlavni-organy-tehotenstvi-a-porod/>.
18. Performance of p16INK4a ELISA as a primary cervical cancer screening test among a large cohort of HIV-infected women in western Kenya: a 2year cross-sectional study. PubMed. [Online] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27625065/>.
19. PILKA, Radovan a PROCHÁZKA Martin. Gynekologie. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2012. 978-80-244-3019-5.
20. ROTTEROVÁ Pavla, NENUTIL, Rudolf, HANZELKOVÁ, Zina et al. Expres p16INK4a v dysplaziích a nádorech děložního čípku. Klinická onkologie. 2003, 3.
21. SADÍLEK, Jan. ThinPrep Pap test. GynHelp. [Online] <https://www.gynhelp.cz/vysetreni/thinprep-pap-test.php>.
22. Sčítání 2021. [Online] <https://www.czso.cz/csu/scitani2021/vekova-struktura>.
23. ŠPAČEK, Jiří, BUCHTA Vladimír a JÍLEK Petr. Vulvovaginální dyskomfort a poruchy poševního prostředí. Praha: Grada, 2013. 978-80-247-4554-1.
24. ŠTORK, Jiří. Dermatovenerologie. Praha: Galén, 2008. 978-80-7262-371-6.
25. VOSMÍK, František. Dermatovenerologie. Praha: Karolinum, 1999. 80-7184-633-3.
26. ZÁMEČNÍK, Josef. Patologie. Praha: LD Prager Publishing, 2019. 9788027064571.
27. Ženská rozmnožovací soustava, těhotenství a porod. Funkce buněk a lidského těla Multimediální skripta . [Online] <http://fbt.cz/skripta/viii-rozmnozovaci-soustavy/1-zenske-pohlavni-organy-tehotenstvi-a-porod/>.

SEZNAM PŘÍLOH

A – návod k vyšetření protilátky anti – p16

B – protokol p16*

C – tabulka hodnot χ^2 testu

PŘÍLOHY

A,



Anti - p16

Myšacia monoklonálna protilátka

KATALÓGOVÉ ČÍSLO

KONCENTROVANÁ

DB 253-0.1	(100 µl)
DB 253-0.2	(200 µl)
DB 253-0.5	(500 µl)
DB 253-1	(1 ml)

PRIPRAVENÁ NA POUŽITIE (RTU)

DB 253-RTU-7	(7 ml)
DB 253-RTU-15	(15 ml)

INFORMÁCIE O PRODUKTE

Klon:	R15-A
Pufor:	20 mM Tris-HCl, pH 8,0
Stabilizátor:	20 mg/ml BSA
Konzervačná látka:	0,05% Na ₂ S

Špecifita:	ľudský antigén
Expirácia:	24 mesiacov odo dňa odoslania
Imunogén:	Ľudský p16 proteín

Bunková lokalizácia:	cytoplazma, jadro
Positívna kontrola:	tkanivo karcinómu krčka maternice
Uniprot číslo:	P42771

SKLADOVANIE A APLIKÁCIA

KONCENTROVANÁ

Skladovanie: +4°C
Aplikácia: IHC-P,
riedenie 1:100

PRIPRAVENÁ NA POUŽITIE (RTU)

Skladovanie: +4°C, nezmrazujte!
Aplikácia: IHC-P,
prípravená na použitie

IHC-P PROTOKOL - NÁVOD NA POUŽITIE

1. Deparafinovanie rezov v 3 xylénoch po 10 min.
2. Rehydratácia rezov v zostupnej rade koncentrácie etylalkoholu (96%, 80% a 70%) po 10 min.
3. Oplach v destilovanej vode – 2 x 5 min.
4. Blokovanie endogénnej peroxidázy – 10 min. v 3% H₂O₂.
5. Oplach rezov v destilovanej vode – 2 x 5 min.
6. Revitalizácia antigénu v Tris-EDTA pufrí, pH 9,0* a inkubácia vo vodnom kúpeli pri 95-97°C – 25 min.
7. Chladenie rezov v pufrí (Tris-EDTA Pufor, pH 9,0) – 15 min.
8. Oplach v destilovanej vode – 2 x 5 min.
9. Oplach v PBS (phosphate buffer saline, pH 7,0-7,5) doplnenom 0,05% Tween-20 (Pufor A) – 2 x 5 min.
10. **KONCENTROVANÁ:**
Inkubácia rezov s primárnou protilátkou – 60 minút vo vlhkej komôrke pri izbovej teplote, **riedenie protilátky 1:100.**
PRIPRAVENÁ NA POUŽITIE (RTU):
Inkubácia rezov s primárnou protilátkou vo vlhkej komôrke pri izbovej teplote, 60 minút. Protilátka je predriedená a **prípravená na použitie.**
11. Oplach v Pufrí A – 3 x 5 min.
12. Aplikácia sekundárnej protilátky (protokol závisí od dodávateľa) a pokračovanie v štandardnom IHC-P protokole (HRP-Peroxid-DAB). Odporúčame mikropolymer-HRP duálny detekčný kit králik/myš DB Biotech (<http://www.dbbiotech.com/products/detekcny-system.html>).
13. Oplach v Pufrí A – 3 x 5 min.
14. Aplikácia chromogénu (DAB), 1 - 3 min.
15. Oplach v obytnej vode, 2 x 5 min.
16. Dotarbenie hematoxylinom – 5 min.
17. Oplach v obytnej vode – 3 x 2 min.
18. Montovanie.

