

lek. med. Dominik Pruski

Rozprawa Doktorska

**„Ocena przydatności metody  
optoelektronicznej w wykrywaniu  
śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i  
raka szyjki macicy”**

---

Promotor: prof. dr hab. Witold Kędzia

Klinika Onkologii Ginekologicznej

Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2010



**Spis treści:**

1. Wstęp.....	5
1.1. Epidemiologia raka szyjki macicy i śródnabłonkowej neoplazji szyjki. ....	5
1.2. Etiologia raka szyjki macicy. ....	7
1.3. Czynniki ryzyka rozwoju raka szyjki macicy. ....	8
1.4. Podział patomorfologiczny nowotworów szyjki macicy. ....	11
1.5. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy (CIN) - rzeczywisty stan przedrakowy.....	12
1.6. Wirus Brodawczaka Ludzkiego – HPV. ....	17
1.7. Cykl życiowy wirusa HPV i inicjacja karcinogenezy.....	17
1.8. Profilaktyka raka szyjki macicy. ....	19
1.9. Nowe metody badań przesiewowych profilaktyki raka szyjki macicy. ....	22
1.10. Optoelektronika w diagnostyce śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. ....	26
2. Cele pracy.....	31
2.1 Cele szczegółowe.....	31
3. Materiał. ....	32
4. Metodyka badań. ....	33
4.1. Metoda optoelektroniczna.....	33
4.1.1. Składowa elektryczna.....	38
4.1.2. Składowa optyczna.....	40
4.2. Cytodiagnostyka. ....	40
4.3. Badanie wirusologiczne. ....	41
4.4. Badanie kolposkopowe. ....	42
4.5. Biopsja miejsc podejrzanych. ....	47
5. Metody statystyczne.....	49
6. Wyniki badań. ....	50
6.1. Wyniki metody optoelektronicznej.....	54
6.2. Wyniki metody molekularnej. ....	59
6.3. Wyniki oceny kolposkopowej.....	62
6.4. Wyniki cytodiagnostyki.....	65

---

6.5. Wyniki testu połączonego ( metoda optoelektroniczna i molekularna).....	68
7. Dyskusja.....	69
8. Wnioski.....	84
Streszczenie.....	85
Summary.....	87
Spis tabel.....	89
Spis wykresów.....	90
Spis fotografii.....	91
Spis rycin.....	92
Wykaz skrótów.....	93
Piśmiennictwo.....	95

## 1. Wstęp.

### 1.1. Epidemiologia raka szyjki macicy i śródnaślukowej neoplazji szyjki.

Rak szyjki macicy stanowi istotny problem zdrowotny w populacji ogólnoswiatowej.<sup>1</sup> Pod względem liczby corocznie rejestrowanych zachorowań jest drugim, po raku piersi, nowotworem złośliwym u kobiet.<sup>2</sup> Każdego roku na świecie rozpoznaje się blisko 500 000 nowych zachorowań na raka szyjki macicy. W skali globalnej liczba zgonów wywołanych tym nowotworem sięga w przybliżeniu 275 000 kobiet rocznie.<sup>3</sup> Szacuje się, że lekarze co minutę rozpoznają raka szyjki macicy, a co dwie minuty na świecie jedna kobieta umiera z tego powodu.

W 2004 roku, w dwudziestu pięciu krajach Unii Europejskiej blisko 31 000 kobiet zachorowało na raka szyjki macicy, a 14 000 zmarło.<sup>4</sup> W populacji kobiet między 15, a 44 rokiem życia żyjących w krajach Unii Europejskiej, rak szyjki macicy zajmuje drugie, po raku gruczołu piersiowego miejsce, pod względem liczby zgonów na nowotwory złośliwe.<sup>5</sup>

Współczynniki epidemiologiczne opisujące występowanie tego nowotworu różnią się w zależności od położenia geograficznego. Najwięcej nowych zachorowań na raka szyjki macicy dotyczy populacji krajów rozwijających się. Najwyższe współczynniki zachorowalności obserwuje się w Afryce, Ameryce Łacińskiej oraz części Azji.

Od wielu lat najwyższe standaryzowane współczynniki zachorowalności na raka szyjki macicy występują w krajach Afryki Środkowo-Wschodniej, takich jak Zimbabwe, Nigeria, Uganda. Nigeria w chwili obecnej jest krajem, gdzie rak szyjki macicy stanowi prawie połowę wszystkich chorób nowotworowych.<sup>6</sup> W niektórych miastach Zimbabwe standaryzowany współczynnik zachorowalności wynosi 67,2 na 100 000 kobiet. Podobnie wysoki standaryzowany współczynnik zachorowalności charakteryzuje miasto Kyadondo i oscyluje w granicach 41 na 100 000 kobiet.<sup>7</sup> Oszacowano, iż u kobiet rasy czarnej zachorowalność na raka szyjki macicy jest 1,5 raza większa niż u kobiet rasy białej. Wśród populacji kobiet rasy czarnej obserwuje się dwa razy większą umieralność na raka szyjki macicy w porównaniu z populacją kobiet rasy białej.<sup>8</sup>

Tajwan jest siódmym pod względem zachorowalności na raka szyjki macicy krajem na świecie.<sup>9</sup> W Indiach, zachorowalność i śmiertelność na raka szyjki macicy odpowiada blisko jednej czwartej wszystkich zachorowań i zgonów z powodu nowotworów złośliwych wśród kobiet.

W Polsce nowotwory złośliwe stanowią drugą, co do częstości, po chorobach układu krążenia przyczynę zgonu u kobiet w wieku poniżej 65 lat.<sup>10</sup> W roku 2005 rozpoznanie raka szyjki macicy postawiono u 3 263 Polek, co stanowi ponad 5% wszystkich rozpoznań onkologicznych dla populacji żeńskiej. Standaryzowany współczynnik zachorowalności na raka szyjki macicy wynosi 11,5 a umieralności 5,7.<sup>11</sup> Polska pod względem wskaźników epidemiologicznych plasuje się pośrodku skali ogólnoświatowej. Jednak w porównaniu z państwami Unii Europejskiej, Stanami Zjednoczonymi, Australią, Nową Zelandią, Izraelem oraz niektórymi państwami azjatyckimi, polskie standaryzowane współczynniki zachorowalności i umieralności na raka szyjki macicy są bardzo wysokie. W zeszłym roku American Cancer Society poinformowało o 11 150 nowych zachorowaniach na raka szyjki macicy oraz 3 650 zgonach z powodu tego nowotworu w Stanach Zjednoczonych. W Chinach obserwuje się niską zachorowalność i umieralność na raka szyjki macicy. Wskaźnik zachorowalności w Kraju Środka, oscyluje między 2, a 4 na 100 000 kobiet. Bardzo niska zachorowalność na raka szyjki macicy występuje w populacji Żydówek żyjących w Izraelu i wynosi około 3 nowe zachorowania rocznie na 100 000 kobiet.

W Polsce, jako przyczyna zgonu rak szyjki macicy lokalizuje się na piątym miejscu stanowiąc około 4,5% wszystkich zgonów spowodowanych chorobami nowotworowymi. Współczynnik umieralności na raka szyjki macicy w Polsce wzrasta liniowo począwszy od 20 roku życia, osiągając szczyt zachorowań około 52 roku życia.<sup>11</sup>

Obserwowana na świecie zachorowalność na raka szyjki macicy wzrastała konsekwentnie od roku 1963 aż do lat osiemdziesiątych. Od lat dziewięćdziesiątych, do chwili obecnej obserwuje się nieznaczny spadek zachorowalności. W Polsce najwyższe wskaźniki zachorowalności na ten nowotwór charakteryzują województwo lubuskie, warmińsko-mazurskie, podlaskie, wielkopolskie i łódzkie. Najmniejszą liczbę nowych zachorowań notuje się w województwie opolskim, mazowieckim i podkarpackim.

Miarą wyleczalności raka szyjki macicy jest odsetek pięcioletnich przeżyć leczonych kobiet. Polska należy do krajów o niskim wskaźniku wyleczalności, który wynosi 48,2 %. W oparciu o badania Eurocare jest on najniższy spośród wszystkich 16 krajów europejskich.<sup>12</sup> Ten niekorzystny stan rzeczy związany jest głównie, ze zbyt późnym wykrywaniem nowych zachorowań, co powoduje, że znaczący odsetek wykrytych nowotworów stanowią pacjentki z wysokim stopniem zaawansowania klinicznego choroby. Ma to niewątpliwy wpływ na skuteczność terapii i odsetek przeżyć pięcioletnich.

Drugim elementem mającym wpływ na niekorzystną sytuację epidemiologiczną w Polsce jest niedostateczne objęcie populacji aktywną profilaktyką raka szyjki macicy. Na świecie, w krajach gdzie od lat obowiązują przesiewowe badania cytologiczne, rozpoznaje się wielokrotnie więcej niż w Polsce przypadków stanów przedrakowych, czyli śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy (CIN – cervical intraepithelial neoplasia), przez co nie dopuszcza się do rozwoju tak znacznej liczby nowotworów inwazyjnych.

Wprowadzenie w niektórych krajach narodowych programów profilaktyki raka szyjki macicy umożliwiło znaczne obniżenie współczynników zachorowalności i umieralności z powodu tego nowotworu. W Finlandii zachorowalność na raka szyjki macicy w latach sześćdziesiątych ubiegłego stulecia wynosiła 15 na 100 000 kobiet, a umieralność 7 na 100 000 kobiet. Wprowadzenie aktywnej i powszechnej profilaktyki raka szyjki macicy umożliwiło spadek zachorowalności do 4,5 na 100 000 w 1991 roku i do 2,8 na 100 000 w 1995 roku. Standaryzowany współczynnik śmiertelności raka szyjki macicy obniżył się do 0,8 na 100 000 kobiet w 1995 roku.<sup>13</sup>

W ciągu roku, globalnie, w toku rutynowych kontroli cytologicznych wykrywa się około 10 milionów neoplazji śród nabłonkowych wysokiego i średniego stopnia oraz blisko 30 milionów neoplazji niskiego stopnia.

## **1.2. Etiologia raka szyjki macicy.**

Etiologia tego nowotworu jest nierozdzielnie związana z przewlekłym zakażeniem wywołanym wirusem brodawczaka ludzkiego, w szczególności typami o wysokim charakterze onkogennym np. HPV 16, 18.<sup>14</sup> W 1996 roku Światowa Organizacja Zdrowia uznała infekcje onkogennymi typami wirusa HPV 16 i 18 za czynnik rakotwórczy dla człowieka. Współistniejące zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego można wykazać dla 99% rozpoznanych przypadków raka szyjki macicy na całym świecie.<sup>15</sup> W oparciu o aktualne dane, potencjałem onkogennym charakteryzują się także inne niż w/w typy HPV takie jak: 21, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68.<sup>16</sup> Związek przyczynowo-skutkowy przetrwałego zakażenia wywołanego onkogennymi typami HPV, a rozwojem raka szyjki macicy jest znacznie lepiej udokumentowany od zależności zachodzącej między wirusami HBV i HCV a pierwotnym rakiem wątroby. Wzrost względnego ryzyka wystąpienia raka szyjki macicy u kobiety przetrwale zakażonej HPV 16, 18 szacuje się na powyżej 500. Dla porównania związek między paleniem tytoniu, a rozwojem raka płuc oceniono na 10. Typ

16 wirusa brodawczaka ludzkiego jest związany najsilniej z patogenezą raka płaskonabłonkowego, a typ 18 z powstaniem raka gruczołowego.

Infekcja wirusem HPV jest najczęstszą chorobą zaliczaną do grupy STD (sexual transmitted disease) czyli chorób przenoszonych drogą płciową. Rocznie rozpoznaje się blisko 300 milionów nowych zakażeń HPV. Z danych US Centers for Disease Control wiemy, iż życiowe ryzyko nabycia infekcji HPV dla aktywnej płciowo kobiety lub mężczyzny wynosi 50%.<sup>17</sup> Niektórzy autorzy oszacowali, że nawet 75% kobiet żyjących na świecie jest narażonych na kontakt z wirusem brodawczaka ludzkiego.<sup>18</sup> Z danych Międzynarodowej Agencji Walki z Rakiem (International Agency of Research on Cancer) najwyższy odsetek zakażeń HPV obserwuje się w Afryce (28,3%) oraz Ameryce Południowej (16%).

Zakażenia incydentalne, a szczególnie przetrwałe zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego, stanowią istotny problem epidemiologiczny i kliniczny na świecie.

Wyróżnia się płciowe i pozapłciowe drogi przenoszenia infekcji HPV. Najczęściej do zakażenia onkogennymi typami HPV dochodzi podczas stosunku seksualnego połączonego z penetracją.<sup>19</sup> Ryzyko transmisji zakażenia niosą ze sobą również inne kontakty seksualne, bez penetracji.<sup>20</sup> Ten mechanizm zakażenia dotyczy głównie nieonkogennych typów HPV. Do pozapłciowej drogi zakażenia zaliczamy przeniesienie wirusa od matki do dziecka, w czasie trwania ciąży lub porodu<sup>21</sup> lub transmisję wirusa poprzez bieliznę lub sprzęt medyczny.<sup>22 23</sup>

### **1.3. Czynniki ryzyka rozwoju raka szyjki macicy.**

Najważniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju raka szyjki macicy jest przetrwałe zakażenie wywołane onkogennymi typami HPV. Z niewielkimi wyjątkami czynniki ryzyka rozwoju infekcji HPV pokrywają się z głównymi i prawdopodobnymi czynnikami ryzyka rozwoju raka szyjki macicy.<sup>24</sup>

Do głównych czynników ryzyka rozwoju raka szyjki macicy zaliczamy:

- przewlekłe zakażenie onkogennym typem wirusa HPV,
- wiek pacjentki,
- wczesne rozpoczęcie współżycia,



- dużą liczbę partnerów seksualnych,
- dużą liczbę porodów,
- wieloletnie palenie papierosów,
- niski status socjo-ekonomiczny,
- śródnabłonkową neoplazję szyjki macicy w wywiadzie.

Do prawdopodobnych czynników ryzyka rozwoju raka szyjki macicy zaliczamy:

- wieloletnie stosowanie hormonalnych leków antykoncepcyjnych,
- dietę ubogą w antyoksydanty,
- zakażenie HIV,
- częste, nieleczone stany zapalne pochwy wywołane m.in. przez *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*.

Statystycznie infekcja wirusem HPV dotyczy najczęściej populacji kobiet pomiędzy drugą, a czwartą dekadą życia. W oparciu o liczne doniesienia naukowe można stwierdzić, iż do zakażenia wirusem dochodzi najczęściej między 20, a 25 rokiem życia.<sup>25</sup> Według Syrjanem i współpracowników, aż 43% nowych zakażeń HPV dotyczy kobiet poniżej 25 roku życia, a 32% charakteryzuje kobiety między 26, a 35 rokiem życia.<sup>26</sup> Natomiast najwyższe ryzyko rozwoju raka szyjki macicy dotyczy populacji kobiet w wieku powyżej 35 lat.

