

**Eugeniusz Rybka**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**„WYKORZYSTANIE MOLEKULARNEJ  
IDENTYFIKACJI 13 TYPÓW DNA HPV  
W PROFILAKTYCE RAKA SZYJKI MACICY  
NA PRZYKŁADZIE KOBIET  
Z ROZPOZNANIEM CYTOLOGICZNYM ASC-US”**

Promotor : prof. dr hab. n. med. Witold Kędzia

Oddział położniczo-ginekologiczny SP ZOZ Kościan

Kościan 2011

**Motto:**

**„Uważam, że poddawanie kobiet z ASCUS badaniu DNA HPV stanie się wkrótce najczęściej stosowanym schematem postępowania w USA.”**

**J. Thomas Cox M. D. Konferencja Bethesda 2001 (8)**

## Spis treści

1. WSTĘP.....	5
1.1. RYS HISTORYCZNY.....	5
1.2. ZWIĄZEK MIĘDZY ZAKAŻENIEM HPV HR A RAKIEM SZYJKI MACICY.....	8
1.3. ROZWÓJ MOLEKULARNYCH METOD IDENTYFIKACJI WIRUSA BRODAWCZAKA LUDZKIEGO.....	13
1.4. WYKRYWANIE CIN W PROGRAMIE PROFILAKTYKI RAKA SZYJKI MACICY.....	18
1.4.1 DEFINICJA, KLASYFIKACJA, WARUNKI ROZWOJU CIN.....	18
1.4.2. METODY WYKRYWANIA CIN.....	21
1.4.2.1. BADANIE CYTOLOGICZNE.....	21
1.4.2.2. KOLPOSKOPIA.....	28
1.4.2.3. TESTY WYKRYWAJĄCE HPV HR.....	31
1.5. BADANIA PRZESIEWOWE.....	34
1.5.1. TYPOWANIE HPV HR- METODA POPRAWIAJĄCA EFEKTYWNOŚĆ PROFILAKTYKI.....	42
2. CELE PRACY.....	44
3. MATERIAŁ.....	45
4. METODA.....	46
4.1. OGÓLNE ZASADY PRZYJĘTE W REALIZOWANYCH BADANIACH.....	46
4.2. CYTODIAGNOSTYKA.....	47
4.3. DIAGNOSTYKA ETAPU POGŁĘBIONEGO- KOLPOSKOPIA.....	48
4.4. MOLEKULARNA DIAGNOSTYKA DNA HPV HR.....	50
4.4.1 TECHNIKA AMPLICOR- REAKCJA ŁAŃCUCHOWEJ POLIMERAZY.....	50
4.4.2 PRZEBIEG REAKCJI.....	51
4.4.3 CECHY TESTU AMPLICOR.....	53
5. WYNIKI.....	54
6. DYSKUSJA.....	58
7. WNIOSKI.....	68
8. STRESZCZENIE.....	69
9. PIŚMIENNICTWO.....	73

10.SPIS TABEL.....	76
11.SPIS RYCIN .....	77
12.WYKAZ SKRÓTÓW .....	78

# 1. WSTĘP

## 1.1. RYS HISTORYCZNY

Na początku lat siedemdziesiątych XX wieku do 80% przypadków raka szyjki macicy rozpoznawanych było w stadium inwazyjnym. Dzisiaj większość, bo 80% przypadków tego nowotworu diagnozowana jest w początkowym stadium. W USA prowadzone od 1950 roku badania cytologiczne spowodowały obniżenie wskaźnika zachorowalności na raka szyjki macicy o 79% oraz wskaźnika śmiertelności o 70% mimo, że odsetek populacji kobiet uczestniczących w cytologicznych badaniach okresowych wynosił tylko około 8%.

Za twórcę cytodiagnostyki powszechnie uważa się George'a Papanicolaou, który w 1928 roku opisał nową metodę wykrywania raka szyjki macicy u kobiet, polegającą na ocenie komórek pobranych w wymazie z powierzchni szyjki macicy. W 1943 roku praca Papanicolaou i Trauta zainicjowała i otworzyła drogę dalszego rozwoju cytopatologii szyjki macicy. Przez wiele lat metoda i klasyfikacja oceny wymazów opracowane przez tych badaczy stanowiły podstawy tzw. cytologii złuszczeniowej (eksfoliatywnej) na całym świecie. (16) Duży wkład w upowszechnienie metody wniosła polska uczona Irena Koprowska, profesor patologii, od 1944 r. pracująca w USA. Przez wiele lat była ona dyrektorem Wydziału Cytologii Uniwersytetu Temple, Centrum Naukowego Zdrowia w Filadelfii oraz konsultantem WHO w dziedzinie cytodiagnostyki. Profesor Koprowska była również członkiem i konsultantem Panamerican Health Organisation, a w 1985 r. otrzymała od American Society of Cytology nagrodę im. G. Papanicolaou.

W 1953 roku Regan i współpracownicy wprowadzili terminy: rak in situ (CIS–carcinoma in situ) oraz dysplazja małego, średniego i dużego stopnia. (16)

Wprowadzone przez Richarta, w roku 1968, pojęcie CIN (cervical intraepithelial neoplasia) zmieniło wcześniejsze twierdzenia. Przedstawiony przez niego system opisywał jak postępujące przedinwazyjne zmiany w nabłonku części pochwowej szyjki macicy mogą

prowadzić do raka naciekającego. Hipotezę Richarta, że wszystkie dysplazje, dzisiaj określane mianem neoplazji, niosą potencjalne ryzyko progresji, zweryfikowały kolejne badania naukowe. Obecnie uważa się, że większość nie leczonych śródnabłonkowych neoplazji niskiego stopnia, oraz część średniego stopnia ulega samoistnej regresji. (16)

Kiedy w roku 1933 Papanicolaou opublikował pierwszy opis komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego z charakterystycznym przejaśnieniem wokół jądra, nie wiedział o wirusowym tle opisywanych zmian. W 1946 roku Ayre wprowadził nazwę „hallo cells” dla komórek o takim wyglądzie w cytologii złuszczeniowej. (5) Charakterystyczne przejaśnienia okołojądrowe zainspirowały, w roku 1956 Kossa do nazwania ich koilocytami (od greckiego słowa *koilos*- jama, wklęsły). (5) Dopiero w roku 1976 Meisel i Fortin opublikowali tezę, w której powiązali występowanie koilocytów z zakażeniem wirusem brodawczaka ludzkiego (human papilloma virus). (5) W tym samym roku zur Hausen, laureat nagrody Nobla z 2008 r., po raz pierwszy wyraził przypuszczenie, że zakażenie HPV jest czynnikiem etiologicznym raka szyjki macicy. (5) Zrozumienie mechanizmu powstawania przejaśnień okołojądrowych stało się możliwe po wyjaśnieniu roli onkoprotein produkowanych przez HPV. Zespół profesora zur Hausena wyizolował DNA HPV typu 6 z brodawek skórnych i DNA HPV typ 16 z wycinków raka szyjki macicy, oraz wykazał, że dwa niestrukturalne białka wirusowe E6 i E7 mają właściwości transformujące. Ponadto badacze ci udowodnili, że niekontrolowana ekspresja spowodowana utratą genu kodującego białko E2 wirusa, prowadzi do inicjacji transformacji nowotworowej komórki. Udowodnili również, że różne typy wirusa charakteryzują się odmiennym potencjałem onkogennym onkoprotein. Poznanie roli HPV w procesie powstawania raka szyjki macicy wywołało dynamiczny rozwój nowych metod diagnostyki molekularnej wirusa.

Pod względem zachorowalności na nowotwory kobiecych narządów płciowych, rak szyjki macicy w Polsce jest na trzecim miejscu po raku endometrium i raku

jajnika. Natomiast pod względem liczby zgonów nowotwór ten jest na miejscu drugim, po raku jajnika , a przed rakiem endometrium. (18)

Corocznie na świecie notuje się ok. 500 000 nowych przypadków raka szyjki macicy i około 270 000 zgonów z tego powodu. Śmiertelność w 80% dotyczy krajów rozwijających się, gdzie rak szyjki macicy jest główną przyczyną zgonów kobiet. (4)

## **1.2. ZWIĄZEK MIĘDZY ZAKAŻENIEM HPV HR A RAKIEM SZYJKI MACICY**

Udowodniono, że przetrwałe zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego jest istotnym czynnikiem rozwoju raka szyjki macicy. O roli wirusa HPV w karcinogenezie świadczą badania kliniczne, molekularne i epidemiologiczne. (5)

W zależności od czułości zastosowanej metody, obecność poszczególnych typów HPV HR (high risk) czyli wysokiego ryzyka onkologicznego stwierdza się w 97 % do 100 % badanych raków szyjki macicy.

Przyjmuje się, że z ponad 100 znanych typów HPV, około 40 wykazuje skłonność do zakażeń okolicy moczowo- płciowej. Z tych 40, około 15 typów określa się jako wirusy wysokiego ryzyka onkogennego HPV HR, które mogą powodować transformację nowotworową

i rozwój inwazyjnego raka szyjki macicy, pochwy, sromu i odbytu. Typy 16 i 18 odpowiadają w Europie i Ameryce Północnej za powstanie prawie 70% raków szyjki macicy. Najczęściej występującym i najbardziej onkogenym HPV jest typ 16 wirusa brodawczaka ludzkiego. Drugim co do częstości wykrywania typem HR HPV jest HPV 18. Typ 16 i 18 oraz 45 HPV odpowiedzialne są za rozwój ponad 75% raków płaskonabłonkowych i ponad 90% raków gruczołowych szyjki macicy.

Corocznie na świecie odnotowuje się około 300 milionów zakażeń wirusem brodawczaka ludzkiego. Około 80% tych zakażeń jest przemijająca i ustępuje samoistnie w ciągu kilkunastu miesięcy. Dzieje się tak dzięki działaniu naturalnych mechanizmów odporności organizmu. Zakażenie wirusowe, które przechodzi w fazę przewlekłą może prowadzić do inicjacji karcinogenezy w komórkach nabłonka wielowarstwowego płaskiego i gruczołowego szyjki macicy. (8)

Do zakażenia dochodzi najczęściej u młodych, aktywnych seksualnie kobiet podczas współżycia płciowego. Przyjmuje się, że zwiększone ryzyko zakażenia dotyczy kobiet, które



rozpoczęły współżycie w młodym wieku, miały kilku partnerów seksualnych i palą nałogowo papierosy. Na świecie, u około 30% kobiet w wieku 20-25 lat wykrywa się zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego. Po 30 roku życia częstość tych zakażeń maleje.

(5)

Wrotami zakażenia wirusowego są uszkodzenia nabłonka narządów płciowych, które powodują, że HPV ma bezpośredni kontakt z warstwą komórek podstawnych. Czas dojrzewania komórki nabłonka czyli keratynocyta wynosi 8 tygodni. Tyle samo trwa najkrótszy cykl życiowy wirusa od zakażenia komórek podstawnych do wytworzenia kompletnych kapsydów. Infekcja HPV może pozostać utajona lub ustabilizować się, nie przechodząc w kolejne stadia choroby. Najbardziej niekorzystna jest progresja, która prowadzi do rozwoju CIN. Szacuje się, że CIN 1 podobnie jak samo zakażenie wirusowe może powstać w kilka miesięcy lub lat od rozwoju zakażenia HPV. Śródnabłonkowa neoplazja niskiego stopnia może ulec samoistnej regresji lub progresji do wyższych stopni neoplazji. Neoplazja dużego stopnia (CIN 3) w większości stanowi źródło rozwoju inwazyjnego raka szyjki macicy, co następuje na ogół w ciągu kilku lat. Śródnabłonkowa neoplazja dużego stopnia może powstać bezpośrednio wskutek infekcji HPV HR bądź przekształcić się z neoplazji małego lub średniego stopnia. Opisuje się również rzadkie przypadki rozwoju inwazyjnego raka szyjki macicy bezpośrednio z etapu przetrwałego zakażenia wirusowego lub neoplazji niskiego stopnia.

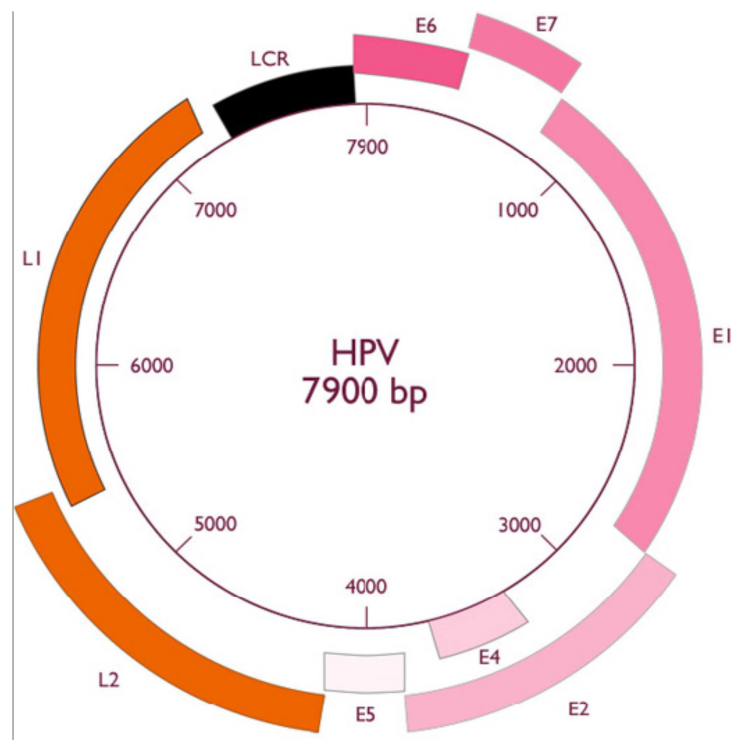
Typy HPV ze względu na różny potencjał onkogenny podzielono na trzy grupy :

- grupa wysokiego ryzyka–15 typów: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82,
- prawdopodobnie wysokiego ryzyka – typy : 26, 53, 66,
- niskiego ryzyka – typy: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 .

W zmianach CIN 2, CIN 3 i rakach najczęściej identyfikowane typy to : 16, 18, 31, 33, 45.

Wirusy brodawczaka ludzkiego należą do rodziny Papillomaviridae i mają podobny schemat organizacji genomu. (Ryc 1).

**Rycina 1. Budowa genomu HPV.**



Na rycinie zaznaczono lokalizację sekwencji kodującej białka wczesne wirusa (E1, E2, E4, E5, E6, E7), białka późne (L1, L2) oraz region regulatorowy LCR. (24)

Ludzki wirus brodawczaka zawiera materiał genetyczny w postaci dwuniciowego DNA zbudowanego z ok. 7900 par zasad. W genomie wirusa można wyróżnić 3 regiony:

- wczesny (E) kodujący 8 białek wczesnych wirusa, w tym dwa E6 i E7 o wysokim potencjale onkogennym ,
- późny zawierający geny L1 i L2 kodujące białka strukturalne wirusa,
- region regulatorowy LCR (Long Control Region), w którym umiejscowione są wirusowe promotory oraz liczne elementy wiążące białko wirusowe E2, a także czynniki komórkowe.

Opis roli poszczególnych białek zawarto w tabeli 1.

**Tabela 1. Funkcje białek wczesnych HPV. (11)**

<b>Białko wirusa</b>	<b>Funkcja</b>
E 1	Indukuje proces replikacji genomu wirusa
E 2	Niezbędne w procesie replikacji wirusowego DNA i regulacji transkrypcji genów
E 3	Funkcja nieznana. Obecne tylko u kilku odmian HPV.
E 1 ^ E 4	Białko fuzyjne uzyskane w wyniku połączenia otwartych ramek odczytu genów dla E1 i E 4. Funkcja nieznana.
E 5	Umożliwia ciągłą proliferację zakażonej komórki i opóźnia jej różnicowanie się.
E 6	Blokuje prawidłowe procesy regulujące podziały zakażonej komórki.
E 7	Blokuje prawidłowe procesy regulujące podziały zakażonej komórki.
E 8 ^ E 2	Białko fuzyjne uzyskane w wyniku połączenia otwartych ramek odczytu genów dla E8 i E 2. Reguluje procesy transkrypcji i replikacji genomu wirusa.

Po zakażeniu komórek warstwy podstawnej nabłonka szyjki macicy oraz okresie inkubacji wirusa dochodzi do produkcji białek wczesnych E1-E7 (early proteins). Ekspresję białka E4 stwierdza się po 3 tygodniach od początku infekcji HPV. Białko E4 ma za zadanie rozerwanie sieci filamentów cytkeratynowych i prawdopodobnie umożliwienie potem translacji późnych białek L1 i L2 (late proteins) oraz uformowanie kapsydu wirusa w powierzchniowej warstwie nabłonka. W procesie złośliwej transformacji nowotworowej keratynocytów konieczne jest działanie białek E6 i E7. Białka te pełnią rolę onkoprotein. Białko produkowane przez gen E6 wirusa łączy się z komórkowym białkiem p53 i powoduje jego degradację. Białko p53 zwane strażnikiem genomu jest antyonkogenem komórkowym. Hamuje ono cykl podziałowy uszkodzonej komórki i powoduje jej zaprogramowaną śmierć czyli apoptozę. Onkoproteina E7 wirusa łączy się z białkiem komórkowym Rb (retinoblastoma) i powoduje uwolnienie czynnika transkrypcyjnego E2F-1, który aktywuje geny związane z proliferacją komórki. Proces ten jest bezpośrednią przyczyną rozwoju neoplazji i raka szyjki macicy.