* Tris-EDTA pufor (10mM Tris báza, 1mM EDTA, pH 9,0):

TRIS 1,21 g; EDTA 0,37 g; Destilovaná voda 1000 ml
Rozpustiť v 700 ml destilovanej vody. Upraviť pH 1M HCl na 9,0. Upraviť konečný objem na 1 liter s destilovanou vodou. Tento roztok skladujte pri izbovej teplote 3 mesiace alebo ovi +4°C cre dlhodobé skladovanie.



HQ SIL výrazná nukleárna a cytoplazmatická pozívitá p16, vizualizovaná anti-p16 protilátkou DB 253, klon R15-A. 4 µm hrubý rez z ľudského tkaniva farbený podľa korešpondujúceho protokolu DB Biotech.

VENTANA PROTOKOL - NÁVOD NA POUŽITIE

DOPORUČANÝ APLIKAČNÝ PROTOKOL PRE VENTANA BENCHMARK SLIDE STAINING SYSTEM

1. Sušenie (Enter).
2. Zahriať sklíčka (72°C) a inkubovať po dobu 4 minút. Sušenie.
3. Odparafinovanie (Enter).
4. Ohriať sklíčka (72°C), Odparafinovanie.
5. Kondicionovanie buniek (Enter).
6. ULTRA Kondicionér #1 (Enter).
7. Zahriať sklíčka (95°C) a inkubovať po dobu 8 minút (Kondicionér buniek #1).
8. 20 minút pri použití fľaše ULTRA CC1 (Enter).
9. 36 minút pri použití fľaše ULTRA CC1 (Enter).
10. Titrácia (Enter).
11. Ručná aplikácia primárnej protilátky a inkubácia po dobu 36 min.
12. Jadrové farbenie (Enter).
13. Aplikovať jednu kvapku Hematoxylin (Jadrové farbenie), zakryť a inkubovať po dobu 4 minút.
14. Po jadrovom farbení (Enter).
15. Aplikovať jednu kvapku biuing reagent (po jadrovom farbení), zakryť a inkubovať po dobu 4 minút.

UPOZORNENIA

1. **Pre riedenie koncentrovaných protilátok doporučujeme použiť DB Riediaci roztok primárnej protilátky (katalógové čísla DB D-125, alebo DB D-250), alebo jeho ekvivalent s minimálnym obsahom "protease free BSA" ≥ 1mg/ml. V opačnom prípade nemusí dôjsť k uznaniu reklamácie.**
2. **Pred otvorením skúmavku centrifugovať.**
3. Reagencia je určená pre profesionálnu In vitro diagnostiku v laboratóriách.
4. Nepoužívajte reagentu po uplynutí doby použiteľnosti.
5. Chráňte obsah fľašičky pred kontamináciou.
6. Akákoľvek odchýlka od odporúčaných postupov uvedených v pracovnom protokole môže mať vplyv na konečné výsledky.
7. Reagencia obsahuje azid sodný (NaN₃), ktorý je toxický pri vyšších koncentráciách, avšak koncentrácia prítomná v tejto reagentii (0,05%) nie je považovaná za nebezpečnú.
8. Likvidácia odpadového materiálu sa musí vykonať podľa platných miestnych predpisov.
9. Používajte pri práci ochranné prostriedky a vyvarujte sa kontaktu s očami a pokožkou.

B,

Detaily protokolu

Agilent
Dako

Protokol - p16*

Verze: 09.07.2020 11:16

Odparafinování			
Dvoufázové odparafinování IHC			
Rozpouštědlo	Transportní kapalina	Teplota	Inkubace horní
Clearify Clearing Agent	DI Water	25 °C	10 s
Inkubace spodní	Cyklů		
1 min	1		
Oplach – zbavení vosku IHC			
Činidlo	Inkubace	Cyklů	
DI Water	5 s	1	
Odmaskování antigenů			
Odmaskování antigenů IHC			
Činidlo	Teplota	Inkubace	Chladicí kapalina
EnV FLEX TRS, High pH	97 °C	30 min	DI Water
Promytí IHC bez vyhledání cíle			
Barvení			
Promytí			
Činidlo	Inkubace	Cyklů	
Wash Buffer	2:40 min	2	
Enzymatické předpůsobení			
Promytí			
Blokování proteinů			
Primární protilátka			
Činidlo	Inkubace		
P16*1:100	20 min		
Promytí			
Činidlo	Inkubace	Cyklů	
Wash Buffer	2 min	10	
Blokování endogenních enzymů			
Činidlo	Inkubace		
EnV FLEX Peroxidase-Blocking Reagent	3 min		
Promytí			
Činidlo	Inkubace	Cyklů	
Wash Buffer	2 min	10	
Sekundární činidlo			
Promytí			
Sekundární činidlo			
Promytí			
Značený polymer			
Činidlo	Inkubace		
EnV FLEX/HRP	20 min		
Promytí			
Činidlo	Inkubace	Cyklů	
Wash Buffer	2 min	10	
Promytí			
Činidlo	Inkubace	Cyklů	