Aktywność płciowa jest bardzo istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju raka szyjki macicy. Wczesne rozpoczęcie współżycia płciowego, duża liczba i częste zmiany partnerów seksualnych wpływają na wzrost ryzyka rozwoju śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Według danych zgłaszanych w wywiadzie, współżycie z 5 - 9 partnerami zwiększa ryzyko bezwzględne rozwoju śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy – CIN do 1,4, a kontakt płciowy z 14-toma partnerami, oznacza wzrost ryzyka bezwzględnego aż do 4,2.<sup>27</sup> W badanej populacji 102 kobiet zgłaszających ponad 10 partnerów seksualnych, odsetek zakażonych HPV oszacowano na 69%.<sup>28</sup> Wczesne rozpoczęcie współżycia ma także wpływ na wzrost ryzyka rozwoju objawów klinicznych zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego.<sup>24</sup> Wszystkie omówione powyżej czynniki ryzyka rozwoju

zakażenia HPV w tym: duża liczba ciąż i porodów skojarzona ze wczesnym rozpoczęciem współżycia należą także do czynników ryzyka rozwoju raka szyjki macicy.

Zdania na temat wpływu palenia tytoniu na rozwój śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy (CIN) są podzielone. Istnieje teoria mówiąca o niekorzystnym wpływie nikotyny, kotyniny oraz innych substancji mutagennych na sprawność mechanizmów immunologicznych w obrębie nabłonka szyjki macicy. Obniżenie liczby komórek APC (antigen presenting cell) w nabłonku szyjki macicy kobiet sprzyja rozwojowi przetrwałej infekcji wirusowej. Istnieją także doniesienia światowe zaprzeczające istnieniu wpływu palenia tytoniu na rozwój raka szyjki.<sup>29</sup>

Niski status socjo-ekonomiczny, który koreluje często z niedożywieniem, niskim poziomem higieny osobistej, a także złymi warunkami życia zwiększa statystycznie ryzyko rozwoju raka szyjki macicy. Typ diety ubogiej w antyoksydanty takie jak; kwas foliowy, retinol, witamina C, E, B5, B12 oraz alfa karoten wpływa na zwiększone prawdopodobieństwo rozwoju przetrwałego zakażenia HPV oraz ryzyko progresji do raka inwazyjnego.<sup>30</sup>

W chwili obecnej wiemy, iż długoletnie, regularne stosowanie hormonów steroidowych w celu antykoncepcyjnym promuje rozwój śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy.<sup>26</sup> Kobiety w ciąży, wieloródki lub pacjentki z zaburzoną gospodarką hormonalną w zakresie hormonów steroidowych mają znamienne większe prawdopodobieństwo rozwoju przetrwałej infekcji HPV, a w konsekwencji śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Estrogeny i gestageny mogą przyspieszać proces transkrypcji niektórych genów wirusowych, w konsekwencji prowadząc do niekontrolowanej proliferacji komórek oraz zahamowania apoptozy.<sup>31</sup> W obrębie DNA HPV typów onkogennych wyizolowano sekwencję nukleotydów GRE (glucocorticoid responsive element) analogiczną do struktury receptora alfa glikokortykoidów.

Koincydentalne zakażenie środowiska pochwy innymi typami wirusów lub bakterii ułatwia proces karcenogenezy oraz progresji zmian typu CIN do raka inwazyjnego szyjki macicy.

Potwierdzono niekorzystny wpływ immunosupresji na rozwój przetrwałej infekcji HPV oraz powstanie śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Chodzi tu głównie o

immunosupresję powstającą w wyniku działania leków stosowanych u chorych przygotowywanych do przeszczepów lub pacjentów zakażonych wirusem HIV.

<b>Czynnik ryzyka rozwoju raka szyjki macicy:</b>	<b>Skala wzrostu ryzyka:</b>
Wczesny wiek inicjacji seksualnej	2-krotnie
Wielorództwo (>3 żywych urodzeń)	4-krotnie
Palenie tytoniu	2-krotnie
Długoterminowe stosowanie antykoncepcji hormonalnej	4-krotnie
Współistniejące choroby przenoszone drogą płciową: HSV 2, HIV, Chlamydia trachomatis	4-krotnie

**Tabela 1. Czynniki ryzyka i ich wpływ na powstanie raka szyjki macicy u kobiet zakażonych onkogennym typem wirusa HPV.** <sup>32 33</sup>

W tabeli 1 przedstawiono czynniki ryzyka i ich wpływ na rozwój raka szyjki macicy u kobiet HPV DNA HR (high risk – wysokiego ryzyka) pozytywnych. Oczywistym czynnikiem ryzyka rozwoju zakażenia HPV i raka szyjki macicy jest zgłaszany w wywiadzie fakt przebytego leczenia z powodu CIN. U kobiet, które miały śródnaślankową neoplazję szyjki macicy, obserwuje się wzrost ryzyka obecności przetrwałego zakażenia wysoce onkogennymi typami wirusa HPV lub wzrost ryzyka ponownego rozwoju tego zakażenia, a co za tym idzie rozwoju CIN i raka szyjki macicy. Tabela 1 stanowi zbiorczą analizę skali ryzyka rozwoju raka szyjki macicy dla poszczególnych czynników zwiększających to ryzyko u kobiet DNA HPV HR pozytywnych.

#### **1.4. Podział patomorfologiczny nowotworów szyjki macicy.**

W 2003 roku Międzynarodowa Organizacja Zdrowia - WHO opracowała klasyfikację nowotworów szyjki macicy – WHO Histological Classification of Tumours of the Uterine Cervix Tumours.<sup>34</sup>

Zgodnie z założeniami tej klasyfikacji nowotwory szyjki macicy dzielimy na następujące grupy:

- grupa nowotworów nabłonkowych obejmująca nowotwory płaskonabłonkowe, gruczołowe, inne nowotwory nienabłonkowe oraz ich stany przedrakowe,
- grupa nowotworów mezenchymalnych oraz zmian rzekomo nowotworowych,
- grupa nowotworów mieszanych nabłonkowo-mezenchymalnych,
- grupa guzów melanocytarnych,
- grupa obejmująca białaczki i chłoniaki,
- grupa innych guzów.

Poza grupą nowotworów nabłonkowych typu płaskonabłonkowego, gruczołowego oraz ich prekursorów, pozostałe występują bardzo rzadko. Raki płaskonabłonkowe stanowią 90% wszystkich nowotworów złośliwych, rozpoznawanych w obrębie szyjki macicy. Znacznie rzadziej rozpoznaje się raki gruczołowe (5-7%). W szyjce macicy rozpoznaje się trzy typy raka płaskonabłonkowego: rak wielkokomórkowy nierogowaciejący, rak wielkokomórkowy rogowaciejący oraz rak drobnokomórkowy. Postacią raka płaskonabłonkowego, który występuje najczęściej jest typ wielkokomórkowy nierogowaciejący.<sup>35</sup>

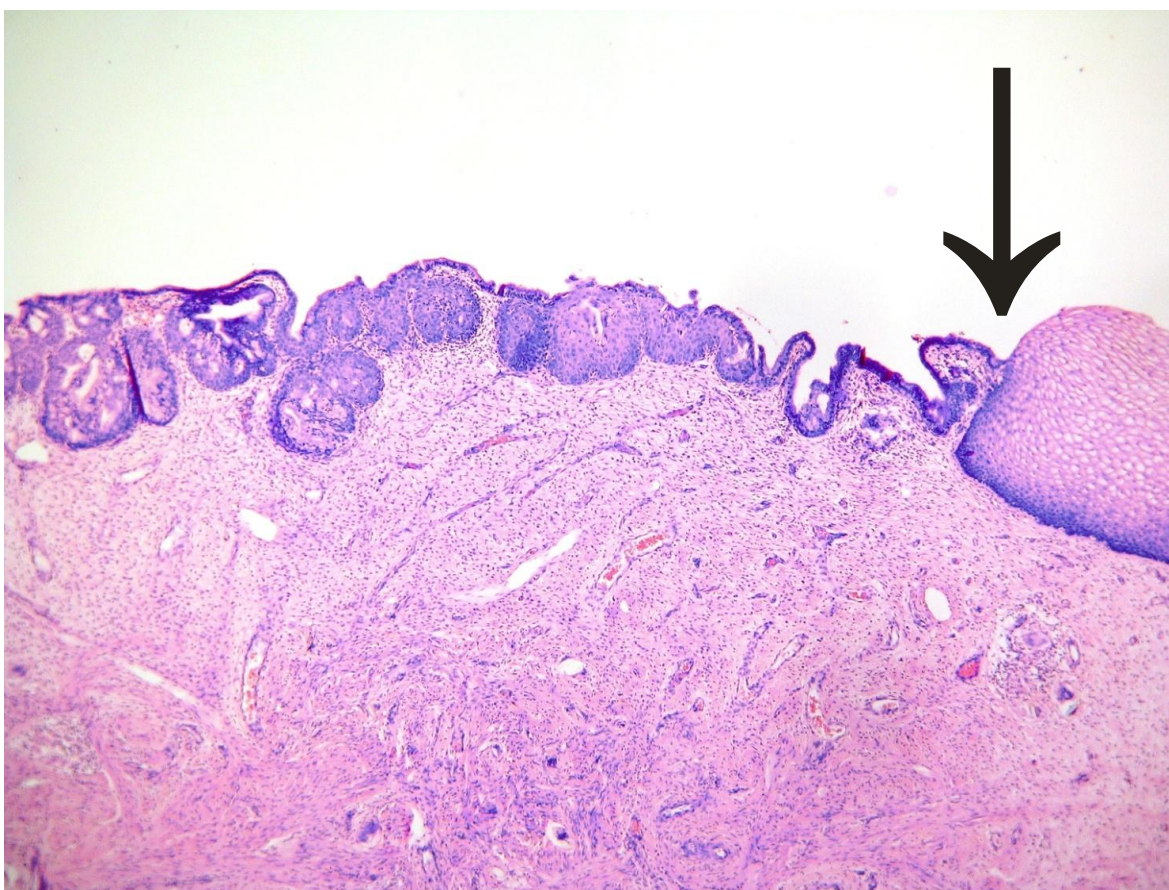
### **1.5. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy (CIN) - rzeczywisty stan przedrakowy.**

Histologicznie w obrębie szyjki macicy występują dwa typy nabłonka; wielowarstwowy płaski, nierogowaciejący oraz gruczołowy. Nabłonek wielowarstwowy płaski w obrębie tarczy szyjki macicy i pochwy zbudowany jest z czterech warstw<sup>36</sup>:

- warstwy podstawnej, zbudowanej z pojedynczego rzędu komórek niedojrzałych, charakteryzujących się obszernym jądrem komórkowym i ubogą cytoplazmą,
- warstwy przypodstawnej, składającej się z dwóch do czterech rzędów komórek niedojrzałych z cechami prawidłowej mitozy,
- warstwy pośredniej, zbudowanej z czterech do sześciu rzędów komórek, z bogatą cytoplazmą, połączonych mostkami międzykomórkowymi zbudowanymi z glikogenu,

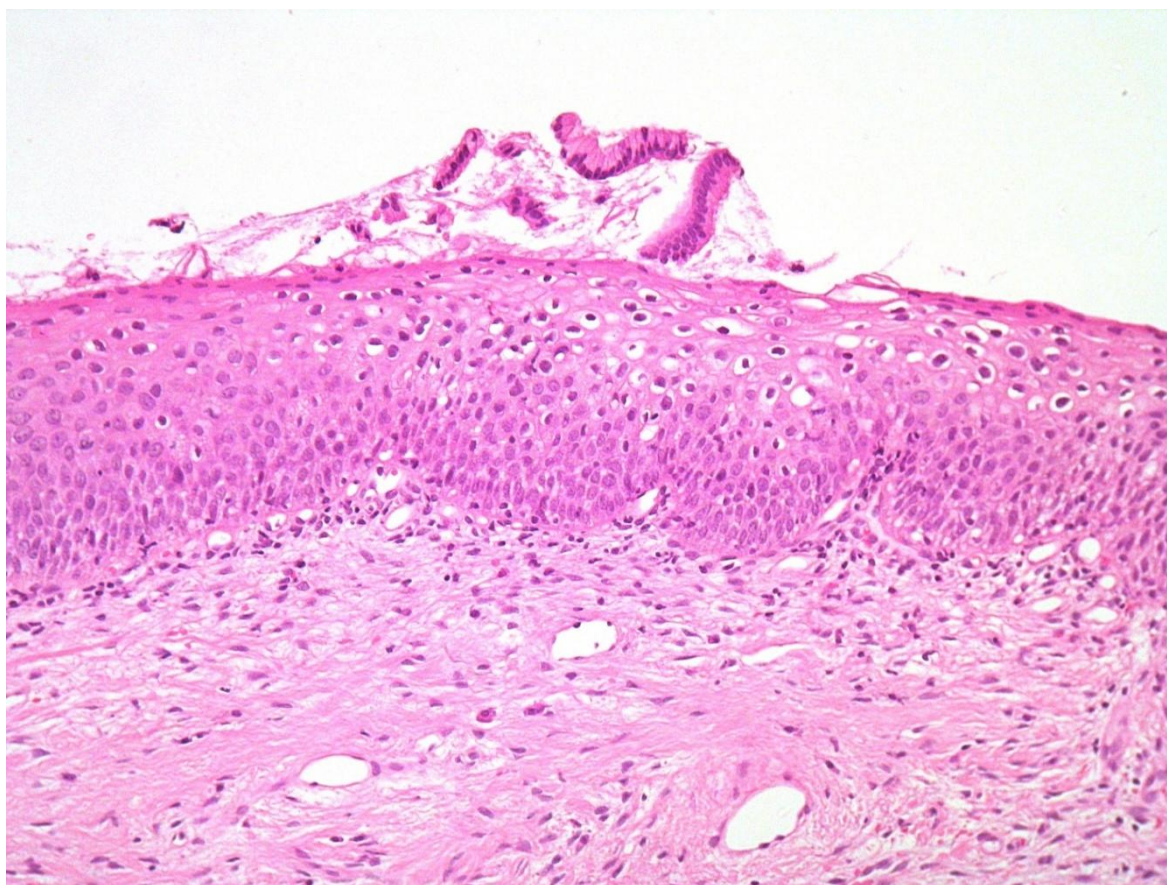
- warstwy powierzchniowej zbudowanej z pięciu do ośmiu warstw komórek o pyknotycznym jądrze i cytoplazmie wypełnionej glikogenem. Komórki te ulegają stopniowemu złuszczeniu.

Przejście nabłonka wielowarstwowego płaskiego w gruczołowy nazywamy strefą przekształceń (zona transformata) (Fotografia 1). Jej lokalizacja anatomiczna w obrębie ujścia zewnętrznego kanału szyjki macicy zmienia się, w zależności od dojrzałości płciowej i gospodarki hormonalnej. Równowaga pomiędzy obu typami nabłonków w obrębie granicy ich zetknięcia może ulegać zaburzeniu. Może to prowadzić do rozwoju ektopii gruczołowej czyli nadmiernej ekspozycji nabłonka gruczołowego. Często obserwowany w strefie przekształceń proces zastępowania nabłonka gruczołowego nabłonkiem wielowarstwowym nazywamy metaplazją. W obrębie strefy przekształceń powstaje ponad 95% zmian śródnabłonkowych i raków inwazyjnych szyjki macicy.