### **1.3. ROZWÓJ MOLEKULARNYCH METOD IDENTYFIKACJI WIRUSA BRODAWCZAKA LUDZKIEGO.**

#### **1. Testy molekularne wykrywające DNA HPV**

Badania molekularne pozwalają wykryć wirusa brodawczaka ludzkiego w każdej formie jego cyklu życiowego. Najpopularniejsze są testy wykrywające DNA i mRNA HPV w wymazie komórkowym z szyjki macicy lub pochwy przeniesionym na podłoże płynne. Starsze metody wykrywania DNA HPV oparte na hybrydyzacji bez amplifikacji takie jak dot-blot, southern-blot, były pracochłonne i wymagały stosunkowo dużych ilości materiału biologicznego. Wprowadzane obecnie oznaczanie DNA HPV metodą mikromacierzy umożliwia typowanie HPV w krótkim czasie przy wykorzystaniu pojedynczych kopii genomu wirusa.(5)

Aktualnie powszechnie stosowane testy wykrywające DNA HPV oparte są na zasadzie wzmocnienia czyli amplifikacji sygnału jak na przykład test Hybryd Capture II (HC2) firmy Digene lub na zasadzie wzmocnienia genomu HPV jak wystandaryzowany, oparty na metodzie PCR (Polymerase Chain Reaction) test Amplicor firmy Roche. W metodzie Amplicor wykorzystywane są startery amplifikujące konserwatywny region DNA kodujący białko L1 wirusów HPV wysokiego ryzyka. Wyprodukowane fragmenty (amplikony) są wychwytywane przez komplementarne nici DNA opłaszczone na mikropłytkach i uwidocznione na zasadzie detekcji kolorymetrycznej. Test wykonuje jednoczesną amplifikację DNA HPV oraz  $\beta$ -globiny jako kontrolę pozytywną metody. Brak detekcji  $\beta$ -globiny w oznaczonej próbce świadczy, że oznaczany materiał jest niediagnostyczny. Wskazuje to na błędy pobrania niedostatecznej ilości materiału biologicznego lub obecność w próbce inhibitorów reakcji. W metodzie Amplicor oznaczanych jest 13 typów HPV wysokiego ryzyka, podobnie jak w metodzie HC2. Test ten nie reaguje niespecyficznie z innymi wirusami, w tym HPV niskiego ryzyka, bakteriami,

drożdżami. Nie jest także wrażliwy na zanieczyszczenie próbki krwią. Amplicor wykrywa HPV typu: 31, 52, 58 i 59 z czułością 240 kopii/ml, a typy 16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 56 i 68 z czułością 100 kopii/ml. Czulość analityczna testu Amplicor mierzona zdolnością do identyfikacji kobiet zakażonych wirusem HPV HR jest większa niż czulość testu HC2. Czulość dla testu Amplicor wynosi 96% a dla testu HC2 89%. Typy HPV wysokiego ryzyka onkogenne są stwierdzane w około 50% zmian opisywanych jako ASC-US wg systemu Bethesda 2001, w 70% zmian opisywanych jako LG SIL (low grade squamous intraepithelial lesion) czyli CIN 1 i 95% zmian HG SIL (high grade squamous intraepithelial lesion) czyli CIN 2+. (5) Definiowanie neoplazji jako CIN 2+, oznacza obecność co najmniej zmiany przedrakowej średniego stopnia. Jednak pozytywna wartość predykcyjna testu oznaczającego DNA HPV, szczególnie u kobiet poniżej 35 roku życia, w wykrywaniu HG SIL, mierzona jako odsetek kobiet z pozytywnym wynikiem testu, u których stwierdza się zmiany CIN 2 + jest niska i nie przekracza kilku procent. Wynika to z faktu, że u młodych kobiet większość infekcji ma charakter przemijający i tylko mały procent wszystkich infekcji ulega progresji do CIN 3 i raka. (5)

## **2. Testy molekularne wykrywające mRNA HPV**

Warunkiem rozwoju zmian typu HG SIL czyli CIN 2 +, które zazwyczaj powstają na podłożu CIN 1, jest przetrwała infekcja wirusowa i produkcja znaczących ilości białek E6/E7. Wzrost ekspresji E6/E7 następuje po integracji wirusa z genomem komórki gospodarza. Regulatorem transkrypcji DNA HPV jest gen kodujący wczesne białko E2. W przypadku integracji DNA HPV z genomem zakażonej komórki, dochodzi do rozerwania struktury DNA wirusa w obrębie genu E2, co prowadzi do utraty negatywnego sprzężenia zwrotnego regulującego transkrypcję wirusa. Skutkuje to nasileniem transkrypcji białek E6 i E7. W zmianach HG

SIL, w przeciwieństwie do zmian typu LG SIL, ekspresja białek L1 i L2 jest bardzo słaba, lub nie stwierdza się jej w ogóle. (5) W zmianach typu LG SIL można spotkać zarówno genom HPV w postaci episomalnej (kolistej) lub zintegrowanej, jak i obie te formy jednocześnie. Wczesna integracja ma miejsce w około 50% wszystkich zmian typu LG SIL. Dla progresji zmian neoplastycznych nabłonka szyjki macicy konieczna jest aktywność genów kodujących białka E6 i E7 HPV HR. W większości zmian typu LG SIL stwierdza się słabą ekspresję białek E6 i E7. Może to wynikać z faktu, że transkrypty E6 i E7 pochodzące z form episomalnych genomu HPV są o wiele mniej stabilne niż transkrypty pochodzące z form zintegrowanych. Ekspresja onkogenów E6 i E7 może więc służyć jako wskaźnik potencjału progresji do zmian typu HG SIL i raka inwazyjnego (5).

Oznaczanie onkogenów E6 i E7 jest możliwe za pomocą m. in. testu Pre Test HPV-Proofer (Nuclisens EasyQ HPV), który wykorzystuje reakcję amplifikacji mRNA za pomocą odwrotnej transkryptazy, RNazy oraz polimerazy RNA. Test amplifikuje mRNA pięciu typów wirusów wysokoonkogennych HPV: 16, 18, 31, 33, 45. Materiał biologiczny do oznaczeń jest pobierany z szyjki macicy na podłoże płynne za pomocą szczoteczki cervex brush. Jakość próbki jest monitorowana w każdej reakcji poprzez wzmocnienie transkryptu genu U1A. Jest to gen ulegający stałej transkrypcji, konieczny do zachowania podstawowych funkcji komórki. Brak obecności jego transkryptów świadczy o degradacji próbki lub zbyt małej liczbie zawartych w niej komórek.

Przewaga oznaczeń transkryptów mRNA HPV HR nad DNA HPV HR polega na tym, że Nuclisens EasyQ HPV wykrywa tylko te przypadki zakażeń, w których wirusy utraciły swój mechanizm kontroli i produkują onkogenne proteiny. Liczne komercyjne testy oznaczające DNA HPV HR wykrywają często tylko strukturalny region L1 genomu. Region ten odgrywa główną rolę w tworzeniu struktury wirusa, ale nie jest zaangażowany w mechanizm onkogenny.

W przypadku utraty regionu L1 wirusa na skutek integracji do ludzkiego genomu, ujemne testy DNA HPV HR określą próbkę jako fałszywie negatywną, nawet pomimo obecnej aktywności onkoprotein E6 i E7 prowadzącej do transformacji komórki. W 3% do 4% przypadków raka szyjki macicy nie można stwierdzić obecności DNA HPV HR używając powszechnie dostępnych komercyjnych testów diagnostycznych identyfikujących region L1.

(5) Jeszcze innym wytłumaczeniem tego zjawiska jest fakt, że powszechnie stosowane komercyjne testy molekularne identyfikują tylko nieliczne typy HPV uczestniczące w inicjacji karcinogenezy komórek nabłonka szyjki macicy.

Specyficzność NucliSENS EasyQ HPV w wykrywaniu HG SIL jest oceniana na 97,3%, a jego pozytywna wartość predykcyjna na 10,3%. Dla testów identyfikujących DNA HPV HR wartości te wynoszą odpowiednio 90% i 3,7%. Oznacza to, że zastosowanie detekcji mRNA E6 i E7 jest celowe z powodu wysokiej wartości diagnostycznej i opłacalności ekonomicznej. Wykazano, że test mRNA HPV HR jest negatywny dla około 50% zmian typu CIN 2 i 20% zmian CIN 3, ale pozytywny we wszystkich przypadkach raka inwazyjnego. (5). Może to wynikać z faktu, że nie wszystkie zmiany CIN 2 i 3 ulegają progresji do raka i wiążą się tylko z obecnością przetrwałego zakażenia. Miejsce oznaczeń transkryptów mRNA w różnych modelach badań przesiewowych raka szyjki macicy powinny wskazać dalsze prospektywne badania populacyjne.

Obecność transkryptów mRNA HPV HR pozwala z dużym, 98% prawdopodobieństwem przewidzieć infekcję przetrwałą, co może mieć znaczenie także w przewidywaniu skuteczności szczepienia przeciw zakażeniu HPV HR. (21), (28) Według badania ALTS, DNA HPV HR stwierdza się w 83% zmian typu LG SIL szczególnie u młodych kobiet, a więc oznaczenie DNA HPV jest tu stosunkowo mało przydatne klinicznie i nieopłacalne ekonomicznie.(5)



Negatywna wartość predykcyjna metody oznaczania DNA HPV HR i mRNA HPV HR jest porównywalna, ale pozytywna wartość predykcyjna identyfikacji aktywności transkrypcyjnej onkogenów jest dwukrotnie wyższa dla testu mRNA. (5)

Większość przygodnych zakażeń HPV u młodych kobiet ustępuje samoistnie około 30-35 roku życia. Dlatego też przydatność testów molekularnych identyfikujących DNA HPV HR jest znacznie większa dla populacji kobiet w wieku równym lub wyższym niż 35 lat, gdzie większość wykrywanych zakażeń wirusowych ma charakter przejściowy. Dzięki oznaczaniu transkryptów mRNA możliwe jest wykrywanie ekspresji wirusowych onkogenów. Ujemny wynik testu mRNA cechuje wyższa wartość prognostyczna w porównaniu do testów DNA HPV dla populacji kobiet poniżej 30 roku życia. (8)

## **1.4. WYKRYWANIE CIN W PROGRAMIE PROFILAKTYKI RAKA SZYJKI MACICY**

### **1.4.1 DEFINICJA, KLASYFIKACJA, WARUNKI ROZWOJU CIN**

Śródnabłonkowe zmiany neoplastyczne (CIN) powstają zwykle jako pojedyncze ognisko w strefie przekształceń szyjki macicy, gdzie nabłonek wielowarstwowy płaski styka się z nabłonkiem gruczołowym. Zmiany te są najczęściej obserwowane na górnej części szyjki macicy.

Główne kryteria rozpoznawcze śródnabłonkowej neoplazji dotyczą:

- niedojrzałości komórek,
- zaburzeń architektони nabłonka,
- nieprawidłowości jądrowych,
- zwiększonej aktywności mitotycznej.

Na stopień zaawansowania śródnabłonkowej neoplazji wskazują :

- zaawansowanie zaburzeń procesu mitozy,
- niedojrzała proliferacja komórek,
- atypia jąder komórkowych. (10)

Śródnabłonkową neoplazję niskiego stopnia, czyli CIN 1 rozpoznajemy, gdy zaburzenia strukturalne dotyczą tylko dolnej warstwy, jednej trzeciej grubości nabłonka. Zmiany w obrębie dwóch trzecich górnych warstw nabłonka decydują kolejno o rozpoznaniu CIN 2 i CIN 3.

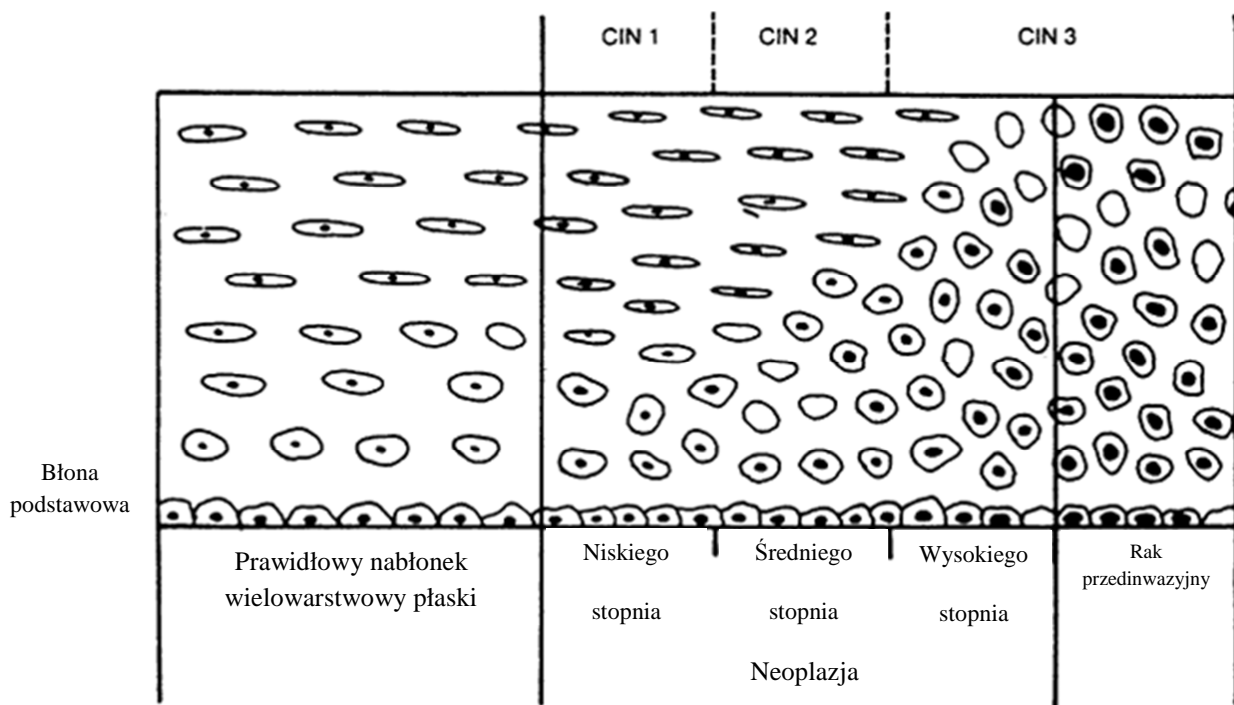
Wyróżniamy trzy stopnie śródnabłonkowej neoplazji (CIN), stopień pierwszy CIN 1, stopień drugi CIN 2 i stopień trzeci CIN 3. Używa się również pojęć śródnabłonkowej neoplazji niskiego, średniego, wysokiego stopnia. Jak już wspomniano powyżej patolog rozróżnia poszczególne stopnie neoplazji zwracając uwagę na trzy podstawowe parametry neoplazji:

morfologię komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego lub gruczołowego, architekturę tego nabłonka, czyli jego warstwowość oraz aktywność mitotyczną. Wraz z narastaniem zmian wynikających ze stopniowego nasilenia procesu karcinogenezy, obserwuje się zmiany w morfologii komórek, polegające głównie na powiększaniu oraz zmianie kształtu jąder komórkowych. Ponadto obserwuje się różną intensywność zabarwienia chromatyny oraz zmniejszenie objętości cytoplazmy na korzyść jądra komórkowego. Nasilenie onkogenezy prowadzi do zupełnego polimorfizmu jądrowego i komórkowego, dotyczącego komórek całej grubości nabłonka.

Kolejnym, bardzo ważnym elementem różnicowania stopnia neoplazji jest analiza warstwowości zmienionego nabłonka szyjki macicy. Zmiany komórkowe początkowo dotyczą warstwy najgłębiej leżącej tuż nad błoną podstawną. Obecność mikrocząstek wirusa, który wnika do głęboko leżących warstw komórkowych powoduje rozwój zakażenia incydentalnego, a przy braku jego samoistnej regresji zakażenia przetrwałego. Komórki leżące nad warstwą podstawną zmieniają swoją morfologię przybierając początkowo formę koilocytów, a następnie wykazują zmiany typowe dla neoplazji. Jak już wspomniano powyżej zatarcie warstwowości w obrębie tworzącej się śródnabłonkowej neoplazji dotyczy początkowo głębokich warstw nabłonka (CIN 1), potem ponad 1/3 grubości błony śluzowej (CIN 2). Przy stwierdzeniu obecności zmiany CIN 3 obserwuje się całkowite zatarcie warstwowości nabłonka spowodowane nieprawidłowym dojrzewaniem wszystkich komórek (Ryc. 2). Kolejne parametry analizy patomorfologicznej na drodze do rozpoznania śródnabłonkowej neoplazji to aktywność mitotyczna. W zaawansowanej karcinogenezie obserwuje się atypowe figury podziałów komórkowych na całej grubości nabłonka (Ryc. 2).

