

přehledový článek

KLASIFIKACE INTRAEPITELIÁLNÍCH NEOPLAZIÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH DLAŽDICOVÉMU KARCINOMU PENISU A JEJICH ANALOGIE S PREKANCERÓZAMI DLAŽDICOVÝCH KARCINOMŮ VULVY

CLASSIFICATION OF THE PENILE INTRAEPITHELIAL
NEOPLASIAS PRECEDING INVASIVE SQUAMOUS CELL
CARCINOMAS AND THEIR ANALOGY WITH PRECANCERS
OF VULVAR SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Michal Michal¹, Ondřej Hes¹,
Denisa Kacerovská¹, Milan Hora²,
Leopold Rotter³, Marian Švajdler¹,
Dmitrij Kazakov¹

¹Biopstická laboratoř s.r.o. a Šiklův ústav
patologie LF UK, Plzeň

²Urologická klinika LF UK, Plzeň

³Reprofit International s.r.o., Klinika
reprodukční medicíny a gynekologie, Brno

Došlo: 13. 1. 2014.

Přijato: 24. 4. 2014.

Kontaktní adresa

prof. MUDr. Michal Michal
Šiklův ústav patologie FN
alej Svobody 80, 304 60 Plzeň
e-mail: michal@medima.cz

Podpořeno projektem Ministerstva zdravot-
nictví ČR koncepčního rozvoje výzkumné or-
ganizace 00669806 – FN Plzeň.

Střet zájmů: žádný.

Souhrn

Michal M, Hes O, Kacerovská D, Hora M,
Rotter L, Švajdler M, Kazakov D. Klasifikace
intraepiteliálních neoplazií předcházejících
dlaždicovému karcinomu penisu a jejich
analogie s prekancerózami dlaždicových
karcinomů vulvy

Prezentujeme souhrn, týkající se klasifikací
intraepiteliálních neoplazií předcházejících
dlaždicovému karcinomu penisu. Vzhledem
k právě se tvořící klasifikaci těchto lézí vychá-
zející z analogických vulvárních lézí uvádíme
nejdříve klasifikaci vulvárních lézí a z nich
odvozujeme klasifikaci penilních lézí. Někte-
ré pojmy jako například Bowenoidní nemoc
a Bowenoidní papulóza či Bowenoidní derma-
tóza, Queyratova erythroplazie, leukoplakie
a obrovský kondylom Buschke-Lowenstein by
se neměly v diagnostice používat.

Klíčová slova:

vulva, vulvární intraepiteliální neoplazie, VIN,
penilní intraepiteliální neoplazie, PeIN, WHO
klasifikace, HPV.

Summary

Michal M, Hes O, Kacerovská D, Hora M, Rotter L, Švajdler M, Kazakov D. Classification of the penile intraepithelial neoplasias preceding invasive squamous cell carcinomas and their analogy with precancerous lesions of vulvar squamous cell carcinoma

We present a review of the classification of penile intraepithelial neoplasias preceding invasive squamous cell carcinomas. Since these lesions are analogous to vulvar lesions, we pre-

sent classification of vulvar lesions, and discuss the analogy between vulvar and penile intraepithelial neoplasia classification. Terms such as Bowenoid papulosis, Bowenoid dermatosis, erythroplasia of Queyrat, leukoplakia, and giant condyloma of Buschke-Lowenstein should not be used in diagnostic pathology.

Key words:

vulva, penis, vulvar intraepithelial neoplasia, VIN, penile intraepithelial neoplasia, PeIN, WHO classification, HPV.

ÚVOD

Klasifikace preneoplastických změn předcházející dlaždicovému karcinomu penisu prochází v současné době rozsáhlou revizí, která zcela mění pohled na tuto diagnosticky obtížnou část patologie. Vzhledem k existenci úplné analogie těchto preneoplastických změn na penisu a na vulvě a nejspíše i několikrát častějšímu výskytu těchto tumorů na vulvě než na penisu jsou znalosti těchto změn na vulvě mnohem lépe prozkoumány, a mnoha patologie jsou proto nová klasifikační schémata z vulvy aplikována na identické změny penisu. Žádná platná mezinárodní klasifikace v současné době tyto změny klasifikačních schémat v patologii penisu nepostihuje, a proto přinášíme jejich přehled a návrh nové klasifikace těchto preneoplastických změn na penisu.