**Fotografia 1. Strefa przekształceń (zona transformata) – połączenie nabłonka gruczołowego i wielowarstwowego płaskiego w obrębie szyjki macicy. - (prof. H. Kędzia, Pracownia Patomorfologiczna GPSK UM Poznań).**

Pojęcie przedinwazyjnego raka szyjki macicy zostało po raz pierwszy wprowadzone w roku 1947, kiedy zaobserwowano, iż zmiany śródnabłonkowe mogą przybierać charakter raka nieprzekraczającego błony podstawnej.<sup>37</sup> Dalsze obserwacje Koss i współpracowników potwierdziły, że tego typu zmiany, nieleczone mogą ulegać progresji do raka inwazyjnego.<sup>38</sup> Przez wiele lat stan przednowotworowy szyjki macicy określano mianem dysplazji. Termin dysplazja oznaczał nieprawidłowy proces dojrzewania komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego. W roku 1968 Richard wprowadził pojęcie śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy (cervical intraepithelial neoplasia - CIN ). Autor ten wysunął także hipotezę, że wszystkie dysplazje nazywane odtąd neoplazjami niosą potencjalne ryzyko rozwoju raka.<sup>39</sup>



**Fotografia 2. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy małego stopnia – CIN 1 - (prof. H. Kędzia, Pracownia Patomorfologiczna GPSK UM Poznań).**

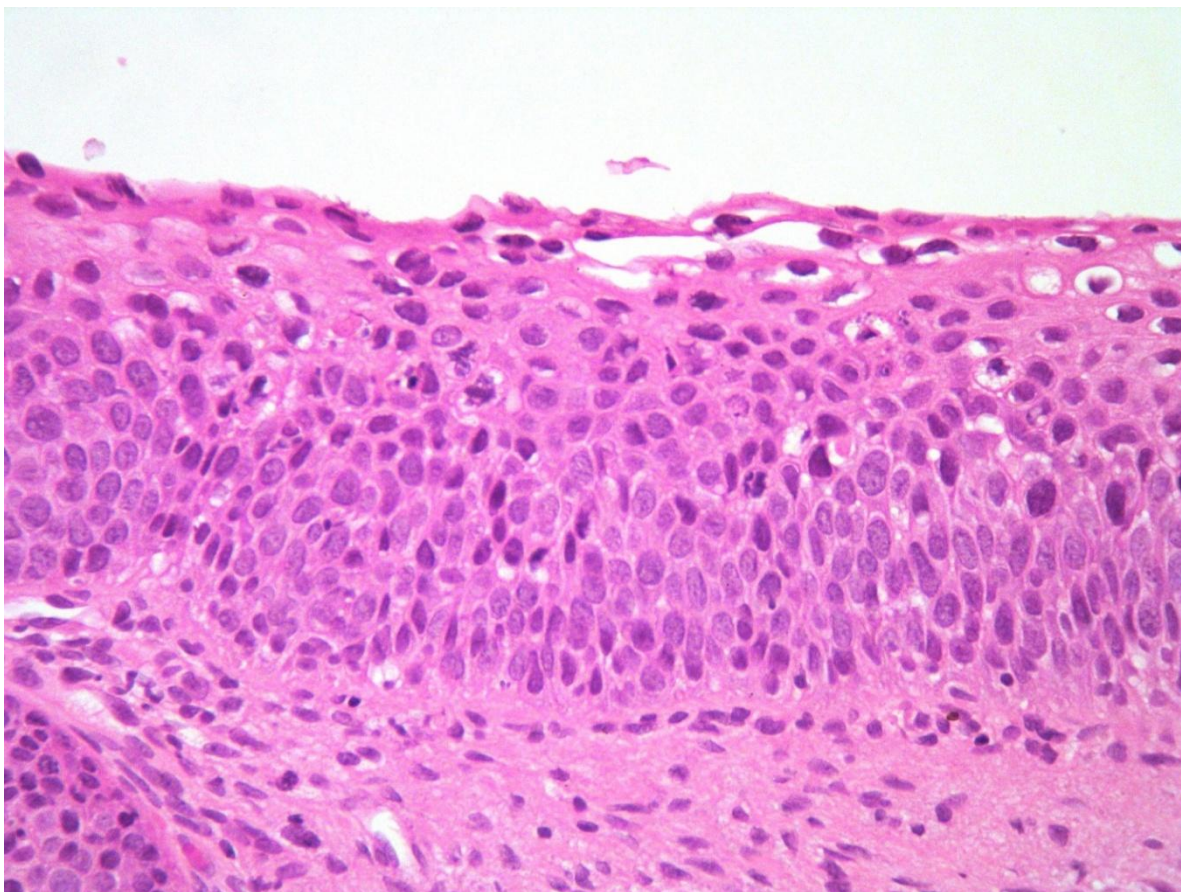
Śródnabłonkową neoplazję cechuje:

- niedojrzałość komórek,
- zwiększona aktywność mitotyczna,

- atypia jądra komórkowego,
- zaburzenia architektониki wewnątrzkomórkowej oraz pozakomórkowej.

Wyróżniamy trzy stopnie śródnabłonkowej neoplazji: mały, średni i duży (odpowiednio CIN 1, CIN 2, CIN 3).

Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy małego stopnia charakteryzuje się brakiem cech dojrzwania komórek w 1/3 dolnej nabłonka oraz obecnością pojedynczych mitoz (Fotografia 2). Warstwy górne nabłonka podlegają prawidłowemu procesowi dojrzwania. Atypia jądrowa niskiego stopnia dotyczy całej grubości nabłonka. W warstwach powierzchniowych występuje koilocytoza.<sup>40</sup>



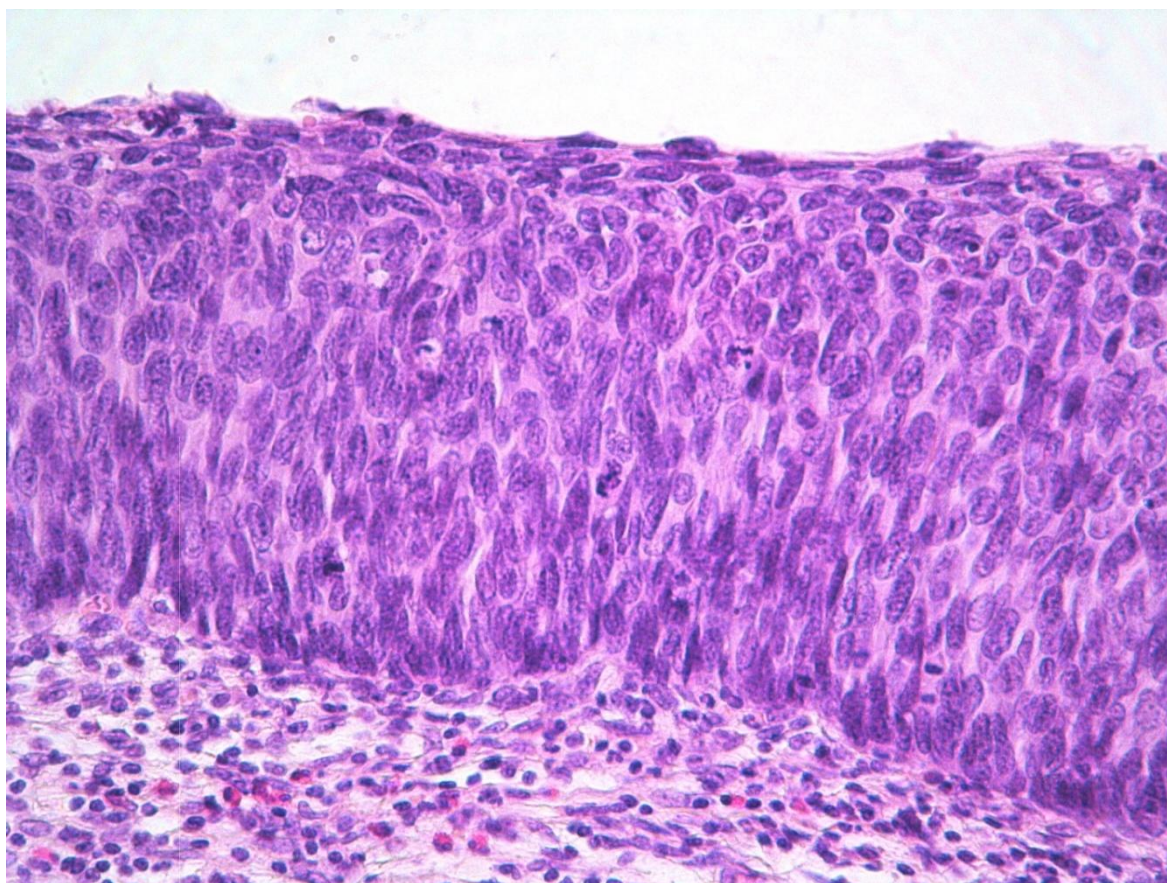
**Fotografia 3. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy średniego stopnia – CIN 2 -**  
(prof. H. Kędzia, Pracownia Patomorfologiczna GPSK UM Poznań).

Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy średniego stopnia dotyczy 2/3 dolnych nabłonka (Fotografia 3). Proces prawidłowego dojrzwania komórek u kobiet z CIN 2 występuje tylko w 1/3 górnej zmienionego nabłonka szyjki macicy. Atypia dotyczy całej

grubości nabłonka. W obrębie 2/3 dolnych nabłonka mogą być widoczne nieprawidłowe podziały komórkowe.

W śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy dużego stopnia – CIN 3 obserwuje się brak dojrzewania, atypię oraz obraz nieprawidłowych podziałów mitotycznych, które dotyczą całego przekroju nabłonka wielowarstwowego płaskiego (Fotografia 4).

Neoplazja szyjki macicy dużego stopnia CIN 3 obejmuje również pojęcie raka przedinwazyjnego szyjki macicy CIS (carcinoma in situ).



**Fotografia 4. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy dużego stopnia – CIN 3** - (prof. H. Kędzia, Pracownia Patomorfologiczna GPSK UM Poznań).

Proces tworzenia śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy może trwać wiele lat. Średnio szacuje się, że od zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego do powstania CIN 3 upływa od 8 - 10 lat. Kolejnie 3 do 5 lat upływa, aby w wyniku progresji na podłożu neoplazji powstał rak szyjki macicy. Śródnabłonkowa neoplazja małego stopnia – CIN 1, często jest konsekwencją incydentalnego, przejściowego zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego. Stąd też około 80% zmian tego typu ulega samoistnej regresji w czasie kilku



miesiący. Przetrwale zakażenie HPV wywołane typem onkogennym wirusa rokuje źle i może prowadzić do rozwoju śródnabłonkowej neoplazji średniego lub dużego stopnia, a w dalszej konsekwencji do raka szyjki macicy.

### **1.6. Wirus Brodawczaka Ludzkiego – HPV.**

Wirus brodawczaka ludzkiego – HPV (human papillomavirus) należy do rodziny Papillomaviridae. Średnica tego niewielkiego wirusa wynosi 55 nm. Cząsteczkę wirusa HPV tworzy nieosłonięty wirion o charakterystycznej ikosaedralnej symetrii. Dwuniciowy kolisty fragment DNA, składający się z około 8 tys par zasad stanowi materiał genetyczny wirusa. W genomie wirusa wyróżniamy trzy regiony:

- region LCR (long control region) – region niekodujący białek wirusowych,
- region E (early) – region odpowiedzialny za kodowanie białek wczesnych, pełniących funkcje transformujące i regulacyjne. Białka te ulegają ekspresji we wczesnych fazach cyklu wirusa brodawczaka ludzkiego,
- region L (late) – region odpowiedzialny za powstanie białek strukturalnych, tworzących kapsyd.<sup>41</sup>

Cechą specyficzną wirusa brodawczaka ludzkiego jest jego tropizm do komórek nabłonkowych skóry, narządów rodnych, przewodu pokarmowego, oddechowego oraz moczowego. Wirusy te zawsze wnikają do komórek warstwy podstawnej, natomiast pełen cykl życiowy wirusa zachodzi w warstwach różnicujących się keratynocytów.<sup>42</sup>

Dotychczas zidentyfikowano ponad 200 typów HPV. Ponad 50 typów tego wirusa należy do tak zwanej podgrupy  $\alpha$ , charakteryzującej się szczególnym tropizmem do nabłonka szyjki macicy. Wśród wirusów wchodzących w skład podgrupy  $\alpha$  możemy wyróżnić HPV o wysokim i niskim potencjale onkogennym. Do tych pierwszych zaliczamy między innymi HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33 oraz HPV 45. Za nisko onkogenne uznajemy HPV 6 i HPV 11. Podtypy należące do podgrup  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$  i  $\nu$  bardzo rzadko prowadzą do inicjacji procesu karcinogenezy.

### **1.7. Cykl życiowy wirusa HPV i inicjacja karcinogenezy.**

Wrotami zakażenia są mikrourazy błony śluzowej odsłaniające głębokie warstwy błony śluzowej nabłonka. Komórki tych warstw bogate są w  $\alpha$  i  $\beta$  integryny uznawane za receptory dla HPV. W komórce gospodarza wirus pozostaje początkowo w formie

episomalnej. W czasie procesu dojrzewania i różnicowania poszczególnych komórek nabłonka dochodzi do aktywacji promotora genów wczesnych, w tym onkogenów E6 i E7. Proces ekspresji tych genów jest kontrolowany przez inne białka wirusowe E1 i E2. Onkoproteiny E6 i E7 razem z pozostałymi regulatorami cyklu komórkowego promują fazę S cyklu komórkowego. Wirusowe białko E6 prowadzi do inaktywacji komórkowego białka supresorowego p53 oraz oddziałuje na białka proapoptotyczne BAX i BCL. Białko E7 razem z drugim supresorem pRB uaktywnia czynnik E2F z kompleksu pRB:E2F. To białko może także oddziaływać na inne stymulatory procesu proliferacji komórek. W magazynowaniu i uwalnianiu cząstek wirusowych udział biorą białka E2 i E4.<sup>43</sup> Proces życiowy wirusa kończy się w warstwach powierzchniowych nabłonka, gdzie genom i kapsyd zbudowany z białek wirusowych L1 i L2 łączą się w jedną całość.<sup>44</sup> Warstwa przypodstawna nabłonka wielowarstwowego płaskiego charakteryzuje się dużą ekspresją białek E6 i E7. W warstwach środkowych zaznacza się ekspresja białka E4 i wirusowego DNA. Warstwę powierzchniową nabłonka płaskiego charakteryzuje duża ekspresja białek strukturalnych L1 i L2.<sup>45</sup>

W cyklu życiowym wirusa brodawczaka ludzkiego wyróżniamy następujące stadia:

- stadium utajone, bez objawów klinicznych, co powoduje, że identyfikacja infekcji HPV możliwa jest jedynie w oparciu o diagnostykę molekularną,
- stadium subkliniczne rozpoznawane na podstawie charakterystycznych obrazów cytologicznych i kolposkopowych,
- stadium kliniczne rozpoznawane na podstawie swoistych zmian makroskopowych, takich jak kłykciny kończyste, rzadziej płaskie.