## Rycina 2. Śródnabłonkowa neoplazja i prawidłowy nabłonek szyjki macicy.

Tworzenie się śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Widoczne, schematycznie przedstawione zmiany w morfologii keratynocytów polegające głównie na zaburzeniu stosunku pomiędzy objętością cytoplazmy, a jądrem komórkowym oraz zatarcie warstwowości nabłonka w wyniku postępu procesu karcinogenezy.



## **1.4.2. METODY WYKRYWANIA CIN**

### **1.4.2.1. BADANIE CYTOLOGICZNE**

Ocena mikroskopowa rozmazów pobranych z tarczy i kanału szyjki macicy dokonywana wg klasyfikacji Papanicolaou, od roku 1950 przyniosła w USA obniżenie wskaźnika zachorowalności na raka szyjki macicy o 79%. Raport Agency for Healthcare and Research Quality wykazał, że czułość konwencjonalnego badania cytologicznego w rozpoznawaniu zmian przednowotworowych szyjki macicy wynosi tylko 51%. Wykazano przy tym, że czułość badania wg klasyfikacji Papanicolaou w rozpoznaniu CIN 2-3 wahała się od 47% do 62%, a swoistość wynosi od 60% do 95%. Jednakże co roku pojawia się około 30% nowych przypadków raka szyjki macicy u kobiet, u których regularnie wykonano badanie cytologiczne. Przyczyną niedoskonałości profilaktyki cytologicznej są błędy w pobieraniu rozmazu, utrwalaniu lub analizie materiału komórkowego. Wobec narastającej konieczności udoskonalenia klasyfikacji Papanicolaou Amerykański Narodowy Instytut Walki z Rakiem (National Cancer Institute) podjął, w 1988 roku, pracę nad nowym usystematyzowaniem opisywanych rozpoznań cytologicznych. Miało to na celu poprawę komunikacji i dostarczenie jednolitych wytycznych terapeutycznych, co w efekcie powinno prowadzić do zwiększenia czułości metody. Wynikiem tych działań było przedstawienie nowej klasyfikacji oceny wymazów cytologicznych wg systemu The Bethesda System (TBS), którą następnie zmodyfikowano w 1992 i 2001 roku. (1) Aktualnie system TBS wykorzystuje się również w Polsce. Klasyfikacja TBS opiera się na ustaleniu diagnozy opisowej połączonej z oceną adekwatności materiału. System Bethesda zmodyfikowano pod kątem zgodności z nowymi technologiami i ustaleniami badawczymi. (1)

Zgodnie z TBS potencjalnie przednowotworowe zmiany nabłonka płaskiego można podzielić na trzy kategorie :

- I - atypowe komórki nabłonkowe ASC (atypical squamous cells)
- II - zmiany w komórkach nabłonka płaskiego małego stopnia LSIL (low squamous intraepithelial lesion)
- III - zmiany w komórkach nabłonka płaskiego dużego stopnia HSIL (high squamous intraepithelial lesion)

Kategoria ASC dzieli się na:

1. Zmiany w komórkach nabłonka o nieokreślonym znaczeniu ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance)
2. Zmiany, w których nie można wykluczyć zmian śródnabłonkowych dużego stopnia ASC-H (atypical squamous cells- cannot exclude HSIL).

W założeniu autorów systemu TBS, rozpoznanie cytologiczne LSIL powinno korelować z obecnością zmiany śródnabłonkowej niskiego stopnia CIN 1 oraz infekcją HPV, obserwowaną jako koilocytoza. Natomiast HSIL powinno sygnalizować duże prawdopodobieństwo obecności zmiany śródnabłonkowej dużego stopnia czyli CIN 2 i CIN 3 lub raka przedinwazyjnego (Tabela 3) (1)

Koilocyty są dużymi, wielobocznymi komórkami nabłonka wielowarstwowego płaskiego, z powiększonymi, nadbarwliwymi jądrami. Posiadają cytoplazmę z przejaśnieniem wokół jądra (tzw. „hallo”), które jest wykładnikiem martwicy tej części cytoplazmy, w następstwie działania wirusowego białka E4. Koilocyty najwcześniej pojawiają się w warstwie przypodstawnej nabłonka (ryc.2). W wyższych, bardziej powierzchniowych warstwach nabłonka obumierają i stają się z czasem niewidoczne. Koilocytoza nie występuje lub jest jedynie słabo wyrażona w zmianach nabłonka o typie HSIL, gdzie nie dochodzi do formowania kapsydu wirusa, różnicowania komórek i produkcji protein L1 i L2. Pomimo, że koilocyty można stwierdzić w około 2% wszystkich rozmazów cytologicznych, to wartość izolowanej koilocytozy dla wnioskowania o obecności zakażenia HPV jest ograniczona. (2)

W przypadkach zapaleń nieswoistych, zakażeń rzęsistkiem pochwowym mogą wystąpić podobne do koilocytów, tzw. pseudokoilocyty. Nieklasycznymi wykładnikami infekcji HPV w obrębie jądra keratynocyta są: nadbarwliwość, nierównomierna barwliwość chromatyny, powiększenie jądra komórkowego, wielojądrzastość i nieprawidłowe mitozy. W klasyfikacji TBS zaleca się formułowanie rozpoznawania cytologicznego LSIL wtedy, gdy koilocytozie towarzyszą opisane powyżej zmiany w jądrze komórki.

Formułowanie kolejnych rozpoznań cytologicznych wiąże się z analizą zmian w morfologii komórki nabłonka szyjki macicy związanej z postępowaniem procesu onkogenezy, wywołanej przetrwałym zakażeniem wirusowym. Jak już wspomniano uprzednio, omawiając definicję poszczególnych stopni śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy, zmiany komórkowe dotyczą przede wszystkim stosunku cytoplazmy do jądra komórkowego, barwliwości, kształtu i liczby jąder komórkowych a także atypowych figur podziału komórkowego. Rozpoznanie cytologiczne LSIL powinny korelować z obecnością CIN 1, a HSIL z CIN 2 lub CIN 3. Najmniej zrozumiałym dla klinicysty rozpoznaniem cytologicznym wg TBS jest ASC-US, oznaczający obecność atypowych komórek o nieokreślonym znaczeniu. Ten stopień oceny rozmazu cytologicznego oznacza konieczność podjęcia działań diagnostycznych, zmierzających do potwierdzenia lub wykluczenia obecności patologii szyjki macicy. Rozpoznanie cytologiczne ASC-US może wiązać się z faktycznym, rzeczywistym stanem przednowotworowym i/lub rakiem przedinwazyjnym, a także ryzykiem obecności raka inwazyjnego. Może też oznaczać istnienie tylko infekcji wirusowej, z koilocytozą komórkową lub wiązać się z całkowitym brakiem zmian patologicznych. W takiej sytuacji ASC-US jest rozpoznaniem cytologicznym fałszywie pozytywnym. Argumentem przemawiającym za sformułowaniem nowej klasyfikacji wg TBS i odejściem od klasyfikacji Papanicolaou był postęp wiedzy na temat powstawania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Odkrycie roli HPV HR w inicjacji karcinogenezy nabłonka wielowarstwowego płaskiego szyjki macicy

uczyniło klasyfikację Papanicolaou nieaktualną. Nie ma też prostej relacji między oboma systemami oceny rozmazów cytologicznych. Zestawienie TBS, mianownictwa patomorfologicznego i systemu Papanicolaou wskazuje na istnienie ścisłej analogii między rozpoznaniem histopatologicznymi, a poszczególnymi rozpoznaniem cytologicznymi wg TBS. Takiej ścisłej korelacji brakuje przy porównaniu z klasyfikacją Papanicolaou. Zarówno porównanie dokonane przez Majaka jak również Addisa, Hacha i Bereka pokazują niezgodności na poziomie rozpoznania ASC-US, któremu skala Papanicolaou przypisuje stopień II nie mający nic wspólnego z rozpoznaniem nieprawidłowości onkologicznych (Tabela 2, 3).

**Tabela 2. Porównanie różnych klasyfikacji zmian nabłonka szyjki macicy. (16)**

Klasyfikacja		Zmiany łagodne	Nieprawidłowości komórek nabłonkowych				
			I	II	III		IV
<b>Papanicolaou</b>							
<b>WHO</b>		—	—	dysplazja małego stopnia	dysplazja średniego stopnia	dysplazja dużego stopnia CIS	rak
<b>CIN</b>		—	—	CIN 1	CIN 2	CIN 3	
<b>Bethesda</b>		zmiany zapalne i odczynowe	ASC AGC	LSIL HPV	HSIL		inwazyjny



**Tabela 3. Porównanie systemów klasyfikacji cytologicznej i klasyfikacji patomorfologicznej zmian z odpowiednimi rozpoznaniem cytologicznymi (1)**

<b>System Bethesda</b>	<b>Dysplasia/CIN</b>	<b>Papanicolaou</b>
Wynik bez odchyień	Wynik prawidłowy	<b>I</b>
Infekcje (należy określić czynnik)	Odczyn zapalny	<b>II</b>
Zmiany odczynowe i naprawcze		
Nieprawidłowości w obrębie nabłonka płaskiego. Atypowe komórki nabłonka płaskiego ASC (1) o nieokreślonym znaczeniu (ASC-US)  (2) Nie można wykluczyć zmian dużego stopnia (ASC-H)	Atypia nabłonka płaskiego Atypia związana z infekcją HPV, - wykluczyć <b>LSIL</b> - wykluczyć <b>HSIL</b> Atypia związana z HPV	<b>II</b>
Zmiany śródnabłonkowe małego stopnia <b>LSIL</b>	Dysplazja małego stopnia <b>CIN 1</b>	<b>III</b>
Zmiany śródnabłonkowe dużego stopnia <b>HSIL</b>	Dysplazja średniego stopnia <b>CIN 2</b> Dysplazja dużego stopnia <b>CIN 3</b> Rak in situ	<b>III</b> <b>IV</b>
Rak płaskonabłonkowy	Rak płaskonabłonkowy	<b>V</b>

Dalszą poprawę trafności oceny cytologicznej przyniosło wynalezienie i szerokie zastosowanie w praktyce tzw. płynnej cytologii (LBC- Liquid Base Cytology). Metoda ta zmniejsza ilość błędów w pobieraniu i przygotowaniu materiału. Pobierany za pomocą szczoteczki materiał, płucze się w płynie utrwalającym, dzięki czemu od 80% do 90% komórek jest przenoszonych do roztworu płynnego, w porównaniu do 10%-20% komórek, które udaje się zwykle umieścić na szkiełku podstawowym w konwencjonalnym badaniu cytologicznym. Metoda LBC ponadto eliminuje ryzyko wysuszenia preparatu. Komórki pozyskiwane są z utrwalacza po przejściu płynu przez filtr, który zatrzymuje większe komórki śródnabłonkowe, odseparowując je od drobnych komórek krwi i komórek zapalnych, co zapewnia uzyskanie cienkiej warstwy materiału diagnostycznego na szkiełku podstawowym i ułatwia analizę cytologiczną. Metoda płynna ogranicza o 70-90% odsetek preparatów niediagnostycznych, czyli niepoddających się analizie. Płynna cytologia jest obecnie powszechnie wykonywaną technologią w większości laboratoriów USA. Technikę cienkowarstwowej cytologii i system ThinPrep 2000 uznano w USA za bardziej skuteczną w wykrywaniu zmian typu LG SIL w porównaniu do konwencjonalnych metod.

Nową technologią oceny wymazu cytologicznego jest AutoPap Screening System, zatwierdzony przez FDA Food and Drug Agency- Agencja Żywności i Leków w USA dla pierwszego oraz powtórnego badania rozmazów cytologicznych pierwotnie ocenionych jako prawidłowe. W metodzie tej stosuje się zautomatyzowany mikroskop wraz ze specjalnym aparatem cyfrowym. System skanuje obrazy utrwalonych i wybarwionych komórek, i wykorzystuje komputerowe techniki wizualne do analizy każdego pola widzenia. Następnie przy użyciu algorytmów komputerowych ocenia się każdy preparat pod kątem prawdopodobieństwa, czy próbka może zawierać nieprawidłowości natury onkologicznej. Wyselekcjonowane preparaty podlegają dalszej analizie cytotechnologa lub cytopatologa. Koncepcja ta ograniczyła liczbę wyników fałszywie negatywnych o 37%. (1). AutoPap

Screening System nie jest obecnie powszechnie używany. Skomputeryzowany sprzęt w dużym stopniu pomaga zidentyfikować potencjalnie nieprawidłowe komórki lub rozmazy, jednak nie ogranicza odsetka wymazów, które są nieprawidłowo przygotowane lub nie są reprezentatywne dla strefy przekształceń szyjki macicy. Niezgodności te są obecnie podstawowym źródłem błędnego odczytu zmuszającym cytologa do zlecenia powtórnego pobrania wymazu. Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) w USA wprowadziło zasadę ponownej oceny 10 % wszystkich negatywnych wyników cytologicznych. Wynika to z tezy, że fałszywie negatywne wyniki są skutkiem ludzkiego błędu lub zmęczenia cytodiagnosty. (1)

W ostatnich latach coraz więcej laboratoriów wykorzystuje technikę AutoPap do wtórnej oceny wszystkich preparatów negatywnych.

#### **1.4.2.2. KOLPOSKOPIA**

Kolposkopia jest konkurencyjną do cytodiagnostyki metodą wykrywania śródanbłonkowej neoplazji szyjki macicy. Ponadto kolposkopia jest stosowana w skriningu jako podstawowy element tzw. etapu pogłębionego, czyli wykrywania patologii u kobiet z nieprawidłowym wynikiem badania cytologicznego takim jak ASC-US, ASC-H, LSIL, HSIL, AGC, rak.

Kolposkopia posiada wyższą czułość niż cytodiagnostyka w wykrywaniu subklinicznych zakażeń HPV i patologii szyjki macicy.

Doświadczony kolposkopista, dysponujący wysokiej jakości sprzętem diagnostycznym wykonując kolposkopię powinien potwierdzić lub wykluczyć obecność patologii szyjki macicy. W sytuacji stwierdzenia zmian, podstawowym zadaniem kolposkopii jest wybór miejsca najbardziej podejrzanego w celu wykonania biopsji. Warunkiem wiarygodności badania kolposkopowego są satysfakcjonujące warunki badania, czyli uwidocznienie całej strefy przekształceń, jaką tworzy zetknięcie nabłonka wielowarstwowego płaskiego tarczy części pochwowej szyjki macicy z nabłonkiem gruczołowym kanału. Za pomocą diagnostyki kolposkopowej można wykrywać nie tylko patologię szyjki macicy ale również formułować podejrzenia rozwoju zakażenia wirusowego. Pomocnym elementem badania kolposkopowego pozwalającym na identyfikację zmienionych obszarów błony śluzowej jest próba z kwasem octowym i płynem Lugola. Aplikacja 3%-5% roztworu kwasu octowego powoduje w miejscach zmienionych spadek przejrzystości nabłonka i/lub jego zbielenie. Od intensywności zbielenia zależy określenie stopnia zaawansowania hipotetycznego stanu przedrakowego. Kwas octowy powoduje odwracalną denaturację białek we wnętrzu komórki zakażonej wirusem brodawczaka ludzkiego. Drugim, bardzo pomocnym testem diagnostycznym używanym do lokalizacji tworzącej się neoplazji jest próba z płynem Lugola, zwana też próbą Schillera lub jodową. Aplikacja płynu Lugola powoduje jednolite brązowe zabarwienie

prawidłowego nabłonka. Miejsca zmienione poprzez tworzącą się śródnabłonkową neoplazję lub patologię wyższego stopnia pozostają niezabarwione.

Tabela 4 przedstawia podstawy różnicowania w obrazie kolposkopowym cech charakterystycznych dla subklinicznego zakażenia HPV i śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Do podstawowych elementów różnicujących oba stany patologiczne nabłonka szyjki macicy należą, charakterystyczne dla CIN 1 cechy obszaru kolposkopowego:

1. wtórne zbielenie nabłonka,
2. wtórna mozaika prosta,
3. niewielkiego stopnia zbielenie nabłonka,

oraz charakterystyczne dla subklinicznego zakażenia HPV cechy obrazu kolposkopowego :

1. musztardowy kolor nabłonka po próbie jodowej,
2. kolce metaplastycznego nabłonka,
3. wtórne zmniejszenie przejrzystości nabłonka po aplikacji kwasu octowego.

Swoistość kolposkopii w formułowaniu podejrzenia zakażenia HPV jest mniejsza niż cytologii. Niekiedy trudno jest odróżnić zakażenie HPV od zmian CIN niskiego stopnia.