SOUČASNÁ PLATNÁ WHO KLASIFIKACE INTRAEPITELIÁLNÍCH NEOPLAZIÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH INVAZIVNÍMU DLAŽDICOVÉMU KARCINOMU PENISU

Většina karcinomů penisu patří do skupiny dlaždicových (skvamózních) karcinomů. In-

vazivní dlaždicové karcinomy jsou zpravidla předcházeny prekursorů těchto tumorů. Poslední WHO klasifikace, která se těchto prekanceróz týká, je z roku 2004, avšak byla sepsána již v roce 2002. Není tedy překvapivé, že je již pro dnešní účely klasifikace a následné léčby zcela nepoužitelná. V této klasifikaci se uvádí, že část dlaždicových karcinomů penisu je způsobena lidskými vysoce rizikovými (high-risk) papillomaviry (HR-HPV) a že tyto nádory mají *in situ* stadium růstu, které autoři navrhuji nazývat (nejspíše po vzoru klasifikace nádoru cervixu) penilní intraepiteliální neoplazie (PeIN) grade I–III. Navíc tato klasifikace směřuje prekancerózy způsobené nízké rizikovými (low-risk) papillomaviry (LR-HPV) (nejčastěji typ 6 a 11) a HR-HPV (nejčastěji typ 16 a 18) do jedné skupiny, jako by se jednalo o jeden a ten samý mechanismus vzniku nádoru. Z tohoto důvodu ve stejné podkapitole autoři dále uvádějí jako prekancerózu obrovský kondylom (Giant condyloma zvaný Buschke-Lowenstein), který odlišují od verukózního dlaždicového karcinomu. Aby zmatkům nebyl konec, jako další typ prekancerózy penisu uvádějí autoři této WHO klasifikace Bowenoidní papulózu a Bowenoidní nemoc a spojují tyto jednotky s výrazy „Queyratova erythroplazie“ (1). Jinými slovy, poslední WHO klasifikace (2004) prekanceróz je nejen nepoužitelná, ale pro správnou léčbu a sledování pacientů přímo nebezpečná.

SOUČASNÁ PLATNÁ WHO KLASIFIKACE INTRAEPITELIÁLNÍCH NEOPLAZIÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH INVAZIVNÍMU DLAŽDICOVÉMU KARCINOMU VULVY

Na začátek krátkého sdělení stavu klasifikace nádorů vulvy je třeba zmínit, že WHO klasifikace prekanceróz vulvy je téměř stejně matoucí a nepoužitelná, jako je tomu u penisu (2). Zmatek ve světové literatuře je možno doložit i tím, že není přesně uvedeno ani to, jestli se má používat anglický výraz „vulval“ nebo „vulvar“. Asi $\frac{2}{3}$ článků používá anglický termín „vulvar“, a proto i v tomto článku bude používán jeho překlad jako „vulvární.“

V poslední WHO klasifikaci týkající se nádorů vulvy z roku 2003 autoři zcela přiznávají analogii s prekurzory dlaždicových karcinomů cervixu a tvrdí, že tyto preneoplazie jsou způsobené HPV a navrhuji jejich gradování na vulvární intraepiteliální neoplazie (VIN) grade I–III. Dále je uváděno, že asi jedna třetina VINů je makroskopicky výrazně pigmentovaná. Autoři této klasifikace zmiňují, že existuje ještě jakýsi simplexní (diferencovaný) typ VINu, který není způsoben HPV, aniž by blíže popsali klinický obraz tohoto VINu a aniž by uvedli jeho klinické rozdíly od HPV indukovaného VINu. Dále autoři přiznávají, že u tohoto simplexního VINu se atypie nacházejí většinou jen ve spodní vrstvě epitelu, ale ze znění textu nepřímě vyplývá, že by se měl tento typ dysplazie rozdělovat na grade I–III jako u HPV indukovaného VINu. Jde však o protirečení, jelikož VIN III se liší od VIN I (stejně jako cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN) III od CIN I) tím, že dysplazie postihuje celou výšku epitelu a ne jen bazální vrstvu epitelu.

