



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Histologická stavba dělohy, porovnání
tkáně fyziologické s vybranými
patologickými stavy

Histology of the uterus, comparison of
physiological tissue arrangement and
selected pathological conditions

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví
Studijní obor: Zdravotní laborant
Autor bakalářské práce: Hana Krykorková
Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Daniela Obitková

Kladno 2020/2021



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Krykorková** Jméno: **Hana** Osobní číslo: **482876**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Specializace ve zdravotnictví**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Histologická stavba dělohy, porovnání tkáně fyziologické s vybranými patologickými stavy

Název bakalářské práce anglicky:

Histology of uterus, comparison of physiological tissue arrangement and selected pathological conditions

Pokyny pro vypracování:

Předmětem bakalářské práce bude histologické porovnání fyziologické stavby děložního čípku s vybranými patologickými stavy této části dělohy. V teoretické části bude popsána anatomie a histologie děložní tkáně a podrobněji bude popsán děložní čípek, jeho funkce, fyziologické a patofyziologické souvislosti a stavy. Praktická část bude zaměřena na přípravu histologických preparátů v jednotlivých korcích od přijetí vzorku tkáně po histologické barvení a dokončení preparátu. Porovnávána bude histologická stavba tkáně fyziologické a patologické zejména v barvení hematoxylin-eozin. Jako doplňková metoda bude použito barvení imunohistochemické, používané zejména k detekci buněk některých maligních novotvarů.

Seznam doporučené literatury:

- [1] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA, Memorix histologie, ed. 2. vydání, Triton, 2017, ISBN 978-80-7553-249-7
- [2] JIRKOVSKÁ, Marie, Histologická technika: základy, ed. 2. vyd., Galén Praha, 2017, ISBN 978-80-7492-325-8
- [3] ROB, Lukáš, Alois MARTAN a Pavel VENTRUBA, Gynekologie, ed. 3. doplněné a přepracované vydání, Galén Praha, 2019, ISBN 978-80-7492-426-2

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

MUDr. Daniela Obitková

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Datum zadání bakalářské práce: **21.9.2020**

Platnost zadání bakalářské práce: **18.09.2022**


prof. MUDr. Leoš Navrátil, CSc., MBA, dr.h.c.
podpis vedouc(ho) katedry


prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
podpis děkana(ky)

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Histologická stavba dělohy, porovnání tkáně fyziologické s vybranými patologickými stavy vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 13.05.2021

.....
Jméno autora vč. titulů
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí práce paní MUDr. Daniele Obitkové za návrh tématu, odborné a konstruktivní rady a za veškerý věnovaný čas a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat paní Bc. Ladislavě Krejčíkové za poskytnutí prostor v laboratoři a dále všem pracovníkům na oddělení Patologie v Ústřední vojenské nemocnici v Praze za veškerou pomoc a poskytnutý materiál pro zpracování.

ABSTRAKT

Bakalářská práce s názvem Histologická stavba dělohy, porovnání tkáně fyziologické s vybranými patologickými stavy se v první části zabývá anatomickým a histologickým popisem tkáně dělohy a děložního hrdla, na jehož patologické změny je práce nejvíce zaměřena. Dále jsou popsána rizika vzniku onemocnění a v případě infekce lidskými papilomaviry, následného přenosu. Pozornost je také věnována vyšetřovacím metodám, které se podílejí na diagnostice onemocnění. Veškeré získané vzorky tkáně byly zpracovány postupy obvyklými v histologické laboratoři. Základní barvení hematoxylin-eosin bylo doplněno imunohistochemickou detekcí s použitím metody KI-67 a P16. Získané preparáty jsou vyhodnoceny s důrazem na porovnání zdravé tkáně a detekovaných patologických stavů. Mezi vybranými patologickými stavy se nacházely jednotlivé stupně prekancerózních lézí (cervikální intraepiteliální neoplazie stupně 1-3, a dlaždicobuněčný karcinom), postihující děložní čípek. Všechny tyto vzorky společně s fyziologickou tkání byly podle standartních operačních postupů zpracovány a následně vyhodnoceny a porovnány. Použitá barvení dobře odlišují vybrané patologické stavy od zdravé tkáně děložního čípku.

Klíčová slova

Děložní čípek; imunohistochemická detekce; dlaždicobuněčný karcinom; prekancerózní léze; hematoxylin-eosin; cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN), KI-67; P16.

ABSTRACT

This bachelor's thesis with the title Histology of the uterus, comparison of physiological tissue arrangement and selected pathological conditions firstly concentrates on anatomical and histological description of uterine and cervical tissue, with the special attention to pathological changes of the cervix. There is the description of the risk factors of the onset of the disease and in case of the human papillomavirus infection of the subsequent transmission. At the same time there are described diagnostic methods, which take part in the diagnostic process of selected diseases. All of the acquired samples of tissue were processed according to the standard operational procedures. The procedure using the basic hematoxylin-eosin staining was completed with immunohistochemical detection using the methods KI-67 and P16. The acquired preparations were evaluated with emphasis on comparison of healthy tissue to detected pathological conditions. Among the chosen pathological conditions there were individual stages of precancerous lesions (cervical intraepithelial neoplasia grade 1-3), and the squamous cell carcinoma which affect the cervix. All of these samples, including the physiological tissue, were processed in accordance with the standard operational procedures and then evaluated and compared. The dyes used for staining the samples are well capable to differentiate chosen pathological conditions from the healthy tissue of the cervix.

Keywords

Cervix, immunohistochemical detection, squamous cell carcinoma, precancerous lesion, hematoxylin-eosin, cervical intraepithelial neoplasia, KI-67, P16.

Obsah

1	Úvod.....	9
2	cíle práce.....	10
3	přehled současného stavu.....	11
3.1	Anatomie děložní tkáně.....	11
3.2	Histologie děložní tkáně.....	13
3.3	Histologie děložního hrdla.....	16
3.4	Funkce děložní tkáně a děložního čípku.....	17
3.5	Metaplastické změny na cervixu.....	18
3.6	Patologické stavy děložního hrdla.....	19
3.6.1	Zánět děložního hrdla (cervicitis).....	19
3.6.2	Polypy děložního čípku.....	20
3.6.3	Ovula Nabothi.....	20
3.6.4	Cervikální intraepitelová neoplazie (CIN).....	21
3.6.5	Karcinom děložního čípku.....	22
3.6.6	Rizikové faktory pro vznik CIN a invazivního karcinomu.....	25
3.7	Vyšetření hrdla děložního.....	25
3.7.1	Prebioptické metody vyšetření.....	25
3.7.2	Bioptické metody vyšetření.....	30
4	Metodika.....	32
4.1	Příjem.....	32
4.2	Příkrojení.....	33
4.3	Fixace.....	34
4.3.1	Fyzikální metody fixace.....	34

4.3.2	Metody chemické fixace	35
4.4	Zalévání do média	37
4.4.1	Zalévání do parafínu	38
4.4.2	Zalévání do celoidinu	40
4.4.3	Zalévání do médií rozpustných ve vodě	41
4.5	Krájení	41
4.5.1	Krájení parafínových bloků	41
4.5.2	Krájení celoidinových řezů	43
4.6	Barvení histologických řezů	43
4.6.1	Barvení metodou hematoxylin-eosin	44
4.7	Imunohistochemická metoda.....	46
5	Výsledky	49
5.1	Příjem a přikrajování děložního čípku	49
5.2	Fixace, zalévání a krájení vzorků	51
5.3	Imunohistochemické zpracování vzorku.....	56
5.4	Detekce zpracovaných vzorků.....	59
5.4.1	Preparáty obarvené metodou Hematoxylin-eosin	59
5.4.2	Preparáty zpracované metodou imunohistochemickou	64
6	Diskuze	67
7	Závěr	71
8	Seznam použitých zkratk.....	72
9	Seznam použité literatury	73
10	Seznam použitých obrázků	87
11	Seznam použitých tabulek.....	89

1 ÚVOD

Byť je v České republice zavedena kvalitní prevence jakéhokoli onemocnění ženského pohlavního ústrojí, často se bohužel mívá účinkem, jelikož velké množství žen na prevenci nedbá. Obecně platí, že žena by měla být alespoň jednou ročně od svých 15. let kontrolována u svého gynekologa. Toto preventivní opatření je zavedeno v důsledku praktikování pohlavního styku a dalších rizikových faktorů vzniku onemocnění ženské ho genitálu.

Má bakalářská práce je zaměřena na patologické změny děložního čípku, což jsou velmi častá onemocnění, postihující ženy převážně okolo 45. let věku. Nové studie však poukazují na výskyt těchto onemocnění u žen v mladších věkových kategoriích.

Mezi patologické stavy řadíme i benigní nálezy, kde popisujeme nejčastěji akutní nebo chronické záněty děložního čípku. Cervicitida pak může do jisté míry ovlivňovat život postižené ženy.

Mnohem závažnější stavy jsou však nálezy maligní, kam řadíme cervikální intraepitelové léze a spinocelulární neboli dlaždicobuněčný karcinom. Právě tyto stavy a nádory ohrožují ženy nejvíce na životě.

Díky preventivním opatřením se zlepšil záchyt progredujících onemocnění a snížila se i mortalita, ovšem přírůstek nově diagnostikovaných žen je stále vysoký, a to jak ve vyspělých, tak i v rozvojových zemích.

Téma mé práce jsem si vybrala záměrně, neboť osobě mě velmi blízké byl diagnostikován maligní nález na děložním čípku.

2 CÍLE PRÁCE

Mezi hlavní cíle mé bakalářské práce patří porovnání patologických stavů děložního čípku oproti jeho fyziologické podobě.

Cílem teoretické části bude popis anatomické a histologické stavby děložní tkáně a čípku, přičemž na hrdlo děložní bude brán větší zřetel. Budou popsány jeho funkce, rizikové faktory a jednotlivé možnosti onemocnění děložního hrdla a jejich diagnostika.

V praktické části budou popsány veškeré metody, jejichž použití na konci celého cyklu povede k získání histologických preparátů, jež budou podrobeny zkoumání. Tento proces bude zahrnovat příjem, přikrajování, fixaci, vlastní zalití, krájení, barvení a zamontování. V této části budou zahrnuty základní i speciální druhy histologického barvení jako je hematoxylin-eosin a specifická imunohistochemická detekce. Práce bude zahrnovat komentované obrázky obsahující fyziologickou tkáň děložního čípku a vybrané patologické stavy.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

Děloha je dutý svalový nepárový orgán, který se skládá z několika částí. Často připomíná tvar hrušky. Dělohu můžeme najít v malé pánvi, kde je uchopena pomocí podpůrného a závěsného aparátu [1].

Jednotlivé části dělohy tvoří:

- 1) Corpus uteri (tělo dělohy);
- 2) Isthmus uteri (úžina dělohy);
- 3) Cervix uteri (hrdlo děložní).

3.1 Anatomie děložní tkáně

Corpus uteri, neboli tělo děložní, je největší a zároveň střední částí dělohy. V této části dále rozlišujeme:

- a) Fundus uteri (dno děložní) – které tvoří horní část dělohy;
- b) Cornua uteri (rohy děložní) – jsou umístěny na pomezí vstupu vejcovodů do dělohy;
- c) Cavitas uteri (dutina děložní) – kterou najdeme uvnitř dělohy [2].

Isthmus uteri, neboli krček děložní, je spojnicí mezi tělem a hrdlem děložním. Zásadní proměnou prochází v těhotenství, kdy dochází ke vzniku většího množství vaziva v jeho stěně a zároveň k úbytku hladkého svalstva [3].

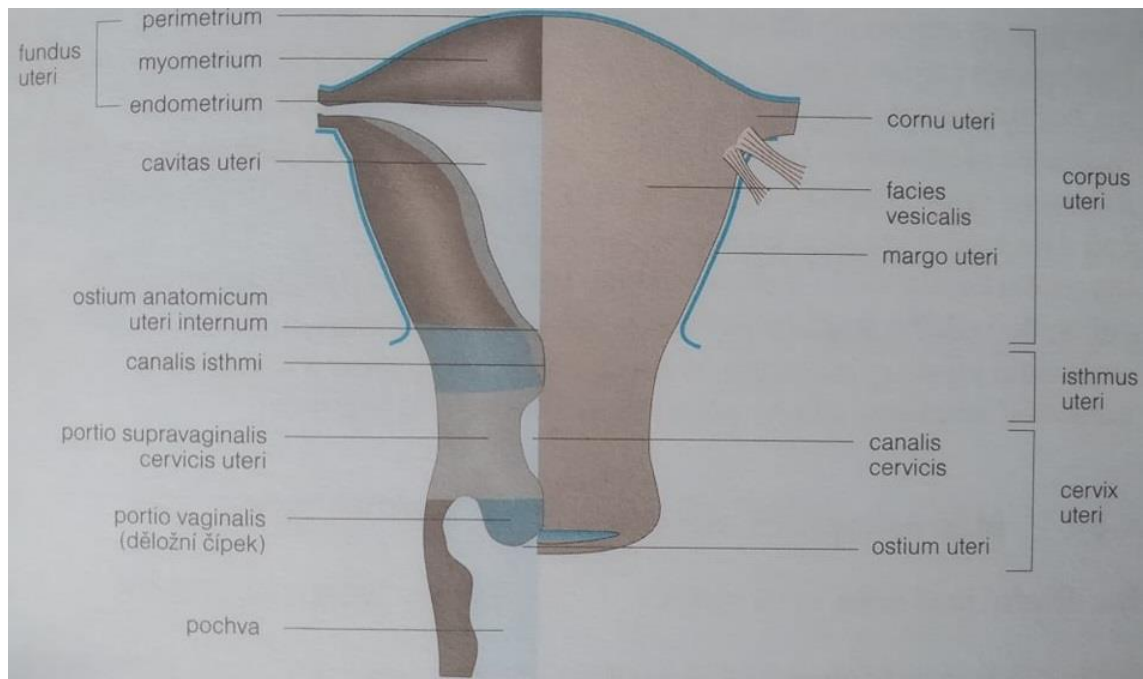
Krček děložní dělíme na 2 části:

- a) Canalis isthmi (dutina úžiny);
- b) Ostium anatomicum uteri internum (vnitřní děložní branka).

Cervix uteri, neboli hrdlo děložní, tvoří nejspodnější část dělohy. Dosahuje délky až 2,5 cm a má válcovitý tvar.

Skládá se z těchto součástí:

- a) Portio supravaginalis cervicis (horní část hrdla děložního) – nachází se těsně nad poševním úponem a jeho sliznice vytváří značné množství plicae palmatae (příčných řas);
- b) Portio vaginalis cervicis (děložní cípek) – jedná se o dolní část hrdla, která vstupuje do pochvy;
- c) Canalis cervicis (kanál hrdla) – je spojnicí děložní dutiny a pochvy;
- d) Ostium uteri (vnější děložní branka) – v této části dochází k vyústění kanálu hrdla na exocervixu v pochvě [4].



Obrázek 1 - Děloha [5]

3.2 Histologie děložní tkáně

Děložní tkáň je zhruba 1,5 cm silná a sestává se ze tří vrstev:

- Tunica mucosa (Endometrium);
- Tunica muscularis (Myometrium);
- Tunica serosa (Perimetrium).

Endometrium je tvořeno dvěma vrstvami, z nichž první, lokalizována na povrchu se nazývá lamina epithelialis, pod ní směrem k děložní svalovině se nalézají lamina propria mucosae. Celkově pak ve sliznici děložní (tunica mucosa) můžeme pozorovat sekreční a bazální buňky, jednoduché tubulózní děložní žlázy a řasinkové buňky [5; 6].

Lamina propria mucosae je tvořena kolagením vazivem, ve kterém nacházíme velké množství fibroblastů. Tyto stromální buňky reagují na hormonální stimulaci tak, že dochází k uskladňování glykogenu a lipidů jako příprava pro

možné otěhotnění. Tento jev označujeme jako predeciduální přeměna, ovšem když dojde k oplodnění, dochází ke vzniku deciduální přeměny a tím pádem i přeměny na deciduální buňky. V mezibuněčné hmotě nacházíme značné množství amorfni složky a retikulárních vláken. V lamina propria mucosae nalézáme glandulae uterinae (děložní žlázy) – jedná se o jednoduché tubulózní žlázy. V této části se vyskytují i granulární buňky, přičemž Hamperlova buňka je považovaná za druhou hlavní granulární buňku endometria. Její hlavní funkce spočívá ve vylučování cytokinů a díky nim tak působí na prorůstání trofoblastu zárodku během jeho uhnízdění a zároveň dochází ke kontrole množení a růstu cév ve sliznici [7; 8].

Endometrium dále rozdělujeme na dvě oblasti. První z nich je Zona functionalis, která tvoří vnější část endometria. Tato vrstva je během menstruačního cyklu odstraňována. Druhá vrstva, která už nepodléhá degradaci, se nazývá Zona basalis. Obsahuje řadu buněk a četnou síť retikulárních vláken [9; 10].

Endometrium se v průběhu dospívání mění. V průběhu pubertálního věku je endometrium tvořeno z jednovrstevného kubického epitelu. Zároveň zde můžeme najít pozůstatek žlázek, které jsou uloženy v tenké lamině proprii mucosae. V období fertilního věku dochází ke vzniku strukturních a funkčních změn ve všech částech dělohy. Kdy ve fundu děložním nacházíme laminu epithelialis, která je tvořena jednovrstevným cylindrickým epitelem [11].

Cévní zásobení endometria je zajišťováno soustavou dvou arterií. První z nich nalezneme ve střední vrstvě myometria, kde je uložena Arteria arcuata, která se větví na přímé arterioly arteriolae rectae a spirálovité arterioly. Zona basalis je zásobovaná krví přes přímé arterioly a u zony functionalis je přívod krve zajišťován spirálovitými arterioly [12; 13].