Do wad kolposkopii należy zaliczyć fakt, że jest badaniem subiektywnym, niewystandaryzowanym, wymaga dużego doświadczenia badającego.

**Tabela 4. Omówienie czynników różnicujących subkliniczne zakażenie HPV od śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. (10)**

<b>Czynniki różnicujące subkliniczne zakażenie HPV od śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy</b>	<b>Subkliniczne zakażenie HPV</b>	<b>Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy</b>
Ocena makroskopowa/ kolposkopowa	Prawidłowy nabłonek	Odchylenia w obrazie kolposkopowym typowe dla CIN 1
Próba z kwasem octowym	Utrata przejrzystości nabłonka, nieznaczne zbielenie, krótko utrzymujące się	Zmiana przybiera barwę białą-szarą i mętnieje na kilka minut
Ocena granicy zmiany	Granica rozmyta, nieostra, liczne ogniska satelitarne, zmiana wieloogniskowa	Granica wyraźnie ostra
Powierzchnia	Brodawkowata, szorstka, lśniąca	Brodawkowata, zwykle wysklepiona ponad powierzchnię prawidłowego nabłonka
Naczynia	Proste o jednakowej średnicy, przebiegające prostopadle do powierzchni	Poszerzona średnica naczyń

### **1.4.2.3. TESTY WYKRYWAJĄCE HPV HR.**

Wykazano, że test DNA HR HPV w porównaniu do 3-krotnie wykonanego wymazu cytologicznego w odstępie 2-6 miesięcy ma większą czułość i podobną swoistość w wykrywaniu zmian typu CIN 2+. Szacuje się, że tylko dwukrotne testowanie DNA HR HPV w ciągu całego życia cechuje się większą czułością i swoistością w wykrywaniu CIN w porównaniu do systematycznej cytodiagnostyki realizowanej w ramach programu profilaktyki. (5) Certyfikowany test identyfikujący DNA HPV HR jest powtarzalny, obiektywny oraz ma najwyższą wartość prognostyczną u kobiet z nieprawidłowym wynikiem cytologii. Diagnostyka molekularna DNA HPV HR jest jednak jest mało swoista u młodych kobiet przed 30 rokiem życia, u których zakażenie wirusowe ma głównie charakter incydentalny, a jego wykrycie nie ma dużego znaczenia klinicznego. (27)

Pomimo dalszego rozwoju cytodiagnostyki jaki wciąż dokonuje się w obecnych czasach, w żadnej modyfikacji tej techniki, nawet przy wykorzystaniu płynnego podłoża w LBC nie uzyskano 100% czułości metody do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji. Podobnie jak w cytodiagnostyce, również rozwój kolposkopii wraz z próbami jej pełnej automatyzacji (optoelektronika, fotodynamika) nie doprowadził do precyzyjnego wykrywania śródnabłonkowej neoplazji u wszystkich chorych kobiet. Prace nad rolą wirusa brodawczaka ludzkiego w inicjacji karcinogenezy szyjki macicy nasunęły również myśl o wykorzystaniu technik molekularnych do wykrywania nie tylko samego zakażenia, ale również związanej z jego obecnością patologii. Wykorzystywane obecnie testy identyfikują od 37 do ponad 60 typów wirusa. Czułość techniki oznaczania DNA HPV i mRNA HPV w powiązaniu z cytodiagnostyką w wykrywaniu patologii szyjki macicy sięga 99%. Do osiągnięcia 100% czułości brakuje testów wirusowych wykrywających rzadko spotykane typy HPV, które sporadycznie, aczkolwiek skutecznie mogą inicjować powstanie patologii szyjki macicy.

Problemem diagnostycznym testów opartych o oznaczanie DNA HPV HR jest stosunkowo niska swoistość badań, nie przekraczająca 60%-70% (Tabela 5).

**Tabela 5. Porównanie 3 metod wykrywania CIN: cytodiagnostyki, kolposkopii, testu identyfikującego DNA HR HPV. (30)**

TEST	CZUŁOŚĆ	SWOISTOŚĆ	WYNIKI	WYNIKI
			FAŁSZYWIE POZYTYWNE	FAŁSZYWIE NEGATYWNE
cytodiagnostyka	30 – 89 %	91 %	9 %	11 – 70 %
kolposkopia	60 – 90 %	48 – 63 %	37 – 52 %	10 – 40 %
test HR DNA HPV	99 %	60 – 70 %	30 – 40 %	1 %

Jak już wspomniano powyżej jest to związane z faktem, że szczególnie u młodych kobiet identyfikacja poszczególnych typów DNA HPV nie musi zawsze oznaczać zakażenia wirusowego o charakterze przewlekłym czy patologii.

U większości młodych kobiet poniżej 35 roku życia pozytywny wynik testu wirusowego łączy się głównie z zakażeniem incydentalnym. Poniżej, w podsumowaniu umieszczono podstawowe zalety i wady trzech obecnie stosowanych metod diagnostycznych, mających za zadanie wykrycie patologii szyjki macicy:

Cytodiagnostyka ocenia morfologię złuszczonych komórek ;

- pośrednio może informować o rodzaju neoplazji,
- nie informuje o obecności onkogenego typu DNA HPV HR,
- nie informuje o lokalizacji i zaawansowaniu zmiany.

Kolposkopia ocenia architekturę nabłonka ;



- informuje o lokalizacji zmiany,
- nie informuje o obecności onkogenego typu DNA HPV,
- pośrednio wskazuje na możliwość zakażenia wirusowego,
- nie informuje o zaawansowaniu neoplazji.

Test DNA HR HPV identyfikuje obecność DNA poszczególnych onkogennych typów HPV ;

- nie informuje o obecności i zaawansowaniu neoplazji,
- nie informuje o czasie trwania i rodzaju zakażenia,
- nie informuje o lokalizacji zmiany. (27)

## 1.5. BADANIA PRZESIEWOWE

W roku 1957 Amerykańska Komisja d. s. Chorób Przewlekłych zdefiniowała badania przesiewowe jako „opartą na przypuszczeniach identyfikację nierozpoznanej choroby lub wady za pomocą testów, badań lub innych zabiegów, które mogą być szybko przeprowadzone”. (2) Badania te są zalecane dla osób potencjalnie zdrowych, u których pozwalają na wczesne wykrycie i leczenie choroby, czego skutkiem jest zmniejszenie śmiertelności w populacji. Badanie przesiewowe nie diagnozuje choroby, a wskazuje tylko na możliwość jej istnienia lub rozwoju. (18) Diagnostyka tego rodzaju prowadzona jest na dużą skalę, aby odróżnić osoby zdrowe od chorych lub mogących zachorować. Badania przesiewowe nie mają na celu precyzyjnej diagnostyki klinicznej. Zwykle są znacznie łatwiejsze i tańsze do wykonania w porównaniu ze skomplikowanymi badaniami rozpoznawczymi. Ich wyniki wymagają jednak weryfikacji i potwierdzenia klinicznego metodą rozpoznawczą. Istotne w badaniach przesiewowych jest ograniczenie do minimum liczby kobiet kierowanych do dalszej kosztownej diagnostyki, bez istotnego zmniejszenia czułości metody wykrywczącej (1).

Według WHO badanie przesiewowe przynosi korzyści ekonomiczne i społeczne, gdy :

- choroba jest ważnym problemem w populacji i często występuje,
- można ją wykryć oraz skutecznie leczyć w stadium przedklinicznym, przedrakowym,
- istnieje test o dużej czułości i swoistości wykrywający stadia przedkliniczne, przedrakowe,
- użycie testu jest akceptowane przez badającego i badanego,
- test jest nieinwazyjny i tani. (2), (18), (31)

Efektywność testu mierzona jest przez jego:

- czułość: zdolność do potwierdzenia choroby ,
- swoistość: zdolność do identyfikacji braku choroby,

- dodatnią wartość predykcyjną (PPV): proporcją osób z pozytywnym wynikiem testu, które rzeczywiście są chore,
- ujemną wartość predykcyjną (NPV): proporcją osób z negatywnym wynikiem testu, które rzeczywiście są zdrowe.

Konsekwencje wyników fałszywie dodatnich są następujące:

- dalsza zbędna diagnostyka,
- niepotrzebne koszty i czasochłonność wykonania procedur medycznych,
- czasowe obniżenie jakości życia osób z fałszywie pozytywną diagnozą, połączone z utratą zaufania tychże osób do udziału w profilaktyce.

Konsekwencją wyników fałszywie ujemnych może być:

- fałszywe poczucie bezpieczeństwa,
- większe prawdopodobieństwo niezgłoszenia się do kolejnego testu przesiewowego. (18)

Rak szyjki macicy spełnia kryteria WHO w zakresie łatwego wykrywania, rozpoznawania oraz leczenia stanów przedrakowych. Jest unikalnym nowotworem do przeprowadzenia badań przesiewowych ponieważ :

- rak występuje stosunkowo często,
- szyjka macicy jest łatwo dostępna badaniom,
- dobrze opisano stany przedrakowe,
- stany przedrakowe można stosunkowo łatwo leczyć, (18)
- terapia stanów przedrakowych nie wymaga dużych nakładów finansowych.

W USA badania przesiewowe zaleca się przeprowadzać po raz pierwszy u kobiet w wieku 21 lat i kontynuować co 3 lata, jeśli uzyskane wyniki nie wykazały niepokojących zmian. Profilaktykę cytologiczną można zakończyć w wieku 65 – 70 lat, w zależności od stanu zdrowia oraz gdy testy przeprowadzone w ciągu ostatnich 5-10 lat wykluczyły obecność patologii. (2)

W Polsce zaleca się rozpoczęcie badań przesiewowych maksymalnie 3 lata po rozpoczęciu współżycia i nie później niż w 21 roku życia. Wyjątek stanowią osoby HIV pozytywne, kobiety ze schorzeniami i upośledzeniami w funkcjonowaniu układu immunologicznego oraz nastolatki molestowane w okresie dojrzewania, u których należy rozpocząć badania przesiewowe w momencie ustalenia tych faktów lub podjęcia aktywności płciowej. Ogólnopolski program profilaktyki raka szyjki macicy dotyczy kobiet od 25 roku życia. Przyjmuje się, że wcześniejsze rozpoczęcie badań przesiewowych doprowadziłoby do zbędnych interwencji diagnostyczno-terapeutycznych u młodych kobiet. Badania cytologiczne w ramach profilaktyki zaleca się zakończyć u kobiet 70 -letnich z udokumentowanymi trzema lub więcej kolejnymi prawidłowymi wynikami cytologicznymi, które nie miały nieprawidłowej cytologii w ciągu ostatnich 10 lat, nie chorowały na CIN lub raka szyjki macicy, nie są HIV dodatnie, nie stosują leczenia immunosupresyjnego, a w dzieciństwie nie były narażone na działanie dietylostilbestrolu (DES). W polskim Populacyjnym Programie Profilaktyki i Wczesnego Wykrywania Raka Szyjki Macicy badania przesiewowe prowadzone są do 59 roku życia. Jako uzasadnienie zakończenia programu przed sześćdziesiątym rokiem życia podaje się, że ryzyko rozwoju raka u kobiet ponad pięćdziesięcioletnich, które uczestniczyły w badaniach przesiewowych jest bardzo niskie. (18), (29)

U kobiet, które przebyły operację usunięcia macicy z powodu raka szyjki macicy okresowe, częstsze niż co 3 lata, badania cytologiczne powinny być prowadzone do końca życia, a po operacji z powodu CIN przez okres 10 lat. (18), (29)

U kobiet po usunięciu macicy z szyjką z innych powodów, badania przesiewowe w kierunku raka szyjki macicy nie są rekomendowane.

W wielu krajach obowiązują zasady, iż w pierwszych latach badań przesiewowych zalecane jest pobieranie wymazów konwencjonalnych raz w roku, lub raz na 2 lata gdy stosuje się cytologię na podłożu płynnym (LBC). (18)

Dla kobiet 30 letnich lub starszych zaleca się wykonanie badania cytologicznego co 2-3 lata, jeśli 3 poprzednie wyniki były prawidłowe, kobieta nie jest HIV pozytywna, nie była narażona na DES i nie jest poddana immunosupresji. (18), (29)

Kobiety zakażone HIV, przyjmujące leki immunosupresyjne, zakażone HPV wysokiego ryzyka, wymagają kontroli co 12 miesięcy. (18), (29)

Jak już wspomniano powyżej nie ma idealnych, na dzień dzisiejszy, testów do badań przesiewowych. Zarówno badania cytologiczne jak i oznaczanie DNA HPV HR mają swoje wady i zalety. Analizując przydatność cytodiagnostyki i testów molekularnych identyfikujących DNA HPV HR dla potrzeb badań skriningowych należy stwierdzić, że:

- Badanie cytologiczne jest badaniem subiektywnym i musi być powtarzane w regularnych odstępach czasu, aby zwiększyć niską czułość tego badania. Ponadto wymaga rozbudowanego organizacyjnie zaplecza. Posiada różną czułość i swoistość w poszczególnych ośrodkach.

Wskaźnik wyników fałszywie ujemnych dla CIN i raków wynosi około 30%, z tego dla raka płaskonabłonkowego około 3,3%, dla zmian HG SIL 4,6%, dla gruczolakoraka około 8.9 %, dla gruczolakoraka in situ 11,75%. (18)

Zaletą cytodiagnostyki jest jej niski koszt i dostępność. Może być wykonywana w każdym gabinecie ginekologicznym.

- Test polegający na oznaczeniu DNA HR HPV w porównaniu do badania cytologicznego ma znacznie wyższą czułość i wysoką negatywną wartość predykcyjną. Swoistość testu wzrasta wraz z wiekiem kobiety ale jest niezadawalająca szczególnie u młodych kobiet. (27 )

U około 4% kobiet w wieku 30-60 lat z prawidłowym wynikiem wymazu cytologicznego stwierdza się obecność DNA HR HPV. Szacuje się, że u około 8-10% z nich rozwinię się w ciągu 4 lat CIN 3. (5)

Badanie ASCUS/LSIL Triage Study wykazało, że pojedyncze oznaczenie wysokoonkogennych typów wirusów HPV pozwala wykryć nieprawidłowości wcześniej i z większą czułością niż cytodiagnostyka oraz pozwala uniknąć wykonania niepotrzebnej kolposkopii u około 50 % pacjentek z ASC-US. (5), (12)

Czułość cytodiagnostyki użytej do wykrycia śródnabłonkowej neoplazji w populacyjnych badaniach przesiewowych nie przekracza 75% w najlepszych światowych ośrodkach diagnostycznych. Dla kobiet korzystających nieregularnie, lub sporadycznie z badań cytologicznych znaczny odsetek wyników fałszywie negatywnych jest największym zagrożeniem. Nieprawidłowe wyniki przesiewowego badania cytologicznego w Polsce są rejestrowane w Systemie Informatycznym Monitorowania Profilaktyki Populacyjnego Programu Profilaktyki i Wczesnego Wykrywania Raka Szyjki Macicy. Ich weryfikacja następuje częściowo w ramach świadczeń NFZ, a częściowo w praktykach prywatnych. W związku z tym baza danych programu SIMP nie daje pełnej odpowiedzi na pytanie ile nieprawidłowych wyników badań cytologicznych wykonanych w ramach przesiewu cytologicznego zostaje zweryfikowanych w etapie pogłębionym. Krajowy Rejestr Nowotworów w Polsce również nie gromadzi informacji o stwierdzanych stanach przedrakowych raka szyjki macicy. Skutkiem tego brak jest wyczerpujących danych o liczbie przypadków i stopniach zaawansowania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy wykrywanych w ramach populacyjnego skringingu. (6), (29)

Niewątpliwie brane pod uwagę w ramach niektórych narodowych programów skringingowych połączenie cytodiagnostyki i oznaczeń DNA HR HPV zwiększa czułość oraz specyficzność badań przesiewowych i pozwala wydłużyć odstępy między poszczególnymi

wymazami. W grupie kobiet poniżej 30 roku życia ze względu na dużą liczbę zakażeń przemijających prowadzenie skriningu przy pomocy wyłącznie oznaczeń DNA HR HPV nie jest zalecane. U kobiet po 35 roku życia specyficzność oznaczeń DNA HR HPV koreluje z cytodiagnostyką. (3), (5)

Analizując rachunek kosztów Goldie i współpracownicy wykazali, że u kobiet 30-letnich i starszych wykorzystanie oznaczeń DNA HPV HR łącznie z cytodiagnostyką powoduje zwiększenie czułości wykrywania patologii co skutkuje zmniejszeniem zachorowalności na raka szyjki macicy i jest bardziej opłacalne ekonomicznie niż prowadzenie skriningu przy pomocy konwencjonalnej cytodiagnostyki. Efekt ten udaje się osiągnąć zarówno przy wykorzystaniu oznaczeń DNA HR HPV do weryfikacji niejednoznacznych wyników cytologii, jak i w połączonym badaniu przesiewowym przy wydłużonych odstępach czasowych poszczególnych kontroli. (13).