KLASIFIKACE INTRAEPITELIÁLNÍCH NEOPLAZIÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH INVAZIVNÍMU KARCINOMU VULVY PODLE INTERNATIONAL SOCIETY FOR THE STUDY OF VULVOVAGINAL DISEASE (ISSVD)

V roce 2004 ISSVD navrhlo terminologii, která se liší od WHO klasifikace vulvárních intraepiteliálních změn z roku 2003 a jednotlivé klinické typy VINů byly klinicky charakterizovány (3, 4). Tato klasifikace striktně oddělila od sebe dva typy VINů, a to:

1. obvyklý (nediferencovaný) VIN, který je způsoben HR-HPV (nejčastěji typ 16, 33, 18) (3–5) a tento typ VINu je dále rozdělen na bazaloidní a bradavičnatý („warty“) podtyp (odlišovat bazaloidní a bradavičnatý podtyp je zcela nedůležité) a
2. diferencovaný (simplexní) VIN, který ve velkém procentu případů (z naší zkušenosti asi ve $\frac{2}{3}$ případů) vzniká na pozadí lichen sclerosus (dříve nazývaný jako „lichen sclerosus et atrophicus“).

Dále, a to je velmi důležité, ISSVD navrhla tyto VINy negradovat, a to z toho důvodu, že epitel na vulvě je tak nízký, že případné gradování tohoto typu VINu na dosahování intraepiteliálních změn do výšky $\frac{1}{3}$, $\frac{2}{3}$ epitelu vulvy (tak, jako je tomu u cervixu) by bylo zcela nereprodukovatelné. U diferencovaného typu VINu je též grading nemožný, protože intraepiteliální atypické změny postihují jen bazální vrstvu epitelu vulvy. Když patolog stanoví diagnózu VINu dle definice, má na mysli automaticky high-grade lézi, která je prakticky synonymní s termínem *in situ* karcinom. Hlavní rozdíly obvyklého a diferencovaného VINu jsou uvedeny v tabulce 1. Klinicky je možné též rozpoznat obvyklý typ VINu tím, že $\frac{1}{3}$ případů obvyklého typu VINu vykazuje melaninovou pigmentaci (obr. 1), což je způsobeno redistribucí a hyperpigmentací epitelu

**Obr. 1.**

Obvyklý (nediferencovaný) VIN s hyperpigmentací

Fig. 1.

Unusual (undifferentiated) VIN with hyperpigmentation

**Obr. 2.**

Lichen sclerosus a diferencovaný PeIN

Fig. 2.

Lichen sclerosus and undifferentiated PeIN

doprovázející obvyklý typ VINu. V naší studii jsme ve spolupráci s dalšími dvěma zahraničními ústavami shromáždili celkem 45 pacientů s pigmentovanými intraepiteliálními změnami anogenitální oblasti. Ve všech případech se jednalo o HPV indukované léze a ani jeden případ diferencovaného typu VIN nebo diferencované penilní intraepiteliální neoplazie (PeIN) nebyl zjištěn (6).

Pro praxi je velice důležité vědět, že ti patologové, kteří nejsou speciálně vyškoleni rozpoznávat diferencovaný typ VINu, a těch je ve světě pořád většina, velké procento případů diferencovaného typu VINu mikroskopicky podhodnotí a odečtou tuto high-grade lézi jen jako „reaktivní“ nenádorové změny nebo jako lichen sclerosus bez přítomnosti VINu. Velmi zdařile tuto alarmující skutečnost ilustruje

Tab. 1. Rozdíly mezi obvyklým typem VINu a diferencovaným typem VINu**Table 1. Difference between typical type VIN and well differentiated type of VIN**