Myometrium – je považováno za nejsilnější vrstvu děložní stěny, která má sílu asi 1,5 cm. Skládá se ze čtyř vrstev hladkých svalových buněk, které jsou prostoupeny vazivem. Dále je tvořeno krevními a lymfatickými cévami a autonomními nervy. Hladké svalové buňky dosahují délky okolo 50 μm u netěhotné dělohy. V graviditě se však myometrium přizpůsobuje tvarům plodu, následným zmnožením (hyperplasií) a prodloužení (hypertrofii) buněk svaloviny. V důsledku těchto jevů mohou hladké svalové buňky dosáhnout délky až 500 μm i více. V těhotenství dochází rovněž k zmnožení nexů (gap junctions), díky kterým jsou hladké svalové buňky propojeny, přičemž nexy se nejvíce podílejí na kooperaci svaloviny při kontrakcích [14; 15].

Čtyři základní vrstvy myometria jsou:

- Stratum musculare submucosum – podslizniční vrstva svaloviny;
- Stratum musculare vasculosum – největší vrstva svaloviny s četnými krevními cévami;
- Stratum musculare supravasculosum – supravaskulární vrstva;
- Stratum musculare subserosum – subserózní vrstva hladké svaloviny, která leží těsně pod perimetriem [16].

Perimetrium – skládá se z tenké vrstvy kolagenního vaziva, které je pokryto jednovrstevným plochým epitelem - mezotelem. Tunica serosa pokrývá celou zadní, přední a horní plochu dělohy. V místech, kde tunica serosa nepokrývá kolagenní vazivo při hranách dělohy, se nachází vazivová vrstva tunica adventicie neboli parametrium. Tato vrstva je tvořena z velkých cév a nervů a obsahuje četné parametriální vazy, které zahrnují svazky kolagenních vláken [17; 18].

Isthmus dělohy - stavba jeho stěny je oproti stěně těla děložního odlišná pouze nepatrně. Ve stěně isthmusu se nachází menší množství hladkých svalových buněk,

dále pak fibroblasty. Cévní zásobení je na rozdíl od stěny těla děložního chudší. Endometrium je nižší a nepodléhá tak silným cyklickým změnám. V istmu dělohy můžeme najít dva typy žlázek – děložní a žlázy hrdla. Během těhotenství se stěna istmu ztenčí, dochází k nárůstu síly kruhové hladké svaloviny a zároveň ubývá hladká svalovina, která je orientována podélně vzhůru. Z istmu se tedy během těhotenství stává dolní děložní segment [19; 20].

3.3 Histologie děložního hrdla

Hrdlo dělohy tvoří bariéru mezi dělohou a vagínou. Jak již bylo zmíněno v anatomické části, cervix uteri se skládá ze dvou hlavních částí, a to z portio supravaginalis cervicis, což je horní část hrdla ohraničena děložní brankou a z portio vaginalis cervicis (čípek), který představuje dolní část děložního hrdla [21].

Portio supravaginalis cervicis je složen ze tří částí:

- Tunica mucosa endocervicalis je lemována jednovrstevným cylindrickým epitelem, který obsahuje mucinózní sekreční buňky, řasinkové a bazální buňky. Tunica mucosa endocervicalis je dále tvořena vazivovou sliznicí (lamina propria mucosa), sestávající z hladkých svalových buněk a z kolagenního vaziva;
- Dále se skládá ze žlázek děložního hrdla (glandulae cervicales), jejichž funkcí je napomáhání s vylučováním výměšku (secernují hlen), přičemž tento výměšek za normálních okolností slouží jako ochranná bariéra před vnikem mikroorganismů do dělohy. Během ovulace se však síla výměšku sníží a tím usnadňuje průchod spermií;
- V neposlední řadě je horní část hrdla složena z tunici fibromuscularis, která na svém pomezí splývá s jeho sliznicí. Tato vrstva obsahuje méně hladkých svalových buněk a více kolagenního vaziva, zároveň zde

můžeme pozorovat elastická vlákna, která mají svůj účinek hlavně během průchodu plodu do pochvy;

- Poslední částí je tunica externa, která je složena ze dvou vrstev – první vrstva pokrývající přední stranu a hrany endocervixu se nazývá tunica adventicia. Druhá vrstva je naopak lokalizována na zadní straně endocervixu a jedná se o tunicu serosu [22; 23].

Portio vaginalis cervicis, neboli čípek, tvoří spodní část děložního hrdla. Do pochvy ústí kanál hrdla dělohy a tím tak vytváří vnější děložní branku. Během života ženy se tvar čípku mění. U pohlavně vyspělé ženy, která nikdy nerodila, má čípek tvar kónický. Ovšem u ženy, která již rodila, má čípek tvar cylindrický a zevní branka je různě široká dle ektropia.

Obecně se děložní čípek skládá z těchto částí:

- Tunica mucosa exocervicalis – je tvořena vícevrstevným nerohovějícím dlaždicovým epitelem. Pod epitelem je tenká lamina propria mucosae skládající se z malého množství kolagenního vaziva, hladkých svalových buněk a velkého množství papil. V cytoplazmě epitelových buněk jsme schopni rozpoznat glykogenová granula;
- Lamina fibromuscularis – vrstva tvořící vnitřní část děložního čípku obsahující velké množství kolagenního vaziva a menší množství hladké svaloviny [24; 25].

3.4 Funkce děložní tkáně a děložního čípku

Děložní tkáň jako taková slouží pro vývoj zárodku a zároveň svou stavbou napomáhá k vypuzení plodu pomocí stahů hladkých svalových buněk.

Hrdlo dělohy má specifickou funkci během gravidity, kdy svou stavbou dokáže uzavřít vnitřní děložní branku a tím tak tvoří zátku proti působení tlaku plodové vody a samotného plodu [26].

Děložní čípek je důležitou součástí dělohy, neboť obsahuje tubulózní žlázky (glandulae cervicales) secernující hlen. Účinek působení hlenu je však rozdílný v průběhu jednotlivých etap života. Během ovulace je hlen spíše vodnatý, díky čemuž přispívá k pohybu spermií. Během druhé poloviny menstruačního cyklu se tvoří výměšek spíše ve formě hlenovité a lepkavé a tím vytváří jakousi ochranou bariéru před mikrobiálními patogeny. Hlen je složen z jednoduchých cukrů, dále z chloridu draselného, elektrolytů, enzymů, albuminu a globulinu. Ovšem během gravidity je hlen hustší a vytváří hlenovitou zátku, která chrání plod před průnikem infekce [27; 28].

3.5 Metaplastické změny na cervixu

Je známo, že se na endocervixu nachází cylindrický epitel, a naopak na ektocervixu je dlaždicový epitel. Místo, kde dochází ke spojení těchto dvou typů epitelů se nazývá skvamokolumnární junkce. Během pohlavního dozrávání a těhotenství dochází vlivem hormonálních změn ke zvětšení objemu samotného cervixu. Na pomezí junkční zóny je endocervikální epitel vystaven kyselému pH, které je fyziologické ve vagíně. Vzhledem k tomu, že je ektocervix uložen kaudálně směrem do pochvy, brání se proti kyselému pH svým epitelem. Aby došlo k ochraně endocervixu, musí se vytvořit metaplastické změny, které začínají nejdříve na pomezí endocervikálních krypt a klků. V konečné fázi se cylindrický epitel přemění na dlaždicový epitel. Místo, kde došlo k takovéto změně označujeme jako transformační zóna [29; 30].

3.6 Patologické stavy děložního hrdla

Na úvod je nutno rozlišit dva patologické stavy, a to patologii benigní, která omezuje svou velikostí okolní orgány, ale nevytváří metastáze a dále patologii maligní šířící se v těle a vytvářející metastáze.

Mezi benigní onemocnění řadíme:

3.6.1 Zánět děložního hrdla (cervicitis)

Jedná se o zánětlivé onemocnění, které postihuje jak endocervix, ectocervix, ale i transformační oblast mezi nimi. Může mít původ bakteriální, virový nebo mykotický. Záněty všeobecně bývají buď infekčního nebo neinfekčního původu. Do infekčních příčin řadíme mikroorganismy, které se do těla ženy dostávají přes vagínu nebo také pohlavním stykem. Mezi neinfekční příčiny řadíme alergie na menstruační tampóny nebo cizí tělesa jako jsou vaginální pesary či latexové kondomy [31; 32].

Rozlišujeme tyto záněty:

- Akutní;
- Chronické.

Akutní záněty se nejčastěji projevují specifickým hnisavým a zapáchajícím výtokem, který svůj vzhled a charakter mění dle svého původce. Dalším symptomem může být edém na cervixu nebo zvýšená tvorba cervikálního hlenu. Po vyšetření prostřednictvím poševních zrcadel můžeme indikovat hrdlo jako zarudlé a lehce krvácející v důsledku zmnožení kapilár. Zánět vzniká následkem pohlavně přenosných nemocí jako jsou lidské papilomaviry, dále jen HPV viry či

chlamydie. Nesmíme opomenout ani vulvovaginální přenosy kvasinek nebo jiných bakteriálních kmenů, které se vyskytují v pochvě [33].

Chronické afekce navazují na akutní záněty, přičemž tyto bývají často bez jakýkoliv příznaků. Někdy ženu trápí tlak v podbřišku zejména při pohlavním styku. Při chronické infekci dochází ke zvýšené tvorbě cervikálního hlenu, který bývá hromaděn v cervikálních kryptách a vyskytující se výtok není zdaleka tak silný jako v akutní fázi cervicitidy. Cervix je zarudlý a edematózní. U neléčené infekce může dojít k progresi až do vejcovodů. Příčinu vzniku rozlišujeme dle vlivů, a to na mechanické (cizí tělesa – jako jsou vaginální pesary), chemické (lokální antikoncepce nebo hygienické prostředky) a biologické (ektopie) [34].

3.6.2 Polypy děložního čípku

Polypy se nejčastěji vytváří jako doprovodná reakce zánětů, u nichž pozorujeme polypovité struktury s rozšířenými žlázkami, které přerůstají nad povrch okolních částí. Pro polypy je specifické, že jádra buněk se nachází při jejich bázi. Dorůstají různých velikostí a nejrizikověji působí v období pohlavního dospívání a menopauzy, kdy dochází ke značnému krvácení. Často tak může dojít k záměně u velkých korporálních slizničních polypů, kdy se nesprávně určí a takto vzniklý tvar se označí jako karcinom děložního těla. Polypy jsou tvořeny cylindrickým epitelem, u něhož můžeme v některých případech pozorovat dlaždicobuněčnou metaplázi. U většiny žen je specifická zvýšená sekrece poševního výtoků nebo lehké špinění po pohlavním styku, ovšem ve většině případů se polypy spíše projevují bezpříznakově [35; 36; 37].

3.6.3 Ovula Nabothi

Dalším typickým nálezem jsou ovula Nabothi. Jedná se o retenční cysty děložního hrdla, které vznikají vlivem metaplastických změn epitelu. Dochází

k přeměně z původního cylindrického epitelu na epitel dlaždicový. Cylindrické buňky, které tvořily hlen, nemohou sekret vypudit přes vývodné kanálky krypt, a proto hlen zůstává v uzavřených kryptách, čímž dochází ke vzniku těchto cyst [38; 39].

Výše uvedená onemocnění tedy řadíme mezi benigní, zatímco v následující části se hodlám věnovat onemocněním maligním.

3.6.4 Cervikální intraepitelová neoplazie (CIN)

Jedná se o prekurzorové léze (prekancerózy), ze kterých následně vznikají dlaždicobuněčné karcinomy. Před vznikem samotného karcinomu dochází ke změnám epitelu, které probíhají několik let. Toto období změn také označujeme jako prekancerózní změny neboli dysplazie [40].

Rozlišujeme tři typy těchto dysplazií:

- CIN I – mírné;
- CIN II – střední;
- CIN III – těžké.

Mírná dysplazie CIN I je často označována jako skvamózní intraepitelová léze nízkého stupně, dále jen LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion). Obsahuje ve vrstvě epitelu buňky, které jsou napadené virem HPV. Tyto buňky označujeme jako Koilocyty. Jejich jádro je zvětšené, hyperchromní a od cytoplazmy je odděleno perinukleární vakuolou. Dysplazii nalézáme obvykle v jedné třetině epitelu, kdy takto vzniklé změny se jeví jako rozšířená bazální vrstva. Když nedojde ke včasnému zachytu, může dojít ke vzniku dysplazie II stupně [41; 42; 43].

Střední dysplazii CIN II zařazujeme do skvamózních intraepitelových lézí vysokého stupně, dále jen HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion). Zahrnuje větší změny, a to v rozdílných počtech a tvarech jednotlivých buněk. Je zde přítomná jaderná pleomorfie a koilocytóza, přičemž mitózy a dysplazie zasahují až do dvou třetin epitelu. Často dochází k progresi do CIN III [44; 45].

Těžkou dysplazii CIN III zařazujeme opět do HSIL. Tento typ dysplazie postihuje celý epitel. Obsahuje větší množství mitózy, buňky jsou chaoticky uspořádány a pleomorfní. Tento typ dysplazie často přechází do mikroinvazivního karcinomu, ze kterého následně vzniká invazivní karcinom [46].

3.6.5 Karcinom děložního čípku

Mezi nejvýznamnější a zároveň nejčastější nádory, které postihují ženy, řadíme dlaždicový neboli spinocelulární epitelový karcinom, u něž rozeznáváme dva typy, a to velkobuněčný nerohovějící, jehož výskyt je častější a dále malobuněčný nerohovějící, který je nebezpečnější. Spinocelulární karcinom se nachází na pomezí přechodu epitelů, kde dochází ke změně z dlaždicového nerohovějícího epitelu ektocervixu na cylindrický epitel endocervixu. Místo přechodu mezi těmito epitely se označuje jako transformační zóna. Dlaždicobuněčný karcinom roste exofyticky nebo endofyticky. Ve formě exofytického růstu je křehký, bílý a kontaktně krvácející. Naopak u endofytického růstu dochází k jeho rozpadu po předešlé infiltraci. Tento typ karcinomu nejčastěji postihuje ženy okolo 45. let věku. Část karcinomů se tvoří v cervikálním kanále, kde je nelze základním gynekologickým vyšetřením zaznamenat. Jestliže nedochází k včasnému залечení, nádor může prorůstat do okolních tkání přes děložní hrdlo až do močového měchýře [47; 48; 49; 50].

Jestliže se nádorová buňka dostane přes dlaždicový epitel a jeho bazální membránu, dochází ke vzniku invazivního karcinomu. Onemocnění bývá v ranných stádiích asymptomatické, ovšem poté dochází ke vzniku kontaktního krvácení po vyšetření či pohlavním styku. S tím se pojí i výtok, v němž se může vyskytovat také krev. V pokročilých fázích ženu trápí bolestivostí v místě výskytu nádoru, onemocnění je doprovázeno intoxikací produkty nádoru a dochází ke vzniku sekundární anémie [51; 52].

Podle závažnosti rozlišujeme čtyři stupně šíření karcinomu, jak je shrnuto v tabulce číslo 1.

Tabulka 1 - TNM – klasifikace karcinomu hrdla dělohy [46]

Kategorie TNM	Stadium FIGO	Nález
TX		Primární tumor nelze zhodnotit
T0		Žádný podklad pro primární tumor
Tis	0	Carcinoma in situ (CIN 3)
T1	I	Karcinom hrdla omezený na dělohu. Šíření nádoru na tělo se nezohledňuje)
T1a	IA	„Preklinický“ invazivní karcinom, rozpoznáný mikroskopicky
T1a1	IA1	Karcinom s mikroskopickou invazí stromatu do hloubky < 3 mm s horizontálním rozměrem < 7 mm ²
T1a2	IA2	Karcinom s mikroskopickou invazí stromatu do hloubky > 3 mm, ale < 5 mm, s horizontálním rozměrem < 7 mm ²
T1b	IB	Makroskopicky viditelné karcinomy omezené na cervix, nebo mikroskopicky prokázané a další karcinomy hrdla větší než T1a2
T1b1	IB1	Makroskopicky viditelná léze s největším rozměrem < 40 mm
T1b2	IB2	Makroskopicky viditelná léze s největším rozměrem > 40 mm
T2	II	Karcinom se šíří mimo dělohu, ale nedosahuje stěny pánve. Tumor může postihovat horní 2/3, nikoli dolní třetinu pochvy
T2a	IIA	Bez infiltrace parametrií
T2b	IIB	S infiltrací parametrií
T3	III	Infiltrující karcinom postihuje i dolní třetinu pochvy a/nebo dosahuje pánevní stěny a/nebo způsobuje hydronefrózu či afunkci ledvin
T3a	IIIA	Nádor postihuje dolní třetinu vaginy, ke stěně pánevní se nešíří
T3b	IIIB	Nádor se šíří k pánevní stěně a/nebo působí hydronefrózu nebo afunkci ledviny
T4	IVA	Karcinom se šíří mimo malou pánev a/nebo prorůstá do sliznice měchýře nebo rekta
M1	IVB	Případy se vzdálenými metastázami bez ohledu na rozsah primárního nádoru

3.6.6 Rizikové faktory pro vznik CIN a invazivního karcinomu

Mezi největší rizikové faktory řadíme nechráněný pohlavní styk, během něhož dochází k přenosu řady onemocnění. Nežádoucí je i počátek pohlavního života v době, kdy ženské tělo není ještě natolik pohlavně zralé. Dalším problémem je častá promiskuita obou partnerů. Právě rizikovému chování připisujeme vznik infekce HPV virem, jenž je rozlišován podle množství buněčných změn a vzniku dysplazií na HPV s nízkým rizikem a HPV s vysokým rizikem. Pro ženy jsou nebezpečné typy s rizikem vysokým – nejčastěji HPV 16, 18, 33 a 36. Tento typ viru se projevuje tím, že virová DNA infikuje lidský genom a dochází k chaotickým mitózám. Vzniklé buňky pak dávají prostor pro tvorbu CIN I a II, které mohou následně vlivem dalších faktorů přerůst až v CIN III či do spinocelulárního karcinomu. V neposlední řadě je třeba zmínit, že na vzniku malignit se může odpovídajícím způsobem podílet také životospráva, kouření cigaret, poruchy imunitního systému, nebo dokonce i genitální infekce. Ženy, které jsou nositelky mutace pro gen BRCA 1 a 2, mají vyšší riziko vzniku invazivního karcinomu hrdla děložního [53; 54].