Rutynowe postępowanie po leczeniu CIN 3 obejmuje wykonanie wymazu cytologicznego w odstępach co kilka miesięcy przez okres do 2 lat. Ponieważ negatywna wartość predykcyjna testu DNA HR HPV w wykrywaniu choroby przetrwałej jest wyższa niż cytodiagnostyki, oznaczenie DNA HPV HR u kobiet po leczeniu CIN pozwala w przypadku wyniku negatywnego na zmniejszenie liczby wizyt kontrolnych, uniknięcie zbędnej diagnostyki pogłębionej i zaoszczędzenie środków finansowych. (5)

Uwzględniając rachunek ekonomiczny oznaczanie DNA HR HPV jest szczególnie uzasadnione w przypadku:

- rozpoznania cytologicznego ASC- US,
- u kobiet w wieku 30 lat i więcej jako badanie przesiewowe konkurujące z cytodiagnostyką,
- do monitorowania kobiet po leczeniu CIN. (5)

Nawet jednokrotne wykonanie w życiu kobiety testu DNA HR HPV może znacząco zmniejszyć ryzyko zgonu z powodu raka szyjki macicy, jeśli skutkiem nieprawidłowego wyniku będzie podjęte właściwe postępowanie diagnostyczne.(18) Pozytywny test na DNA HPV HR, wykonany dwukrotnie co 12 miesięcy, identyfikuje kobiety z przewlekłym zakażeniem wirusowym zagrożone rozwojem nowotworu w ciągu 3-10 lat. Przy ujemnym wyniku testu na obecność DNA HR HPV, wymaz cytologiczny powinien być powtórzony dopiero za 2-5 lat.

Jak już wspomniano powyżej dla poprawy skuteczności profilaktyki i obniżenia jej kosztów zasadne jest typowanie DNA HR HPV wysokiego ryzyka w kombinacji z cytodiagnostyką u kobiet 30- letnich i starszych. Sugeruje się, że szczególnie duże znaczenie ma oznaczenie DNA HR HPV przy weryfikacji wyników ASC-US. Natomiast stosowanie u kobiet po trzydziestym roku życia kombinowanych badań przesiewowych: cytologia + test DNA HR HPV– prowadzi do redukcji zachorowań na raka inwazyjnego i jest mniej kosztowne niż wymaz cytologiczny wykonywany co roku przez 30 lat. Wydaje się, że w przypadku wyniku ASC-US wykonanie testu DNA HR HPV ma większą czułość i swoistość w wykrywaniu CIN 2 i CIN 3 niż 3-krotne wykonanie wymazu cytologicznego. Dla zmian ASC-US opisana czułość cytodiagnostyki wynosi 81,8% a swoistość 57,6%, natomiast czułość testu na obecność DNA HPV HR wynosi 94,8%, a swoistość 67,3% . (27)

W chwili obecnej badania przesiewowe w kierunku raka szyjki macicy polegają głównie na ocenie cytologicznej komórek nabłonka szyjki macicy. W przyszłości powinny obejmować też detekcję DNA i/lub mRNA HPV typów wysokiego ryzyka. Szacuje się, że ponad 90% raków szyjki macicy powstaje w strefie transformacji szyjki macicy, której komórki są najczęściej kolonizowane przez zakażenie wirusowe.

Nowoczesny model skriningu cytologicznego zakłada wykonanie testu podwójnego, czyli wymazu cytologicznego i badania molekularnego na obecność DNA HR HPV. Celem tego



jest identyfikacja kobiet z obecną lub tworzącą się neoplazją. Postępowanie takie, akceptowane zarówno przez ASCCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology- Amerykańskie Towarzystwo Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy), jak i ACOG (American College of Obstetricians and Gynecologists- Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów) wg wstępnych wyników badań pozwala osiągnąć blisko 100% czułości w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. (14) Według rekomendacji opracowanych przez NCI/ASCCP oparcie przesiewu raka szyjki macicy na wykonaniu badania cytologicznego i DNA HPV HR (13 lub 14 typów wysokoonkogennych) u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym co najmniej  $\leq$  ASC-US prowadzi do 3 możliwych scenariuszy algorytmów diagnostycznych:

algorytm pierwszy:

ASC-US i DNA HPV HR ujemny  $\rightarrow$  powtórny wymaz cytologiczny i test na DNA HPV HR za 6-12 miesięcy .

algorytm drugi :

ASC-US i DNA HPV HR dodatni  $\rightarrow$  kolposkopia z biopsją.

algorytm trzeci :

rozpoznanie cytologiczne  $>$  ASC-US i DNA HPV HR dodatni / ujemny  $\rightarrow$  kolposkopia z biopsją. (14)

Bardzo istotne jest stwierdzenie, że ujemny wynik testu DNA HPV HR przy prawidłowym wyniku oceny wymazu cytologicznego cechuje 99-99,9% ujemna wartość predykcyjna; natomiast dodatni wynik DNA HPV HR przy prawidłowym wyniku cytologicznym zobowiązuje do powtórzenia obu badań za 6-12 miesięcy. (14)

Skrining cytologiczny, którego celem jest rozpoznawanie stanów przedrakowych i patologii prowadzących do tych stanów , można prowadzić za pomocą pobierania wymazów cytologicznych uzupełnionych molekularnym oznaczaniem HPV typów wysokiego

ryzyka, badaniami kolposkopowymi lub innymi oznaczeniami biochemicznymi, np.: białka supresorowego świadczącego pośrednio o obecności wirusa w komórce -p16INK4a. (15)

### **1.5.1. TYPOWANIE HPV HR - METODA POPRAWIAJĄCA EFEKTYWNOŚĆ PROFILAKTYKI.**

Możliwość pośredniego wykrycia zakażenia HPV w cytodiagnostyce ograniczona jest do zmian jawnych klinicznych i subklinicznych. Badaniem cytologicznym nie można w ogóle wykryć infekcji utajonych, bo te nie powodują zmian makro- i mikroskopowych. Cytodiagnostyka nawet identyfikująca objawy infekcji wirusowej w obrazie morfologicznym komórek nie różnicuje typu zakażeń wywołanych przez typy HPV wysokiego ryzyka onkogennego od zakażeń typami niskiego ryzyka onkogennego powodującymi łagodne zmiany śródnabłonkowe.

Zakażenia typami HPV niskiego ryzyka (głównie 6 i 11) odpowiadają za około 25% zmian typu CIN 1 obserwowanych na szyjce macicy. Wszystkie typy HPV HR odpowiadają za pozostałe 75% rozpoznań CIN 1, a typy 16 i 18 stanowią razem 25% tych zmian. (14)

Genotypowanie, czyli identyfikowanie metodami molekularnymi poszczególnych typów wirusa HPV HR umożliwia :

- wczesną identyfikację zwiększonego ryzyka rozwoju patologii ,
- ocenę ryzyka i dynamiki progresji,
- korygowanie fałszywie ujemnych rozpoznań cytologicznych ,
- wczesne podjęcie leczenia rozpoznanych zmian, ponieważ typy HPV 16 i 18 odpowiadają za rozwój 70% raków szyjki macicy.

U kobiet z rozpoznaniem ASC-US i LG SIL oznaczanie transkryptów E6 i E7 jako czynnika sprzyjającego progresji CIN do raka jest bardziej opłacalne ekonomicznie niż

oznaczanie DNA HPV HR. (5) W przypadku stwierdzenia mRNA E6 i E7 ryzyko rozwoju CIN 2 i 3 w okresie 2 najbliższych lat jest 69,8 razy większe w porównaniu do populacji kobiet z prawidłowym wynikiem wymazu cytologicznego. Obecność DNA HR HPV podnosi ryzyko rozwoju CIN tylko 5,7 razy (5). Na podstawie obecnej wiedzy wydaje się, że oznaczenie transkryptów E6 i E7 jest obiecującą perspektywą diagnostyczną w profilaktyce raka szyjki macicy szczególnie w ocenie ryzyka progresji zmian śród nabłonkowych.

Według badań Khana, Loricza i współpracowników ryzyko rozwoju zakażenia przetrwałego i CIN 3 u kobiet z prawidłowym wynikiem wymazu cytologicznego jest najwyższe dla zakażeń wywołanych przez HPV 16, 18 i wynosi 20% w ciągu 10 lat (12). W sytuacji infekcji wywołanej wirusami innymi niż typ 16 i 18 i przy prawidłowym wyniku rozmazu cytologicznego ryzyko rozwoju CIN 3 określa się na 1% do 2% w ciągu 10 lat.

Dane opublikowane w raporcie WHO dotyczące rozpowszechnienia infekcji HPV na świecie uzasadniają genotypowanie typów wirusa brodawczaka ludzkiego u kobiet z prawidłowym wynikiem oceny wymazu cytologicznego .

Dla regionu Europy Środkowo – Wschodniej u kobiet z prawidłowym wynikiem wymazu cytologicznego najczęściej wykrywa się infekcje HPV 16, 31, 18, 66. Ta sama analiza podaje, że u kobiet z istniejącą patologią szyjki macicy typy HPV prowadzące do CIN i raka w Europie Środkowo – Wschodniej to 16, 18, 45, 31. Na tej podstawie można powiedzieć, że wykrycie obecności DNA HPV 16, 18, 45, 31 u kobiet z prawidłowym wynikiem wymazu cytologicznego mieszkających w Polsce jest podstawą do kwalifikacji tych kobiet do grupy najwyższego ryzyka rozwoju przetrwałego zakażenia wirusowego prowadzącego do CIN i raka szyjki macicy. (9)

## **2. CELE PRACY**

1. Ocena rozpowszechnienia DNA HPV HR u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.
2. Ocena korelacji pomiędzy występowaniem zmian typu HG SIL, a obecnością DNA HPV HR u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.
3. Ocena korelacji pomiędzy występowaniem zmian typu LG SIL, a obecnością DNA HPV HR u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US .
4. Znaczenie prognostyczne rozpoznania LG SIL u kobiet z wynikiem oceny wymazu cytologicznego ASC-US, DNA HPV HR negatywnych.

### **3. MATERIAŁ**

Badania wykonano u 218 kobiet, w tym 188 pacjentek Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy (PPSM) Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (GPSK UM), ul. Polna 33 oraz 30 pacjentek oddziału położniczo-ginekologicznego Samodzielnego Publicznego Zakładu Opieki Zdrowotnej w Kościanie (SP ZOZ w Kościanie) z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US, skierowanych w latach 2006-2009 do Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy celem przeprowadzenia diagnostyki pogłębionej polegającej na :

- standardowym badaniu kolposkopowym,
- biopsji miejsc podejrzanych identyfikowanych w trakcie kolposkopii w warunkach satysfakcjonujących (widoczna cała granica nabłonków gruczołowego i wielowarstwowego płaskiego oraz uwidoczniono całą nieprawidłową zmianę),
- biopsji miejsc najbardziej podejrzanych czterech kwadrantów egzocervix przy niesatysfakcjonujących warunkach badania,
- pobraniu wyskrobin z kanału szyjki macicy,
- pobraniu wymazu komórkowego na test DNA HPV HR.

## 4. METODA

### 4.1. OGÓLNE ZASADY PRZYJĘTE W REALIZOWANYCH BADANIACH

- Oceniane preparaty pobrane zostały w ramach prowadzenia programu profilaktyki raka szyjki macicy za pomocą szczoteczki cyto-brush na szkiełko podstawowe.
- Wymazy cytologiczne utrwalone cytofixem barwiono automatycznie w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy metodą Papanicolaou.
- Ocena wymazów dokonywana była wg standardów obowiązujących w Unii Europejskiej oraz zatwierdzonych przez ASCCP (Amerykańskie Towarzystwo Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy).
- Kolposkopię wykonywano za pomocą aparatu Olympus OCS 500.
- Obrazy kolposkopowe oceniano wg skali Reida.
- Kolpogramy archiwizowano w programie IRIS.
- Testy molekularne na obecność DNA HPV HR wykonywano za pomocą techniki AMPLICOR (Roche Diagnostics).
- Na potrzeby przeprowadzonych badań przyjęto następujące standardy postępowania u pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym LG SIL, DNA HPV HR (-) :
  - czas trwania obserwacji - 12 miesięcy,
  - co 3 miesiące wymaz cytologiczny,
  - co 6 miesięcy – kolposkopia z oceną kolpogramu wg skali Reida,
  - co 6 miesięcy – test molekularny na obecność DNA HPV HR .

## 4.2. CYTODIAGNOSTYKA

Wymazy do badań cytologicznych pobierano z tarczy i ujścia zewnętrznego szyjki macicy szczoteczką typu cervex-brush w sposób konwencjonalny na szkiełko podstawowe i utrwalano preparatem Cytifix –aerazol (skład: alkohol metylowy, butan, propan, izobutan, PVP/VA kopolimer). Drugą szczoteczką w ten sam sposób pobierano wymaz z szyjki macicy i przenoszono na podłoże płynne w celu oznaczenia DNA HPV HR; szczoteczkę opłukiwano w preparacie Thin Prep Preserv Cyt Solution na bazie metanolu; przechowywano w chłodziarce, w temperaturze +3°C do czasu przekazania do Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy Szpitala Klinicznego Położniczo-Ginekologicznego UM w Poznaniu.

Preparaty barwione były metodą Papanicolaou za pomocą automatu do barwienia firmy Shandon UK A 78010402, z użyciem hematoksyliny Mayera, Orange G, eozyny, EA 36, alkoholu etylowego 96% .

Preparaty cytologiczne w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu oceniane były w skali The Bethesda System. Oceny dokonywał zespół doświadczonych cytotechników co najmniej 10-letnim stażem pracy. Zasady pracy zespołu były dostosowane do standardów obowiązujących w Unii Europejskiej i USA :

- cytotechnik- ocenia standardowo 100 rozmazów cytologicznych na dzień,
- starszy cytotechnik– ocenia wyrywkowo 10% wyników ujemnych i wszystkie wymazy nieprawidłowe  $\geq$  ASC-US
- patomorfolog – ocenia wtórnie i konsultuje wszystkie wyniki dodatnie.

### **4.3. DIAGNOSTYKA ETAPU POGŁĘBIONEGO - KOLPOSKOPIA**

Wycinki i wyskrobiny do badań histopatologicznych utrwalane były w 10% formalinie i oceniane w Pracowni Patomorfologicznej Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu po uprzednim skrojeniu na skrawki cienkobarstwowe i wybarwieniu hematoxyliną i eozyną (H+E).

Obrazy kolposkopowe oceniano wg skali Reida. Skala Reida zwana jest też wskaźnikiem kolposkopowym Reida. Jest to punktowa klasyfikacja kolposkopowa, która służy obiektywizacji oceny kolpogramów. Poszczególnym cechom obrazu kolposkopowego przypisuje się wartość punktową od 0 do 2 punktów, gdzie ocenie podlegają kolor zmiany, granice zmiany, obecność naczyń krwionośnych i próba jodowa. (Tabela 6)



**Tabela 6. Skala Reida**

<b>Cecha kolposkopowa</b>	<b>0 pkt</b>	<b>1 pkt</b>	<b>2 pkt</b>
<b>Kolor</b>	Delikatne zbielenie, półprzezroczyste, zbielenie poza granicą strefy przekształceń, śnieżno białawe zbielenie z połyskującą powierzchnią.	Pośrednie zbielenie, świecące, szaro-biały odcień.	Intensywne, perłowe zbielenie
<b>Granica zmiany, ukształtowanie powierzchni</b>	Postrzępione granice zmiany, cieniutkie ograniczenie od otoczenia, granice „geograficzne”. Zmiany satelitarne dobrze ograniczone do nowej granicy międzynabłonkowej. Powierzchnia brodawkowata i kłykcinowata.	Zmiany o regularnych kształtach, ostro ograniczone od otoczenia.	Zwinięte, złączające się brzegi zmiany o zróżnicowanym stopniu zbielenia.
<b>Naczynia krwionośne</b>	Delikatne punkcikowanie i mozaika.	Brak naczyń po próbie z kwasem octowym.	Grube punkcikowanie i mozaika.
<b>Próba jodowa</b>	Dodatnie zabarwienie, obszar jodonegatywny, który otrzymał 3 lub mniej punktów charakteryzujących trzy pierwsze cechy.	Częściowy wychwyt jodu, obszar cętkowany.	Obszary jodonegatywne, obszar jodonegatywny, który otrzymał 4 lub więcej punktów charakteryzujących 3 pierwsze cechy.