Replikacja HPV zależna jest od podziałów zakażonych komórek. Do ekspresji genów wczesnych dochodzi w warstwach powierzchniowych nabłonka, natomiast białkowe produkty genów późnych identyfikowane są w wyższych warstwach błony śluzowej. Komórki powierzchniowe, które ulegają procesowi eksfoliacji nie podlegają podziałom i zawierają już w pełni wykształcone wiriony.<sup>46</sup> Proces transformacji nowotworowej zaczyna się w momencie integracji DNA HPV z genomem prawidłowej komórki nabłonka. Jest to możliwe gdy dochodzi do pęknięcia kolistej formy DNA HPV oraz do przesunięcia chromatyny w obrębie DNA chromosomalnego komórek gospodarza. Koliste DNA wirusowe ulega rozejściu na pograniczu regionu genów kodujących białka E1 i E2.<sup>47</sup>

### 1.8. Profilaktyka raka szyjki macicy.

Głównym celem programów profilaktycznych w onkologii jest obniżenie wskaźników zachorowalności i śmiertelności na określoną jednostkę chorobową. Rozróżniamy profilaktykę: pierwotną (pierwszorzędową) oraz wtórną (drugorzędową).

Profilaktyka pierwotna polega na ograniczeniu ekspozycji na znane czynniki ryzyka rozwoju określonego schorzenia. W przypadku raka szyjki macicy polega na identyfikacji oraz eliminacji głównych i prawdopodobnych czynników ryzyka oraz szczepieniach przeciwko onkogennym typom wirusa brodawczaka ludzkiego.

Rozpoznanie cytologiczne według Papanicolaou	Obraz cytologiczny
I <sup>o</sup>	Obecne prawidłowe komórki warstwy powierzchniowej i pośredniej, pojedyncze leukocyty.
II <sup>o</sup>	Obecne prawidłowe komórki warstwy powierzchniowej i pośredniej, obecne komórki gruczołowe, metaplastyczne, obecna flora bakteryjna, leukocyty, histiocyty.
III <sup>o</sup>	Obecne komórki dysplastyczne.
IV <sup>o</sup>	Obecne komórki dysplastyczne oraz pojedyncze komórki nowotworowe.
V <sup>o</sup>	Liczne komórki nowotworowe, liczne leukocyty oraz erytrocyty.

**Tabela 2. Klasyfikacja rozmazów cytologicznych według Papanicolaou.**

Profilaktyka wtórna polega na procesie wykrywania wczesnych zmian o charakterze przednowotworowym, czyli śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy typu CIN 1, CIN 2, CIN 3 oraz wczesnych postaci raka szyjki macicy. Głównym narzędziem profilaktyki wtórnej jest test przesiewowy. Przydatność profilaktyczną i efektywność testu

diagnostycznego ocenia się przez jego: czułość, swoistość oraz dodatnią i ujemną wartość predykcyjną. Metoda testu przesiewowego musi być zaakceptowana zarówno przez badanego, jak i badającego. Badanie przesiewowe powinno być niebolesne, proste, nieinwazyjne, tanie, powtarzalne i łatwe do przeprowadzenia.

Obecnie wciąż, jedynym powszechnie akceptowanym i stosowanym testem przesiewowym w programach profilaktyki wtórnej raka szyjki macicy jest badanie cytologiczne.<sup>48</sup> Można je wykonać w sposób konwencjonalny poprzez pobranie i przeniesienie złuszczonych komórek nabłonka płaskiego i gruczołowego szyjki macicy na szkiełko podstawowe, lub z wykorzystaniem modyfikacji polegającej na wykorzystaniu podłoża płynnego – LBC (liquid base cytology). Aktualnie zalecaną przez Polskie Towarzystwo Ginekologiczne klasyfikacją oceny preparatów cytologicznych jest wprowadzony w 1988 roku system TBS (The Bethesda System). W porównaniu do klasyfikacji Papanicolaou system TBS charakteryzuje opisowe przedstawienie wykrytych zmian. Umożliwia to podział rozpoznań cytologicznych wskazujących na obecność neoplazji od rozpoznań związanych ze stanami zapalnymi, atrofią lub innymi schorzeniami niezwiązanymi z podejrzeniem istnienia zmian przednowotworowych czy raka.

Wprowadzona przez Papanicolaou i Koprowską w 1954 roku klasyfikacja oceny wymazów cytologicznych (Tabela 2), umożliwiła wdrożenie masowych, populacyjnych, aktywnych badań przesiewowych opartych o pobieranie wymazów cytologicznych.<sup>49 50</sup> Doprowadziło to do 50% obniżenia zachorowalności oraz 70% spadku umieralności na raka szyjki macicy w krajach realizujących masowe programy profilaktycznych badań cytologicznych.

W 1988 roku wprowadzono nowy system oceny rozmazów cytologicznych – The Bethesda System (TBS), który dzięki swojemu opisowemu charakterowi umożliwił między innymi, zbliżenie rozpoznań cytologicznych do odpowiadającym im stopniom zaawansowania CIN oraz zmniejszenie liczby wyników fałszywie negatywnych i pozytywnych. Jednak, pomimo wprowadzenia klasyfikacji TBS wraz z ostatnimi modyfikacjami, czułość i swoistość oceny wymazu cytologicznego użytego do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy nie przekracza w najlepszych pracowniach cytodiagnostycznych odpowiednio 75% i 80%.

Do nieprawidłowych rozpoznań cytologicznych w systemie TBS zaliczamy:

- ASC (atypical squamous cells) – atypowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego. W obrębie rozpoznania cytologicznego ASC wyróżniamy: ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) – atypowe komórki nabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu oraz ASC-H (atypical squamous cells, cannot exclude HSIL) – atypowe komórki nabłonkowe, nie można wykluczyć zmian typu HSIL,

- LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion) – zmiany niskiego stopnia w komórkach nabłonka płaskiego,

- HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion) – zmiany wysokiego stopnia w komórkach nabłonka płaskiego,

- AGUS (atypical glandular cells of undetermined significance) - atypowe komórki gruczołowe o nieokreślonym znaczeniu,

- rozpoznanie cytologiczne raka płaskonabłonkowego oraz raka gruczołowego.

W zależności od rozpoznania cytologicznego diagnostykę należy rozszerzyć o ponowne pobranie wymazu cytologicznego, badanie molekularne na obecność DNA onkogennych typów wirusa HPV, kolposkopię i pobranie celowanych wycinków do badania histopatologicznego.

Do dziś nierozwiązaną ułomnością cytodiagnostyki użytej do wykrywania CIN i raka szyjki macicy jest wysoki odsetek wyników fałszywie negatywnych wynoszący:

- dla zmian typu HSIL 4,6%,

- dla raka płaskonabłonkowego 3,3%,

- dla raka gruczołowego 8,9%,

- dla raka gruczołowego „in situ” 11,7%.<sup>51</sup>

Niska czułość pojedynczego badania cytologicznego oraz stosunkowo wysoki odsetek wyników fałszywie ujemnych jest bezpośrednim powodem kontynuowania poszukiwań nowych metod diagnostycznych służących do wykrywania CIN w masowych badaniach profilaktycznych.

### 1.9. Nowe metody badań przesiewowych profilaktyki raka szyjki macicy.

Zastosowanie metod molekularnych do identyfikacji DNA onkogennych typów HPV umożliwiło kwalifikację kobiet do grupy wysokiego ryzyka rozwoju śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Diagnostyka molekularna oparta o łańcuchową reakcję polimerazy (PCR) umożliwia detekcję materiału genetycznego 13 onkogennych typów wirusa HPV i charakteryzuje się bardzo wysoką czułością, ale zarazem niską swoistością. Reakcje PCR po raz pierwszy opisał Mullis w 1983 roku.<sup>52</sup> Niezadawalająca swoistość powoduje, że molekularna detekcja DNA HPV HR nie może być zastosowana jako metoda przesiewowa. Test Amplicor PCR (Roche Diagnostics) służący do wykrywania 13 typów DNA HPV HR oparty jest na czterech głównych procesach: przygotowaniu próbki, amplifikacji docelowego materiału DNA dzięki zastosowaniu swoistych primerów, hybrydyzacji z zastosowaniem sond oligonukleotydowych oraz detekcji produktów amplifikacji w drodze reakcji barwnej.<sup>53</sup> Granica wykrywalności wirusa testem zależy od liczby kopii wirusa w 1 ml buforu. Czułość wykrywania wszystkich typów onkogennych wynosi 100% dla co najmniej 480 kopii wirusa na 1 ml. Drugim testem molekularnym służącym do identyfikacji DNA HPV HR o wysokim wskaźniku powtarzalności wyników jest metoda HYBRYD CAPTURE II.

Odkryciem ostatnich lat jest zastosowanie metod molekularnych wykrywających transkrypty mRNA wirusów HPV HR, co umożliwia identyfikację pacjentek z przetrwałym zakażeniem wirusowym, u których rozpoczął się proces inkorporacji DNA wirusa w materiał genetyczny komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego lub gruczołowego szyjki macicy. Ta metoda charakteryzuje się bardzo wysoką czułością i swoistością wynoszącą odpowiednio 98% i 85%. Niedogodnością tego typu diagnostyki jest konieczność stworzenia dobrze wyposażonego laboratorium biologii molekularnej, wyszkolenia kadry biologów molekularnych oraz wysoki koszt pojedynczego badania. Aktualnie stosowane komercyjne testy ukierunkowane na wykrycie mRNA HPV pozwalają diagnozować infekcję wirusową wywołaną tylko przez 5 typów DNA HPV HR: 16, 18, 31, 33 i 45.

Pomimo rozwoju technik molekularnej detekcji DNA HPV HR i mRNA HPV HR ciągle aktualny jest postulat zwiększenia czułości i swoistości poszczególnych narzędzi diagnostycznych w wykrywaniu zmian patologicznych szyjki macicy. Idealna metoda wykrywcza, powinna charakteryzować się wysoką czułością i swoistością badania zbliżoną maksymalnie do wartości 100%. Takie narzędzie diagnostyczne powinno gwarantować

pewne wykrycie zmiany o charakterze śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy u kobiet rzeczywiście chorych. Prawidłowy wynik badania, charakteryzujący się swoistością zbliżoną do 100% pozwoliłby na znaczące wydłużenie odstępów między kolejnymi badaniami kontrolnymi bez ryzyka rozwoju CIN. Dysponowanie testem obdarzonym wysokimi wartościami czułości i swoistości oznaczałoby w efekcie znaczące oszczędności nakładów przeznaczanych na realizację badań profilaktycznych. Oszczędności te wynikałyby bezpośrednio z redukcji liczby kontroli i obniżonego odsetka błędnych wyników diagnostycznych. Weryfikacja fałszywie pozytywnych rozpoznań cytologicznych stanowi dzisiaj znaczny odsetek wykonywanych obecnie kolposkopii i biopsji pobieranych z miejsc podejrzanych. Populacyjne zastosowanie metody diagnostycznej o 100% czułości i swoistości doprowadziłoby do dalszego, znaczącego obniżenia zachorowalności i umieralności na raka szyjki macicy, przy jednoczesnym zmniejszeniu aktualnych nakładów finansowych ponoszonych przez budżet państwa przy realizacji profilaktyki.

Nowe narzędzia diagnostyczne powinny umożliwić precyzyjniejszą identyfikację nie tylko pacjentek z grup podwyższonego ryzyka rozwoju CIN w przyszłości, ale również wykryć pacjentki z obecną już neoplazją niskiego, a przede wszystkim średniego i wysokiego stopnia.

W zakresie badań nad pewną identyfikacją CIN poszukuje się metod tanich, powtarzalnych i nieinwazyjnych, które w trakcie pojedynczej wizyty kontrolnej pozwolą lekarzowi na jednoczesowe wykrycie patologii oraz rozszerzenie procesu diagnostycznego. Takich rozwiązań potrzebują przede wszystkim kraje rozwijające się, gdzie dostęp do lekarza pierwszego kontaktu jest znacznie utrudniony, a ponadto brak jest pracowni cytodiagnostycznych i odpowiednio wykwalifikowanego personelu medycznego. W wielu miejscach na świecie kobiety mają ograniczony dostęp do lekarza ginekologa. Z tego też powodu poszukuje się metod diagnostycznych umożliwiających otrzymanie wyniku badania przesiewowego wykrywającego CIN w czasie rzeczywistym („real time device”), które w trakcie pojedynczej, często jedynej w życiu wizyty umożliwią natychmiastowe podjęcie dalszej diagnostyki czyli biopsji miejsc podejrzanych.

Możliwość otrzymywania wyniku w czasie rzeczywistym, nie tylko przyspieszy postawienie ostatecznego rozpoznania, ale również podjęcie terapii. Zmniejszenie liczby wizyt kontrolnych umożliwi jednocześnie redukcję w sposób znaczący kosztów

diagnostyki i pośrednio kosztów terapii. Oparcie profilaktyki raka szyjki macicy o narzędzia wykrywcze generujące wynik w trakcie badania spowoduje, że czas od pierwszej wizyty do wyleczenia może ulec nawet czterokrotnemu skróceniu. W niektórych przypadkach może mieć to decydujący wpływ na ostateczną kwalifikację stopnia zaawansowania zmiany i rokowanie.

Bardzo obiecującą koncepcję stanowi zastosowanie do badań profilaktycznych diagnostyki biofizycznej wykorzystującej analizę komputerową danych i sieci neuronowe, co ma umożliwić w znacznym stopniu eliminację błędów ludzkich i wprowadzić automatyzację procesu badań przesiewowych. Każdy wynik uzyskany w oparciu o metody biofizyczne można poddać bieżącej analizie i zarchiwizować, a także porównać z określonym algorytmem danych. Dysponując obiektywną i powtarzalną metodą diagnostyczną można tworzyć algorytmy dotyczące poszczególnych populacji w zależności od płci, rasy oraz pochodzenia. Informatyzacja profilaktyki ułatwiłaby w znaczący sposób możliwość konsultacji trudnych klinicznie przypadków.

Dziedziną, która bardzo dynamicznie wkracza w profilaktykę i diagnostykę śródnamionkowej neoplazji szyjki macicy jest biofizyka. Metody biofizyczne nie są obciążone tak wysokim, jak cytodiagnostyka odsetkiem wyników fałszywie dodatnich i ujemnych, wynikających często z błędu ludzkiego. Wykorzystanie diagnostyki biofizycznej do wykrywania CIN pozwala na wdrożenie pełnej automatyzacji badania i jego archiwizację. Zaawansowana technologicznie metodyka umożliwia nie tylko eliminację błędu ludzkiego, ale również dąży do ograniczenia konieczności skomplikowanego, kosztownego i czasochłonnego szkolenia oraz ciągłego podnoszenia kwalifikacji na rzecz wykorzystania nowoczesnej aparatury badawczej, obdarzonej dużą czułością i swoistością w wykrywaniu CIN.