3.7 Vyšetření hrdla děložního

Rozlišujeme dva typy vyšetření – prebioptické a bioptické.

3.7.1 Prebioptické metody vyšetření

Rozpoznáváme tři základní metody:

- Kolposkopie;
- Cytologický stěr;
- HPV test.

Kolposkopie je diagnostická metoda, která dokáže vyšetřit celá zevní rodidla, ale její hlavní účel je určení závažnosti léze a její vztah k endocervikálnímu kanálu. Pomocí této metody se hodnotí abnormální cytologický nález a slouží k diagnostice odběru biopsie. Základním přístrojem je kolposkop, který funguje na principu přímého zobrazení binokulárním optickým systémem. Kolposkopické vyšetření je dvojího druhu – nativní a rozšířené. Nativním provedením se rozumí imobilizování děložního hrdla pomocí gynekologických zrcadel a odstraněním hlenu. Tímto způsobem můžeme diagnostikovat základní změny vyskytující se na děložním hrdle jako je infekce a nebo původci krvácení. Rozšířená kolposkopie je dvoufázová, kde v první části aplikujeme na děložní hrdlo 3% kyselinu octovou, která vytváří reverzibilní koagulaci, precipitaci jaderných proteinů a rozpouští hlen, tím dokáže zviditelnit patologické změny na epitelu. V druhé části se přidává na stejné místo Lugolův roztok, jenž dokáže přesně označit léze a zároveň i odlišit epitel, který obsahuje glykogen a epitel bez glykogenu. Jedná se tak o identifikaci jódnegativních oblastí. Tento test se také označuje jako Schillerův test [55; 56].

Tabulka 2 - Kolposkopická terminologie nálezů na děložním hrdle (Rio de Janeiro 2011) [58]

1. Obecné zhodnocení
Adekvátnost kolposkopie – adekvátní/ neadekvátní z důvodu (zánět, krvácení, jizvení)
Přehlednost skvamokolumnární junkce (SCJ) – plně/ částečně/ nepřehledná
Typy transformační zóny (TZ) – TZ 1,2,3
2. Normální kolposkopické nálezy
Originální dlaždicový epitel – zralá a atrofický
Cylindrický epitel – ektopie a ektropium
Metaplastický dlaždicový epitel – ovula Naboti, otevřená ústí žlázových krypt
Deciduóza v těhotenství
3. Abnormální kolposkopické nálezy
 - Obecné zhodnocení
Lokalizace léze – uvnitř nebo vně TZ
Rozsah léze podle ciferníku
Velikost léze – počet postižených kvadrantů nebo procento postiženého povrchu
 - Grade 1 (minor) – méně významné
Epitelové znaky – jemně sytý bílý epitel po kyselině octové, nepravidelný geografický okraj
Cévní znaky – jemná mozaika, jemné puntíčkování
 - Grade 2 (major) – významné
Epitelové znaky – sytý bílý epitel po kyselině octové, rychlý nástup zbledení, lemována ústí žlázových krypt, ostrý okraj léze, přítomnost výběžků bílého epitelu proti SCJ, přítomnost vnitřní hranice vymezující oblast sytě bílého epitelu uloženého centrálně vůči periferní oblasti jemně sytého epitelu
Cévní znaky – hrubá mozaika, hrubé puntíčkování
 - Nespecifický
Leukoplakie (keratóza, hyperkeratóza), eroze, Schillerův test - jodnegativní
4. Suspekce na invazivní karcinom
Atypické cévy
Další znaky – fragilní cévy, nepravidelný povrch, exofytická léze, nekróza, ulcerace (nekrotická), tumor, makroskopický nádor
5. Různé nálezy
Kondylomata, kongenitální TZ, stenóza, zánět, vrozená anomálie, polyp (exocervikální/ endocervikální), endometrióza, pooperační změny

Onkologická cytologie patří mezi nejznámější screeningové metody. Cytologický stěr může být dvojího druhu, z něhož první je odběr s následným nátěrem na skle, druhý je odběr do tekutého média. Během výkonu musí dojít nejenom k záchytu buněk exocervixu, ale i ke stěru kanálu hrdla děložního. Na skle pak musí být stěr fixován 95% alkoholem. Poté je preparát obarven dle Papanicolaoua (hematoxylin-oranž G). V tekutém médiu se vzorek zpracovává jako sediment s výskytem buněk [57; 58].

Tabulka 3 - Systém Bethesda (2001) – cytodiagnostika [61]

1. Kvalita nátěru – optimální, suboptimální, nehodnotitelný (specifický důvod)
2. Popis infekce – identifikovatelné znaky
3. Hormonální stav – odpovídá nebo neodpovídá věku a menstruačnímu cyklu
4. Buněčné změny dlaždicového epitelu
Normální nález
ASC-US (neurčité epitelové změny vyžadující kontroly)
ASC-H (neurčité epitelové atypie, podezřelé závažnější změny)
Low grade SIL – nízký stupeň dlaždicové intraepitelové léze (odpovídá HPV infekci a lehké dysplazii/ CIN I)
High grade SIL – vysoký stupeň dlaždicové intraepitelové léze (odpovídá dysplazii střední, těžké a CIS/ CIN II, III)
karcinom
5. Buněčné změny žlázoového epitelu
Normální nález endocervikálních buněk
Normální nález endometriálních buněk
AGC-NOS (neurčité epitelové změny vyžadující kontroly)
AGC-NEO (neurčité epitelové atypie, podezřelé z neoplazie)
AIS (adenokarcinom in situ)
Adenokarcinom endocervikální
Adenokarcinom endometriální

HPV test hraje důležitou roli v sekundární prevenci u pacientek, u nichž byly diagnostikovány některé cytologické abnormality nebo u žen imunokompromitovaných či při regresi cervikálních lézí. Tímto testem se stanovuje HPV-DNA nebo HPV-mRNA. Principem metody je zjištění

přítomnosti 13-14 nejčastěji se vyskytujících HPV typů a jejich následná genotypizace, kdy jsou tři nejčastější typy (HPV 16, 18, 45) odděleny od HPV-HR. Samotný test se provádí jako klasický odběr pro cytologické vyšetření [59; 60].

3.7.2 Bioptické metody vyšetření

- Minibiopsie;
- Cílená excize;
- Kyretáž;
- Konizace;
- Trachelektomie.

Minibiopsie neboli punch biopsie je speciální metoda, která se provádí za pomoci speciálních kleští udávajících velikost odebrané tkáně. Vyšetření musí probíhat pod kolposkopickou kontrolou exocervixu [61].

Cílená excize musí být opět prováděna pod kolposkopickou kontrolou. Postiženou tkáň odebíráme skalpelem. Velikost suspektního vzorku je dána dle nejzávažnější léze [62].

Kyretáž se provádí pomocí vysoce ostré kyrety, s jejíž pomocí odebíráme tkáň z endocervikálního kanálu [63].

V případě konizace získáváme nejdokonalejší informace o stavu léze. Existuje několik typů aplikace této metody. Dříve se konizace prováděla skalpelem, laserem nebo nůžkami. Nyní je preferováno využití radiofrekvenční kličky či jehly. Velikost použité kličky při odběru tkáně je dána šíří exocervikální léze. Výkon navazuje na předešlé rozšířené kolposkopické vyšetření, kdy je samotný řez prováděn za použití vysoké frekvence, čímž dojde k minimálnímu termickému poškození tkáně. Druhou možností je použití vysokofrekvenční rigidní jehly. Tato metoda je výhodnější z pohledu excize cylindrické tkáně léze

nacházející se v endocervikální části děložního hrdla. Výhodou u obou vyšetření je, že se naříznuté tkáně nesešívají, ale pomocí daného přístroje jsou koagulovány. Obecně platí, že všechny konizáty by měly být opatřeny stehem v místě 12, který označuje střed předního pysku u pacientky nacházející se v leže na zádech. Vzorky se následně zpracují v radiálních nebo v sagitálních řezech [64; 65].

Trachelektomie je poslední bioptickou metodou, která má dvě podoby, a to prostou nebo radikální. První z nich je trachelektomie prostá, kde dochází k téměř úplnému vynětí děložního hrdla. Za to u trachelektomie radikální se provádí odnětí nádoru společně s částí zdravé tkáně, proto dochází k vyříznutí úsekových částí pochvy a parametrií dle rozsahu postižení. Tento výkon je prováděn buď abdominálně, vaginálně nebo laparoskopicky a často bývá doplněn pánevní lymfadenektomií. Výhodou této metody je schopnost zachovat fertilitu ženy [66].

4 METODIKA

V této části se budu zabývat postupem pro příjem vzorků děložní tkáně a následným zhotovením histologického preparátu. Základní postup zpracování vzorků je pro všechny materiály stejný. Skládá se z příjmu, přikrojení, fixace, zalévání do speciálních medií, krájení, barvení a diagnostiky.

Veškeré úkony prováděné v laboratoři musí být zpracovány tak, aby byla dodržena bezpečnost a ochrana zdraví při práci (BOZP).

4.1 Příjem

Jakýkoliv biologický materiál podléhá při příjmu pečlivé kontrole. Prvním krokem je administrativní kontrola spočívající v porovnání údajů v průvodním listu se štítkem transportní nádoby přijímaného materiálu. Kontrolují se základní osobní údaje pacienta, a to jméno, příjmení, rodné číslo, kód pojišťovny a diagnóza.

Průvodní list by měl obsahovat především datum, kdy byl proveden odběr biologického materiálu, krátký klinický popis s možným podezřením na přítomnost novotvaru a v případě zjištěného onemocnění i odhad doby jeho vzniku. Zároveň zde nesmí chybět označení žadatele včetně jeho identifikačních údajů. Na průvodním listu musí být také záznam o použitém fixačním roztoku, do kterého byl biologický materiál vložen.

Při následné kvalitativní kontrole zkoumáme již samotný biologický materiál, přesněji jeho množství, vzhled, množství fixačního roztoku a nádobu, ve které je uložen. Všechny tyto procesy musí být správně dodrženy, jinak hrozí riziko poškození materiálu. Pokud dojde ke včasnému zjištění jakéhokoliv poškození materiálu, vzorek se vrátí odesílateli a zjištěná komplikace je zapsána

do dokumentů, včetně průvodního listu a laboratorního informačního systému (LIS). Jestliže však nebyla zjištěna žádná chyba, je průvodní list opatřen datem, časem příjmu a podpisem pracovníka, jenž biologický materiál přijal.

Po přijetí materiálu, administrativní kontrole a kvalitativní kontrole je v laboratorním informačním systému každému vzorku přiděleno specifické pořadové číslo prostřednictvím elektronické žádanky. Pořadové číslo je zapsáno také na průvodní list. Díky tomuto číslu je biologický materiál snáze dohledatelný v archivních skladech, ve kterých se průvodní listy společně s parafinovými vzorky archivují až po dobu 10 let. Biologický materiál se uchovává ještě po 2 dny od uvolnění výsledku vyšetření.

4.2 Přikrojení

Jakmile je biologický materiál podroben veškerým kontrolám, následně je odeslán k pověřenému lékaři. Odpovědný laboratorní personál předem předpřipraví tkáňové kazetky s nadepsaným pořadovým číslem přiděleným během příjmu biologického materiálu. Lékař a laborantka následně provedou kontrolu shody čísel na nádobě, průvodním listu a tkáňových kazetkách tak, aby nedošlo k záměně vzorků. Na průvodním listu laborantka označí své jméno a jméno lékaře, který úkon provádí. Lékař ve shodě se standardními postupy připraví řezy z biologického materiálu a tento vloží do označených kazetek. Některý materiál je natolik drobný, že kazetky musí být vyplněny molitanovými filtry k předejití ztráty materiálu příliš velkými otvory v mřížce kazetky. Laborantka zapisuje do průvodního listu veškeré úkony, které pověřený lékař provádí, zapíše i počet kazetek, v nichž je daný materiál uložen. Posledním zápisem v průvodním listu je informace lékaře o výběru metody, kterou bude daný materiál zpracováván.

Biologický materiál malých rozměrů a nízkého počtu kusů, který nevyžaduje krájení, laborantka zpracuje sama bez přítomnosti lékaře. Obvykle tyto vzorky nemusí laborantka přikrajovat, pouze změří jejich šířku, délku a výšku. Tyto míry musí být zapsány do průvodního listu daného vzorku. Následně je materiál přenesen mezi molitanové filtry na tkáňové kazetky.

Tkáňové kazetky jsou pak vloženy do nádoby, obsahující 10% formaldehyd.

4.3 Fixace

Fixace je metoda, která má za úkol prudkou, ale zároveň šetrnou denaturaci tkáňových bílkovin tak, aby tkáň byla zachována a nedocházelo k jejímu samovolnému rozpadu (autolýze). Jakýkoli vzorek musí být ihned po odebrání fixován, jinak by mohlo dojít k samovolnému rozkladu vlivem působení buněčných enzymů. Zafixovaný vzorek by měl být co nejvíce totožný se vzorkem nativní tkáně. Klíčovým momentem celé fixace je použití ideálního fixačního činidla, které by nemělo příliš změnit strukturu fixované tkáně a její barvitelnost. Důležitá je i síla fixačního činidla způsobující prostoupení tekutiny celým vzorkem, a to za relativně krátkou dobu [67].

Všechny tkáně můžeme fixovat dvěma základními metodami:

- Metodou fyzikální;
- Metodou chemickou.

4.3.1 Fyzikální metody fixace

Fyzikální metody fixace jsou v histologických laboratořích méně využívány, avšak stále potřebné. Nejčastěji prováděnou fyzikální metodou fixace je vysušení tkáně za nízké teploty, kdy veškeré úkony jsou prováděny ve stroji (kryostatu). Histologické vzorky jsou vloženy do vakua ve stroji, kde se rychle zmrazí a

zároveň vysouší při teplotě -60°C . Takto připravené vzorky lze následně krájet. Tato metoda se nejvíce využívá pro peroperační biopsie. Mezi další postupy fyzikálních metod řadíme fixaci varem nebo teplem [68].

4.3.2 Metody chemické fixace

Chemická fixace je více rozšířená, protože je snadnější jak na přípravu, tak i na úkon fixace. Tato metoda se provádí použitím fixačních roztoků, které jsou složeny buď z jedné nebo z více chemických látek [69].

Mezi nejběžněji užívané fixační tekutiny řadíme:

- Formol;
- Fixační tekutiny s kyselinou pikrovou;
- Fixační tekutiny se sublimátem.

Nejvíce používaná fixační tekutina nese název formol, chemickým složením se jedná o formaldehyd. Často je označován jako formalín, který je běžně do histologických laboratoří dovážen ve formě vodného roztoku s koncentrací 40 %. Takovýto roztok je nutno naředit tak, aby byl získán výsledný 4% formaldehyd. Tato fixační tekutina je využívána nejvíce díky své snadné přípravě a nízké ceně. Formol se musí uchovávat v tmavé láhvi, do níž je přisypán práškový uhličitan vápenatý, jenž zneškodňuje kyselinu mravenčí rozkladem na mravenčan vápenatý, CO_2 a H_2O . Tento postup uchování roztoku je nezbytný, jelikož kyselina mravenčí má potenciál poškodit strukturu tkáně. Reakcí formolu s práškovým uhličitanem vápenatým dostaneme neutrální formol. Tkáň se běžně fixuje v rozmezí 24-48 hodin, přičemž delším stáním vzorků ve fixační tekutině nedojde k jejich poškození. Zafixované vzorky se následně přenesou, buď do 70% etanolu nebo jsou proplachovány ve vodě, a to po dobu 2-4 hodin. Formol je velice dobré fixační činidlo pro histologické účely, avšak pro vyšetření

cytologické je nevhodný. Formol velmi rychle proniká tkání, čímž je umožněna následná dobrá barvitelnost tkáně. Dále velmi dobře tkáně konzervuje a při krátké fixaci nerozpouští tuky [70].

Druhým nejčastěji používaným fixačním roztokem je fixační tekutina s kyselinou pikrovou, kde se využívá tekutina Bouinova a tekutina Pasteelsova, přičemž více užívaná je Bouinova tekutina. Tato je specifická svým rychlým průnikem tkání. Výhodou je zachování dobré barvitelnosti fixované tkáně. Avšak tento typ tekutiny se nemůže využívat u hojně prokrvených orgánů, protože vlivem tohoto roztoku dochází k hemolýze krve. To způsobí ztvrdnutí tkáně, a tyto následně nelze krájet. Další nevýhodou je, že se nemůže používat u vzorků, které mají být zality do celoidinu, jelikož Bouinova tekutina způsobuje nepropustnost tkáně pro celoidin. Běžně se fixuje 24 hodin. Vzorky se po fixaci mohou promýt pouze v 80% etanolu. Naopak tekutina Pasteelsova se využívá především u tkání, u kterých mají být prokázány polysacharidy. Zde je doba fixace okolo 4-24 hodin, kdy se fixovaná tkáň následně vloží do bezvodného etanolu [71].