Punktację kolposkopową interpretowano następująco:

0-2 punkty = podejrzenie infekcji HPV brak patologii, można odstąpić od biopsji

3-4 punkty = podejrzenie LG SIL, wskazana biopsja

5-8 punktów = podejrzenie HG SIL lub zmiany wyżej zaawansowane, niezbędna biopsja

#### **4.4. MOLEKULARNA DIAGNOSTYKA DNA HPV HR**

Wszystkie oznaczenia DNA HPV HR wykonano w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy Szpitala Klinicznego Położniczo-Ginekologicznego UM w Poznaniu. Do badań stosowano Test Amplicor firmy Roche Diagnostics. Jest to wystandaryzowana metoda wykorzystująca technikę amplifikacji genomu HPV oparta na PCR (Polymerase Chain Reaction) - reakcję łańcuchową polimerazy. PCR odzwierciedla naturalny proces replikacji DNA i umożliwia w warunkach in vitro szybkie powielanie wybranych odcinków DNA wirusa. Jest metodą bardzo czułą, umożliwiającą amplifikację nawet śladowych ilości wyjściowego DNA wirusa. Reakcja łańcuchowa polimerazy, to metoda powielania łańcuchów DNA w warunkach laboratoryjnych, polegająca na sekwencji wielokrotnego podgrzewania i oziębiania próbki. Technika została wynaleziona w 1983 roku przez Kary'ego Mullisa z kalifornijskiej firmy Cetus, za co Mullis otrzymał w roku 1993 Nagrodę Nobla.

##### **4.4.1 TECHNIKA AMPLICOR - REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY.**

W metodzie Amplicor (Roche Diagnostics) wykorzystywane są startery amplifikujące konserwatywny region DNA kodujący białko L1 wirusów HPV wysokiego ryzyka. Wyprodukowane fragmenty (amplikony) są wychwytywane przez komplementarne nici DNA opłaszczone na mikropłytkach i uwidocznione na zasadzie detekcji kolorymetrycznej. Test wykonuje jednoczesną amplifikację DNA HPV HR oraz beta globiny jako kontrolę pozytywną metody. Brak detekcji beta globiny w oznaczonej próbce wskazuje, że oznaczany materiał jest nieadekwatny i niediagnostyczny. Zdarza się to wtedy, gdy wystąpiły błędy podczas pobrania lub gdy próbka zawiera inhibitory reakcji.

W metodzie Amplicor oznaczanych jest 13 typów HPV wysokiego ryzyka onkogenego .

Test nie reaguje niespecyficznie z innymi wirusami, w tym HPV niskiego ryzyka, bakteriami, drożdżami. Nie jest wrażliwy na zanieczyszczenie próbki krwią.

Wykrywa HPV typy : 31, 52, 58 i 59 z czułością 240 kopii/ml, a typy 16, 18, 33, 35, 39, 45, 51, 56 i 68 z czułością 100 kopii/ml.

W reakcji łańcuchowej polimerazy wykorzystuje się następujące składnik:

- Termostabilną polimerazę DNA stanowi polimeraza *Taq* wyizolowana z bakterii *Thermus aquaticus* l.
- matrycowy DNA
- Startery (primery), czyli krótkie (najczęściej ok. 20 nukleotydów) fragmenty DNA komplementarne do fragmentów matrycy, znajdujących się na obu końcach interesującego nas genu. Wyróżniamy dwa typy starterów: starter przedni (forward)- jego sekwencja musi być taka sama jak sekwencja powielana; starter wsteczny (reverse)- jego sekwencja musi być komplementarna do powielanej).

Ponadto w przebiegu detekcji DNA HPV używa się roztworu tRNA zabezpieczającego przed adsorbacją innych składników mieszaniny na ściankach naczynia oraz barwniki i wskaźniki informujące o przebiegu reakcji .

#### 4.4.2 PRZEBIEG REAKCJI

Reakcja PCR składa się z wielokrotnie powtarzanego cyklu trzech etapów, które zachodzą w różnych temperaturach. Można zatem wymuszać je bez ingerencji w skład mieszaniny, a jedynie przez zmianę temperatury mieszaniny reakcyjnej.

1. *Denaturacja*. Pierwszym etapem jest rozplecenie podwójnej helisy matrycowego DNA. W wysokiej temperaturze ( 94- 95 °C) pękają wiązania wodorowe i podwójna helisa DNA rozdziela się na dwa pojedyncze łańcuchy. W celu uzyskania tego efektu podnosi się temperaturę mieszaniny reakcyjnej do wymaganych 95° na 15 sekund.
2. *Annealing* – przyłączanie - hybrydyzacja odcinków starterowych. Polega na tworzeniu odcinków dwuniciowych, składających się z przygotowanych starterów - cząsteczek

DNA komplementarnych do sekwencji DNA oskrzydających gen mający ulec namnożeniu - z matrycową cząsteczką DNA. Etap ten zachodzi w temperaturze niższej, ściśle określonej dla danej pary starterów (pomiędzy 45-60 °C), przyłączają się one do matrycy. Ponieważ roztwory primerów są dodawane w dużym nadmiarze w stosunku do matrycy, jest bardzo mało prawdopodobne, żeby na tym etapie, zamiast hybryd starter-matryca utworzyły się hybrydy połączonych ze sobą dwóch nici matrycy.

3. *Elongacja* – wydłużanie primerów. Na tym etapie zachodzi właściwa synteza DNA i tym samym amplifikacja pożądanego genu. Podwyższenie temperatury do około 72°C powoduje utworzenie się na matrycy, z przyłączonymi do niej starterami, kompleksu z polimerazą DNA, wskutek czego rozpoczyna się synteza nici komplementarnej do matrycy. Reakcja ta trwa zwykle 30 sekund.

Następnie cykl powtarza się i w kolejnym etapie annealingu i elongacji jako matryca mogą służyć wszystkie zsyntetyzowane dotychczas cząsteczki genu. W ten sposób reakcja, dopóki substraty i enzym są w wystarczającej ilości, zachodzi coraz szybciej, powodując coraz większy przyrost kopii genu na etapie elongacji. Z jednej cząsteczki po  $n$  cyklach reakcji można by uzyskać  $2^n$  cząsteczek, gdyby wydajność metody była stuprocentowa. W praktyce wydajność procesu jest mniejsza, co nie zmienia faktu, że metoda PCR pozwala na geometryczne zwielokrotnienie pożądanego łańcucha DNA. Konwencjonalna technika PCR pozwala na namnażanie łańcuchów DNA o maksymalnej długości ok. 10 kopii par zasad.

#### 4.4.3 CECHY TESTU AMPLICOR :

- Jest to jedyny dostępny test bazujący na technice PCR z certyfikatem UE do diagnostyki medycznej *in vitro*.
- Wykorzystuje technikę PCR do identyfikacji i amplifikacji DNA HPV HR z 13 genotypów wysokiego ryzyka w pojedynczej reakcji.
- Dostarcza powtarzalne wyniki, nie budzące wątpliwości interpretacyjnych.
- Wymaga 250 µl próbki, pozwalając na diagnostykę DNA HPV HR po wykonaniu cytologii płynnej.
- Zapewnia równoczesną izolację i amplifikację genu  $\beta$ -globiny oraz kontrolę analizy dostatecznej ilości komórek i inhibicji reakcji PCR w każdej próbce badanej.
- Posiada wbudowany enzymatyczny system AmpErase® co ogranicza ryzyko zanieczyszczeń krzyżowych.
- Nie wymaga znajomości sekwencji badanego genu, wystarczy znajomość sekwencji nukleotydów w odcinkach oskrzydłających gen.
- Stosowane startery nie muszą być komplementarne do matrycy w 100%. Pozwala to na amplifikację wariantów tego samego genu, które różnią się od siebie niewielkimi zmianami w sekwencji.
- Jednocześnie jest to metoda specyficzna, przy doborze odpowiednich starterów, powielaniu ulega tylko jeden odcinek DNA .
- Jest to metoda bardzo czuła. Pozwala na wykrycie nawet pojedynczej cząsteczki DNA HPV HR.

## 4. WYNIKI

Do analizy molekularnej włączono 218 pacjentek z nieprawidłowym rozpoznaniem cytologicznym ASC-US. Przeprowadzony test na obecność DNA HPV HR zidentyfikował materiał genetyczny wirusa u 75 (34,40%) kobiet. (Tabela 7)

Wśród 75 pacjentek z wynikiem oceny wymazu cytologicznego ASC-US i pozytywnym wynikiem testu molekularnego na DNA HPV HR rozpoznano 16 (21,33%) zmian typu CIN 1 (LG SIL). Ponadto u 6 (8,0%) pacjentek rozpoznano zmianę typu CIN 2 i u 2 (2,67%) zmiany typu CIN 3 (HG SIL). (Tabela 7)

Ogółem wśród 75 pacjentek z wynikiem oceny wymazu cytologicznego ASC-US i dodatnim wynikiem testu molekularnego na DNA HPV HR, u 24 badanych kobiet rozpoznano śródnabłonkową neoplazję szyjki macicy, co stanowi 32,0% wszystkich pacjentek DNA HPV HR pozytywnym. (Tabela 7)

Wśród 143/218 (65,60%) pacjentek z wynikiem oceny wymazu cytologicznego ASC-US i ujemnym wynikiem testu molekularnego na DNA HPV HR, u 6/143 (4,20%) kobiet rozpoznano zmianę typu CIN 1 (LG SIL). (Tabela 7)

U żadnej z badanych pacjentek z wynikiem oceny wymazu cytologicznego ASC-US i ujemnym testem molekularnym na DNA HPV HR nie rozpoznano zmian typu HG SIL (CIN2/CIN3). (Tabela 7)

**Tabela 7. Liczba rozpoznanych śródnabłonkowych neoplazji szyjki macicy CIN1, CIN 2, CIN 3 u kobiet DNA HPV (+), z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.**

<b>Pacjentki z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US n = 218</b>	<b>CIN 1</b>	<b>CIN 2</b>	<b>CIN 3</b>	<b>Suma</b>
<b>DNA HPV (+) n = 75/218 (34,40%)</b>	16/75 21,33%	6/75 8,00%	2/75 2,67%	DNA HPV (+)/CIN 24/75 32,0%
<b>DNA HPV (-) n= 143/218 (65,60%)</b>	6/143 4,20%	0	0	DNA HPV (-)/CIN 6/143 4,20%

**Czułość** testu na obecność 13 typów DNA HPV HR w wykrywaniu HG SIL, u wszystkich badanych kobiet z ASC-US wyniosła 100%. Oznacza to, że w badanych przypadkach 100% kobiet z wykrytym HG SIL uzyskało dodatni wynik testu na obecność DNA HPV HR.

**Swoistość** testu na obecność 13 typów DNA HPV HR w wykrywaniu HG SIL, czyli prawdopodobieństwo uzyskania ujemnego wyniku testu u osoby zdrowej dla wszystkich badanych pacjentek wyniosła 68,10% .

Prawdopodobieństwo obecności HG SIL, u kobiet z dodatnim wynikiem testu na obecność 13 typów DNA HPV HR, czyli **dodatnia wartość predykcyjna** testu dla całej badanej populacji wyniosła 10,67%.

Prawdopodobieństwo braku HG SIL, u kobiet z ujemnym wynikiem testu na obecność DNA 13 typów HPV HR, czyli **ujemna wartość predykcyjna testu** dla całej badanej populacji wyniosła 100%.

**Tabela 8. Ocena wartości diagnostycznej testu na obecność 13 typów DNA HPV HR w wykrywaniu HG SIL w grupie pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.**

<b>Parametry podlegające ocenie w badanej populacji n=218 kobiet</b>	<b>Liczba kobiet z wynikiem pozytywnym dla danego testu</b>
test HPV HR (+)	75/218 (34,40%)
test HPV HR (-)	143/218 (65,60%)
wykryty HG SIL	8/218 (3,67%)
brak HG SIL	210/218 (96,33%)



**Tabela 9. Opis uzyskanych wyników - wartości dla danego parametru testu na DNA HPV HR (Amplicor Roche Diagnostics) identyfikującego CIN u kobiet DNA HPV (+) z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i wykluczającego obecność CIN u kobiet DNA HPV (-) z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.**

<b>Parametry opisujące wartość diagnostyczną testu molekularnego</b>	<b>Uzyskane wartości dla danego parametru</b>
wynik testu prawdziwie (+)	8
wynik testu prawdziwie (-)	143
wynik testu fałszywie (+)	67
wynik testu fałszywie (-)	0
czułość testu	100%
swoistość testu	68,1%
wartość predykcyjna dodatnia testu	10,67%
wartość predykcyjna ujemna testu	100%

W okresie co najmniej 12 – miesięcznej cytologiczno- kolposkopowej obserwacji sześciu kobiet LG SIL (CIN 1) DNA HPV HR ujemnych nie zaobserwowano progresji u żadnej badanej pacjentki. U pięciu z nich w trakcie obserwacji wykazano samoistną regresję LG SIL.

## 6. DYSKUSJA

Od roku 2006 działa w Polsce aktywny populacyjny program profilaktyki wtórnej raka szyjki macicy. Z roku na rok liczba pobranych rozmazów cytologicznych rośnie. W roku 2007 pobrano ich 685 471, w 2009 r.- 877 232. Dynamicznie rośnie też liczba wymazów pobranych w Wielkopolsce, gdzie w roku 2006 wykonano ich ok. 3500, a w 2009 r. blisko 60 000. W Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy PPSM Ginekologiczno- Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu w roku 2009 dokonano oceny 14 484 rozmazów cytologicznych z 47 ośrodków etapu podstawowego. (25)

Klasyfikacja rozmazów cytologicznych w ramach aktywnego populacyjnego programu profilaktyki wtórnej raka szyjki macicy prowadzona jest w systemie The Bethesda (TBS), który od 2006 roku obowiązuje w Polsce.

Blisko połowę nieprawidłowych, w sensie onkologicznym, rozpoznań cytologicznych w tym systemie, wg danych z USA, stanowią rozpoznania ASC-US, czyli atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego o nieokreślonym znaczeniu. Uważa się, że obecność atypowych komórek o nieokreślonym znaczeniu (ASC-US) w rozmazie cytologicznym nie jest równoznaczna z rzeczywistą patologią szyjki macicy. Liczne doniesienia potwierdzają, że w części przypadków kobiety z rozpoznaniem ASC-US są zdrowe lub tylko zakażone HPV. (14)

Rozpoznanie cytologiczne ASC-US jest przyczyną najczęstszych błędów diagnostycznych. U pacjentek z ASC-US nie można też wykluczyć obecności szerszego zakresu patologii, od raka inwazyjnego poprzez HG SIL (zmiana śródnabłonkowa wysokiego stopnia CIN 2, CIN 3, CIS), LG SIL (zmiana śródnabłonkowa niskiego stopnia CIN 1), aż do pacjentek zdrowych, błędnie zakwalifikowanych do kolposkopii na podstawie fałszywie pozytywnego wyniku badania cytologicznego. (23) Potwierdzają to także dane z PPSM GPSK w Poznaniu z roku 2009, gdzie rozpoznano dwa nieoperacyjne przypadki inwazyjnego

raka szyjki macicy u młodych kobiet, które nie miały przeprowadzonej właściwej diagnostyki pogłębionej przez okres 2 lat, pomimo powtarzających się rozpoznań ASC-US i AGUS. U 32-letniej nieródki rozpoznano raka płaskonabłonkowego w II stopniu klinicznego zaawansowania wg FIGO, u 35-letniej nieródki rozpoznano raka gruczołowego w II stopniu klinicznego zaawansowania wg FIGO (dane własne PPSM).

Według danych (ASCCP) Amerykańskiego Towarzystwa Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy na każde 100 pacjentek z CIN 2 i CIN 3 diagnozowanych każdego roku w USA przypada 15 niewykrytych neoplazji w grupie kobiet badanych cytologicznie co 6 miesięcy oraz tylko 4 niewykryte neoplazje w grupie kobiet badanych testem na obecność DNA HPV HR. Każdego roku w Stanach Zjednoczonych badanie DNA HPV HR u kobiet z ASC-US umożliwia wykrycie 176 000 neoplazji dużego stopnia (CIN 3). Zalecone przez ASCCP (Amerykańskie Towarzystwo Kolposkopia i Patologii Szyjki Macicy) uwzględnienie testów molekularnych identyfikujących DNA onkogennych typów HPV w celu potwierdzenia konieczności dalszej diagnostyki u kobiet z ASC-US dzieli grupę pacjentek z tym rozpoznaniem cytologicznym na dwie części. Pierwsza DNA HPV HR ujemna, powraca do rutynowych badań cytologicznych za 12 miesięcy, druga DNA HPV HR dodatnia jest kierowana do diagnostyki kolposkopowej. (14)

Na konferencji Bethesda 2001 zaproponowano algorytm postępowania w realizowaniu programu profilaktyki raka szyjki macicy w przypadku uzyskania wyniku cytologicznego ASC-US uwzględniający trzy alternatywne drogi postępowania:

1. Powtórny wymaz cytologiczny za 6 i 12 miesięcy, a w sytuacji ponownego wyniku ASC-US, kolposkopia, ewentualnie biopsja wraz z abrazją diagnostyczną kanału szyjki macicy.
2. Natychmiastowa kolposkopia ewentualnie biopsja, wraz z abrazją diagnostyczną kanału szyjki macicy.

3. Test DNA HPV HR. Kolposkopia w sytuacji wykrycia DNA HPV HR i ewentualnie biopsja wraz ze skrobaniem kanału szyjki macicy. Jeśli wynik testu jest ujemny, zalecany jest wymaz cytologiczny za 12 miesięcy.