	Obvyklý VIN	Diferencovaný VIN
synonymum	nediferencovaný VIN	simplexní VIN
věk	střední věk	starší pacientky
etiologický vztah k HR-HPV	ano	ne
imunohistochemická pozitivita s protilátkou proti p16 onkogenu	ano	ne
vztah k lichen sclerosus	ne	ano, u více než 60 % pacientek
multifokalita a skip léze	ano	ne
nutnost histologického zhodnocení přítomnosti intraepiteliální neoplazie v okrajích excize	kvůli multifokalitě a skip lézím obvyklého VINu nedůležité	ano
riziko progresu v dlaždicový karcinom	30 %	víc než 80 %
rychlost progresu do invazivního karcinomu	často mnoho let	1–3 roky, mnohem rychlejší než u obvyklého VINu
léčba	5-fluorouracil, bleomycin, cidofovir	chirurgická excize
histologická rozpoznatelnost patologem	snadná	obtížná
spojení s intraepiteliálními neoplaziemi v jiných orgánech	ano, až 40 % pacientek má CIN nebo intraepiteliální neoplazie v anální oblasti	ne

práce holandských patologů, kteří zrevidovali předchozí biopsie u invazivních karcinomů vulvy ve spojení s lichen sclerosus a u 42 % patientek, u kterých se vyskytl v pozdějším období dlaždicový karcinom vulvy, byl diferencovaný VIN nerozpoznán a podhodnocen jako benigní proces (7, 8).

Dále je třeba zdůraznit, že není žádná vzácnost zastihnout současně na vulvě nález jak VINu obvyklého typu, tak i diferencovaného VINu společně s vyvinutým lichen sclerosus.

KLASIFIKACE PENILNÍCH INTRAEPITELIÁLNÍCH NEOPLAZIÍ PŘEDCHÁZEJÍCÍCH INVAZIVNÍMU DLAŽDICOVÉMU KARCINOMU PENISU

Jsme si vědomi pouze jediné práce, která přehledně uvedla již novou klasifikaci penilních intraepiteliálních neoplazií (9). Jelikož senior autor této práce je dr. A. Cubilla, který má ve WHO klasifikaci na starosti nádory penisu, je prakticky jisté, že tato práce bude i základem budoucí WHO klasifikace penilních intraepiteliálních neoplazií (PeIN). I když autoři této práce to otevřeně nepřiznávají, jejich návrh klasifikace kopíruje ISSVD klasifikaci intraepiteliálních neoplazií vulvy (3, 4). Zcela v analogii s klasifikací VIN je PeIN dělen na nediferencovaný typ způsobený HR-HPV (dále rozdělený na podtypy bazaloidní a bradavičnatý), který v této práci budeme nazývat jako obvyklý (nediferencovaný) PeIN. Druhým typem je diferencovaný PeIN, který nemá vztah k HR-HPV a ve většině případů přichází ve spojení s lichen sclerosus (na penisu dříve nazývaný jako „balanitis xerotica obliterans“) (obr. 2) (10). Rozdíly v morfologii a klinickém chování jsou identické jako u vulvy. Obvyklý PeIN, na rozdíl od diferencovaného PeINu, vzniká u mladších pacientů, je často multifokální, progreduje méně často a doba potřebná k progresi do invazivního karcinomu je výrazně delší než u diferencovaného PeINu. Při diagnostikování obvyklého PeINu u homosexuálních pacientů je nutností vyloučit obdob-

né preneoplastické změny v anální/perianální oblasti, a to buď cytologií, či cytologickým odběrem na HPV genotypizaci, neboť tito pacienti mají až 40násobně vyšší pravděpodobnost tohoto onemocnění v dané oblasti. V případě, že preneoplastická léze je silně makroskopicky pigmentovaná, je téměř jisté, že stejně jako u vulvárních lézí, se bude jednat o HR-HPV indukovaný, obvyklý PeIN, a ne o diferencovaný PeIN (6). Téměř všechny případy obvyklého PeINu jsou imunohistochemicky p16 onkogen pozitivní. P16 imunohistochemická pozitivita v této lokalitě je používána jako levná náhražka HR-HPV genotypizace a téměř všechny případy obvyklého PeINu jsou p16 onkogen pozitivní, zatímco diferencovaný PeIN je p16 onkogen imunohistochemicky negativní. Hlavní rozdíly obvyklého a diferencovaného PeINu jsou uvedeny v tabulce 2.

Velmi důležitý fakt pro urology je ten, že zatímco histologické rozpoznání obvyklého PeINu patologem je jednoduché, histologické rozpoznání diferencovaného PeINu, stejně jako je tomu u diferencovaného VINu (7, 8), nezaškoleným patologem je obtížné, protože atypické změny postihují jen bazální vrstvu epitelu. Na našich plzeňských pracovištích pracuje celkem 46 patologů, z nichž část je superspecializována tak, že jeden patolog odečítá biopsie pouze z jednoho orgánu. Diagnostiku penilních a vulvárních intraepiteliálních neoplazií neprovádí v našich laboratořích uropatolog, ale dermatopatolog, který odečítá výhradně kožní biopsie.