Třetí v pořadí jsou fixační tekutiny se sublimátem HgCl_2 (chlorid rtuťnatý), které opět rychle prostupují tkání a dobře ji barví. Během této metody fixace je důležité dbát na striktní práci bez kovových pomůcek, jelikož působením fixační tekutiny se sublimátem dochází ke korozi kovových předmětů. Nevýhodou této metody je, že po fixaci dochází ke vzniku černě zbarvené sraženiny, jenž se následně odstraňuje z tkáně pomocí jodování ihned po fixaci. K tomuto účelu slouží jodové tinktury nebo Lugolův roztok, které se přidávají k etanolu. Takto připravený roztok slouží jako promývací tekutina po fixaci. Odbarvování v etanolu trvá přibližně 24 hodin. Mezi nejrozšířenější tekutiny se sublimátem patří SUSA, tekutina Zenkerova a tekutina Hellyho [72].

Dalšími používanými fixačními tekutinami jsou etanol nebo oxid osmičelý. Etanol se často zapisuje pod názvem absolutní etanol. Využívá se k fixaci jako 100% bezvodý, anebo je součástí jiných fixačních roztoků. Podobně jako ostatní látky má své výhody i nevýhody. Etanol je výjimečný tím, že nepoškozuje chemicky tkáň a dokáže rozpouštět tuky. Na druhou stranu nedokáže dokonale prostupovat do tkání a způsobuje jejich značné smršťování. Etanol se nejvíce využívá u vyšetření vedoucích k průkazu železa a vápníku v neurohistologii. Běžná fixace trvá v rozmezí 3-8 hodin. Zato oxid osmičelý se pro fixaci využívá buď v podobě roztoků nebo par. Během přípravy roztoku se musí dbát na pečlivou přípravu a opatrnost, jelikož oxid osmičelý se redukuje v přítomnosti i malého množství organických látek a zároveň jakýkoli únik par tohoto oxidu dráždí nosní sliznici a oční spojivky. Příprava roztoku je jinak velmi jednoduchá a jeho koncentrace by se měla pohybovat do 2 %. Oxid osmičelý se skladuje v ampulce, která se vloží do nádoby se specifickým množstvím redestilované vody. Samotná fixace malých tkání trvá 24 hodin a jejich následný proplach v tekoucí vodě trvá stejně dlouhou dobu. Jak už bylo zmíněno, fixace oxidem osmičelým se využívá i v podobě par. Tento princip metody se nejvíce využívá pro tkáně bioptické nebo nekroptické, kdy fixovaný řez vložíme na dno nádoby, kde jsou umístěny krystalky tohoto oxidu. Tento typ fixačního činidla nemění strukturu tkáně, a proto má své velké využití i v elektronové mikroskopii. Jeho nevýhodou je pomalý vstup do tkání, není stálý, rychle se redukuje, snadno přefixovává tkáň a jeho užití v laboratoři je velice nákladné [73].

4.4 Zalévání do média

Metodou zalévání histologického materiálu vytvoříme pevný bloček, jenž následně můžeme krájet pomocí mikrotomových nožů. Média dělíme na ta, která jsou rozpustná ve vodě a na nerozpustná ve vodě. U všech je však princip stejný

- aplikováním média na histologický preparát dosáhneme vyplnění i těch nejmenších mikroskopických útvarů na vzorku.

Základní rozdělení médií:

- Zalévání do parafínu;
- Zalévání do celoidinu;
- Zalévání do medií rozpustných ve vodě.

4.4.1 Zalévání do parafínu

V současné době je tato metoda označovaná za nejpoužívanější, jelikož je velice snadná, přesná, rychlá a jejím použitím dostaneme kvalitní parafínové bločky. Avšak jako každá metoda má i tato svá omezení. Zalévání do parafínu se nedoporučuje u kostí, chrupavek a šlach. Tyto tuhé tkáně je třeba zalévat do média, které je tužší než zalévaná tkáň. Je to dáno tím, že samotný parafín způsobuje ztvrdnutí a smršťování tkání. Zalévání do parafínu se skládá ze čtyř fází:

- Odvodnění;
- Prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín;
- Prosycení tkáně parafínem;
- Vlastní zalití.

Fáze první – Odvodnění

Účelem odvodňování tkání je odstranění veškeré vody, která v tkáních zůstala během fixace. Tento postup se provádí pomocí vzestupné řady etanolů tak, aby nedocházelo ke smrštění tkání. Celý postup začíná použitím 70% etanolu, dále následuje 80% etanol, poté 90% etanol a naposledy je vzorek zpracován ve dvou lázních se 100% etanolem. Doba, po kterou necháváme vzorek v jednotlivých

odvodňovacích nádobách, je dána jejich velikostí a strukturou. Celý postup trvá přibližně 1 až 2 dny. Je důležité mít na paměti, že delší odvodňování v bezvodém etanolu způsobuje tvrdnutí tkáně, která se pak hůře krájí [74].

Fáze druhá – Prosycení tkáně tekutinou rozpouštějící parafín

V této části musí dojít k odstranění etanolu z předešlé fáze. K tomuto úkonu se přistupuje za účelem rozpuštění parafínu, jelikož tento je v etanolu nerozpustný. Pro prosycení se tak musí používat látka, která v sobě dobře rozpouští parafín a zároveň je dobře mísitelná s bezvodým etanolem. Tyto podmínky splňují především látky s nižším bodem varu. Do této skupiny látek spadá benzen, xylen. Lze též využít látky s vyšším bodem varu, jako jsou methylbenzoáty, methylsalicyláty nebo cedrový olej. Benzen je specifický svým vysokým indexem lomu, což znamená, že se prosycovaná tkáň benzenem projasní a je průsvitná. Samotné prosycování spočívá ve vkládání tkáně do tří po sobě jdoucích nádob obsahujících benzen. V každé nádobě je tkáň ponechána 15 minut. Celkově tak prosycování u standardních řezů trvá 45 minut. Ovšem čas této metody je závislý na velikosti tkáně. Vzorek nesmí být v prosycované lázni příliš dlouho, neboť by mohlo dojít k poškození tkáně a k jejímu následnému tuhnutí. V methylbenzoátech a v methylsalicylátech tkáň netvrdne, ba naopak je měkčí a po zalití do parafínu se velmi dobře krájí. Byť jsou látky s vyšším bodem varu lepší na práci, využívají se méně kvůli časové náročnosti prosycování [75].

Fáze třetí – Prosycení tkáně parafínem

Tkáňový bloček, ze kterého jsme odstranili etanol, se přenáší do parafínu přímo anebo přes lázeň benzen-parafín. Tímto roztokem se tkáň prosycuje po dobu 30 minut při 40°C. Poté se tkáň přenesení do čistého parafínu, jenž má okolo 56-58°C. Tkáň se prosycuje parafínem přes tři lázně tak, aby se dokonale odstranil veškerý benzen. V první lázni se tkáň nechává po dobu 2-4 hodin, ve druhé pak

4-6 hodin a v poslední 8-12 hodin. Teplota lázní nesmí být vyšší než 58°C, jinak hrozí poškození tkáně v podobě ztvrdnutí a smrštění. Takováto tkáň se pak špatně krájí a barví. Pro běžné tkáně se využívá parafín s bodem tání okolo 55°C, ovšem existuje i parafín s bodem tání okolo 50°C, který se využívá pro speciální vyšetření [76].

Fáze čtvrtá – Vlastní zalití do parafínu

K vlastnímu zalití se používá zkvalitněný a přefiltrovaný parafín, který dosud nebyl použit při prosycování tkání. Zalévání probíhá v zalévací komůrce v kovových nebo plastových nádobách, zhruba odpovídajících velikosti dané tkáně. Na dno nádoby pomocí pinzety přeneseme požadovanou tkáň. Takto upevněnou tkáň následně zalijeme předem zahřátým parafínem majícím teplotu okolo 60°C. Na nádobu se připevní tkáňový bloček, v němž byl vzorek uchován a takto připravená nádoba se nechá šokově zamrazit. Po zmražení je bloček z kovové nádoby vyjmut a následně přikrojen do čtverce nebo obdélníku tak, aby vrstva parafínu byla okolo tkáně přibližně 3-5 mm široká. Takovýto vzorek je připraven na krájení [77].

4.4.2 Zalévání do celoidinu

Celoidin je nitrát celulózy, který je rozpustný v éteru a etanoléteru. Má mnoho podob, ve kterých se dováží. Buď ve formě suchého celoidinu nebo ve formě, již se využívá pro histologické účely jako čistá nitrocelulóza anebo celoidin nasáklý bezvodým etanolem. Celoidin své využití nachází při zalévání tuhých tkání, jako jsou kosti, chrupavky a šlachy nebo zuby. Tento postup zalévání do celoidinu probíhá za laboratorní teploty a díky tomu nedochází ke smršťování tkání. Nevýhodou této metody je velká časová náročnost, kdy zalévání tkáně může trvat i několik měsíců [78].

4.4.3 Zalévání do médií rozpustných ve vodě

K zalévání tkání do médií, která jsou mísitelná s vodou, dochází v případě, kdy tkáň nemůže být ve styku s organickými rozpouštědly jako je benzen, xylen nebo etanol. Tento moment může nastat při vyšetření na průkaz lipidů. Výhodou této metody je, že se tkáň nemusí odvodňovat a tím pádem nedojde k jejímu smrštění. Mezi nejvýznamnější médium mísitelné s vodou řadíme želatinu, následně pak celodal nebo vosky mísitelné s vodou [79].

4.5 Krájení

Po zalití tkání do parafínu jsou tkáňové bloky připraveny na krájení. Tento proces je nutný za účelem získání velmi tenkých řezů zkoumané tkáně. Krájení tkáňových bloků se provádí na speciálních krájecích přístrojích označovaných jako mikrotomy. Rozlišujeme dva základní druhy mikrotomů – mikrotom sáňkový a rotační. Mikrotomy se od sebe liší svou mechanikou pohybu a vytvářením řezů. Mikrotom sáňkový se běžně využívá pro krájení parafínových i celoidinových bloků. Je složen z litinového podstavce s kluznou plochou, která je opatřena mikrotomovým nožem s neapolskou svorkou. Hlavním úkolem svorky je pevné uchopení mikrotomového nože, který zároveň umožňuje měnit sklon nože k rovině řezu nebo upravit sklon nože ke směru řezu. Tenké řezy můžeme získat i za použití druhé možnosti, a to mikrotomu rotačního. Tento typ nože se využívá jedině pro krájení parafínových bloků a pro zhotovení sériových řezů. Liší se svou mechanikou v tom, že mikrotomový nůž je pevně upevněn ve svorce a proti němu se pohybuje tkáňový bloček. Součástí mikrotomu je mikrometrický šroub, který umožňuje navolit si potřebnou tloušťku řezu [80].

4.5.1 Krájení parafínových bloků

Parafínové bločky můžeme krájet jak na sáňkovém, tak i na rotačním mikrotomu. Před zahájením krájení je nutné si navolit úhel mezi blokem a

mikrotomovým nožem pomocí mikrometrického šroubu a neapolské svorky. Krájení pomocí sáňkového mikrotomu musí mít úhel sklonu menší než 10°. Před každým řezem je nutné si zkontrolovat úhel mezi histologickým bločkem a mikrotomovým nožem. Nejběžnější komplikace během krájení bločků nastává, když se řezy začnou kroutit nebo svinovat. Tyto problémy jsou způsobeny buď nízkou teplotou v místnosti krájení, nebo tím, že jsou řezy tlustší, anebo je parafín příliš tvrdý. Další komplikace mohou nastat v důsledku vysoké teploty v místnosti krájení, existence měkkého parafínu, špatně nastaveného nože nebo použití tupého nože, kdy nám vznikají řezy, které se sráží, anebo stlačují dohromady. Pokud jsou správně dodržena výše zmíněná pravidla, tvoří se stejnoměrné řezy v podobě souvislých pásků, které následně vkládáme na podložní sklíčka společně s destilovanou vodou nebo vodou se želatinou. Takto připravený preparát vložíme na ploténku vyhřátou okolo 50°C. Následně se vlivem působení tepla připravený řez roztáhne. Někdy je zapotřebí dopomoci roztáhnutí pomocí dvou preparačních jehel. Po napnutí řezu se nechá odkapat přebytečná tekutina a histologické preparáty se vloží do termostatu, který je vyhřátý na 38-40°C [81].

Krájení parafínových bloků v sérii

Krájení je možné provádět na sáňkovém i rotačním mikrotomu. Principem této metody je získání všech řezů z krájeného histologického bločku. Řezy by měly být souvislé a vytvářet spojené rovné pásky. Při provedení řezu musí být přední část bločku rovnoběžná s dlouhou osou mikrotomového nože. Řezy by neměly být ani moc krátké a ani moc dlouhé, aby nedocházelo ke ztrátám řezů. Vzniklé řezy opět přeneseme na podložní sklíčko s tekutinou a necháme preparát vlivem tepla na vyhřívané ploténce natáhnout [82].

4.5.2 Krájení celoidinových řezů

Veškeré tkáně zalité do celoidinových bločků krájíme jedině na sáňkovém mikrotomu. Před krájením se musí nastavit úhel mezi nožem a bločkem, kdy sklon nože k rovině by měl být větší jak 10° . Během krájení musíme nůž i tkáňový bloček smáčet 70% etanolem. Řezy se během krájení sbalují, proto je nutné takovýto řez rozbalit pomocí štětce namočeného rovněž v 70% etanolu. Řez pak převedeme do nádoby, která je vyplněna stejně koncentrovaným etanolem. V této nádobě řez zůstává až do samotného barvení. Celoidinové řezy se napínají a lepí na podložní sklíčka až po obarvení. Lepit je lze pomocí éterových par, kdy se řezy přenesou do 96% etanolu, v němž se napnou na podložní sklíčka. Napnuté řezy se přenesou do uzavřené nádoby, kde jsou podrobeny parám éteru po dobu 5 minut [83].

4.6 Barvení histologických řezů

Jednotlivé histologické řezy se musí obarvit, čímž dochází k zviditelnění jednotlivých struktur tkáně. U neobarvených řezů prakticky nelze rozeznat jednotlivé součásti tkáně v důsledku téměř shodné lomivosti světla ve světelném mikroskopu. K barvení se využívají barvicí činidla, která se specificky vážou na různé složky buněk a tkání, díky čemuž je lze od sebe rozlišit. V histologické laboratoři dělíme barviva na dvě základní skupiny podle přítomností radikálů na zásadité a kyselé. Rozdíl mezi barvivy je v částech tkání, kterou obarvují. Barvivo kyselé, často označované jako plazmatické, barví především cytoplazmu. Zatímco barviva zásaditá, označovaná jako jaderná, barví jádra buněk. Jestliže se tkáň barví kyselými barvivy, je možné ji označit jako eosinofilní, a to kvůli používanému barvivu eosinu. Naproti tomu se složky tkáně obarvené zásaditými barvivy označují jako bazofilní, kdy je využíváno barvivo

hematoxylin. Pokud se řez barví kyselými i bazickými barvivami najednou, hovoříme o vzniku neutrofilní tkáně. Nejvíce používanou metodou barvení je hematoxylin-eosin. Existují i jiné druhy barviv, která barví tkáně pomocí metachromatických barviv. Princip tohoto barvení spočívá v obarvení tkáně jinou barvou oproti barvě, kterou činidlo poskytuje [84].

4.6.1 Barvení metodou hematoxylin-eosin

Tato metoda je nejpoužívanější ve všech histologických laboratořích. Sestává z několika fází, které je potřeba dodržet, aby vznikl bezchybný preparát. Mezi tyto fáze patří:

- Deparafinace řezů;
- Vlastní barvení řezů;
- Odvodnění;
- Projasnění;
- Montování.

V první fázi dochází k deparafinaci. Jak je již patrné z názvu, v tomto kroku musíme zbavit řezy parafínu, aby vůbec mohlo dojít k samotnému barvení. Většina barviv je připravována jako vodné roztoky, které by nedokázaly prostoupit do tkáně přes parafín. Celý tento proces začíná vložením tkáně do dvou lázní xylenů po 5 minutách. Jelikož xylen je také jako parafín hydrofobní, musíme po rozpuštění parafínu vkládat řezy postupně do sestupné řady etanolů a nakonec do vody. V každé lázni je tkáň ponechána okolo 5 minut [85].

V druhé fázi dochází k vlastnímu barvení, kdy pracujeme již s odparafinovanými řezy, které byly promyty ve vodě, a tím došlo k jejich zavodnění. Řezy přeneseme na 3-10 minut do barviva hematoxylinu. Doba ponechání vzorků v zásaditém barvivu je závislá na řadě faktorů, jako je stáří

barviva, druhu tkáně a na použité fixaci. Obarvené řezy musíme nechat propláchnout ve vodě a v kyselém etanolu (skládá se ze 3-5 kapek kyseliny chlorovodíkové na 100 ml 96% etanolu). K tomuto kroku dochází, jelikož hematoxylin kromě zbarvení veškerých jader buněk do modra obarvuje i jiné tkáňové součásti a je tedy třeba tyto dodatečně zbarvené tkáně odbarvit diferencováním. Po proplachu řezy vkládáme do nádoby s eozinem po dobu 1-5 minut. Po obarvení opět řezy krátce opláchneme destilovanou vodou [86].

Ve třetí fázi musí dojít k odvodnění tak, aby se ze vzorku odstranila veškerá přebytečná voda. Toho docílíme tak, že se tkáň postupně přenáší přes nádoby vzestupnou řadou etanolů a následně se vzorek převede poslední lázní obsahující karbol-xylen [87].