Detaily protokolu

Agilent
Dako

Wash Buffer	2 min	10
Promytí		
Činidlo	Inkubace	Cyklů
DI Water	31 s	1
Promytí		
Činidlo	Inkubace	Cyklů
Wash Buffer	2 min	10
Substrátový chromogen		
Činidlo	Inkubace	
EnV FLEX Substrate Working Solution	10 min	
Promytí		
Činidlo	Inkubace	Cyklů
Wash Buffer	2 min	10
Promytí		
Činidlo	Inkubace	Cyklů
DI Water	31 s	1
Promytí		
Činidlo	Inkubace	Cyklů
Wash Buffer	2 min	10
Barvení pozadí		
Barvit pozadí		
Činidlo	Inkubace	
Hematoxylin	3 min	
Promytí		
Činidlo	Inkubace	Cyklů
DI Water	2 min	10
Promytí		
Činidlo	Inkubace	Cyklů
Wash Buffer	2 min	10

Zdroj: protokoly k p16 od firmy Dako

C,

Degrees of freedom (df)	Significance level (α)							
	.99	.975	.95	.9	.1	.05	.025	.01
1	-----	0.001	0.004	0.016	2.706	3.841	5.024	6.635
2	0.020	0.051	0.103	0.211	4.605	5.991	7.378	9.210
3	0.115	0.216	0.352	0.584	6.251	7.815	9.348	11.345
4	0.297	0.484	0.711	1.064	7.779	9.488	11.143	13.277
5	0.554	0.831	1.145	1.610	9.236	11.070	12.833	15.086
6	0.872	1.237	1.635	2.204	10.645	12.592	14.449	16.812
7	1.239	1.690	2.167	2.833	12.017	14.067	16.013	18.475
8	1.646	2.180	2.733	3.490	13.362	15.507	17.535	20.090
9	2.088	2.700	3.325	4.168	14.684	16.919	19.023	21.666
10	2.558	3.247	3.940	4.865	15.987	18.307	20.483	23.209
11	3.053	3.816	4.575	5.578	17.275	19.675	21.920	24.725
12	3.571	4.404	5.226	6.304	18.549	21.026	23.337	26.217
13	4.107	5.009	5.892	7.042	19.812	22.362	24.736	27.688
14	4.660	5.629	6.571	7.790	21.064	23.685	26.119	29.141
15	5.229	6.262	7.261	8.547	22.307	24.996	27.488	30.578
16	5.812	6.908	7.962	9.312	23.542	26.296	28.845	32.000
17	6.408	7.564	8.672	10.085	24.769	27.587	30.191	33.409
18	7.015	8.231	9.390	10.865	25.989	28.869	31.526	34.805
19	7.633	8.907	10.117	11.651	27.204	30.144	32.852	36.191
20	8.260	9.591	10.851	12.443	28.412	31.410	34.170	37.566
21	8.897	10.283	11.591	13.240	29.615	32.671	35.479	38.932
22	9.542	10.982	12.338	14.041	30.813	33.924	36.781	40.289
23	10.196	11.689	13.091	14.848	32.007	35.172	38.076	41.638
24	10.856	12.401	13.848	15.659	33.196	36.415	39.364	42.980
25	11.524	13.120	14.611	16.473	34.382	37.652	40.646	44.314
26	12.198	13.844	15.379	17.292	35.563	38.885	41.923	45.642
27	12.879	14.573	16.151	18.114	36.741	40.113	43.195	46.963
28	13.565	15.308	16.928	18.939	37.916	41.337	44.461	48.278
29	14.256	16.047	17.708	19.768	39.087	42.557	45.722	49.588
30	14.953	16.791	18.493	20.599	40.256	43.773	46.979	50.892
40	22.164	24.433	26.509	29.051	51.805	55.758	59.342	63.691
50	29.707	32.357	34.764	37.689	63.167	67.505	71.420	76.154
60	37.485	40.482	43.188	46.459	74.397	79.082	83.298	88.379
70	45.442	48.758	51.739	55.329	85.527	90.531	95.023	100.425
80	53.540	57.153	60.391	64.278	96.578	101.879	106.629	112.329
100	61.754	65.647	69.126	73.291	107.565	113.145	118.136	124.116
1000	70.065	74.222	77.929	82.358	118.498	124.342	129.561	135.807

Zdroj: https://www.scribbr.com/wp-content/uploads/2022/05/chi-square-distribution-table.png?fbclid=IwAR11d6qC0m4tTu2gHrd-7N6yvlSqIqlw3fgPjKwto_VShSKWnpxN4pERhWI