Stejně jako na vulvě, tak i na penisu je možné zastihnout současně jak obvyklý typ VINu, tak i diferencovaný VIN společně s vyvinutým lichen sclerosus.

Jako úplnou novinku bychom chtěli uvést, že před 3 měsíci byla publikována práce, která dokazuje, že existuje ještě jeden typ preneoplazie dlaždicového karcinomu vulvy a penisu (a samozřejmě i celého zbývajícího anogenitálního traktu včetně vaginy, cervixu a anu), která je odlišná od obvyklého a diferencovaného VINu a PeINu (11). Jedná se o léze, které jsou způsobeny LR-HPV, a to především HPV typy 6 a 11, v menšině případů se jedná o HPV 42, 44 a 70. Dříve se mělo za to, že LR-HPV způsobují bezvýhradně benigní léze (diagnostikované histologicky většinou jako papilomy, benigní kondylomy a různé typy bradavic). Tato práce dokázala, že i LR-HPV mohou způsobit invazivní dlaždicový karcinom. Většinou se jedná léze, které jsou bradavičnatě-verukózně

Tab. 2. Rozdíly mezi obvyklým typem PEINu a diferencovaným typem PEINu
Table 2. Difference between typical type VIN and well differentiated type of PEIN

	Obvyklý PEIN	Diferencovaný PEIN
synonymum	nediferencovaný PEIN	simplexní PEIN
věk	střední až starší věk	starší pacienti
etiologický vztah k HR-HPV	ano	ne
imunohistochemická pozitivita s protilátkou proti p16 onkogenu	ano	ne
vztah k lichen sclerosus	ne	ano, u více než 60 % pacientů
multifokalita a skip léze	ano	ne
nutnost histologického zhodnocení přítomnosti intraepiteliální neoplazie v okrajích excize	kvůli multifokalitě a skip lézím obvyklého PEINu není důležité histologické zhodnocení dosahování do okrajů excize	ano
riziko progresu v dlaždicový karcinom	30 %	většina
rychlost progresu do invazivního karcinomu	často mnoho let	1–3 roky, mnohem rychlejší než u obvyklého PEINu
histologická rozpoznatelnost patologem	snadná	obtížná
spojení s intraepiteliálními neoplazemi v jiných orgánech	ano, až 40 % homosexuálních intraepiteliální neoplazie v anální oblasti	ne

(„verrucous-warty carcinoma“) konfigurované a histologicky se jedná o papilární skvamózní typy dlaždicových karcinomů. Pacientů s lézemi penisu bylo osm z celkového počtu 57 a jejich nádory byly diagnostikovány jako bradavičnatý karcinom („warty carcinoma“) (pět případů) a verukózní karcinom („verrucous carcinoma“) (jeden případ) a ve dvou případech se jednalo o histologicky běžně vypadající dlaždicové karcinomy. Většina těchto LR-HPV indukovaných lézí s verukózní či bradavičnatou konfigurací se dříve nazývaly obrovský kondylom Buschke-Lowenstein, mají velmi dobrou prognózu a zpravidla nemetastazují. Většina z nich je imunohistochemicky p16 onkogen negativní.

Na závěr bychom chtěli upozornit na dva důležité aspekty této navržené klasifikace:

1. Některé pojmy jako například Bowenoidní nemoc a Bowenoidní papulóza (12) či Bowenoidní dermatóza (odpovídají obvyklému (nediferencovanému) VINu a obvyklému (nediferencovanému) PEINu), Queyratova erythroplazie (odpovídá obvyklému

VINu a obvyklému PeINu) a obrovský kondylom Buschke-Lowenstein (odpovídá verukóznímu dlaždicovému karcinomu) a leukopalakie by se neměly v diagnostice používat a urologové by je měli odmítat. Jedná se o historicky zastaralé, matoucí termíny, zpravidla svědčící o nevzdělanosti odečítajícího patologa.