V předposlední fázi dochází k projasnění, které spočívá v přenesení tkání do dvou lázní xylenu po dobu 5 minut [88].

V poslední části se obarvené řezy zamontovávají. Na podložní sklíčka musíme upevnit krycí sklíčka za pomoci montovacího média. Rozlišujeme dvě základní skupiny médií, a to mísitelná s vodou a média nemísitelná s vodou. Ať už se používá jakékoli médium, musí splňovat specifické náležitosti – musí být dokonale průhledné, nesmí jakkoli poškodit obarvení tkání a v poslední řadě musí mít vysoký index lomu. Do médií, která jsou rozpustná ve vodě, řadíme glycerin, glycerinovou želatinu nebo sirup z arabské gumy. U těchto médií nemusí dojít k odvodnění řezů a preparát uzavíráme přímo. Mezi média, jenž jsou nerozpustná ve vodě, řadíme cedrový olej, syntetické pryskyřice, anebo kanadský balzám, přičemž právě kanadský balzám je nejvíce používaným montovacím médiem. Jedná se o pryskyřici získávanou z kanadské jedle, která je rozpustná v xylenu. Postup zamontování probíhá následovně. Na prosycené podložní sklíčko kápeme kanadský balzám, na který přiložíme krycí sklíčko

tak, aby nedocházelo k vytvoření bublin. Hotový preparát vložíme do termostatu na 2-3 dny při zhruba 40°C, aby došlo k vypaření xylenu a ztvrdnutí balzámu [89].

Tabulka 4 - Postup barvení hematoxilin-eozin [90]

Krok č.	Úkon	Doba
1	Sušící komora 56°C	15 min
2	Xylen	7 min
3	Xylen	7 min
4	Xylen	6 min
5	96% alkohol s benzinem	2 min
6	96% alkohol s benzinem	2 min
7	96% alkohol s benzinem	2 min
8	Praní ve vodě	2 min
9	Mayerův hematoxylin	3-10 min
10	Praní ve vodě	5 – 20 vt
11	Eozin	10 vt
12	Praní ve vodě	20 vt
13	96% alkohol s benzinem	20 vt
14	96% alkohol s benzinem	20 vt
15	96% alkohol s benzinem	20 vt
16	Aceton	1 min
17	Aceton	1 min
18	Aceton/xylen 1:1	1 min
19	Xylen	1 min
20	Xylen	1 min
21	Xylen	1 min

4.7 Imunohistochemická metoda

Je to metoda vysoce citlivá a slouží k detekci vybraných patologických stavů včetně karcinomů. Využívá monoklonální nebo polyklonální protilátky, které vytváří specifickou vazbu s hledaným antigenem.

V následujících odstavcích se budu zabývat jednotlivými kroky této metody, které vedou k získání imunohistochemického preparátu. Tyto postupy jsou

v mnoha fázích stejné jako při zpracování vzorku klasickou histologickou metodou.

I v imunohistochemii je dán velký zřetel na výběr fixačního roztoku, jenž musí svou úlohu plnit tak, aby nenarušil celistvost tkáně a nedocházelo k jejímu znehodnocení. Hlavním důvodem fixace je zachování antigenu ve vzorku, který potřebujeme detekovat. Nejpoužívanější fixační tekutinou je pufrovaný formol. Ten dokáže tlumit výkyvy pH a tím tak chrání antigenní struktury před denaturací. Samotná fixace pak nesmí být delší než 24 hodin, proto se zásadně tkáně zpracovávají do menších rozměrů [91].

Fixované tkáně jsou následně zality do zalévacího média, kterým je parafín. Tento postup je stejný jako u vzorků zpracovávaných pro základní histologické barvení.

Poslední částí je imunohistochemická detekce. Před jejím zahájením je zapotřebí demaskovat epitopy antigenů, u nichž mohlo během fixace dojít k jejich zamaskování či blokaci. Nejběžněji používanými demaskovacími látkami jsou proteolytické enzymy, které odstraňují nechtěné vazby na antigenních strukturách. Nejčastějšími proteolytickými enzymy jsou trypsin, pepsin a pronáza. Tyto enzymy svým účinkem mohou způsobovat odlepení nakrájených tkání ze speciálních podložních sklíček. Tomuto jevu můžeme zabránit aplikováním Elmerovy želatiny nebo chromželatiny při upevňování tkáně na podložní sklíčko [92].

Samotná detekce antigenu je zprostředkována za pomoci protilátek, přičemž ty jsou tvořeny dalšími komponentami, jež se podílí na vizualizaci hledané struktury. Celá reakce je založena na vazbě antigenu s primární protilátkou, na kterou se váže sekundární protilátka opatřená biotinem. K tomuto komplexu je následně navázán enzym způsobující enzymatickou přeměnu dodaného

substrátu na barevný produkt. Primární protilátkou nejčastěji bývá neznačená myší protilátka. Sekundární protilátka nese navázaný enzym či biotin. Pro vizualizaci imunohistochemické reakce jsou nejčastěji používány dva typy enzymů, z nichž prvním je peroxidáza a druhým je alkalická fosfatáza. Při použití peroxidázy musí dojít k její částečné blokaci vodným peroxidem vodíku, jelikož může způsobovat falešnou pozitivitu u tkání obsahujících hemoproteiny. Ty můžeme nacházet v játrech nebo v erythrocytech. Naproti tomu alkalická fosfatáza je vůči hemoproteinům nesenzibilní [93].

Během celé této procedury je zapotřebí dodržovat pokyny od výrobce, který stanovuje přesné postupy pro ředění a zacházení s reagensy.

Po vizualizaci komplexu jsou řezy dobarveny hematoxylinem-eosinem. Každý vzorek poté musí projít odvodňovací a projasňovací řadou, přičemž na závěr jsou sklíčka s preparáty zamontována. Poslední tři úkony jsou prováděny za použití stejného postupu, jako je tomu u zpracování tkáně základním histologickým barvením.

5 VÝSLEDKY

5.1 Příjem a přikrajování děložního čípku

Děložní čípek je dodáván na oddělení Patologie v Ústřední vojenské nemocnici v Praze ve dvou základních formách:

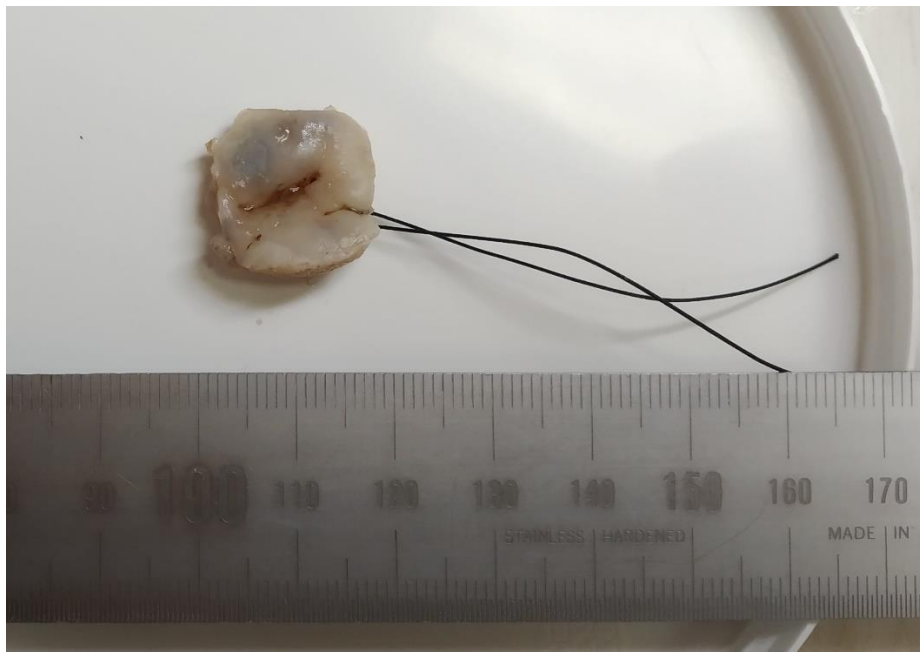
- Děloha jako celý orgán
- Samotný čípek

Děložní tkáň musí být nejdříve podrobena administrativní kontrole, která je stejná jako u jiných biologických vzorků. Ústřední vojenská nemocnice v Praze má odlišný systém evidování vzorků a žádanek do elektronického systému. Na rozdíl od jiných nemocnic zde namísto laboratorního informačního systému používají nemocniční informační systém označovaný pod zkratkou AMIS.

Děložní čípek se v histologické laboratoři zpracovává vždy celý, ať už je samotný nebo ještě součástí dělohy. Před samotným zahájením přikrajování však patolog musí změřit danou tkáň a míry sdělit zapisovací laborantce. U všech tkání se vždy měří průměr, výška a šířka. Patolog i v průběhu přikrajování musí sdělit tvar, barvu a nezvyklé útvary. Je pravidlem, že do laboratoří bývá čípek zaslán s opatřeným stehem. Tento steh bývá umístěn nejvíce v poloze u čísla 3, přičemž toto označení má svůj význam především pro klinika, aby se lépe orientoval pro případ, že by se v daném vzorku našel patologický nález. Samotný čípek se proto přikrajuje směrem od stehu v pořadí hodinových ručiček. Jestliže je čípek součástí dělohy a nebývá označen stehem, zpracuje se počátečním nářezem na jakémkoli místě, po odejmutí dělohy a děložního hrdla. U obou vzorků patolog provádí sériové řezy o šíři 2-3 mm v průběhu cervikálního kanálu. Každý řez by měl obsahovat epitel včetně přechodu exocervixu na endocervix.



Obrázek 2 - Děloha bez adnexů (vlastní foto)



Obrázek 3 - Konus (vlastní foto)



Obrázek 4 - Přikrojený čípek v tkáňových kazetkách (vlastní foto)

5.2 Fixace, zalévání a krájení vzorků

Po přikrojení vzorků, které byly vloženy do tkáňových kazetek, opatřených příslušným pořadovým číslem tkáně, jsou kazetky uloženy v nádobě s 10% formolem na 2-8 hodin. Po výše uvedené době jsou kazetky převedeny do tkáňového automatu Tissue-Tek VIP 6, v němž probíhá odvodnění a prosycení tkáně parafínem. Tento postup je navolen přes standartní program, zaznamenaný v tabulce 3.

Tabulka 5 - Standartní program v tkáňovém automatu Tissue-Tek VIP 6 [94]

Č.stanice	Roztok	Čas
1	Formalín	1 hodina
2	Alkohol 70%	45 minut
3	Alkohol 80%	45 minut
4	Alkohol 96%	45 minut
5	Alkohol 96%	45 minut
6	Alkohol 96% s xylenem (1:1)	1 hodina
7	Xylen	45 minut
8	Xylen	45 minut
9	Xylen	1 hodina
10	Xylen	1 hodina
11	Parafín	1 hodina a 30 minut
12	Parafín	1 hodina a 30 minut
13	Parafín	1 hodina a 30 minut



Obrázek 5 - Tkáňový automat Tissue-Tek VIP 6 (vlastní foto)

Následující den jsou všechny vzorky vyjmuty z tkáňového procesoru a připraveny na vlastní zalití do parafínu, které probíhá na zalévací lince LEICA EG 1150 H. Součástí zalévacího automatu je i mrazící stroj, jenž šokově zmrazí tkáň zalité parafínem.

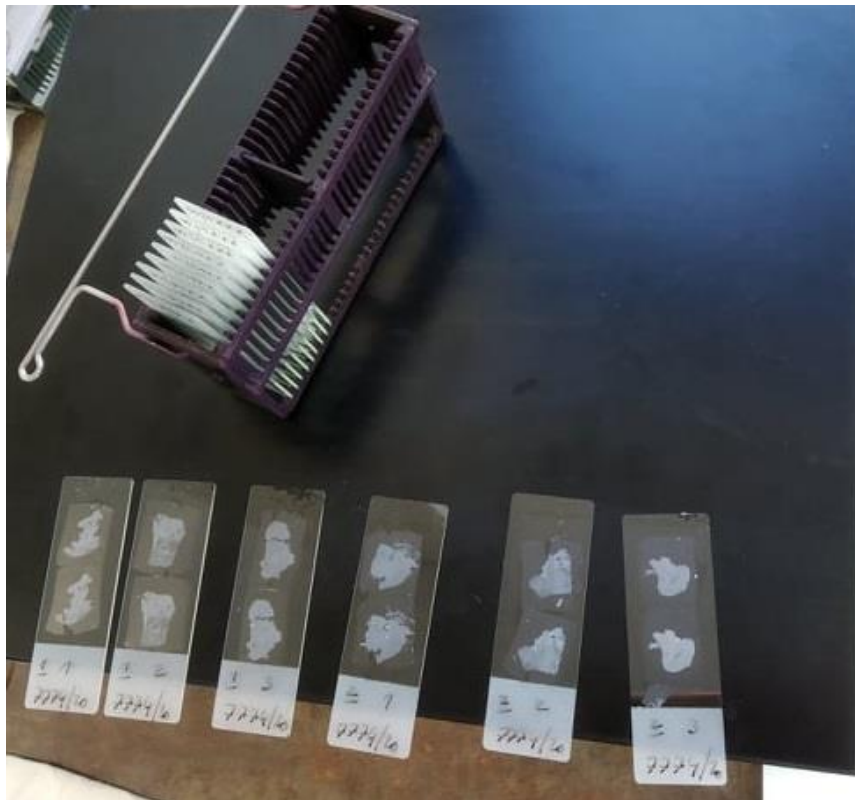


Obrázek 6 - Zalévací automat LEICA EG 1150 H s mrazící linkou (vlastní foto)

Zmrazené vzorky jsou následně připraveny na krájení. Krájení probíhá na sáňkových mikrotomech HM 400. Vzniklé řezy jsou přeneseny na podložní skla se želatinou, které se položí na ploténku, zahřátou na teplotu okolo 50°C. Po napnutí řezů na sklíčka se preparáty přenesou ve stojánku do barvicího automatu Tissue Stainer TST 44C. Všechna sklíčka se v barvicím automatu odparafinují a obarví. Součástí tohoto stroje je také automatické zamontování obarvených skel pomocí montovací pásky Tissue Tek Coverslipping Film, který plně nahrazuje krycí sklíčka.



Obrázek 7 - Sáňkový mikrotom (vlastní foto)



Obrázek 8 - Vyhřívací ploténka se vzorky (vlastní foto)



Obrázek 9 - barvicí automat Tissue Stainer TST 44C (vlastní foto)



Obrázek 10 - Montovací automat (vlastní foto)

5.3 Imunohistochemické zpracování vzorku

Na imunohistochemickém oddělení v Ústřední vojenské nemocnici v Praze se vzorky zpracovávají dvěma způsoby, a to ve stroji nebo ručně. V automatizovaném stroji Leica Bond-Max si přístroj zpracuje veškeré úkony sám, od deparafinace pomocí média devax, až po samotné barvení. Po posledním úkonu se obarvené vzorky převedou ručně přes odvodňovací řadu, která je složena ze dvou lázní alkoholu s benzenem, ze dvou lázní acetonu a ze tří lázní xylenu. Preparáty jsou ve všech lázních ponechány po dobu 1 minuty. Následně jsou vzorky zamontovány ručně nebo pomocí automatizovaného přístroje, přičemž se používá montovací médium pertex.



Obrázek 11 - Automatizovaný imunohistochemický přístroj Leica Bond-Max (vlastní foto)



Obrázek 12 - Preparáty s krycími sklíčky a s protilátkami (vlastní foto)



Obrázek 13 - Odvodňovací řada (vlastní foto)

Druhou možností je zpracování vzorků ručně. Kroky jsou stejné jako u automatizovaného přístroje. Vzorky nejdříve deparafinujeme přes tři lázně xylenu a tři lázně 96% alkoholu s bezenem. Ve všech lázních jsou vzorky ponořeny po dobu 10 minut. Následně se vzorky musí demaskovat v pufru o příslušném pH, jenž je vložen do vodní lázně při 98°C. Preparáty jsou zde uchovány po dobu 10-30 minut. Po vypršení času se po dobu 20 minut vzorky zchlazují při laboratorní teplotě ve stejném pufru, ve kterém byly zahřívány.



Obrázek 14 - Vodní lázeň (vlastní foto)

Následně se preparáty musí blokovat proti endogenní peroxidáze pomocí 3% peroxidu vodíku po dobu 10 minut. Poté se preparát opláchne v promývacím pufru, dále jen PBS, o pH 7,2 po dobu 5 minut. Preparáty se opět po promytí vloží do vlhké komůrky a na řezy se nakape, pomocí automatické pipety okolo 100 μ l, primární protilátky, která se nechá inkubovat 30 minut. Nato se vzorky znovu propláchnou v čistém PBS na 2x5 minut. V předposledním kroku se ve vlhké komůrce na řezy nakape detekční systém EnVision (mouse/rabbit), jenž se nechá působit 30 minut. Následuje promytí v čistém PBS pufru na 2x5 minut. Naposledy nakapeme na řezy ve vlhké komůrce DAB chromogen, neboli diamidobenzen, který necháme působit po dobu 5-10 minut. Následuje pětiminutový oplach v čistém PBS a poté dobarvení jader v Mayerově hematoxylinu po dobu 5 minut. Závěrem celého postupu je převedení vzorků přes odvodňovací řadu a zamontování preparátu. Tyto poslední úkony jsou zcela shodné s výše zmíněným postupem u automatizovaného přístroje.