W tabeli 3 przedstawiono charakterystykę siedmiu nowych, aktualnie poddawanych badaniom klinicznym systemów biofizycznych służących do wykrywania śródnamionkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy. Przedstawiona aparatura badawcza reprezentuje współczesne koncepcje wykorzystujące techniki biofizyczne do wykrywania patologii szyjki macicy. Wspólnym mianownikiem poszczególnych, prezentowanych w tabeli 3, systemów diagnostycznych jest oparcie ich działania o co najmniej jedną z poniższych składowych:



- ocenę zbielenia po 3-5% kwasie octowym, aplikowanym na powierzchnię szyjki macicy,
- fluorescencję, powstającą po nałożeniu na powierzchnię szyjki fotouczulacza i poddaniu jej działaniu światła o określonej długości fali,
- pomiar przepływu ładunku elektrycznego przez nabłonek pokrywający szyjkę macicy,
- efekt bezpośredniego odbicia fali światła o określonej długości od powierzchni prawidłowego i patologicznie zmienionego nabłonka szyjki macicy,
- ocenę rozproszenia wstecznego fali światła o określonej długości przez nabłonek szyjki macicy.

Urządzenie „The University of Sheffield Device” ocenia impedancję, na którą składa się pojemność i oporność elektryczna nabłonka szyjki macicy.

Prototypowy system Cerviscan wykorzystuje technikę fluorescencji i spektroskopii. Urządzenie analizuje zjawisko fluorescencji i zmian parametrów odbitego światła po zetknięciu z prawidłowym i zmienionym nabłonkiem szyjki macicy po aplikacji roztworu kwasu octowego

Sonda Colpoprobe wykorzystuje laser fluorescencyjny w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Powyższa metoda wymaga aplikacji roztworu kwasu octowego.

Wielomodułowy hiperspektralny system obrazowy (MHI) oraz trójmodułowy system spektroskopowy (TMS) wykorzystuje fluorescencję tkankową, po aplikacji roztworu wodnego kwasu octowego na powierzchnię szyjki macicy.

System THE FORTH wykorzystuje światło białe w celu uzyskania obrazu szyjki w czasie 10 minut po aplikacji roztworu kwasu octowego. Urządzenie wykorzystuje przetwarzanie cyfrowe do wzmocnienia kontrastu obrazu wybielonego nabłonka oraz parametrów fali światła odbitego przez powierzchnię nabłonka.

Jedną z najbardziej obiecujących koncepcji wykorzystania optoelektroniki w programie profilaktyki raka szyjki macicy jest system diagnostyczny Truscreen.

SYSTEM DIAGNOSTYCZNY	A	B	C	D	E
TRUSCREEN	NIE	NIE	TAK	TAK	TAK
UNIVERSITY OF SHEFFIELD DEVICE <sup>54</sup>	NIE	NIE	NIE	NIE	TAK
CERVISCAN <sup>55</sup>	TAK	TAK	NIE	NIE	NIE
COLPOPROBE <sup>56</sup>	TAK	TAK	NIE	TAK	NIE
MHI SYSTEM <sup>57</sup>	TAK	TAK	TAK	NIE	NIE
TMS SYSTEM <sup>58</sup>	TAK	TAK	TAK	TAK	NIE
FORTH DEVICE <sup>59</sup>	TAK	NIE	NIE	TAK	NIE

**Tabela 3. Nowe narzędzia diagnostyczne do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy.**

A – aplikacja kwasu octowego,

B – fluorescencja,

C – efekt odbicia bezpośredniego fali światła,

D – rozproszenie wsteczne odbitej fali świetlnej,

E – pomiar zmiany impulsu elektrycznego.

### **1.10. Optoelektronika w diagnostyce śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy.**

Historia badań nad impedancją tkanek rozpoczęła się w 1926 roku, kiedy to Fricke i Morse analizowali przepływ ładunku elektrycznego przez guzy piersi <sup>60</sup>. W roku 1949 Langman i Burr stwierdzili znaczne różnice potencjałów elektrycznych przepływających przez zdrowe i patologicznie zmienione tkanki szyjki macicy <sup>61</sup>. Dopiero w 1990 roku

Coppleson zastosował metodę optoelektroniczną do wykrywania zmian patologicznych w obrębie szyjki macicy.

Omawiana metoda wykorzystuje następujące zjawiska optyczno-elektroniczne, które zachodzą, gdy powierzchnię szyjki macicy poddamy działaniu wiązki świetlnej i potencjałowi elektrycznemu o określonych, znanych parametrach:

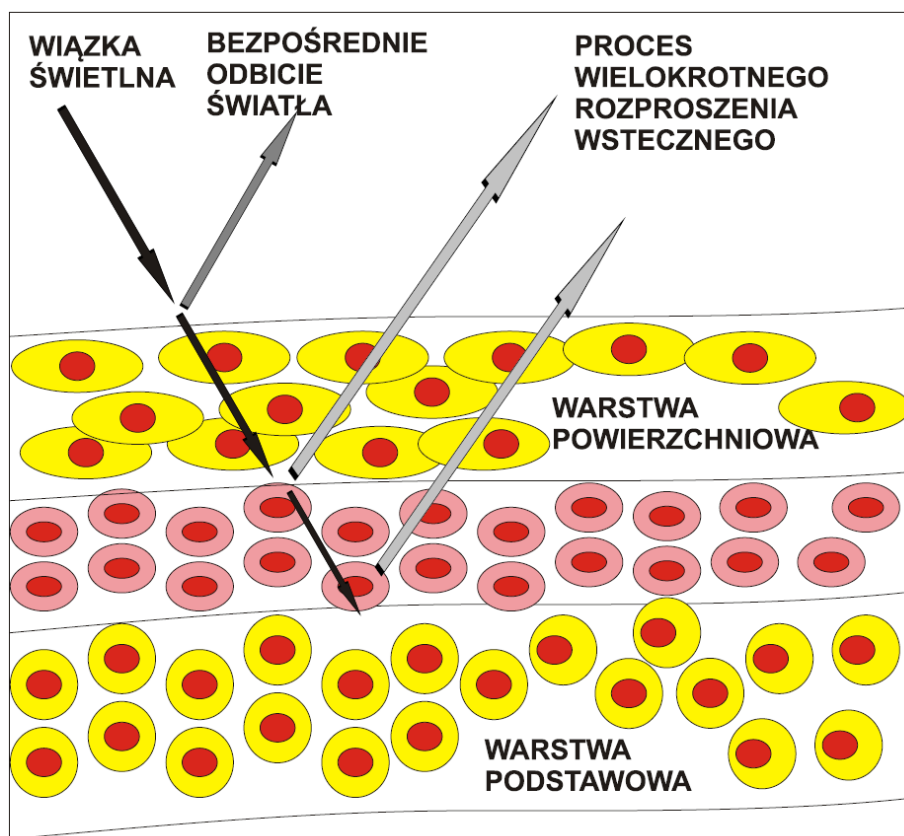
- bezpośrednie odbijanie fali światła o określonej długości fali,
- rozproszenie wsteczne fali światła o określonej długości fali,
- rozproszenie ładunku elektrycznego o znanym potencjale wejściowym.

Odbicie bezpośrednie fali światła o określonej długości zależy od współczynników załamania światła w powietrzu i tkance. Charakter odbicia informuje nas o topografii i strukturze powierzchni szyjki macicy, jak również o właściwościach powierzchniowych warstw nabłonka wielowarstwowego płaskiego i gruczołowego dystalnej części kanału szyjki macicy.

Większość padającej wiązki światła jest poddana wielokrotnemu rozproszeniu i wchłonięciu w tkance (Rycina 1). Powtarzalny proces rozproszenia fali światła dostarcza informacji o strukturze analizowanych tkanek, ich unaczynieniu, jak również komórek, z których są zbudowane. Cechy, takie jak natężenie oraz rozmieszczenie przestrzenne reemitowanego, odbitego światła różnią się w przypadku prawidłowej i patologicznie zmienionej tkanki. Badanie polegające na odbijaniu fali światła i jej rozproszeniu wstecznym przy zastosowaniu tych samych parametrów długości fali jest powtarzalne i przewidywalne, a zmiany uzyskiwanych parametrów korelują ze stopniem patologii szyjki macicy.

Kształt krzywej przepływu impulsu elektrycznego oraz jego wartość po modyfikacji przez prawidłową i zmienioną błonę śluzową w czasie, zależy od następujących czynników:

- pojemności elektrycznej tkanki,
- oporności elektrycznej tkanki,
- częstości impulsów elektrycznych.



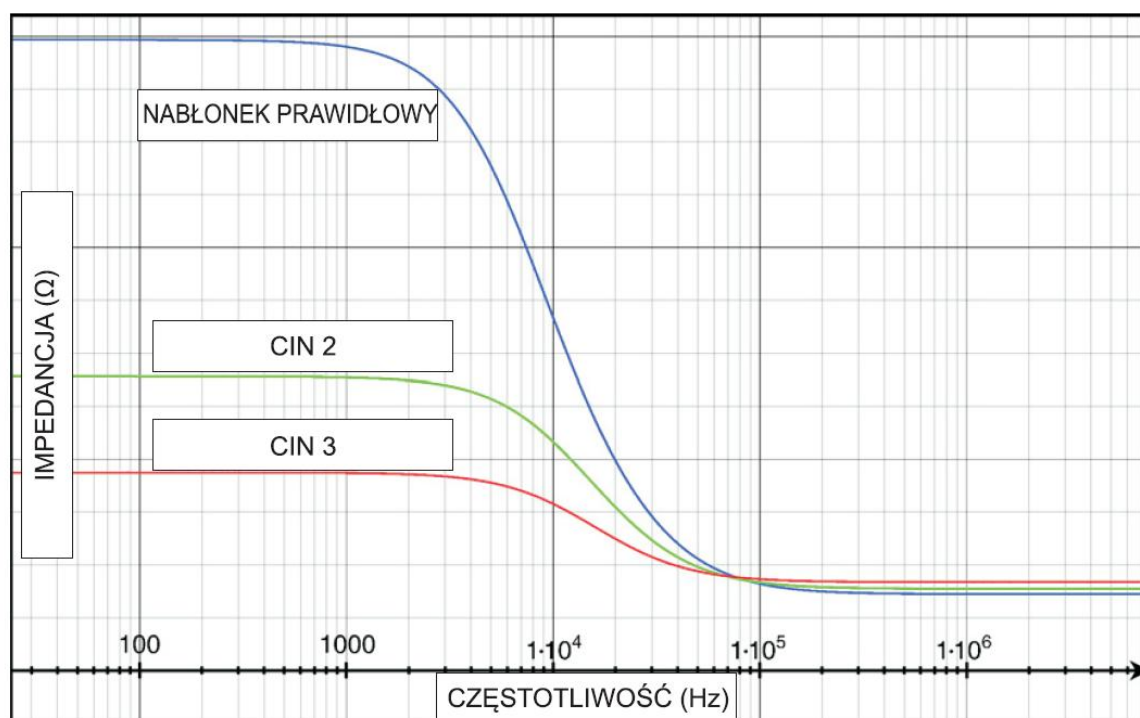
**Rycina 1. Schemat przechodzenia wiązki świetlnej przez nabłonek wielowarstwowy płaski szyjki macicy.**<sup>62</sup>

Charakterystyka parametrów elektrycznych tkanek zależy od własności poszczególnych typów komórek z jakich się składają i cech macierzy międzykomórkowej. Oceniając przewodnictwo elektryczne pojedynczej komórki należy ocenić właściwości elektryczne cytoplazmy, błony komórkowej i innych elementów morfotycznych.

Cytoplazma może być traktowana jako wielofazowy układ koloidalny złożony z różnorodnych cząsteczek rozpuszczonych. Wykazuje ona cechy złożonego elektrolitu, w którym jedne cząstki stanowią środowisko dyspersyjne, a inne fazę dyspersyjną. Przewodnictwo elektryczne zależy także od składu poszczególnych jonów w strukturze komórki oraz ich ruchliwości. Błona komórkowa dzięki warstwie lipidowej jest izolatorem elektrycznym, który w połączeniu z substancją wewnątrz i zewnątrzkomórkową pełni funkcje kondensatora. Pozostałe elementy morfotyczne komórki pełnią funkcję półprzewodników.

Efektywny opór tak złożonego układu nazywamy impedancją ( $Z$ ). Na impedancję elektryczną komórki składają się; rezystancja, czyli opór właściwy ( $R$ ) oraz reaktancja,

czyli opór pojemnościowy (C). Wartość impedancji jest odwrotnie proporcjonalna do częstotliwości prądu i pojemności elektrycznej układu. W organizmie ludzkim występują zarówno obwody w połączeniu szeregowym jak i równoległym. Z tego też powodu dla potrzeb analizy metody optoelektronicznej stosuje się matematyczne przekształcenie połączenia szeregowego na równoległe. W dość znacznym uproszczeniu można powiedzieć, iż impedancja bioelektryczna tkanki jest miarą połączonego oporu i przesunięcia prądu fazowego, który przejdzie przez tkankę prawidłową i patologicznie zmienioną.



**Rycina 2. Impedancja prawidłowego nabłonka wielowarstwowego płaskiego i śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy.<sup>63</sup>**

Każda biologiczna tkanka posiada swoją określoną rezystancję oraz reaktancję, która zależy od właściwości dielektrycznej poszczególnych składowych tej tkanki czyli komórek.<sup>64</sup> Prawidłowe tkanki w porównaniu do patologicznie zmienionych charakteryzują się inną wartością impedancji (Rycina 2).<sup>65</sup> Nabłonek wielowarstwowy płaski i gruczołowy szyjki macicy charakteryzuje się zupełnie odmiennym oporem efektywnym, w porównaniu do tkanki zmienionej zapalnie, metaplastycznie lub neoplastycznie.

Ocena struktury błony śluzowej za pomocą metody optoelektronicznej jest możliwa dzięki zastosowaniu optycznych sensorów rejestrujących różne długości fali światła

widzialnego i podczerwonego oraz elektrycznych biosensorów używanych do stymulacji nabłonka z częstotliwością 14 impulsów / sekundę. Aparatura optoelektroniczna mierzy powracającą, odbitą, rozproszoną wiązkę światła oraz odpowiedź elektryczną, czyli powracający impuls elektryczny zmodyfikowany przez tkankę prawidłową lub zmienioną patologicznie.

Informacja w postaci odbitej wiązki rozproszonego światła i powracającego impulsu elektrycznego jest filtrowana, szeregowana według porównywania ze wzorcem i analizowana komputerowo. Ostatecznym elementem analizy jest porównanie uzyskanego modelu charakterystycznego dla danej pacjentki ze wzorcem. Wzorzec jest zbiorem kluczowych parametrów uzyskanych od kobiet różnego pochodzenia, rasy, wieku, rodności itd.<sup>66</sup> Dane zebrane w bibliotece wzorca stanowią zbiór doświadczeń optoelektronicznych z badań przeprowadzonych u kobiet z różnego rodzaju patologią szyjki macicy, a w szczególności ze zmianami typu CIN i nowotworami wywodzącymi się z nabłonka wielowarstwowego płaskiego i gruczołowego. Dla każdej z tych „wzorcowych” kobiet opracowano swoisty „podpis optoelektroniczny” potwierdzony analizą kolposkopową, cytologiczną i histologiczną. Ocena optoelektroniczna nabłonka szyjki macicy uzyskana w czasie rzeczywistym jest obiektywna poprzez swoją automatyzację i pozwala uniknąć błędu ludzkiego tak charakterystycznego dla cytodiagnostyki.