Według rekomendacji polskich towarzystw naukowych, w tym Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, oraz Polskiego Towarzystwa Patologów i Centralnego Ośrodka Koordynującego Populacyjny Program Profilaktyki i Wczesnego Wykrywania Raka Szyjki Macicy, zalecany algorytm diagnostyczny dla kobiet z ASC-US można ująć tabelarycznie (19), (28), (29):

**Tabela 10. Algorytm diagnostyczny dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.**

<b>Wynik</b>	<b>Powtórna cytologia</b>	<b>Test HPV</b>	<b>Kolposkopia (z biopsją szyjki i kanału )</b>	<b>Konizacja diagnostyczno-terapeutyczna</b>
ASC-US	TAK za 6-12 miesięcy	TAK	TAK tylko w sytuacji DNA HPV HR (+)	NIE

**Tabela 11. Algorytm diagnostyczny dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US zależnie od wieku badanych kobiet.**

Wynik badania cytologicznego	Wiek kobiety	Test DNA HPV	Test mRNA HPV
ASC-US	< 30 lat	NIE	TAK
ASC-US	>30 lat	TAK	TAK

Aktualnie amerykańskie towarzystwa naukowe (NCI /ASCCP) rozważają jako standard oparcie profilaktyki raka szyjki macicy o test podwójny czyli wykonanie u każdej pacjentki wymazu cytologicznego i jednocześnie oznaczenie DNA HR HPV. Uzasadnieniem jest stwierdzenie, że wykrycie zakażenia przynajmniej HPV 16 i 18 u kobiet z prawidłowym wynikiem wymazu cytologicznego oznacza większe ryzyko obecności CIN 3 niż rozpoznanie cytologiczne ASC-US. (20) W przypadku prawidłowej cytologii i ujemnego wyniku DNA HPV HR odstępy między badaniami mogą wynosić nawet 3 lata. W sytuacji trzykrotnego testu podwójnego złożonego z wymazu cytologicznego i oznaczenia DNA HPV HR, odstępy między następnymi badaniami można wydłużyć nawet do 5 lat. Taka modyfikacja programu nie niesie ze sobą wzrostu ryzyka utajonego rozwoju patologii.

Podobny jak omówiony powyżej i reprezentowany przez NCI/ASCCP kierunek zmian w diagnostyce patologii szyjki macicy proponuje porozumienie innych organizacji i towarzystw naukowych. Stanowisko wspólne USP STF (United States Preventive Services), ACS (American Colposcopy Society), ASCCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology) oraz ASCP (American Society for Clinical Pathology) omawia nowoczesne wykorzystanie diagnostyki molekularnej do zwiększenia czułości i obniżenia kosztocłonności profilaktyki i wczesnego wykrywania raka szyjki macicy. Stanowisko to

wyraża się m.in. w propozycji nowych algorytmów postępowania w sytuacji gdy profilaktykę oprzemy o wspomniany już powyżej test podwójny wykorzystujący technikę wymazu cytologicznego pobieranego na podłoże płynne oraz detekcję molekularną wybranych typów wirusów brodawczaka ludzkiego. Pierwszy z proponowanych algorytmów dotyczy postępowania w sytuacji rozpoznania cytologicznego ASC-US i ujemnego wyniku testu wirusologicznego. Wspólna propozycja wymienionych powyżej ośrodków opiniotwórczych zaleca jako obowiązujące powtórzenie testu podwójnego za 5 lat. Zwraca uwagę fakt, że propozycja ta stanowi kontynuację dotychczas proponowanego schematu diagnostycznego, wykorzystanego również przy opracowaniu założeń niniejszej pracy ale jeśli chodzi o czas przerwy do następnej kontroli jest znacznie dalej idącą formą algorytmu diagnostycznego. Według nowej propozycji z proponowanych 12 lub 24 miesięcy, kontrola zostaje w sposób bezpieczny odsunięta w czasie o kolejne 36 miesięcy. To niezwykle wysokie „zaufanie prognostyczne”, jakie twórcy nowego skringu pokładają w ujemnym wyniku badania molekularnego u kobiet z ASC-US stanowi potwierdzenie tez udokumentowanych również w wyniku prac przeprowadzonych w ramach niniejszego doktoratu. Tak zostało to wykazane i potwierdzone w przeprowadzonych badaniach ; patologii szyjki macicy począwszy od CIN 2+ należy szukać wyłącznie u kobiet DNA HPV HR dodatnich, zakażonych przetrwale wirusem brodawczaka ludzkiego. Ujemny wynik testu molekularnego jest aktualnie traktowany jako dyskryminator zmian identyfikowanych w ramach rozpoznania cytologicznego ASC-US i pozwala bezpiecznie odstąpić od konieczności dalszej weryfikacji stanu nabłonka wielowarstwowego płaskiego i gruczołowego szyjki macicy.

Wysoka 100% czułość testu na DNA HR HPV w wykrywaniu neoplazji szyjki macicy połączona z prawidłowym wynikiem oceny wymazu cytologicznego zapewnia wg aktualnych doniesień 99,9- procentową negatywną wartość predykcyjną. Czyli o tych pacjentkach można powiedzieć, że na pewno są zdrowe. (16), (17)

Jak już wspomniano we wstępie, obecność zakażenia HPV HR u kobiet z rozpoznaniem CASUS potwierdzona dodatnim wynikiem testu molekularnego uwiarygodnia i wyjaśnia obserwowane u tych kobiet zmiany cytoonkologiczne. Stąd też zalecenia ASCCP, aby u każdej kobiety ASC-US DNA HPV HR pozytywnej rozważyć wykonanie kolposkopii i biopsji miejsc podejrzanych. W USA, gdzie jakość oceny wymazów cytologicznych jest wysoka, około 50% badanych kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US jest równocześnie DNA HPV dodatnia. Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania wykazały, że tylko 34,4% pacjentek ASC-US było zarazem DNA HPV HR pozytywnych. Można zaryzykować twierdzenie, że wartość diagnostyczna rozpoznań cytologicznych ASC-US formułowanego w ramach polskiego programu profilaktyki i wczesnego wykrywania raka szyjki macicy jest znacznie niższa niż w USA czy Europie Zachodniej. Ta niższa wartość diagnostyczna przekłada się na fakt, że rozpoznanie to aplikowane jest często w sytuacji, gdzie nie powinno ono być formułowane, a obserwowane zmiany nie kwalifikują się, aby je opisywać jako atypowe komórki nabłonka płaskiego o nieokreślonej etiologii. Potwierdzeniem tej tezy są wyniki uzyskane w ramach realizacji niniejszej pracy. Wśród 143 kobiet ASC-US DNA HPV(-) nie rozpoznano żadnego przypadku HG SIL czyli CIN2/CIN3 uznawanego za rzeczywistą patologię szyjki macicy. Wyjaśnienia wymaga 6 zmian typu CIN1/ LG SIL rozpoznanych u pacjentek ASC-US/ DNA HPV (-). Późniejsza, 12-miesięczna obserwacja tej grupy kobiet polegająca na okresowej kontroli cytologicznej i kolposkopowej wykazała samoistną regresję wykrytych i rozpoznanych zmian. Na tej podstawie można z dużą dozą pewności sądzić, iż wszystkie sześć przypadków CIN 1 rozpoznanych u kobiet ASC-US, DNA HPV HR ujemnych wynikało z przebytego incydentalnego zakażenia wirusowego, które samoistnie ustąpiło przed włączeniem omawianych kobiet do badań będących tematem niniejszej pracy. Wykryte na podstawie wymazu cytologicznego zmiany w morfologii komórek (ASC-US) i rozpoznanie histopatologiczne CIN1 (LG SIL) stanowiły

swoistą pozostałość po przebytej infekcji wirusowej. Prawdopodobne ustąpienie zakażenia spowodowało brak progresji opisywanych zmian i samoistne ustąpienie LG SIL. Ujemny wynik testu molekularnego u tych sześciu kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US powinien stanowić podstawę do odstąpienia od kolposkopii i diagnostyki patomorfologicznej. Wyniki dalszej obserwacji klinicznej dowodzą poprawności takiego postępowania. Brak progresji i samoistne ustąpienie zmian u wszystkich kobiet ASC-US DNA HPV (-)/ CIN 1, stanowi wiarygodny dowód do przyjęcia za właściwe odstąpienia od diagnostyki pogłębionej w sytuacji ASC-US DNA HPV HR (-) w przyszłości.

Badania molekularne identyfikujące DNA HPV HR u kobiet z ASC-US można traktować jako swoistą walidację jakości oceny rozmazów. Im więcej wyników ASC-US DNA HPV HR dodatnich, tym wyższa czułość tego rozpoznania cytologicznego dla identyfikacji patologii szyjki macicy. Uzasadnieniem tej tezy jest nierozzerwalny związek między obecnością DNA HPV HR, a patologią szyjki. Szacuje się, że DNA HPV 16, 18 jest obecny w 70% wszystkich raków szyjki macicy. Szersza analiza 10 typów HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56) wykazała, że identyfikuje się je w 98% wszystkich raków płaskonabłonkowych i gruczołowych szyjki macicy.

Identyfikacja genotypów HPV jest coraz bardziej docenianym narzędziem diagnostycznym biologii molekularnej wykorzystywanym w profilaktyce i wczesnym wykrywaniu raka szyjki macicy. Znalazło to swoje odbicie w omawianym powyżej konsensusie organizacji rządowych i towarzystw naukowych USA zajmujących się profilaktyką onkologiczną i identyfikacją patologii szyjki macicy. W kolejnym nowym algorytmie zalecanym przez USP STF, ACS, ASCCP, ASCP jest przeprowadzenie genotypowania wirusa u wszystkich kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i dodatnim wynikiem „szerokiego” testu molekularnego identyfikującego jak najwięcej genotypów HPV. Stwierdzenie obecności DNA 16 lub 18 u kobiety ASC-US/DNA HPV HR pozytywnej stanowi aktualnie wskazanie do



natychmiastowej kolposkopii. Natomiast brak potwierdzenia obecności dwóch najbardziej niebezpiecznych pod kątem karcinogenezy typów HPV pozwala bezpiecznie na wykonanie ponownego testu podwójnego PAP/HPV za 12 miesięcy. Ponownie dodatni test na DNA HPV HR jest wtedy również wskazaniem do kolposkopowej weryfikacji zmian.

Uzyskany w niniejszej pracy odsetek 34,4% DNA HPV HR pozytywnych kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US wskazuje na potrzebę dalszego doskonalenia praktycznego użycia klasyfikacji TBS obowiązującej od 5 lat w Polsce. Jednocześnie przeprowadzone badania potwierdzają potrzebę i przydatność testów molekularnych identyfikujących DNA HPV HR wykorzystywanych do uściślenia wskazań do diagnostyki pogłębionej u kobiet z obecnymi atypowymi komórkami nabłonka płaskiego o nieokreślonym znaczeniu w rozmazie cytologicznym.

Szerokie wdrożenie diagnostyki molekularnej ma uzasadnienie nie tylko merytoryczne ale również ekonomiczne. Molekularna weryfikacja wskazanych do kolposkopii kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US jest znacznie tańsza od konieczności wykonywania diagnostyki endoskopowej u każdej pacjentki z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.

Potwierdzają to również wyniki badań przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy. Nawet szacunkowa ocena wyraźnie wskazuje, że wykonanie 218 kolposkopii połączone z pojedynczą biopsją i pobraniem wyskrobin z kanału szyjki macicy jest znacznie droższym rozwiązaniem od przeprowadzenia tylko 75 endoskopowych procedur diagnostycznych dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US/ DNA HPV HR (+).

Analogicznie dla powyżej omówionej sytuacji opłacalność takiego postępowania jest również korzystna dla weryfikacji kobiet z ujemnym wynikiem oceny wymazu cytologicznego przy użyciu testów molekularnych. Opłacalność ta pozostaje faktem nawet po odliczeniu kosztów

218 analiz obecności DNA HPV HR przeprowadzonych dla każdej kobiety z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na pilną potrzebę popularyzacji w Polsce standaryzowanej technologii molekularnej stosowanej w badaniach profilaktyki raka szyjki macicy.

Teza taka, która jeszcze kilka lat wstecz wydawała się zbyt śmiała i daleko idąca dzisiaj nie budzi już powszechnego zdziwienia i nieufności wśród badaczy i organizatorów profilaktyki onkologicznej. Wspomniany powyżej konsensus między USPSTF, ACS, ASCCP, ASCP czyli uznanymi ośrodkami opiniotwórczymi z USA, kontynuującymi misję profilaktyczną rozpoczętą przez Konferencję w Bethesdzie zakłada szybkie wdrożenie narzędzi biologii molekularnej do rutynowych badań przesiewowych. Przedstawiona w roku 2012 koncepcja zakłada, że populacja kobiet powyżej 30 roku życia uczestnicząca w okresowych badaniach kontrolnych będzie poddawana testowi podwójnemu, polegającemu na pobraniu wymazu cytologicznego na podłoże płynne i przeprowadzeniu identyfikacji DNA HPV HR. W dalszym postępowaniu obowiązuje przedstawiany powyżej algorytm dla rozpoznań cytologicznych ASC-US oraz wskazanie do wykonania kolposkopii dla stopni co najmniej LSIL. Przydatność badań molekularnych identyfikujących DNA HPV wykazały również badania prowadzone od sześciu lat w ramach ośrodka będącego jednym z wykonawców prac składających się na niniejszą pracę doktorską. Przykład Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy zorganizowanej w GPSK w Poznaniu pokazuje, że umiejętne połączenie narzędzi molekularnych i nawet konwencjonalnej cytodiagnostyki przynosi nadszpiewanie dobre efekty diagnostyczne. Taki algorytm postępowania pozwolił w ramach aktywności profilaktycznej PPSM na wykrycie, rozpoznanie i wyleczenie 577 zmian CIN 2+, w latach 2009-2012. Efekty wdrażania nowych technologii jako narzędzi wykrywczych widoczne są również w danych epidemiologicznych dotyczących zachorowania i umieralności na raka

szyjki macicy. W latach 2005-2010 zachorowalność na raka szyjki macicy w Wielkopolsce obniżyła się z 12,6 na 8,9/100 000 kobiet. Natomiast umieralność zmniejszyła się w analizowanym okresie, z 5,7 na 4,5/100 000 kobiet.

W podsumowaniu należy stwierdzić, że przeprowadzone badania jeszcze raz potwierdziły wysoką wartość narzędzi biologii molekularnej identyfikujące DNA HPV HR w procesie wykrywania patologii szyjki macicy. Narzędzia te są obdarzone wysoką czułością identyfikacji, czego brakuje obecnie stosowanym metodom. Na tej podstawie można zaryzykować twierdzenie, że najbliższa przyszłość w diagnostyce i wczesnym wykrywaniu raka szyjki macicy będzie należała do nowoczesnej diagnostyki zakażenia HPV HR.

## 7. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań sformułowałem następujące wnioski:

1. Wśród kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US większość stanowią pacjentki z ujemnym wynikiem testu na obecność DNA HPV HR.
2. Rozpoznanie cytologiczne ASC-US i obecność zmiany śródbłonkowej wysokiego stopnia ściśle koreluje z dodatnim wynikiem testu na DNA HPV HR.
3. Zmiany śródbłonkowe niskiego stopnia rozpoznaje się zarówno w populacji kobiet ASC-US HPV HR (+) i ASC-US HPV HR (-).
4. Ujemny wynik testu na DNA HPV HR u kobiet ze zmianami śródbłonkowymi niskiego stopnia rokuje samoistną regresję neoplazji.
5. Wśród kobiet ze zmianami śródbłonkowymi niskiego stopnia, DNA HPV HR (-) w trakcie 12- miesięcznej obserwacji nie stwierdza się progresji zmian.
6. Nie obserwuje się progresji zmian śródbłonkowych niskiego stopnia u kobiet z ujemnym wynikiem testu na obecność DNA HPV HR.

## 8. STRESZCZENIE

W Polsce od roku 2006 realizowany jest Ogólnokrajowy Program Populacyjnej Profilaktyki Raka Szyjki Macicy. Jednym z elementów tego programu jest ocena wymazów cytologicznych w skali TBS (The Bethesda System). Dane pochodzące z państw, gdzie klasyfikacja ta stosowana jest od wielu lat dowodzą, że najczęściej formułowanym nieprawidłowym, w sensie onkologicznym, rozpoznaniem cytologicznym jest ASC-US (atypowe komórki nabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu). Wraz ze wzrostem liczby wykonywanych badań cytologicznych do etapu pogłębionej diagnostyki programu kwalifikowanych jest coraz więcej kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US. Jednym z systemowych rozwiązań diagnostycznych proponowanych na świecie jest rutynowe wykonywanie u pacjentek z rozpoznaniem ASC-US testu na obecność onkogennych typów HPV. W przypadku pozytywnego wyniku testu zaleca się wykonanie kolposkopii z pobraniem wycinków celowanych.