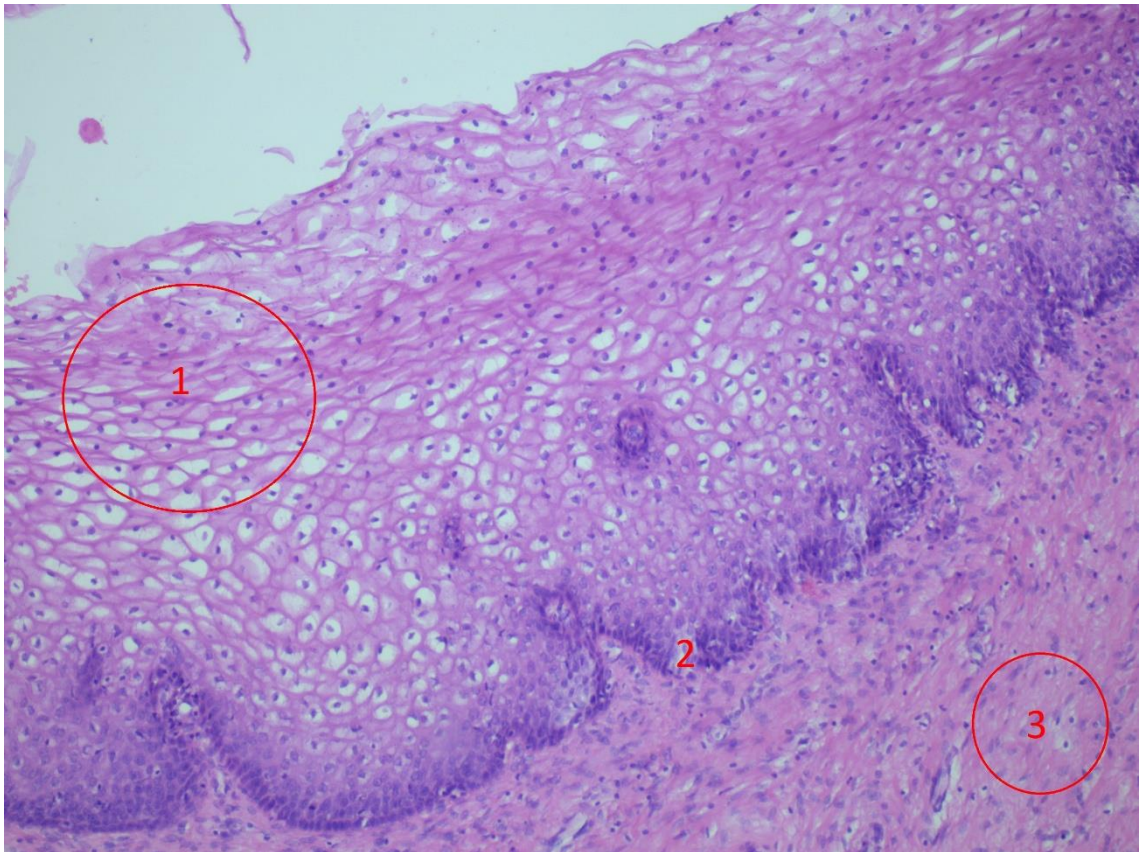
Obrázek 15 - Preparáty ve vlhké komůrce (vlastní foto)

5.4 Detekce zpracovaných vzorků

5.4.1 Preparáty obarvené metodou Hematoxylin-eosin

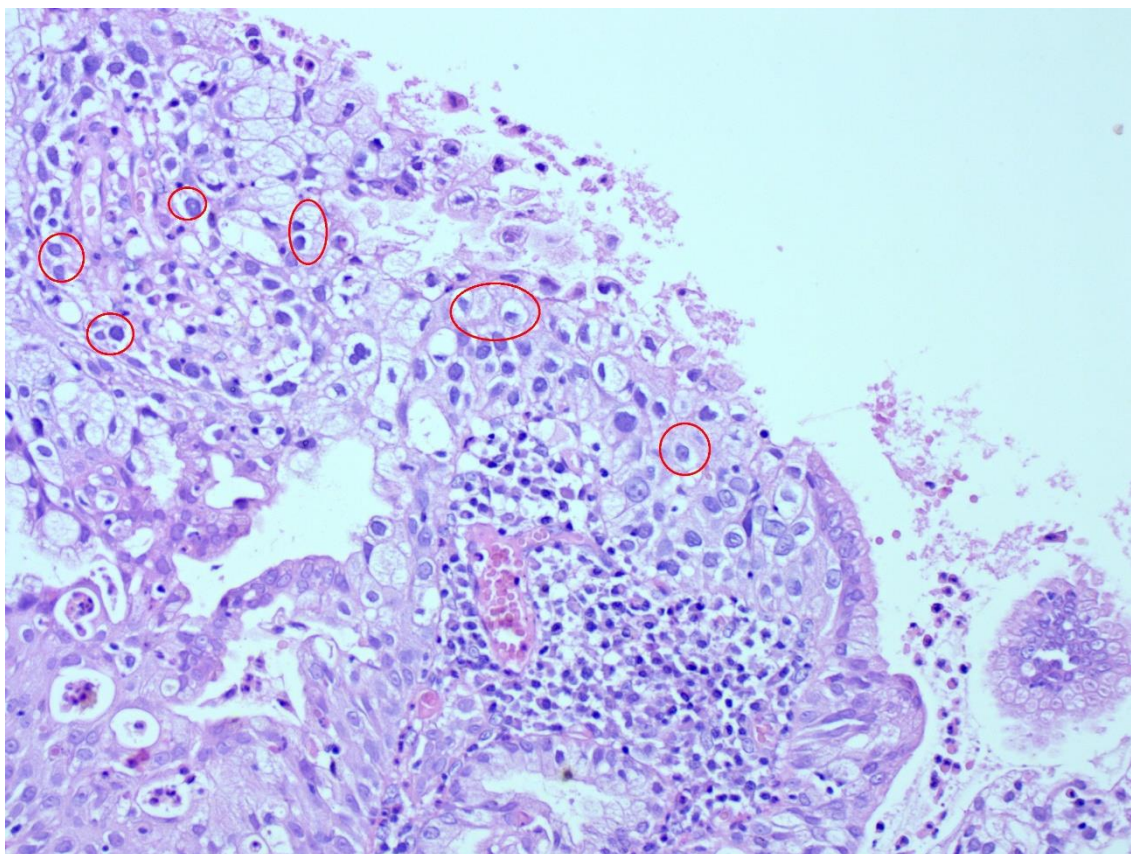
Barvení hematoxylin-eosin patří mezi základní barvicí metody, jejímž principem je obarvení jader buněk modře až fialově a cytoplazmy růžově. V následujících obrázcích můžeme pozorovat zdravou tkáň děložního čípku oproti jednotlivým patologickým nálezům.

Ve zdravé tkáni děložního čípku můžeme pozorovat nerohovějící, vícevrstevný dlaždicobuněčný epitel (1). Nenarušenou bazální vrstvu (2), za kterou následuje zdravá stromální část (3).



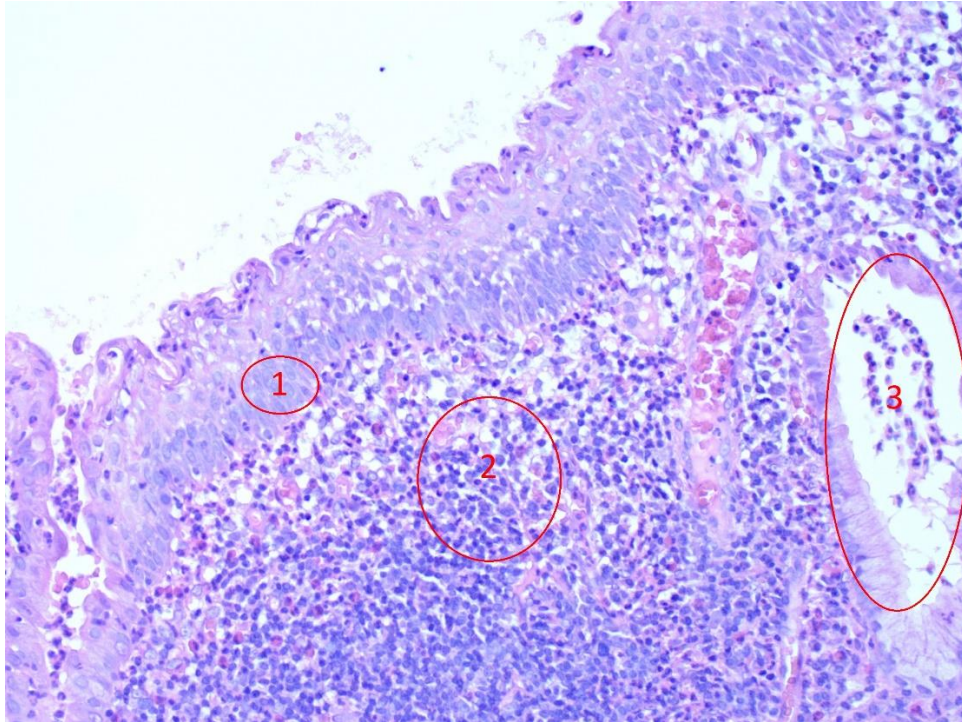
Obrázek 16 - Zdravá tkáň děložního čípku (vlastní foto)

Jestliže žena prodělává infekci, nejčastěji způsobenou HPV viry, dochází ke změnám buněk epitelu a vytváří se koilocyty. Tyto buňky se nacházejí ve vícevrstevném dlaždicovém nerohovějícím epitelu. Mají výrazné perinukleární projasnění a na periferii je výrazně eosinofilní cytoplazma se zvětšenými jádry a nepravidelnou jadernou membránou.



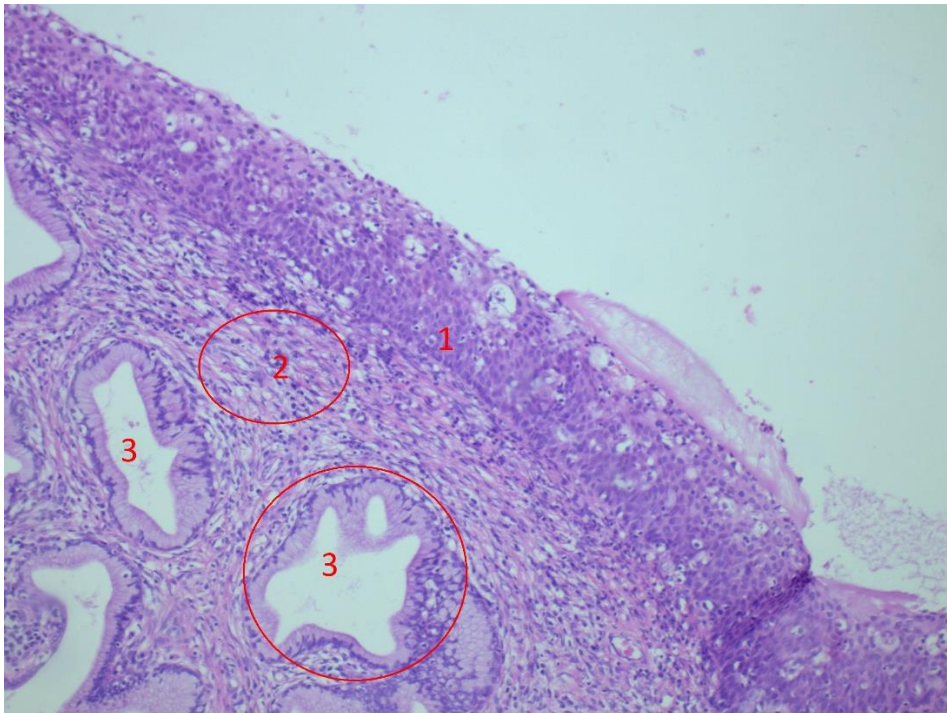
Obrázek 17 - Koilocyty (vlastní foto)

Pokud infekce HPV viry není zachycená včas, způsobuje patologické změny v epitelu. První fází je CIN I, kdy můžeme pozorovat exocervix krytý dlaždicobuněčným epitelem, kde jsou patrné LG (low grade) dysplastické změny do výše 1/3 epitelu (1). Ve stromatu jsou těžké chronické fokálně aktivní zánětlivé změny (2). Zároveň zde můžeme pozorovat endocervikální žlázy (3).



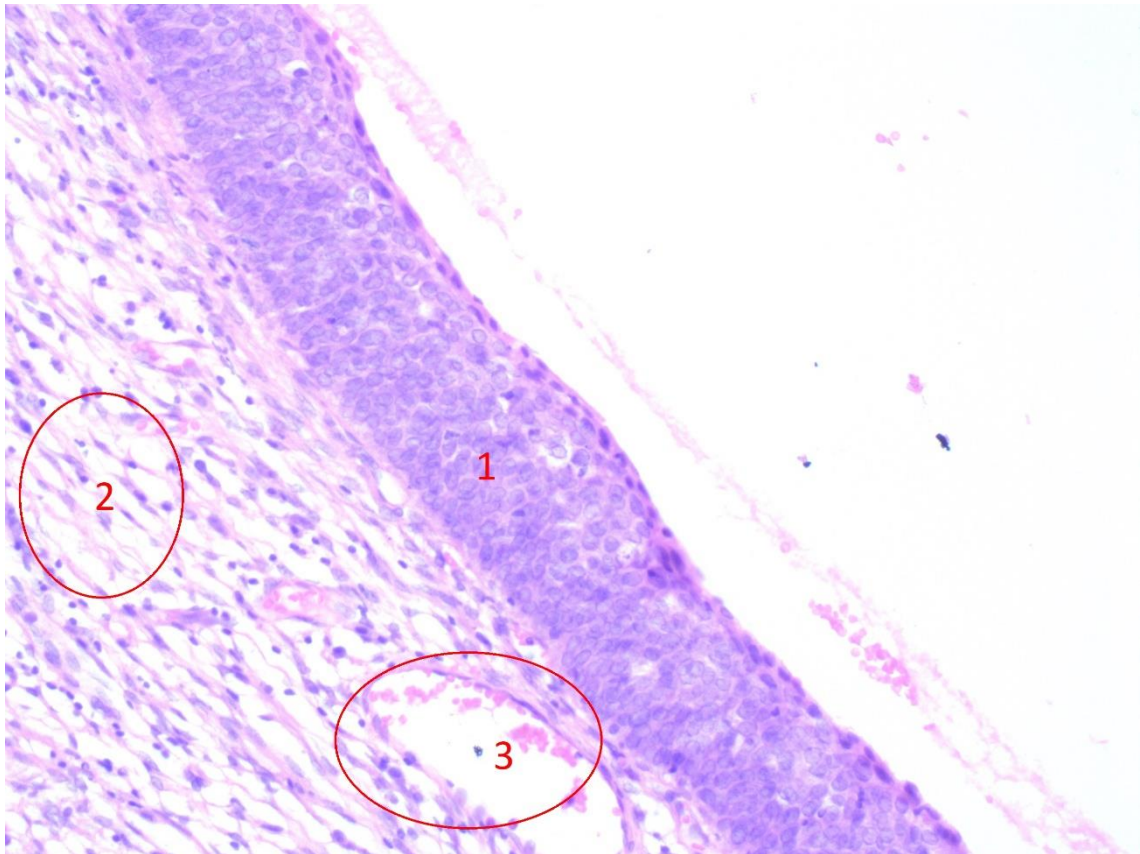
Obrázek 18 - CIN I (vlastní foto)

Ve druhé fázi došlo k progresi do CIN II, kde můžeme pozorovat zvýšenou proliferaci buněk epitelu do 2/3 výše epitelu (1). Buňky jsou polymorfní s mitózami a jadernými atypiiemi. Ve stromatu jsou výrazné chronické zánětlivé změny (2). A opět zde nacházíme endocervikální žlázy (3).



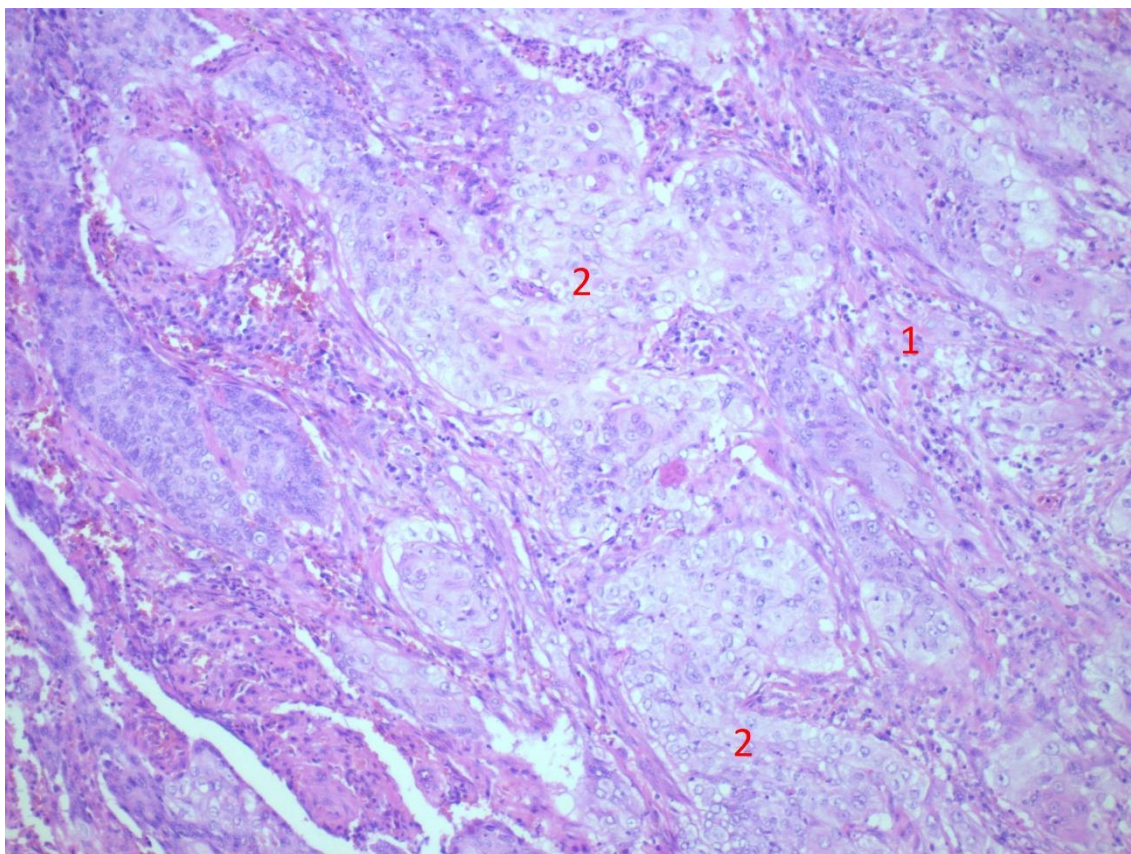
Obrázek 19 - CIN II (vlastní foto)

Další progresí vzniká CIN III, kde můžeme pozorovat dysplastické změny HG (high grade) v celé šíři epitelu, bez přítomnosti koilocytů (1). Stroma s chronickým zánětem (2). Cévu s červenými krvinkami (erytrocyty) (3).