Wynik badania optoelektronicznego, przy zastosowaniu urządzenia Truscreen klasyfikuje się jako prawidłowy, nieprawidłowy lub niediagnostyczny. Ilościową wartość uzyskanych parametrów badania optoelektronicznego wyraża dla każdego badania liczba pNOR (probability of normal) o zakresie od 0,0 do 1,0. Liczba pNOR określa prawdopodobieństwo występowania prawidłowego nabłonka płaskiego oraz gruczołowego szyjki macicy w oparciu o algorytm danych.

Potwierdzenie przydatności metody optoelektronicznej do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy w ramach masowych badań profilaktycznych może w znaczący sposób wpłynąć na zmianę złej sytuacji w zakresie wczesnego wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy.

## **2. Cele pracy.**

Ocena przydatności metody optoelektronicznej w wykrywaniu śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy.

### **2.1 Cele szczegółowe:**

1. Ocena czułości i swoistości metody optoelektronicznej użytej do wykrywania śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy.

2. Określenie zależności pomiędzy liczbą graniczną pNOR, a czułością i swoistością metody optoelektronicznej.

3. Porównanie czułości i swoistości metody optoelektronicznej użytej do wykrywania śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy w porównaniu do cytodiagnostyki, testu molekularnego na obecność DNA HPV HR oraz oceny kolposkopowej szyjki macicy.

### 3. Material.

Od sierpnia 2006 do grudnia 2008 roku przebadano 293 pacjentki w Klinice Onkologii Ginekologicznej oraz w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno - Położniczo Szpitala Klinicznego w Poznaniu (PPSM GPSK), które zgłosiły się z powodu nieprawidłowego wyniku badania cytologicznego. Za wynik nieprawidłowy w klasyfikacji Papanicolaou uznano IIIb, IV, V oraz powtarzające się co najmniej dwa razy rozpoznania cytologiczne IIIa. Dla systemu TBS, za wyniki nieprawidłowe uznawano następujące rozpoznania cytologiczne; ASC-US, LSIL, ASC-H, HSIL, AGUS, AGC oraz rak. Wszystkie pacjentki zakwalifikowane do badania były pełnoletnie, niekarmiące oraz nie będące w ciąży. Wiek chorych zamykał się między 18, a 81 rokiem życia. Na wykonanie badań otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu nr 178/04. Każda pacjentka wyraziła pisemną zgodę na przeprowadzenie badania. Przeprowadzone badania były prospektywne i zaślepione.



#### 4. Metodyka badań.

U pacjentek kierowanych do PPSM GPSK z powodu nieprawidłowego wyniku oceny wymazu cytologicznego, po uprzednim zebraniu wywiadu lekarskiego ukierunkowanego na przebyte schorzenia onkologiczne ze szczególnym uwzględnieniem CIN i raka szyjki macicy, informacji o wyniku poprzednich badań cytologicznych, obejmującego przeszłość położniczą, wiek pierwszej i ostatniej miesiączki, typ stosowanej antykoncepcji oraz palenie papierosów wykonano w następującej kolejności badania diagnostyczne:

- badanie metodą optoelektroniczną,
- powtórne pobranie wymazu cytologicznego i ocena według standardów obowiązujących w Programie Profilaktyki Raka Szyjki Macicy.
- pobranie wymazu w celu identyfikacji DNA HPV HR,
- badanie kolposkopowe,
- pobranie biopsji celowanej z miejsc zmienionych identyfikowanych w wyniku w/w metod oraz wykonanie abrazji diagnostycznej kanału szyjki macicy,
- przekazanie pobranego materiału do badania patomorfologicznego.

Odstępowano od diagnostyki optoelektronicznej w przypadku niemożliwości uwidocznienia całej powierzchni tarczy szyjki macicy, stwierdzenia zmian krwawiących i w obecności dużych torbieli Nabotha. Badania metodą optoelektroniczną nie wykonywano u pacjentek w ciąży, połogu, po radio i fototerapii oraz, u których w przeciągu 3 miesięcy wykonywano zabiegi operacyjne na szyjce (biopsja, konizacje itp.).

##### 4.1. Metoda optoelektroniczna.

Po uprzednio przeprowadzonym badaniu podmiotowym dokonywano oceny części pochwowej szyjki macicy we wziernikach.

W badaniu wykorzystano system diagnostyczny wykorzystujący metodę optoelektroniczną - Truscreen (Polartechnics) (Rycina 3).

W skład urządzenia wchodzi:

- konsola komputerowa,

- głowica wyposażona w biosensory optoelektroniczne,
- jednorazowe końcówki typu SUS oraz oprzyrządowanie dodatkowe.

Wykorzystywany w niniejszej pracy system diagnostyczny Truscreen opiera się na zastosowaniu optoelektronicznych biosensorów i analizy komputerowej.<sup>67 68</sup> Pozwala dokonać natychmiastowej oceny struktury nabłonka do granicy błony podstawnej, tym samym różnicując prawidłowy nabłonek od zmian in situ.

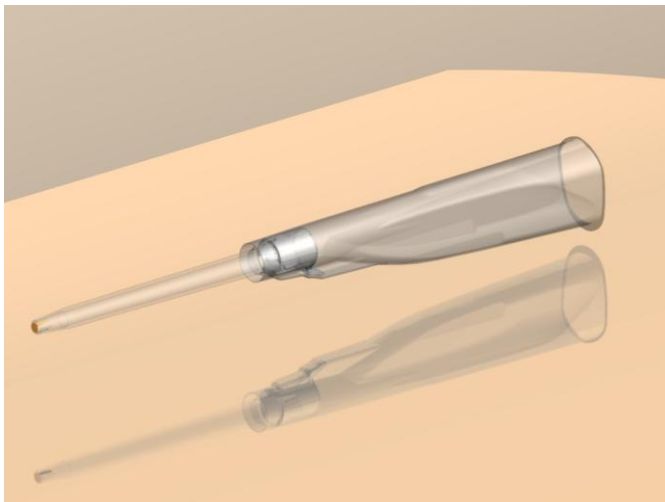
System interpretuje modyfikację parametrów emitowanej fali i impulsu elektrycznego, identyfikując 16 różnych fizjologicznych i patologicznych typów nabłonka wielowarstwowego płaskiego i gruczołowego tj. :<sup>69</sup>

- pierwotny nabłonek wielowarstwowy płaski nierogowaczący,
- nabłonek gruczołowy,
- nabłonek z cechami niedojrzałej metaplastji,
- nabłonek z cechami dojrzałej metaplastji,
- wtórny nabłonek wielowarstwowy płaski nierogowaczący,
- nabłonek atroficzny,
- torbiele Nabotha,
- nabłonek wielowarstwowy płaski z cechami infekcji HPV,
- rozrost polipowaty nabłonka gruczołowego,
- nabłonek wielowarstwowy płaski nierogowaczący pokrywający sklepienia pochwy,
- CIN 1,
- CIN 2,
- CIN 3,
- raka szyjki macicy.

A



B

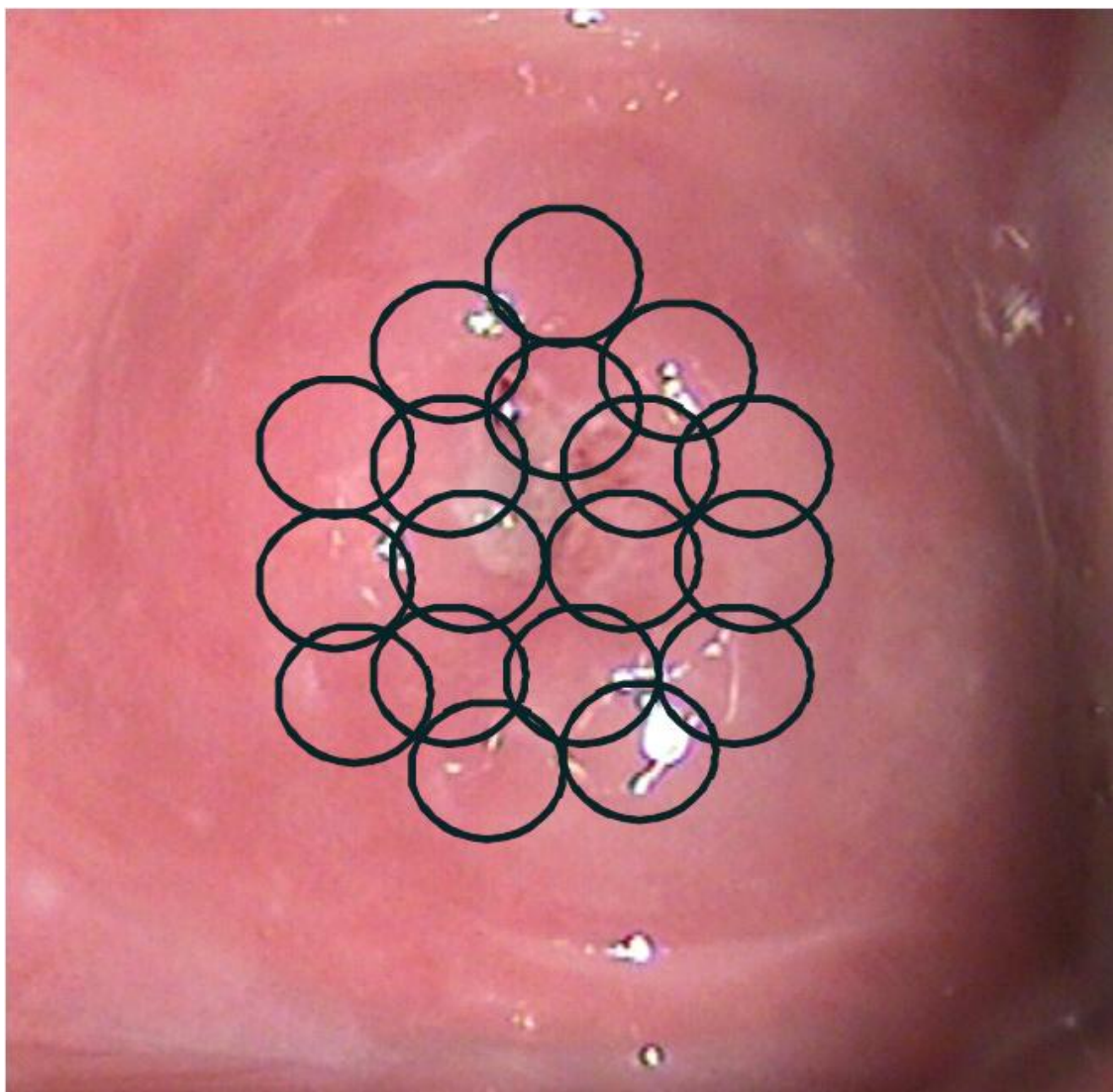


**Rycina 3. Urządzenie optoelektroniczne Truscreen (A) oraz jednorazowa końcówka typu SUS (B).**

Identyfikacja ta jest możliwa dzięki porównaniu uzyskanych wyników ze wzorcem. Wzorec jest zbiorem kluczowych parametrów uzyskanych od 3 000 badanych kobiet różnego pochodzenia, rasy, wieku, z prawidłowym i patologicznym nabłonkiem płaskim i gruczołowym szyjki macicy.

Technika wykonania badania jest prosta i szybka. Polega ona na precyzyjnym umieszczeniu końcówki aplikatora na szyjce macicy, w celu przeprowadzenia skanowania całej powierzchni nabłonka. Badanie jest bezbolesne i trwa od 1 do 2 minut. Końcówka aparatu używana do skanowania jest zabezpieczona osłoną jednorazowego użytku - SUS (single use sensor). Urządzenie automatycznie reaguje po zetknięciu z powierzchnią

szyjki. Informuje również automatycznie o konieczności przesunięcia końcówki aparatu wokół szyjki na zasadzie sygnałów „stop i ruszaj”. Badaniem staramy się objąć obszar wokół strefy przekształceń - według załączonego schematu (Rycina 4). Warunkiem uzyskania w pełni diagnostycznego wyniku jest wykonanie co najmniej 15 pełnych cykli pomiarowych. Maksymalna liczba cykli pomiarowych w pojedynczym badaniu wynosi 25.



**Rycina 4. Schemat przedstawiający prawidłowe skanowanie informacji z tarczy szyjki macicy.**

Osiemnaście skanów obejmuje widoczny dystalny odcinek kanału szyjki macicy pokryty nabłonkiem gruczołowym, strefę przekształceń i tarczę części pochwowej szyjki macicy.

TruScreen® cervical screening system	
Patient's Name:	PACJENT
Operator's Name:	OPERATOR
Date of Exam:	DATA
Exam Centre :	OŚRODEK
SUS Batch Code	
Console Serial No. C1013 Handpiece Serial No. HL0008 Algorithm Version : 02.036 Firmware Version : F5.68	
Exam Result :	WYNIK
No. of Spots :	LICZBA ANALIZ
Note: Low squamous spot count	
Exam Type :	Adjunct
Exam Reference : 12	
Comments	
Operator's Signature:	
<small>Screening test only. To be used in conjunction with other screening techniques. Interpretation of the results of the screening tests is the sole responsibility of the physician.</small>	

**Rycina 5. Wydruk standardowego wyniku badania optoelektronicznego.**

Wynik badania metodą optoelektroniczną ma formę wydruku, zawierającego zakodowane dane analizy komputerowej oraz porównanie uzyskanych parametrów ze wzorcem (Rycina 5). Dla celów naukowych wynik badania pozostawał w formie „zaślepionej” do momentu otrzymania ostatecznego rozpoznania histopatologicznego dla danego przypadku. Po odkodowaniu każdy wynik badania optoelektronicznego

klasyfikowano jako prawidłowy, nieprawidłowy lub niediagnostyczny. Ilościową wartość uzyskanych parametrów badania optoelektronicznego wyrażała dla każdego badania liczba pNOR (probability of normal) o zakresie od 0,0 do 1,0. Liczba pNOR określa prawdopodobieństwo występowania prawidłowego nabłonka płaskiego oraz gruczołowego szyjki macicy w oparciu o algorytm danych. Za wynik nieprawidłowy, uznaje się wartości pNOR  $\leq 0,5$ , a za prawidłowy  $> 0,5$  (Rycina 6).