2. Je možné, že urologům se pojmy obvyklý (= nediferencovaný) PeIN a diferencovaný (= simplexní) PeIN mohou zdát zavádějící. Je to především z toho důvodu, že diferencovaný (simplexní) PeIN je diagnózou pro osud pacienta zpravidla závažnější než obvyklý (= nediferencovaný) PeIN, ačkoli terminologie názvosloví by mohla napovídat o pravém opaku. Vysvětlením této zdánlivé nesrovnalosti je to, že terminologie je odvozená od histologického vzhledu těchto preneoplazií penisu, kde diferencovaný (simplexní) PeIN vypadá histologicky zdánlivě „benigněji“ než PeIN obvyklý (= nediferencovaný) a není odvozen od jejich klinického chování.

LITERATURA

1. **Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA.** World Health Classification of Tumors. Tumours of the urinary system and male genital organs. Pathology and genetics. Lyon: IARC Press 2004.
2. **Tavassoli F, Devilee P.** World Health Classification of Tumors. Tumors of the breast and female genital organs. Pathology and genetics. Lyon: IARC Press 2003.
3. **Sideri M, Jones RW, Wilkinson EJ, Preti M, Heller DS, Scurry J, Haefner H, Neill S.** Squamous vulvar intraepithelial neoplasia: 2004 modified terminology, ISSVD Vulvar Oncology Subcommittee. J Reprod Med 2005; 50: 807–810.
4. **Heller DS, van Seters M, Marchitelli C, Moyal-Barracco M, Preti M, van Beurden M.** Update on intraepithelial neoplasia of the vulva: proceedings of a workshop at the 2009 World congress of the International Society of Vulvovaginal Diseases. Edinburg, Scotland, September 2009. J Lower Gen Tract Dis 2010; 14: 363–373.
5. **De Sanjosé S, Alemany L, Ordi J, et al.** Worldwide human papillomavirus genotype attribution in over 2000 cases of intraepithelial and invasive lesions of the vulva. Eur J Cancer 2013; 49: 3450–3461.
6. **Kacerovska D, Requena L, Carlson JA, Santonja C, Michal M, Bouda J, Konstantinova AM, Kaspírkova J, Fikrle T, Rotter L, Kazakov DV.** Pigmented squamous intraepithelial neoplasia of the anogenital area: a histopathological and immunohistochemical study of 64 specimens from 45 patients exploring the mechanisms of pigmentation. American Journal of Dermatopathology 2014; accepted for publication, in press.
7. **Van Nieuwenhof H, Bulten J, Hollema H, Dommerholt RG, Massuger LFAG, van der Zee AGJ, Hullu JA, van Kempen LCLT.** Differentiated vulvar intraepithelial neoplasia is often found in lesions, previously diagnosed as lichen sclerosus, which have progressed to vulvar squamous cell carcinoma. Mod Pathol 2011; 24: 297–305.
8. **van den Eiden L, de Hullu JA, Massuger LFAG, Greffe JMM, Bult P, Wiersma A, van Engen-van Grunsven ACH, Sturm B, Bosch SL, Hollema H, Bulten J.** Interobserver variability and the effect of education in the histopathological diagnosis of differentiated vulvar intraepithelial neoplasia. Mod Pathol 2013; 26: 874–880.
9. **Velazquez EF, Chaux A, Cubilla AL.** Histologic classification of penile intraepithelial neoplasia. Semin Diagn Pathol 2012; 29: 96–102.
10. **Vik V, Nencka P, Záleský M, Zachoval R.** Lichen sclerosus – stále přehlížená urologická diagnóza se závažnými komplikacemi. Ces Urol 2011; 52: 78–84.
11. **Guimera N, Lloveras B, Lindeman J, Alemany L, van de Sandt M, Alejo M, Hernandez-Suarez G, Bravo IG, Molijn A, Jenkins D, Cubilla A, Muñoz N, de Sanjose S, Bosch FX, Quint W; RIS HPV TTHPV.** The occasional role of low-risk Human papillomaviruses 6, 11, 42, 44, and 70 in anogenital carcinoma defined by laser capture microdissection/PCR methodology. Results from a global study. Am J Surg Pathol 2013; 37: 1299–1310.
12. **del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J.** Pathways of vulvar intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. Histopathology 2013; 62: 161–165.