Obrázek 20 - CIN III (vlastní foto)

Poslední a nejzávažnější progresí vzniká dlaždicobuněčný karcinom. Stroma (1) cervixu je rozsáhle infiltrované čepy středně diferenciovaného dlaždicobuněčného karcinomu, bez rohování (2). Nádorové buňky jsou polymorfní s mitózami.

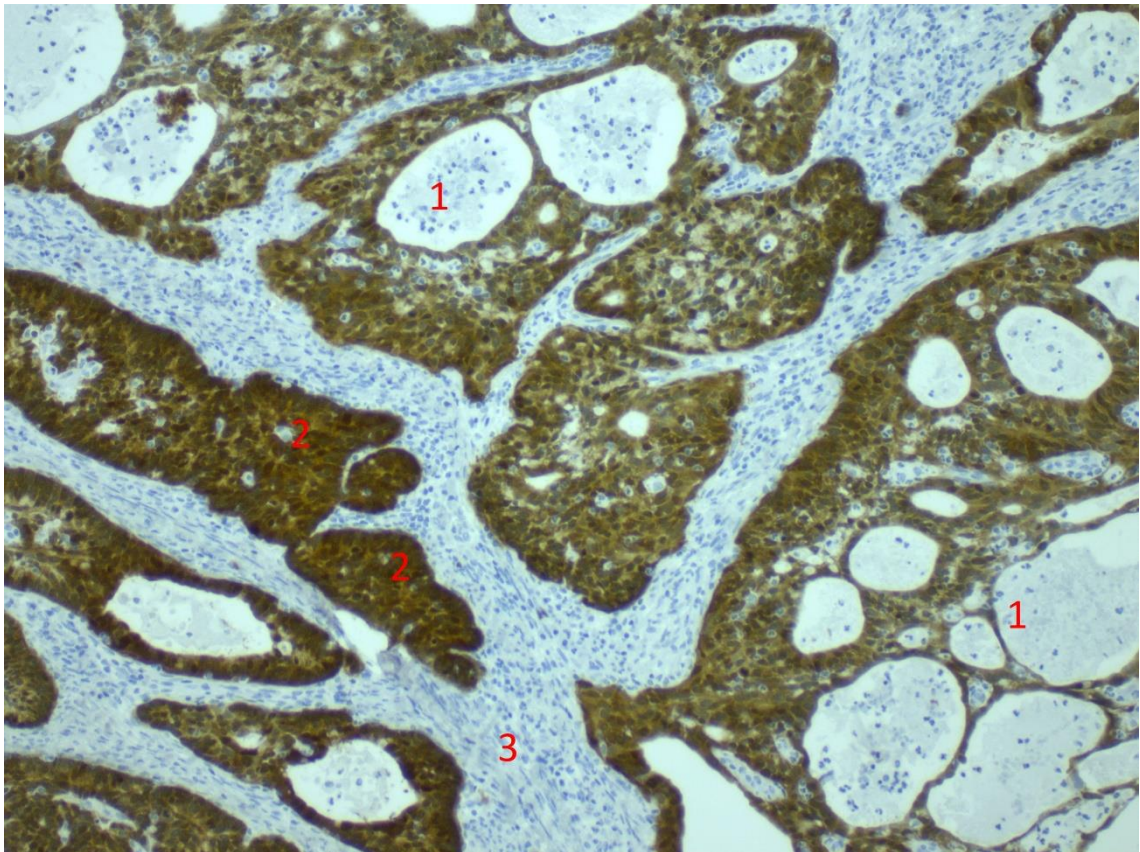


Obrázek 21 - Dlaždicobuněčný karcinom (vlastní foto)

5.4.2 Preparáty zpracované metodou imunohistochemickou

Tato metoda je založena na vazbě antigenu se specifickou protilátkou. Případná pozitivita ve vzorku se projeví změnou barvy na hnědou. V děložním čípku provádíme dvě imunohistochemické metody, a to stanovení P16, která poukazuje na nádorové změny buněk ať už jaderné nebo cytoplazmatické. Druhou metodou je stanovení KI-67, jenž dává informaci o proliferační aktivitě epitelových buněk.

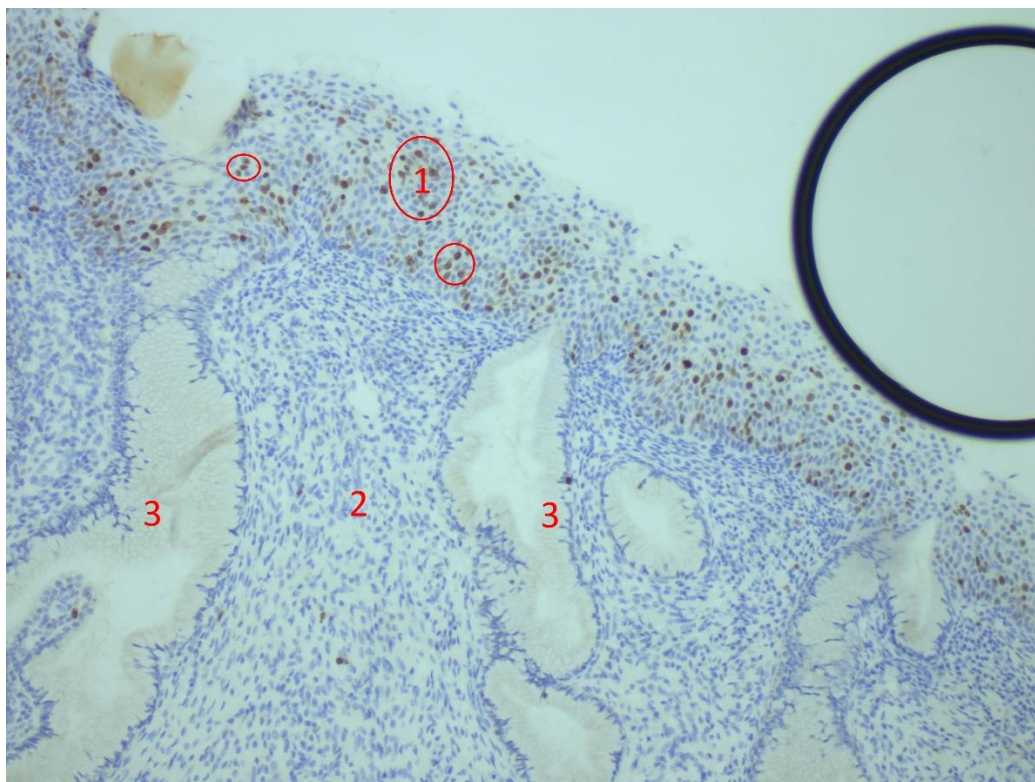
Stanovení pomocí P16 v následujícím preparátu pozorujeme masivní infiltraci cervikálního stromatu adenokarcinomem, který tvoří kribriformní čepy (1). Nádorové buňky exprimují markr P16 (2). Infiltrované stroma (3)



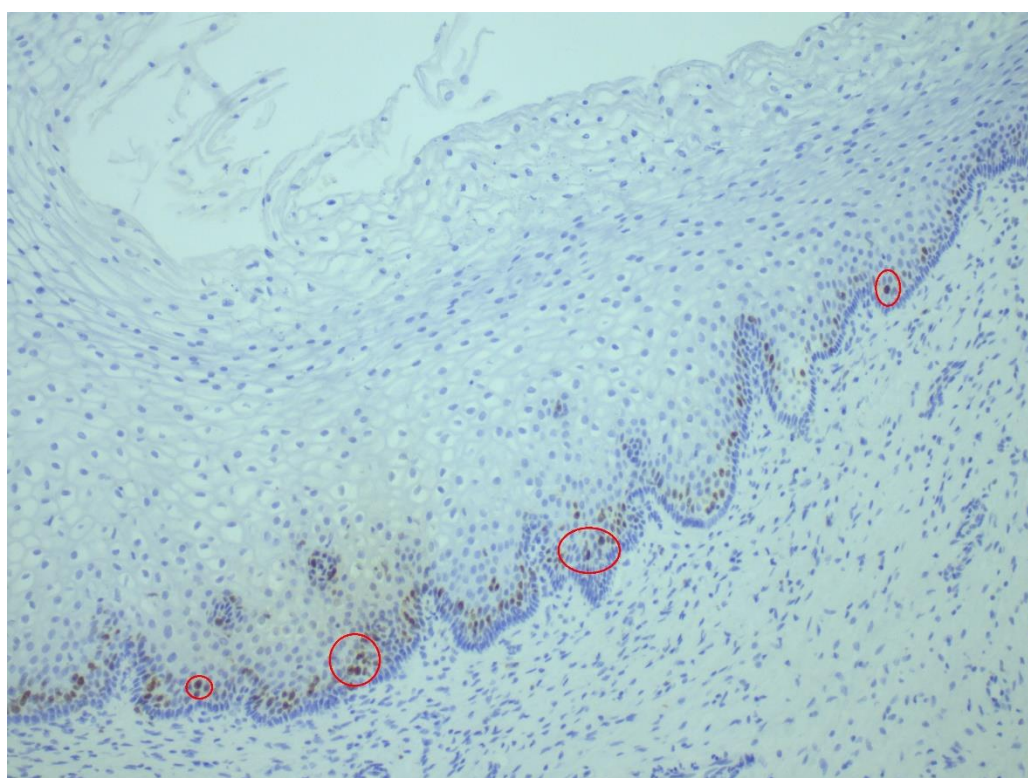
Obrázek 22 - Průkaz pozitivitu adenokarcinomu děložního čípku metodou P16
(vlastní foto)

U stanovení metodou KI-67 pozorujeme dlaždicovou metaplazii s obrazem HG dysplastických změn typu CIN II (1). Dále stroma (2) infiltrované endocervikálními žlázkami (3).

U druhého preparátu máme pro srovnání provedenou metodu KI-67 u fyziologické tkáně děložního čípku. Pozorujeme proliferační aktivitu pouze v bazální vrstvě epitelu. Tyto změny jsou zcela normální a poukazují na běžné vyžívání buněk.



Obrázek 23 - Průkaz pozitivní proliferací aktivity v CIN II metodou KI-67 (vlastní foto)



Obrázek 24 - Proliferační aktivita ve zdravé tkáni čípku metou KI-67 (vlastní foto)

6 DISKUZE

Onemocnění děložního hrdla je velice častým onemocněním mnoha žen ve středním věku života. Tento stav může ovlivňovat řada faktorů, mezi nimiž je nejdůležitější přenos rizikových lidských papilomavirů pohlavním stykem. HPV pak napadají genom epitelových buněk děložního hrdla a způsobují rozvoj prekancerózních lézí, které se mohou rozvinout až v samotný karcinom. Dalším faktorem, jenž způsobuje rozvoj onemocnění děložního hrdla, může být životospráva ženy, opakující se genitální infekce nebo poruchy imunitního systému. Všechny tyto skutečnosti vedou ke stále vysokému výskytu onemocnění vycházejících z epitelu děložního hrdla. V České republice je běžně diagnostikováno okolo 800 případů karcinomu děložního čípku. Z toho okolo 300 žen každý rok zemře. Při srovnání zemí Evropské unie je ze statistik možné pozorovat, že východoevropské země jsou postiženy mnohem více než země západoevropské. Je to dáno tím, že v postkomunistických zemích rozvoj screeningu cervixu vznikl teprve nedávno. Zatímco incidence v České republice činí okolo 15 diagnostikovaných nových případů onemocnění na 100 000 žen, v zemích jako je Lotyšsko nebo Estonsko incidence představuje zhruba kolem 23 pozitivně diagnostikovaných případů na 100 000 žen. S vyvíjející se léčbou a možností záchytu klesá mortalita žen. [95].

Každá žena by měla docházet na každoroční preventivní prohlídku u gynekologa a tím přispívat k včasnému záchytu nemoci. V České republice je zaveden plošný screening patologických změn epitelu cervixu již od 15. let věku. Věková hranice byla zavedena s ohledem na možné praktikování pohlavního styku a tím i možné riziko přenosu HPV. Samotný screeningový test je neinvazivní metoda, která slouží pro včasný záchyt buněčných abnormalit epitelu děložního hrdla. Při jakémkoli podezření na výskyt abnormalit v cytologickém stěru se u pacientek provede test na výskyt HPV. Avšak jako každý jiný test i zmíněné screeningové vyšetření může vykazovat falešnou pozitivitu

nebo falešnou negativitu. Jestliže je prokázán vyšší stupeň postižení cervixu, pak následují invazivní metody, jejichž cílem je odběr postižené tkáně a snaha zachovat daný orgán.

Veškeré odebrané vzorky jsou dopraveny do specializované laboratoře a podrobeny vyšetření. Ze všech tkání je dle standardních operačních postupů připraven histologický preparát. Ten se pak barví základním barvivem hematoxylin-eosin. U specifických nálezů, u nichž není zcela jistá míra poškození daného orgánu, je provedena imunohistochemická detekce. Ta jasně určí pomocí speciálních protilátek, o jaké poškození cervixu se jedná.

Jak již bylo zmiňováno výše, základním histologickým barvivem je hematoxylin-eosin. Je to přehledný typ barvení pro určení většiny diagnóz, ale není specifický. Proto při nejistotě při určení některé diagnózy se doporučuje provést i imunohistochemický průkaz. Pro děložní hrdlo se využívají protilátky antiKI-67 a antiP16. Přičemž antiKI-67 podává informace o proliferačním stavu epitelových buněk a antiP16 detekuje nádorové změny buněk, které mohou být jaderného nebo cytoplazmatického původu. U obou stanovení musí být provedena i pozitivní kontrola, aby byla zachována jistota funkčnosti metody. Výhodou imunohistochemické detekce je tedy její specifičnost. Nevýhodou je pak cenová náročnost těchto testů, jelikož každá tkáň má svá antigenní místa, na která se naváží jen specifické protilátky získané ze speciálních reagensů. Naopak použití základního barviva je levnější. Na druhou stranu je nutno vzít do úvahy, že imunohistochemická detekce je přesnější [96; 97].

Při srovnání jednotlivých preparátů je zcela jasná rozdílnost mezi zdravou tkání děložního hrdla a jeho patologickými stavy. U zdravé tkáně můžeme pozorovat nenarušený vícevrstevný dlaždicobuněčný nerohovějící epitel. Dále celistvou bazální vrstvou a ničím nenarušenou stromální část. Jestliže je žena

infikována HPV, můžeme pozorovat změnu v dlaždicobuněčném epitelu, ve kterém nacházíme buňky zvané koilocyty. Tyto buňky je možné fyziologicky pozorovat v menším množství během proliferační aktivity v bazální vrstvě epitelu. Nacházíme-li v preparátu větší množství koilocytů, znamená to pouhou infekci HPV. Pokud zmnožení koilocytů není zachyceno včas, dochází k progresi do CIN I. Tento stav se od zdravé tkáně liší změnou ve vícevrstevném dlaždicovém nerohovějícím epitelu, který je infiltrován do výše 1/3. Dále jsou viditelné změny ve stromální části, kde se obvykle vyskytují hojné endocervikální žlázy. Po této fázi následuje CIN II, jenž je typický pro výskyt dysplastických změn epitelu do výše 2/3. Ve stromatu pozorujeme aktivní zánětlivé změny s endocervikálními žlázkami. V poslední progredující fázi CIN III je pozorovatelná proliferační aktivita buněk přes celý epitel. V této části již nejsou viditelné koilocyty, za to je viditelná mnohem více aktivita chronického zánětu. Pokud nedojde k okamžitému залечení, může dojít k progresi do invazivního karcinomu. Při tomto stavu je viditelný průnik nádorových buněk přes bazální vrstvu. Stroma obsahuje velké množství kribriformních čepů [98; 99].

Spinocelulární karcinom může přerůst do dalších tkání jako je močový měchýř. Proto je důležitý včasný záchyt, popřípadě včasné odebrání infiltrované tkáně. Jestliže si patolog není jistý mírou postižení děložního čípku, je provedena imunohistochemická detekce. Ta zobrazuje už jen daný antigen produkovaný nádorovou tkání.

V rámci preventivních prohlídek je dbán velký zřetel i na profylaktické proočkování dívek před zahájením sexuálního života. V České republice existují tři typy vakcín, z nichž každá z nich je specifická proti vybraným typům HPV. Mezi tyto vakcíny patří Silgard, Cervarix a Gardasil 9 [100].