Celem pracy była ocena rozpowszechnienia DNA HPV HR u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US, ocena korelacji pomiędzy występowaniem zmian typu HG SIL, a obecnością DNA HPV HR u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US, ocena korelacji pomiędzy występowaniem zmian typu LG SIL, a obecnością DNA HPV HR u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US oraz ocena znaczenia prognostycznego rozpoznania LG SIL u kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US, DNA HPV HR negatywnych.

Materiał stanowi 218 kobiet skierowanych w latach 2006-2009 do Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy (PPSM) Szpitala Klinicznego Położniczo-Ginekologicznego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US, celem przeprowadzenia diagnostyki pogłębionej.

Metoda badania polegała na wykonaniu kolposkopii (kolposkop Olympus) celem wyznaczenia miejsc podejrzanych, z których pobierano biopsję, ocenie kolpogramu wg skali Reida, pobraniu wyskrobin z kanału szyjki macicy do badania histopatologicznego, pobraniu materiału komórkowego celem wykonania testu molekularnego identyfikującego 13 onkogennych typów DNA HPV techniką AMPLICOR (Roche Diagnostic). Pacjentki ze zmianami typu LG SIL obserwowano zgodnie ze standardami obowiązującymi w PPSM.

Wśród badanych 218 kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US było 75 pacjentek DNA HPV HR pozytywnych. Zmiany typu HG SIL stwierdzono wyłącznie w grupie pacjentek z pozytywnym wynikiem testu molekularnego. Zmiany typu LG SIL rozpoznano zarówno u kobiet ASC-US z pozytywnym jak i negatywnym wynikiem identyfikacji molekularnej 13 onkogennych typów HPV. Po co najmniej 12-miesięcznej obserwacji nie stwierdzono progresji choroby u żadnej pacjentki z rozpoznaniem LG SIL i ujemnym wynikiem testu molekularnego.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w badanej populacji kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US przeważają pacjentki z ujemnym wynikiem testu na obecność DNA HPV HR. Wśród kobiet z wynikiem cytologicznym ASC-US zmiany typu HG SIL rozpoznano wyłącznie u pacjentek DNA HPV HR (+); nie stwierdzono ich u pacjentek DNA HPV HR (-). Zmiany LG SIL rozpoznano zarówno w populacji kobiet ASC-US HPV HR (+) i ASC-US HPV HR (-). W populacji pacjentek ASC-US HPV HR (+) stwierdzono ich znamiennie więcej niż u pacjentek HPV HR (-). Wśród pacjentek z rozpoznaniem ASC-US i DNA HPV HR (-) po co najmniej 12-miesięcznej obserwacji nie stwierdzono żadnego przypadku progresji zmian patologicznych.

## SUMMARY

In Poland, nationwide Cervical Cancer Prevention Program is conducted since 2006. One of the components of the program is evaluation of pap smears based on TBS scale (The Bethesda System). Data from countries, where this classification has been employed for several years, show that the most frequently observed abnormal result, in oncological sense, is ASC-US cytology (atypical squamous cells of undetermined significance). Along with increased number of pap smears, more women with ASC-US cytology are qualified for further diagnostic tests with ASC-US cytology. One of the proposed systemic diagnostic solutions worldwide is routine test for the presence of oncogenic types of HPV in women with an ASC-US result. In case of a positive test result, colposcopy and targeted biopsies are indicated.

The aims of this study are assessment of the prevalence of HR HPV DNA in women with an ASC-US cytology, assessment of the correlation between the presence of HG SIL and presence HR HPV DNA in women with an ASC-US cytology, assessment of the correlation between the presence of LG SIL and presence of HR HPV DNA in women with an ASC-US cytology and assessment of the prognostic value of LG SIL diagnosis in women with an ASC-US result, who are negative for HR HPV DNA.

Two hundred eighteen women with an ASC-US cytology referred to Laboratory of Cervical Pathophysiology, Obstetrics and Gynecology Clinical Hospital of Medical University in Poznan during 2006-2009 underwent further diagnostic tests.

Methods included colposcopy (Olympus colposcope), colposcopy directed biopsies, assessment of the colpogram based on Reid's scale, sampling of endocervical canal for histopathology evaluation, and collection of cellular material for molecular test, which identifies 13 oncogenic types of HPV DNA using AMPLICOR technique (Roche Diagnostic).

Patients diagnosed with LG SIL were observed in accordance with standards observed in Laboratory of Cervical Pathophysiology.

Among the 218 women with an ASC-US result, 75 were positive for HR HPV DNA types. Lesions of HG SIL - type were exclusively observed in population of women with a positive molecular test result. Lesions of LG SIL – type were observed in ASC-US women with both positive and negative molecular test results, which identified 13 oncogenic types of HPV. After at least a 12 month observation no progression was observed in women with LG SIL and a negative molecular test result.

Based on the obtained results, one can conclude that in the tested population of women with an ASC-US result, negative results of HR HPV DNA predominate. Among women with an ASC-US result, HG SIL was diagnosed exclusively in women in the HR HPV DNA (+) group. It was not diagnosed in women in the HR HPV DNA (-) group. Lesions of LG SIL type were diagnosed in both populations of women ASC-US, HR HPV (+) and ASC-US, HR HPV (-). In population of ASC-US, HR HPV (+) women, LG SIL was significantly more common than in HR HPV (-) women. Among patients with an ASC-US and HR HPV DNA (-) result after at least a 12-month observation, there were no cases of progression of pathological changes.



## 9. PIŚMIENNICTWO

1. Berek Jonathan S., Novak E.: Ginekologia t. 2. Medipage. Addis J. B. , Hatch K. D., Berek J. S. Śródnabłonkowe choroby narządów płciowych 2008; 621-650
2. Bieber Eric J.: Ginekologia kliniczna. Elsevier Urban & Partner Wrocław 2009 t. 1.; 127-148 .
3. Bieber E.J. i wsp. Ginekologia kliniczna t. 2. Elsevier Urban & Partner Wrocław 2009; 679-683.
4. Brzeziński Z. J., Szamotulska K.: Epidemiologia kliniczna .PZWL 1997; 58-67.
5. Chil A.: Metody wykrywania zakażeń wirusem HPV; Biuletyn Bio Merieux 2009; 1-6
6. Dyzmann- Sroka A, Myślińska W, Olenderczyk W et al. Nowotwory złośliwe w Wielkopolsce w 2010 roku. Wielkopolskie Centrum Onkologii. Biuletyn nr 9. Poznań 2012. Ed. Wielkopolski Rejestr Nowotworów
7. Einstein M. H., Baron M. i wsp. 2009. Human Vaccines 15- 20. Porównanie immunogenności i bezpieczeństwa szczepionek Cervarix i Gardasil przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (HPV) związanemu przyczynowo z rozwojem raka szyjki macicy u zdrowych kobiet w wieku 18- 45 lat.
8. Harper D. Management follow- up Heterogenity of CIN 3, EUROGIN Abstracts. Human Papillomavirus, cervical and other diseases. Prague, July 8-11, 2012 , MTC 3-1-8, p 17.
9. HPV and Cervical Cancer in the World 2007 Raport. WHO/ ICO Information Centre on HPV and cervical cancer, Vaccine 2007.
10. Kędzia H., Kędzia W. Nowotwory narządów płciowych kobiet. Diagnostyka morfologiczna, postępowanie kliniczne. Rozdział 16, Nowotwory nabłonkowe szyjki macicy. MedPharm Wrocław 2010 Wyd. 2.

11. Kędzia W. Analiza czynników komórkowych i ustrojowych w procesie kancerogenezy komórek nabłonka paraepidermalnego szyjki macicy zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego. Rozprawa habilitacyjna. Poznań 2003, Wydawnictwo Naukowe UAM, Serie Nauki Medyczne, Nr 1.
12. Kędzia W., Spaczyński M., Nowe metody wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Rak szyjki macicy. Profilaktyka, diagnostyka i leczenie. Red. Spaczyński M., Kędzia W., Nowak- Markwitz E. PZWL. W-wa 2009, 83-95
13. Kędzia W., Józefiak A.: Identyfikacja mRNA genów E6/E7 ludzkiego wirusa brodawczaka w wymazach z szyjki macicy kobiet z nieprawidłowym wynikiem cytologicznym– badania wstępne; Aktualności bioMerieux; wrzesień 2009 nr 50; 8-10.
14. Kędzia W., Józefiak A. Wartość praktyczna wykrywania 14 typów DNA HPV z możliwością genotypowania w diagnostyce patologii szyjki macicy. Monitor HPV nr 5. 2009.
15. Khan Mj., Castle, Lorincz A.T. and al. The elevated 10- year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus /HPV/ type 16 or 18 and possible utility of type- specific HPV testing in clinical practica. Journal of National Cancer Institut 2005, 97, 14, 1072-9.
16. Majak B. M.: Podręczny atlas cytologii ginekologicznej. Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner. Wrocław 2002; 6-8, 23-27, 80, 90.
17. Majewski S., Sikorski M.: Szczepionki przeciwko genitalnym typom HPV. Szczepienia przeciw HPV. Profilaktyka raka szyjki macicy i innych zmian związanych z zakażeniami HPV. Red. Majewski S., Sikorski M.; CZELEJ Sp. z o.o. Lublin 2006; 4-5, 27-33, 71-86.

18. Nowak- Markwitz E., Ginekologia i położnictwo 2009, VI Krajowa Konferencja Szkoleniowa 20-21 listopada 2009, Kraków; Materiały Szkoleniowe 59-66.
19. Nowak- Markwitz E.: Postępowanie w przypadku nieprawidłowego wyniku badania cytologicznego. Aktualności bioMerieux; wrzesień 2009 nr 50; 3-6.
20. Olszewski W., Woyke S., Gorczyca W., Chosia M.: Cytodiagnostyka raka szyjki macicy ZPNP AM Szczecin 1990; 45-47, 59-60, 66-70.
21. Paavonen J., Naud P. et al. 2009. Efficacy of human papillomavirus (HPV) 16/ 18 ASO4- adjuvanted vaccine against cervical infection and pre cancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double- blind, randomised study in young women. Lancet 2009, 374. 9686:301- 14.
22. Paszkowski T., Dębski R. Symposium Naukowo- Szkoleniowe Ginekologia 2007. Standardy postępowania w ginekologii onkologicznej. Materiały Szkoleniowe. Poznań 2007.
23. Piver M. S.: Podręcznik Onkologii Ginekologicznej. Rak Szyjki Macicy. PZWL 1999; 118-150.
24. Prendiville W., Davies P. The Human Papillomavirus. in: Prendiville W., Davis P., eds. The Health Professionals HPV Handbook: Human papillomavirus and cervical cancer. Oxford: Taylor and Francis, 2004b: 11-26.
25. Rokita W. Analiza wartości diagnostycznej wybranych testów molekularnych i immunocytochemicznych w wykrywaniu zmian patologicznych szyjki macicy. Wydawnictwo Naukowe UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. 2011
26. Sikorski M: Zakażenia HPV – Współczesne poglądy i praktyka. TERMEDIA Poznań 2008; 22-40, 161-178.
27. Spaczyński M., Nieprawidłowy wynik przesiewowego badania cytologicznego- zasady postępowania. Symposium Naukowo- Szkoleniowe Ginekologia 2009

Standardy postępowania w ginekologii onkologicznej. Materiały Szkoleniowe, Poznań 2009.

28. Spaczyński M., Kędzia W., Nowak- Markwitz E.; Profilaktyka pierwotna i wtórna raka szyjki macicy, diagnostyka i leczenie. Poznań 2008; 11-30, 39-68, 105-111.
29. Spaczyński M., Kędzia W., Nowak- Markwitz E.: Rak Szyjki Macicy– profilaktyka, diagnostyka i leczenie PZWL 2009; 57-79,200.
30. Tuon F., Rev Assoc Med. Bras 2002; Bull World Health Organ vol 83 no. 3 Geneve 2005; Raport of Agency for Healthcare and Quality 2004 Bethesda.
31. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (2007) HPV and cervical cancer in the 2007 report. Vaccine 25 .

## **10. SPIS TABEL**

Tabela 1. Funkcje białek wczesnych HPV. (9) .....	11
Tabela 2. Porównanie różnych klasyfikacji zmian nabłonka szyjki macicy. (14) .....	24
Tabela 3. Porównanie systemów klasyfikacji cytologicznej i klasyfikacji patomorfologicznej zmian z odpowiednimi rozpoznaniem cytologicznymi (1) .....	25
Tabela 4. Omówienie czynników różnicujących subkliniczne zakażenie HPV od śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. (8) .....	30

Tabela 5. Porównanie 3 metod wykrywania CIN: cytodiagnostyki, kolposkopii, testu identyfikującego DNA HR HPV. (27) .....	32
Tabela 6. Skala Reida.....	49
Tabela 7. Liczba rozpoznanych śródnabłonkowych neoplazji szyjki macicy CIN1, CIN 2, CIN 3 u kobiet DNA HPV (+), z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US.....	55
Tabela 8. Ocena wartości diagnostycznej testu na obecność 12 typów DNA HPV HR w wykrywaniu HG SIL w grupie pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US. ....	56
Tabela 9. Opis uzyskanych wyników- wartości dla danego parametru testu na DNA HPV HR (Amplicor Roche Diagnostics) identyfikującego CIN u kobiet DNA HPV (+) z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US i wykluczającego obecność CIN u kobiet DNA HPV (-) z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US. ....	57
Tabela 10. Algorytm diagnostyczny dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US. ....	60
Tabela 11. Algorytm diagnostyczny dla kobiet z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US zależnie od wieku badanych kobiet.....	61

## **11. SPIS RYCIN**

Rycina 1. Budowa genomu HPV. ....	10
Rycina 2. Śródnabłonkowa neoplazja i prawidłowy nabłonek szyjki macicy.. ....	20

## 12. WYKAZ SKRÓTÓW

ACOG - Amerykańskie Towarzystwo Położników i Ginekologów (ang. American College of Obstetricians and Gynecologists)

ACS- Amerykańskie Towarzystwo Kolposkopowe (American Colposcopy Society)

ASCP- Amerykańskie Towarzystwo Patologii Klinicznej (American Society for Clinical Pathology)

ASCCP- Amerykańskie Towarzystwo Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (ang. American Society for Colposcopy and Cervical Pathology)

ALTS – ASCUS /LSIL Triage Study – zorganizowane przez NCI badanie kliniczne analizujące wyniki cytologiczne ASC-US i LSIL

AGC- atypowe (nieprawidłowe) komórki gruczołowe (ang. Atypical Glandular Cells)

ASC-US- atypowe (nieprawidłowe) komórki nabłonka płaskiego o nieokreślonym znaczeniu (ang. Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance )

ASC-H – atypowe (nieprawidłowe) komórki nabłonkowe, w których nie można wykluczyć zmian typu HSIL

bp – pary zasad

CIS – rak in situ – rak nie przekraczający błony podstawnej (łac. Carcinoma in situ)

CIN – szyjkowa śródnabłonkowa neoplazja (ang. Cervical Intraepithelial Neoplasia )

CIN 1 – dysplazja małego stopnia

CIN2 – dysplazja średniego stopnia

CIN3 – dysplazja dużego stopnia

CLIA - Clinical Laboratory Improvements Amendments – instytucja odpowiedzialna za postęp laboratoryjny w USA

DES – diethylstilbestrol

E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8 – białka wczesne wirusa HPV

DNA - kwas dezoksyrybonukleinowy (ang. Deoxyribonucleic Acid)

FDA – Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Agency)

HC2 – test Hybryd Capture II

HPV – human papilloma virus

HR HPV - typ HPV wysokiego ryzyka onkogennego (ang. high risk HPV)

HGSIL - zmiany śród nabłonkowe wysokiego stopnia (ang. High Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. Human immunodeficiency virus)

LGSIL - zmiany śród nabłonkowe niskiego stopnia (ang. Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion)

LCR – długi region regulatorowy (kontrolny) (ang. Long Control Region)

LBC – cytologia na podłożu płynnym (ang. Liquid Base Cytology)

L1, L2 – geny późne kodujące białka strukturalne wirusa (ang. Late proteins)

mRNA – RNA informacyjne (ang. Messenger Ribonucleid Acid)

NCI – Amerykański Narodowy Instytut Walki z Nowotworami (ang. Nacional Cancer Institute)

NPV – negatywna wartość predykcyjna (ang. negative predictiv value)

PAP – ocena cytologii wg systemu Papanicolaou

PCR - reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)

PPSM GPSK – Pracownia Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego

PPV – dodatnia wartość predykcyjna (ang. positive predictiv value)

P 53 – białko transkrypcyjne o własnościach supresora nowotworowego; aktywuje mechanizmy naprawy DNA i indukuje apoptozę

pRb – białko komórkowe retinoblastoma

RNA – kwas rybonukleinowy (ang. Ribonucleid Acid)

SCJ – strefa przekształceń = połączenie nabłonka płaskiego i gruczołowego (ang. Squamous Columnar Junction)

SIMP – System Informatyczny Monitorowania Profilaktyki

TBS – system Bethesda (ang. The Bethesda System)

USPSTF United States Preventive Services Task Force - Amerykańska Grupa Robocza do spraw Działań Prewencyjnych