LICZBA	MOŻLIWE ZAKODOWANE WYNIKI
0	U,V,W,X,Y
1	o,p,q,r,s
2	K,L,M,N,O
3	j,k,l,m,n
4	A,B,C,D,E
5	t,u,v,w,x
6	e,f,g,h,i
7	P,Q,R,S,T
8	F,G,H,I,J
9	Z,a,b,c,d

#### Rycina 6. Dekoder wyników metody optoelektronicznej.

Przykładowe wyniki pNOR zakodowane i odkodowane:

$$pNOR = ZAK = 0,942$$

$$pNOR = Peo = 0,761$$

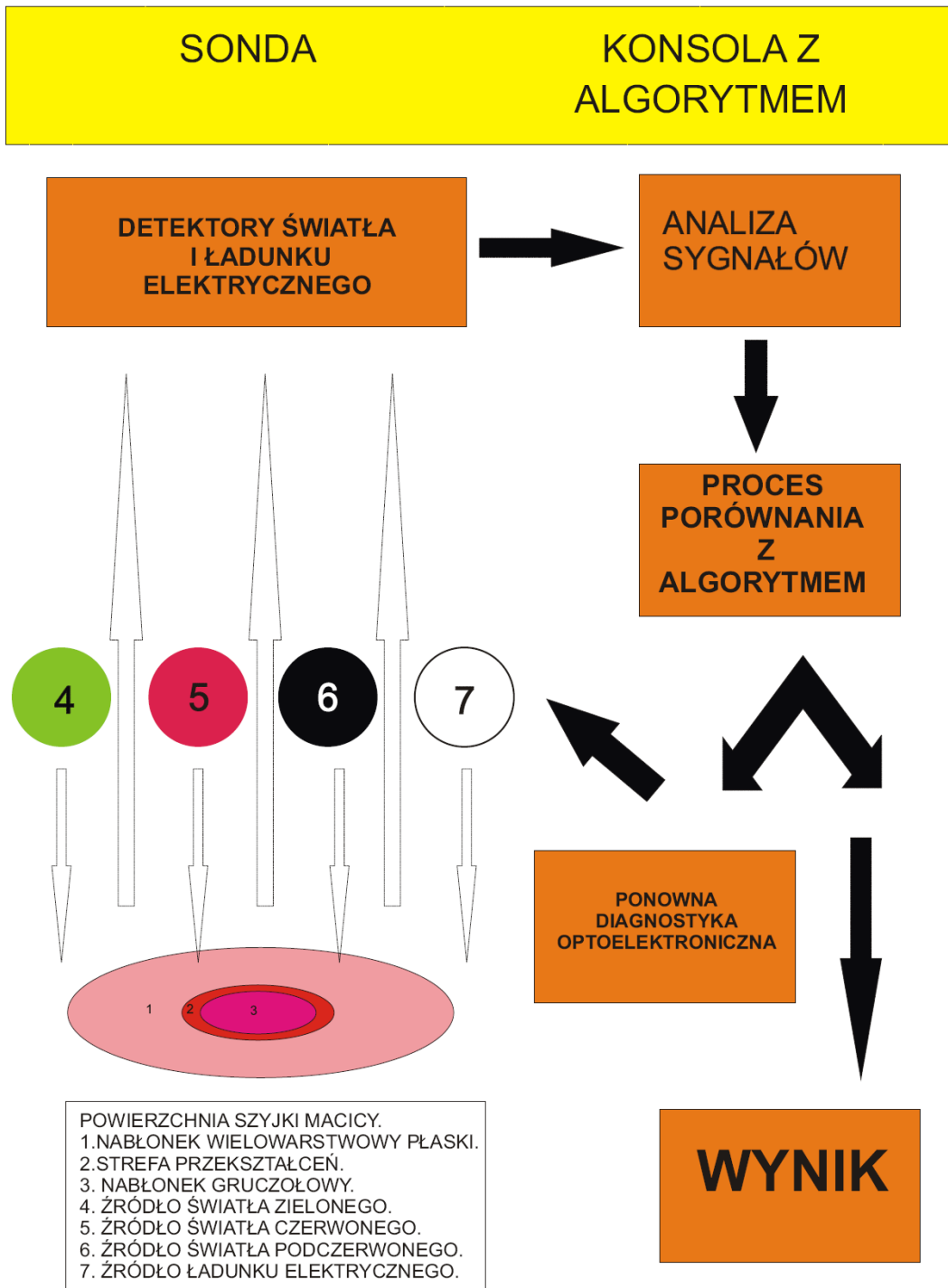
$$pNOR = pcL = 0,192$$

$$pNOR = Uja = 0,039$$

#### 4.1.1. Składowa elektryczna.

Metoda optoelektroniczna systemu diagnostycznego Truscreen wykorzystuje wielofunkcyjne elektrody, które stymulują szyjkę macicy impulsami elektrycznymi o napięciu 0,8 V i czasie trwania 350  $\mu$ s. Krzywa przepływu ładunku zależy od typu tkanki stymulowanej, czyli od jej impedancji. Wykorzystane w urządzeniu trzy wielofunkcyjne elektrody wysyłają naprzemiennie impulsy. Kiedy jedna z nich pełni funkcję generatora ładunku elektrycznego pozostałe dwie sprawują funkcję detektorów i mierzą spadek

napięcia w czasie. Dzięki zastosowaniu dwóch detektorów ładunku w cyklu naprzemiennym, system kontroluje prawidłowe przyleganie końcówki do całej powierzchni szyjki macicy, określając czy dany cykl był diagnostyczny.



Rycina 7. Schemat działania urządzenia optoelektronicznego.

Urządzenie wykonuje do 20 podcykli na sekundę. Po ukończeniu pakietu cykli diagnostycznych, system generuje informację o konieczności zmiany lokalizacji końcówki. Dioda czerwona informuje, o zbyt krótkim czasie aplikacji końcówki, żółta o trwaniu procesu analizy powierzchni szyjki macicy. Dioda zielona oznacza konieczność zmiany miejsca przylegania.

Zmiana parametrów składowej elektrycznej po przejściu ładunku przez prawidłową lub patologiczną błonę śluzową urządzenia kwalifikuje badaną tkankę do jednej z 21 grup, z której każda charakteryzuje się inną impedancją (Rycina 2).

#### **4.1.2. Składowa optyczna.**

Metoda optoelektroniczna wykorzystuje falę światła widzialnego oraz podczerwonego. Źródłem światła są diody typu LED o mocy od 7 do 130  $\mu$ W. Cztery diody emitują światło o trzech różnych długościach fali. Diody LED wykonują około 14 cykli na sekundę. Urządzenie optoelektroniczne wykorzystuje trzy różne długości światła (podczerwień od 780nm do 1mm, światło czerwone oraz zielone). W kontakcie z tkanką fale świetlne ulegają bezpośredniemu odbiciu oraz wielokrotnemu procesowi rozproszenia wstecznego (Rycina 1). Detektory fal rozproszonych wychwytyją powracające fale świetlne o zmodyfikowanych przez tkankę prawidłową lub patologiczną parametrach. Otrzymane informacje zostają porównane z algorytmem danych i zakwalifikowane do jednej z 21 grup.

#### **4.2. Cytodiagnostyka.**

Materiał pobierano szczoteczką cervex-brush z tarczy i kanału szyjki macicy. Po usunięciu nadmiaru śluzu materiał komórkowy był przenoszony na odtłuszczone szkiełko podstawowe, oznaczone numerem zgodnym z danymi klinicznymi pacjentki, odnotowanymi na karcie badania cytologicznego i dokumentacji badania. Bezpośrednio po pobraniu preparat był umieszczany w 96% alkoholu etylowym, skażonym eterem, na co najmniej 10 minut. Następnie szkiełka podstawowe płukano wodą destylowaną, osuszano i przenoszono do roztworu hematoksyliny Mayera na 10 minut. Po wyciągnięciu preparat ponownie płukano wodą destylowaną w celu usunięcia nadmiaru barwnika. Jakość barwienia kontrolowano oceną mikroskopową. Wybarwione rozmazy zanurzano w barwniku Orange. Po dwóch minutach rozmazy płukano dwukrotnie w 96% alkoholu, po czym zanurzano w barwniku EA 36 na 2 minuty. Po wyciągnięciu preparat czterokrotnie płukano w roztworach alkoholowych. Następnie szkiełko zanurzano kilkakrotnie w



ksylenie, po czym tak utrwalony i wybarwiony rozmaz pokrywano rozcieńczonym ksylenem oraz balsamem kanadyjskim i przykrywano szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowane preparaty były poddawane ocenie mikroskopowej przy użyciu mikroskopu optycznego Axiolab (Zeiss) w powiększeniu 200-krotnym i 400-krotnym. Preparaty były klasyfikowane według skali Papanicolaou i The Bethesda System. Oceny preparatów dokonywał cytotechnik kontrolowany przez cytotechnika z co najmniej 10 letnim stażem pracy. Co dziesiąty preparat prawidłowy pod względem zmian cytoonkologicznych poddawano powtórnej ocenie wykonywanej przez starszego cytotechnika. Wszystkie preparaty zakwalifikowane jako nieprawidłowe pod względem zmian cytoonkologicznych poddawano powtórnej ocenie przez lekarza patomorfologa. Taki schemat oceny rozmazów cytologicznych jest zgodny z zasadami stosowanymi w masowych programach profilaktyki raka szyjki macicy obowiązującymi na świecie.

#### **4.3. Badanie wirusologiczne.**

Materiał do badania wirusologicznego pobierano szczoteczką typu cervex brush, z tarczy, kanału szyjki macicy oraz sklepień pochwy. Uzyskany materiał umieszczano w buforze płynnym ThinPrep PreservCyt Solution (Cytoc Corporation), przechowywano w temperaturze od +2 do +8 °C i poddawano dalszej obróbce w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy.

W badaniach wykorzystano test molekularny PCR - Amplicor HPV Roche Diagnostics, identyfikujący obecność któregośkolwiek z 13 onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego. Test Amplicor HPV jest jakościowym testem służącym do wykrywania DNA wirusów HPV wysokiego ryzyka o genotypach 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68 in vitro. Procedura badania molekularnego składa się z czterech etapów:

- przygotowania próbki,
- amplifikacji docelowego materiału DNA przy użyciu komplementarnych primerów swoistych dla wirusa brodawczaka ludzkiego,
- hybrydyzacji produktów amplifikacji z sondami oligonukleotydowymi,
- detekcji produktów amplifikacji związanych z sondami na drodze reakcji barwnej.

Otrzymanie wyniku dodatniego w teście molekularnym PCR - Amplicor HPV Roche Diagnostics potwierdza obecność w pobranym materiale DNA co najmniej jednego z 13 onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego.

Równoczesna izolacja i amplifikacja genu  $\beta$ -globiny zapewnia kontrolę analizy ilości komórek i inhibicji reakcji w każdej próbce badanej. Amplicor HPV Roche Diagnostics jest jedynym dostępnym testem bazującym na technice PCR z certyfikatem powtarzalności CE do diagnostyki medycznej in vitro.<sup>70</sup>

#### 4.4. Badanie kolposkopowe.

Kolposkopia została wprowadzona po raz pierwszy przez Hinselmanna w 1925 roku i jest badaniem diagnostycznym umożliwiającym pólmikroskopową ocenę powierzchni błony śluzowej sromu, pochwy, szyjki macicy oraz okolicy okołodbytniczej przy zastosowaniu binokulara powiększającego oraz specyficznych odczynników chemicznych.



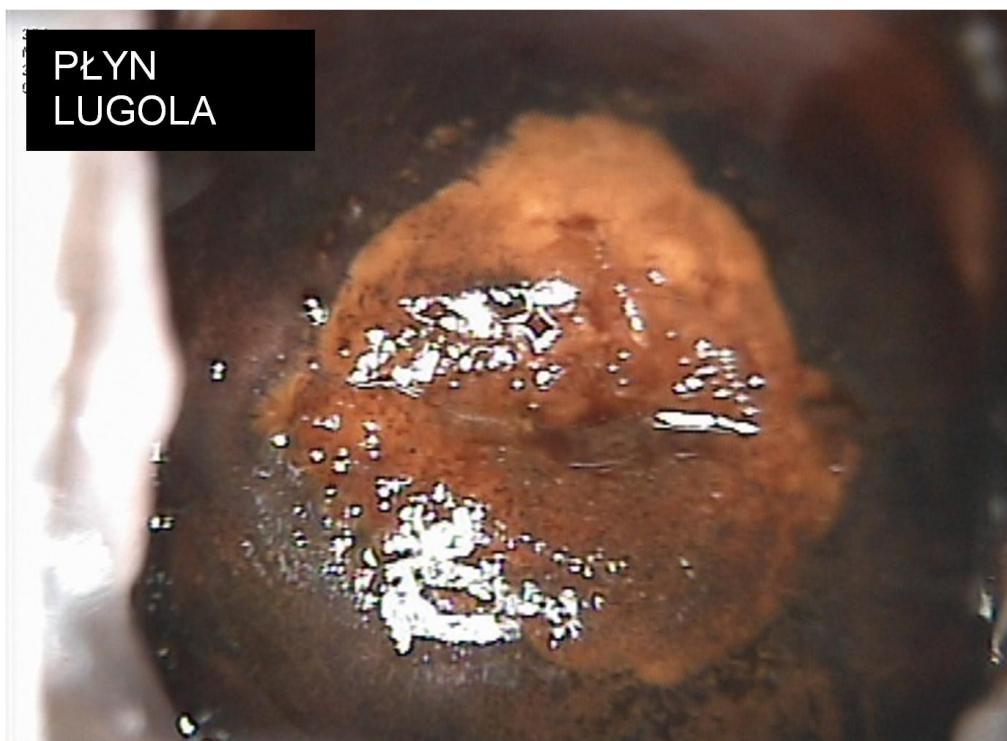
**Fotografia 5. Widoczne silne zbielenie nabłonka wielowarstwowego płaskiego po próbie z 3-5% roztworem kwasu octowego. Histologicznie potwierdzona zmiana typu CIN 2.**

Badanie kolposkopowe składa się z czterech podstawowych etapów :

- uwidocznienia sromu, pochwy oraz tarczy szyjki macicy,

- oceny zmian na sromie, pochwie, szyjce macicy i okolicy około odbytniczej,
- identyfikacji miejsc podejrzanych z wykorzystaniem skali Reida,
- pobrania wycinków z miejsc podejrzanych do oceny patomorfologicznej, jeżeli było to uzasadnione podejrzeniem obecności patologii szyjki macicy.<sup>71</sup>

Każdorazowo po uwidocznieniu szyjki macicy i przemyciu jej powierzchni solą fizjologiczną w celu usunięcia nadmiaru śluzu, identyfikowano i oceniano strefę przekształceń. Brak wizualizacji całej strefy przekształceń kwalifikował obraz do kategorii kolpogramów niesatysfakcjonujących. Badanie kolposkopowe zaczynało od oceny powierzchni błony śluzowej w powiększeniu 2 - 8 krotnym. Zastosowanie większych powiększeń umożliwiało szczegółową ocenę podnabłonkowego łożyska naczyniowego.



**Fotografia 6. Widoczne jasnożółte pole po próbie Schillera z płynem Lugola. Histologicznie potwierdzona zmiana typu CIN 2.**

<p><b>I. Prawidłowe obrazy kolposkopowe:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- pierwotny nabłonek wielowarstwowy płaski,</li> <li>- nabłonek gruczołowy,</li> <li>-strefa przekształceń.</li> </ul>	<p><b>II. Nieprawidłowe obrazy kolposkopowe:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- płaskie zbielenie nabłonka po aplikacji roztworu kwasu octowego,</li> <li>- gęste zbielenie nabłonka po nałożeniu kwasu octowego,</li> <li>- delikatna mozaika,</li> <li>- gruba mozaika,</li> <li>- delikatne punkcikowanie,</li> <li>- grube punkcikowanie,</li> <li>- częściowo dodatnia próba jodowa,</li> <li>- obszar jodonegatywny,</li> <li>- naczynia atypowe.</li> </ul>
<p><b>III. Obrazy kolposkopowe sugerujące raka inwazyjnego.</b></p>	<p><b>IV. Kolposkopia niesatysfakcjonująca:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- niewidoczna granica międzynabłonkowa,</li> <li>- ciężkie zapalenie i atrofia,</li> <li>- uraz,</li> <li>- niewidoczna szyjka.</li> </ul>
<p><b>V. Różne obrazy kolposkopowe:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- brodawczaki,</li> <li>- keratoza,</li> <li>- nadżerki,</li> <li>- zapalenie,</li> <li>- atrofie,</li> <li>- zmiany doczesnowe,</li> <li>- polipy.</li> </ul>	

**Tabela 4. Klasyfikacja obrazów kolposkopowych (Barcelona 2003).**

Dokonywana następnie aplikacja 3-5% wodnego roztworu kwasu octowego na powierzchnię tarczy szyjki macicy ma na celu wywołanie obrzęku i zbielenia patologicznie zmienionego nabłonka. Za proces bielenia odpowiada przejściowa chemiczna denaturacja cytokeratyny 10. Pod wpływem niskiego pH cytokeratyna traci swój ładunek ujemny, uwalnia wodę z komórki oraz powoduje zmętnienie cytoplazmy, co można obserwować w obrazie kolposkopowym.<sup>72</sup> Zbielenie to jest szczególnie wyraźne w przypadku zmian typu CIN i raka szyjki macicy (Fotografia 5).