Byť je snaha zajistit komplexní prevenci dívkám a ženám, je toto úsilí v mnoha ohledech bezvýsledné. Neboť mnoho žen i dívek nepodstupuje pravidelné preventivní prohlídky. Další komplikací je nedůvěra matek vůči preventivnímu očkování svých dcer. Díky tomu je v České republice incidence výskytu infekce HPV stále vysoká. Každý rok tak vychází okolo 15 potvrzených případů ze 100 000 žen [101].

7 ZÁVĚR

Patologické abnormality děložního hrdla jsou, po karcinomu prsu, druhým nejzávažnějším onemocněním žen. Tyto problémy se u žen začínají projevovat okolo 35. let věku. Pokud nedojde k včasnému zachytu a onemocnění progreduje až do invazivního karcinomu, je úmrtnost vysoká. Ženy by proto měly podstupovat preventivní prohlídky v rámci screeningového programu. Zároveň by dívky měly být očkovány profylaktickými vakcínami zajišťujícími imunitu vůči lidským papilomavirům. Podle studií je dokázáno, že účinnost preventivních vakcín je na vysoké úrovni, ovšem nemělo by se zapomínat na přeočkování po 10 letech. Vzhledem k častějšímu postižení žen tímto onemocněním bylo od 1.1.2021 zavedeno, pojišťovnou proplacené, provedení HPV testu v rámci preventivní prohlídky ve 35. roce a ve 45. roce života.

Hlavní náplní mé práce bylo srovnání fyziologické tkáně děložního hrdla s vybranými patologickými stavy. K tomuto úkonu bylo zapotřebí znát rozdíly mezi histologickou a anatomickou stavbou zdravé tkáně a jejími patologickými abnormalitami. Odběr, zpracování a detekce histologických preparátů je na vysoké úrovni.

Pro pochopení závažnosti celé problematiky byl kladen důraz na porozumění progresi onemocnění a jeho detekci.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

HPV – Lidský papilomavirus (Human papillomavirus)

CIN – Cervikální intraepitelová neoplazie

LSIL - Skvamózní intraepitelové léze nízkého stupně (low-grade squamous intraepithelial lesion)

HSIL - Skvamózní intraepitelové léze vysokého stupně (High-grade squamous intraepithelial lesion)

SCJ - Skvamokolumnární junkce

BOZP - Bezpečnost a ochrana zdraví při práci

LIS – Laboratorní informační systém

AMIS – Nemocniční informační systém

DAB - Diamidobenzen

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 375-376. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [2] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 372-379. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [3] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 372-382. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [4] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 372-377. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [5] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 377. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [6] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 220-222. ISBN 80-86022-80-3.
- [7] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 377-380. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [8] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 220-233. ISBN 80-86022-80-3.

- [9] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 369-378. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [10] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 222-226. ISBN 80-86022-80-3.
- [11] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 379-385. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [12] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 375-379. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [13] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 220-224. ISBN 80-86022-80-3.
- [14] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 365-381. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [15] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 218-224. ISBN 80-86022-80-3.
- [16] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 375-379. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [17] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 379-386. ISBN 978-80-7553-009-7.

- [18] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 218-221. ISBN 80-86022-80-3.
- [19] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 378-388. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [20] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 214-230. ISBN 80-86022-80-3.
- [21] BALKO, Jan, Zbaněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 379-383. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [22] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 379-390. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [23] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 221-229. ISBN 80-86022-80-3.
- [24] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 379-387. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [25] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 213-223. ISBN 80-86022-80-3.

- [26] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 371-381. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [27] BALKO, Jan, Zbyněk TONAR a Ivan VARGA. *Memorix histologie*. 1. Praha: Triton, 2016, s. 374-385. ISBN 978-80-7553-009-7.
- [28] KONDRÁDOVÁ, Václava, Jiří UHLÍK a Luděk VAJNER. *Funkční histologie*. 2. vyd. Jinočany: H&H Vyšehradská s.r.o, 2000, s. 215-223. ISBN 80-86022-80-3.
- [29] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL. *Repetitorium gynekologie*. 2.rozšířené vydání. Praha: Maxdorf, 2011, s. 27-30. Jessenius. ISBN 978-80-7345-138-7.
- [30] KOBILKOVÁ ET AL., Jitka. *Základy gynekologie a porodnictví*. 1. Praha: Galén, 2005, s. 40. ISBN 80-7262-315-X.
- [31] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL. *Repetitorium gynekologie*. 2.rozšířené vydání. Praha: Maxdorf, 2011, s. 737-742. Jessenius. ISBN 978-80-7345-138-7.
- [32] MOTLÍK, Karel a Jaroslav ŽIVNÝ. *Patologie v ženském lékařství*. 1. Praha: Grada, 2001, s. 58-66. ISBN 80-7169-460-6.
- [33] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL. *Repetitorium gynekologie*. 2., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2011, s. 740-742. Jessenius. ISBN 978-80-7345-267-4.

- [34] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL.
Repetitorium gynekologie. 2., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2011, s. 735-742. Jessenius. ISBN 978-80-7345-267-4.
- [35] MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ.
Patologie. 2. U Průhonu 22, Praha 7: Grada Publishing a.s., 2012, s. 275. ISBN 9788024735306.
- [36] STŘÍTESKÝ, Jan. *Patologie. 1. Chválkovická 5*, Olomouc: EPAVA, 2001, s. 272. ISBN 8086297063.
- [37] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL.
Repetitorium gynekologie. 2., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2011, s. 740. Jessenius. ISBN 978-80-7345-267-4.
- [38] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL.
Repetitorium gynekologie. 2., aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2011, s. 742-750. Jessenius. ISBN 978-80-7345-267-4.
- [39] KOBILKOVÁ ET AL., Jitka. *Základy gynekologie a porodnictví. 1.* Praha: Galén, 2005, s. 111-115. ISBN 80-7262-315-X.
- [40] MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ.
Patologie. 2., dopl. vyd. Praha: Grada, 2012, s. 273-274. ISBN 978-80-247-3530-6.

- [41] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL. *Repetitorium gynekologie. 2., aktualiz. vyd.* Praha: Maxdorf, 2011, s. 746-747. Jessenius. ISBN 978-80-7345-267-4.
- [42] STRÍTESKÝ, Jan. *Patologie: [učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium]*. Olomouc: Epava, 2001, s. 272-274. ISBN 8086297063.
- [43] MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie. 2., dopl. vyd.* Praha: Grada, 2012, s. 270-274. ISBN 978-80-247-3530-6.
- [44] MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie. 2., dopl. vyd.* Praha: Grada, 2012, s. 274-277. ISBN 978-80-247-3530-6.
- [45] MOTLÍK, Karel a Jaroslav ŽIVNÝ. *Patologie v ženském lékařství. 1.* Praha: Grada, 2001. ISBN 80-716-9460-6.
- [46] MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie. 2., dopl. vyd.* Praha: Grada, 2012, s. 112-118. ISBN 978-80-247-3530-6.
- [47] STRÍTESKÝ, Jan. *Patologie: [učebnice pro zdravotnické školy a bakalářské studium]*. 1. Olomouc: Epava, 2001, s. 270-274. ISBN 8086297063.
- [48] MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie. 2., dopl. vyd.* Praha: Grada, 2012, s. 274-280. ISBN 9788024735306.

- [49] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL. *Repetitorium gynekologie. 2.*, aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2011, s. 749-766. Jessenius. ISBN 978-80-7345-267-4.
- [50] KOBILKOVÁ ET AL., Jitka. *Základy gynekologie a porodnictví. 1.* Praha: Galén, 2005, s. 112-123. ISBN 80-7262-315-X.
- [51] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL. *Repetitorium gynekologie. 2.*, aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2011, s. 749-751. Jessenius. ISBN 978-80-7345-267-4.
- [52] KOBILKOVÁ ET AL., Jitka. *Základy gynekologie a porodnictví. 1.* Praha: Galén, 2005, s. 112-116. ISBN 80-7262-315-X.
- [53] MAČÁK, Jirka, Jana MAČÁKOVÁ a Jana DVOŘÁČKOVÁ. *Patologie. 2.*, dopl. vyd. Praha: Grada, 2012, s. 274. ISBN 9788024735306.
- [54] KOLAŘÍK, Dušan, Michael HALAŠKA a Jaroslav FEYEREISL. *Repetitorium gynekologie. 2.*, aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, 2011, s. 745-746. Jessenius. ISBN 978-80-7345-267-4.
- [55] ROB, Lukáš, Alois MARTAN a Pavel VENTRUBA. *Gynekologie. Třetí, doplněné a přepracované vydání.* Praha: Galén, 2019, s. 227-228. ISBN 9788074924262.
- [56] ČEPICKÝ, Pavel. *Kapitola z diferenciální diagnostiky v gynekologii a porodnictví. 1.* U Průhonu 22, Praha 7: Grada Publishing a.s., 2018, s. 113-120. ISBN 978-80-247-5604-2.

- [57] ROB, Lukáš, Alois MARTAN a Pavel VENTRUBA. *Gynekologie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2019, s. 220-230. ISBN 978-80-7492-426-2.
- [58] ČEPICKÝ, Pavel. *Kapitola z diferenciální diagnostiky v gynekologii a porodnictví*. 1. U Průhonu 22, Praha 7: Grada Publishing a.s., 2018, s. 114-116. ISBN 978-80-274-5604-2.
- [59] ROB, Lukáš, Alois MARTAN a Pavel VENTRUBA. *Gynekologie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2019, s. 226-232. ISBN 978-80-7492-426-2.
- [60] ČEPICKÝ, Pavel. *Kapitola z diferenciální diagnostiky v gynekologii a porodnictví*. 1. U Průhonu 22, Praha 7: Grada Publishing a.s., 2018, s. 121-122. ISBN 978-80-274-5604-2.
- [61] ROB, Lukáš, Alois MARTAN a Pavel VENTRUBA. *Gynekologie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Na Popelce 3144/10a, 150 00 Praha 5: Galén, 2019, s. 227-230. ISBN 978-80-274-5604-2.
- [62] ROB, Lukáš, Alois MARTAN a Pavel VENTRUBA. *Gynekologie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Na Popelce 3144/10a, 150 00 Praha 5: Galén, 2019, s. 228-231. ISBN 978-80-274-5604-2.
- [63] ROB, Lukáš, Alois MARTAN a Pavel VENTRUBA. *Gynekologie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Na Popelce 3144/10a, 150 00 Praha 5: Galén, 2019, s. 229-230. ISBN 978-80-274-5604-2.

- [64] ROB, Lukáš, Alois MARTAN a Pavel VENTRUBA. *Gynekologie*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Na Popelce 3144/10a, 150 00 Praha 5: Galén, 2019, s. 230-232. ISBN 978-80-274-5604-2.
- [65] DUBOVÁ, Olga a Michal ZIKÁN. *Gynekologie a porodnictví: praktické repetitorium*. 1. Praha: Maxdorf, 2019, s. 385-388. Jessenius. ISBN 978-80-7345-599-6.
- [66] DUBOVÁ, Olga a Michal ZIKÁN. *Gynekologie a porodnictví: praktické repetitorium*. 1. Praha: Maxdorf, 2019, s. 338-345. Jessenius. ISBN 978-80-7345-599-6.
- [67] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 25. ISBN 8070132027.
- [68] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 25-26. ISBN 8070132027.
- [69] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 26. ISBN 8070132027.
- [70] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 27-28. ISBN 8070132027.

- [71] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 29. ISBN 8070132027.
- [72] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 29-31. ISBN 8070132027.
- [73] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 32-33. ISBN 8070132027.
- [74] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 34-37. ISBN 8070132027.
- [75] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 37. ISBN 8070132027.
- [76] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 38. ISBN 8070132027.
- [77] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 38-40. ISBN 8070132027.

- [78] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 43-46. ISBN 8070132027.
- [79] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 47-50. ISBN 8070132027.
- [80] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 51-60. ISBN 8070132027.
- [81] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 61-66. ISBN 8070132027.
- [82] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 64-66. ISBN 8070132027.
- [83] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 66-67. ISBN 8070132027.
- [84] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 68-69. ISBN 8070132027.

- [85] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 69-71. ISBN 8070132027.
- [86] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 71-72. ISBN 8070132027.
- [87] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 72-73. ISBN 8070132027.
- [88] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 72-76. ISBN 8070132027.
- [89] VACEK, Zdeněk. *Histologie a histologická technika*. Díl II. Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 1995, s. 71-74. ISBN 8070132027.
- [90] SOP -*Barvení histologických řezů*. oddělení patologie, Vojenská fakultní nemocnice v Praze, 2020.
- [91] LUKÁŠ, Zdeněk. *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice: Immunohistochemical methods in biology and surgical pathology*. 1. V Brně: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 1997, s. 13-17. ISBN 802100620x.

- [92] LUKÁŠ, Zdeněk. *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice: Immunohistochemical methods in biology and surgical pathology*. 1. V Brně: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 1997, s. 17-29. ISBN 802100620x.
- [93] LUKÁŠ, Zdeněk. *Imunohistochemické metody v biologii a v bioptické diagnostice: Immunohistochemical methods in biology and surgical pathology*. 1. V Brně: Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, 1997. ISBN 80-210-0620-X.
- [94] SOP - *Zalévání do parafínu*. oddělení patologie, Vojenská fakultní nemocnice v Praze, 2020.
- [95] MÁJEK, O., V. DVOŘÁK, O. NGO, L. DUŠEK, J. MUŽÍK, L. ŠNAJDROVÁ a K. HEJDUK. *Program cervikálního screeningu v České republice* [online]. Masarykova univerzita, Brno, 2021, [cit. 2021-04-26]. ISSN 1804-087X. Dostupné z: Dostupný z WWW: <https://www.cervix.cz>.
- [96] Immunohistochemistry. *The human protein atlas - Immunohistochemistry* [online]. PubMed, 2015 [cit. 2021-04-26]. Dostupné z: <https://www.proteinatlas.org/learn/method/immunohistochemistry>
- [97] GHOSH, Apurv, M NIRUPAMA, Nandan PADMANABHA a Hema KINI. Assessment of p16 and Ki67 Immunohistochemistry Expression in Squamous Intraepithelial Lesion with Cytomorphological Correlation. *Iranian Journal of Pathology* [online]. 2020, **15**(4), 268-273 [cit.

2021-04-26]. ISSN 2345-3656. Dostupné z:

doi:10.30699/ijp.2020.112421.2208

- [98] POVÝŠIL, Ctibor a Ivo ŠTEINER. *Speciální patologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-494-2.
- [99] ZÁMEČNÍK, Josef, ed. *Patologie*. 1. 156 00 Praha 5 - Zbraslav: PRAGER PUBLISHING, 2019. ISBN 978-80-270-6457-1.
- [100] *Současný screening karcinomu děložního hrdla v České republice: Acta medicae*. 2020, . ISSN 1805-398X.
- [101] ROB, Lukáš. Zhoubné nádory děložního hrdla (čípku). *Linkos.cz* [online]. Gynekologicko porodnická klinika, 3. LF a Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Onkogynekologické centrum FNKV, Šrobárova 50, Praha 10, 10000, 2021 [cit. 2021-04-26]. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/pacient-a-rodina/onkologicke-diagnozy/gynekologicke-nadory-c51-54-c56-57/zhoubne-nadory-delozniho-hrdla-cipku/>

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Děloha [5].....	13
Obrázek 2 - Děloha bez adnexů (vlastní foto).....	50
Obrázek 3 - Konus (vlastní foto)	50
Obrázek 4 - Přikrojený čípek v tkáňových kazetkách (vlastní foto)	51
Obrázek 5 - Tkáňový automat Tissue-Tek VIP 6 (vlastní foto).....	52
Obrázek 6 - Zalévací automat LEICA EG 1150 H s mrazicí linkou (vlastní foto)	53
Obrázek 7 - Sáňkový mikrotom (vlastní foto).....	54
Obrázek 8 - Vyhřívací ploténka se vzorky (vlastní foto).....	54
Obrázek 9 - barvicí automat Tissue Stainer TST 44C (vlastní foto)	55
Obrázek 10 - Montovací automat (vlastní foto).....	55
Obrázek 11 - Automatizovaný imunohistochemický přístroj Leica Bond-Max (vlastní foto).....	56
Obrázek 12 - Preparáty s krycími sklíčky a s protilátkami (vlastní foto)	57
Obrázek 13 - Odvodňovací řada (vlastní foto)	57
Obrázek 14 - Vodní lázeň (vlastní foto)	58
Obrázek 15 - Preparáty ve vlhké komůrce (vlastní foto)	59
Obrázek 16 - Zdravá tkáň děložního čípku (vlastní foto).....	60
Obrázek 17 - Koilocyty (vlastní foto)	61
Obrázek 18 - CIN I (vlastní foto)	62
Obrázek 19 - CIN II (vlastní foto)	62
Obrázek 20 - CIN III (vlastní foto)	63
Obrázek 21 - Dlaždicobuněčný karcinom (vlastní foto).....	64
Obrázek 22 - Průkaz positivity adenokarcinomu děložního čípku metodou P16 (vlastní foto).....	65
Obrázek 23 - Průkaz positivity proliferační aktivity v CIN II metodou KI-67 (vlastní foto).....	66

Obrázek 24 - Proliferační aktivita ve zdravé tkáni čípku metou KI-67 (vlastní foto)..... 66

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - TNM – klasifikace karcinomu hrdla dělohy [46]	24
Tabulka 2 - Kolposkopická terminologie nálezů na děložním hrdle (Rio de Janeiro 2011) [58]	27
Tabulka 3 - Systém Bethesda (2001) – cytodiagnostika [61]	29
Tabulka 4 - Postup barvení hematoxilin-eozin [90]	46
Tabulka 5 - Standartní program v tkáňovém automatu Tissue-Tek VIP 6 [94]	52