<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, śnieżnobiałe 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 od nowej granicy międzynabłonkowej. Powierzchnia brodawczakowata i kłykciniowata.	Zmiany o regularnych kształtach, ostro ograniczone od otoczenia.	Zwinięte, złuszczone 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 pkt charakteryzujących trzy pierwsze cechy.	Częściowy wychwyty jodu, obszar cętkowany.	Obszary jodonegatywne, obszar jodonegatywny który otrzymał 4 lub więcej pkt charakteryzujących trzy pierwsze cechy.

**Tabela 5. Skojarzony indeks kolposkopowy Reida.**<sup>73</sup>



**PRACOWNIA PATOFIZJOLOGII SZYJKI MACICY**  
 GINEKOLOGICZNO POŁOŻNICZY SZPITAL KLINICZNY  
 UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO IM. KAROLA  
 MARCINKOWSKIEGO W POZNANIU

KIEROWNIK: PROF. UM DR HAB. WITOLD KĘDZIA

Nazwisko:

PARA:

Imię:

PAPA:

ZBIELENIE: (0-1-2)	<input type="text"/>	PRÓBA OCTOWA	
BRZEG: (0-1-2)	<input type="text"/>		
NACZYNIA: (0-1-2)	<input type="text"/>	PRÓBA JODOWA	
JODONEG: (0-1-2)	<input type="text"/>		
RCI: (0-8)	<input type="text"/>	Uwagi:    	
ROZPOZNANIE WSTĘPNE:			
		Poppis:  Data:	

**Rycina 8. Standardowy protokół badania kolposkopowego, wykorzystywany w PPSM GPSK – Poznań.**

Kolejnym etapem badania kolposkopowego była próba Schillera z płynem Lugola. Prawidłowy nabłonek wielowarstwowy płaski zawierający glikogen wybarwia się na ciemnobrązowo. Nabłonek neoplastyczny oraz nabłonek gruczołowy zawierający

niewielkie ilości glikogenu nie ulega w tej próbie zabarwieniu lub pozostaje w kolorze jasno żółtym (Fotografia 6).

Oceny kolpogramów pod kątem obecności patologii dokonywano w ramach niniejszej pracy korzystając z klasyfikacji obrazów kolposkopowych stworzonej przez Międzynarodową Federację Patologii Szyjki Macicy i Kolposkopii w 2003 roku (Tabela 4).

Badanie kolposkopowe wykonywano przy użyciu kolposkopu stereoskopowego (Olympus OCS-500). Każdorazowo wykonywano próbę z roztworem 3-5% kwasu octowego i test Schillera. Do oceny obrazów kolposkopowych posłużyła ośmiopunktowa skala Reida, opisująca brzeg i zbielenie zmiany wykrytej po aplikacji roztworu kwasu octowego, jodonegatywność oraz charakter naczyń (Tabela 5). Za wynik nieprawidłowy przyjęto obrazy kolposkopowe ocenione w skali Reida na 3 i więcej punktów. Ocena obrazu kolposkopowego na 3 do 5 punktów sugeruje obecność zmian typu CIN 1 lub CIN 2. Punktacja powyżej 6 sugeruje obecności CIN 3 lub raka inwazyjnego.

Wszystkie otrzymane obrazy kolposkopowe podlegały procesowi automatycznej archiwizacji komputerowej w programie IRIS GINEKOLOGIA firmy Medicom. Oprócz archiwizacji cyfrowej, każdy kolpogram opisywano z zastosowaniem skali Reida stosując do tego celu protokół badania ( Rycina 8).

#### **4.5. Biopsja miejsc podejrzanych.**

U wszystkich badanych kobiet pobierano celowane wycinki z miejsc podejrzanych oraz wykonywano łyżeczkowanie kanału szyjki macicy. Wybór miejsca biopsji następował na podstawie badania kolposkopowego. W sytuacji kolposkopii niesatysfakcjonującej pobierano cztery wycinki z czterech kwadrantów tarczy szyjki macicy i łyżeczkowano kanał szyjki macicy. Każdorazowo dążono, aby w pobranych wycinkach zawarta była strefa przekształceń.

W sytuacji kolposkopii satysfakcjonującej i przy braku wyraźnych cech obecności CIN lub bardziej zaawansowanej patologii szyjki macicy, pobierano materiał tkankowy ze strefy przekształceń oraz każdorazowo łyżeczkowano kanał szyjki macicy.

Materiał pochodzący z biopsji był poddawany procesowi utrwalenia w buforowanej formalinie i zatapiający w bloczkach parafinowych. Skrawki tkankowe umieszczano na szkiełkach oraz barwiono hematoksyliną i eozyną. Wszystkie preparaty histopatologiczne przygotowywano i poddawano podwójnej, niezależnej, zaślepionej ocenie

histopatologicznej w Pracowni Patomorfologicznej - GPSK UM w Poznaniu oraz w Pracowni Patomorfologicznej - Whittington Hospital w Londynie (Wielka Brytania).



## 5. Metody statystyczne.

Wiek pacjentek opisano średnią arytmetyczną i odchyleniem standardowym oraz medianą, wartością minimalną i maksymalną. Sprawdzono zgodność wyżej wymienionych parametrów z rozkładem normalnym - testem Shapiro-Wilka. Ponieważ nie potwierdzono zgodności z rozkładem normalnym zastosowano testy nieparametryczne. Do porównania wieku w grupie badanej i kontrolnej zastosowano test Manna-Whitney'a. Wynik testu wskazywał, że różnica wieku pomiędzy grupą badaną, a kontrolną nie jest istotna statystycznie, czyli obie grupy są jednorodne pod względem wieku.

Dla metod diagnostycznych wyznaczono czułość, swoistość, wartość predykcyjną dodatnią i wartość predykcyjną ujemną z 95% przedziałami ufności.

W celu oceny zdolności diagnostycznej parametrów metody optoelektronicznej, kolposkopii oraz cytodiagnostyki wyznaczano krzywą ROC (Receiver Operating Characteristic Curve). Przyjęto zasadę, że gdy pole pod krzywą jest bliskie wartości 1 wówczas trafność testu jest wysoka, natomiast gdy pole pod krzywą jest bliskie lub równe wartości 0,5 trafność testu jest niska. Krzywa ROC pozwala na znalezienie wartości parametru (tzw. punktu odcięcia), w której osiągnięta jest najwyższa czułość i swoistość. Ze względu na specyfikę wyników testu molekularnego na obecność DNA HPV HR (dodatni/ujemny) nie wykreślono krzywej ROC dla tego rodzaju diagnostyki.

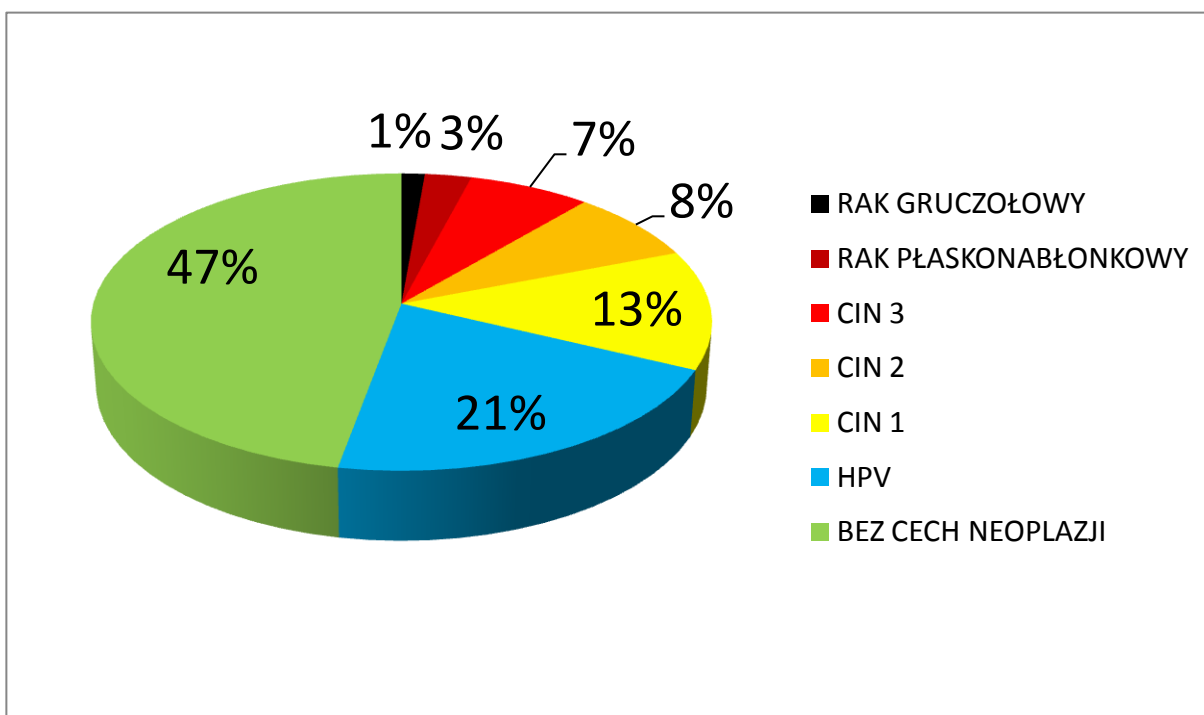
Hipotezy statystyczne weryfikowano na poziomie istotności  $\alpha=0,05$ .

Obliczenia wykonano przy pomocy pakietu statystycznego StatSoft, Inc. (2007), STATISTICA (data analysis software system), v.8.0, InStat v 3.00 firmy GraphPad. oraz Analyse-it Software.

## 6. Wyniki badań.

Odsetek rozpoznań histopatologicznych z cechami neoplazji w grupie 293 badanych kobiet wyniósł 32,08% (94/293) (Wykres 1). Wyniki uszeregowano w zależności od rozpoznania histopatologicznego na:

- 38 pacjentek z rozpoznaniem CIN 1,
- 23 pacjentki z rozpoznaniem CIN 2,
- 21 pacjentek z rozpoznaniem CIN 3,
- 8 pacjentek z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego – CA,
- 4 pacjentki z rozpoznaniem raka gruczołowego – ACA,
- 199 pacjentek z wykluczoną patologią szyjki macicy.

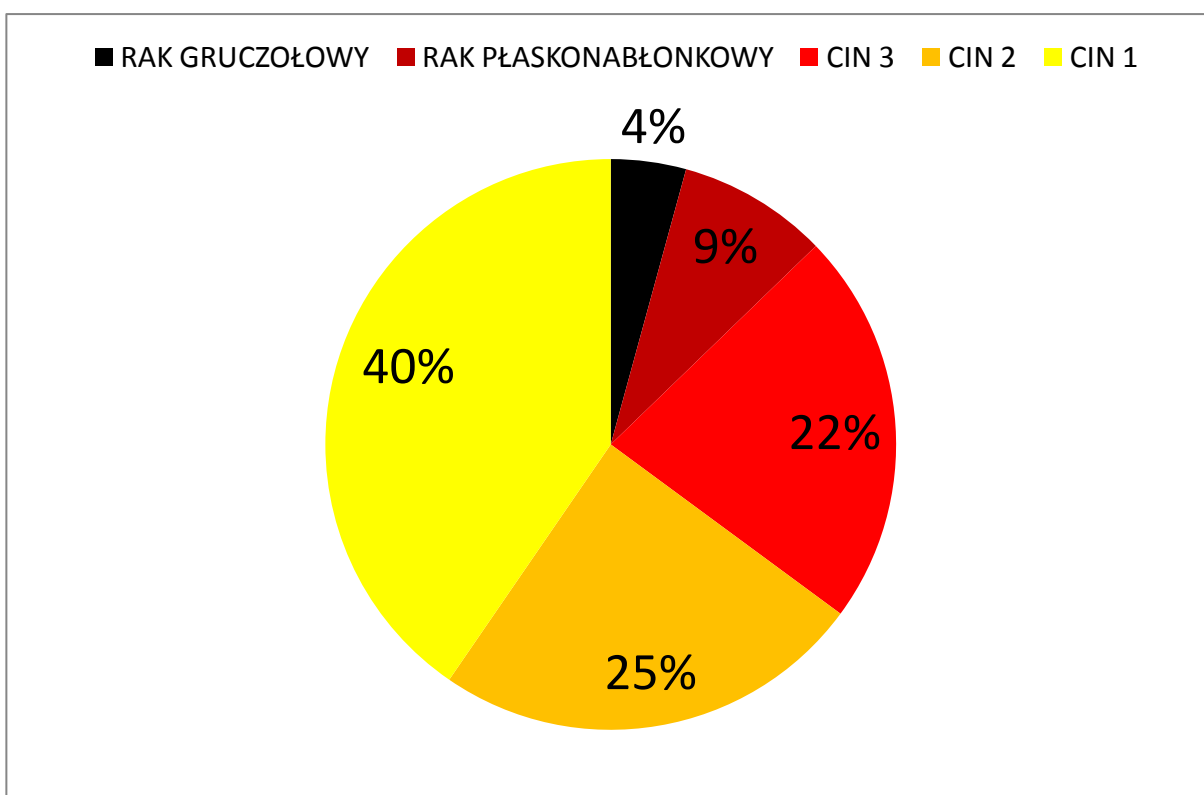


**Wykres 1. Udział procentowy poszczególnych rozpoznań histopatologicznych oraz pacjentek, u których wykluczono patologię szyjki macicy w całej populacji badanej:**

- rak gruczołowy 1% - 4/293,
- rak płaskonabłonkowy 3% - 8/293,
- CIN 3 7% - 21/293,
- CIN 2 8% - 23/293,
- CIN 1 13% - 28/293,
- wykluczona patologia szyjki macicy 68% - 199/293.

Do grupy badanej zakwalifikowano 94 pacjentki z rozpoznaniem histopatologicznymi wskazującymi na obecność neoplazji lub raka. Za grupę kontrolną uznano 199 pacjentek z rozpoznaniem histopatologicznymi wykluczającymi patologię szyjki macicy.

Najczęstszym rozpoznaniem onkologicznym w grupie badanej było rozpoznanie histopatologiczne śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy niskiego i średniego stopnia, które stanowiło odpowiednio 40% i 25% wśród wszystkich rozpoznań z cechami neoplazji (Wykres 2).

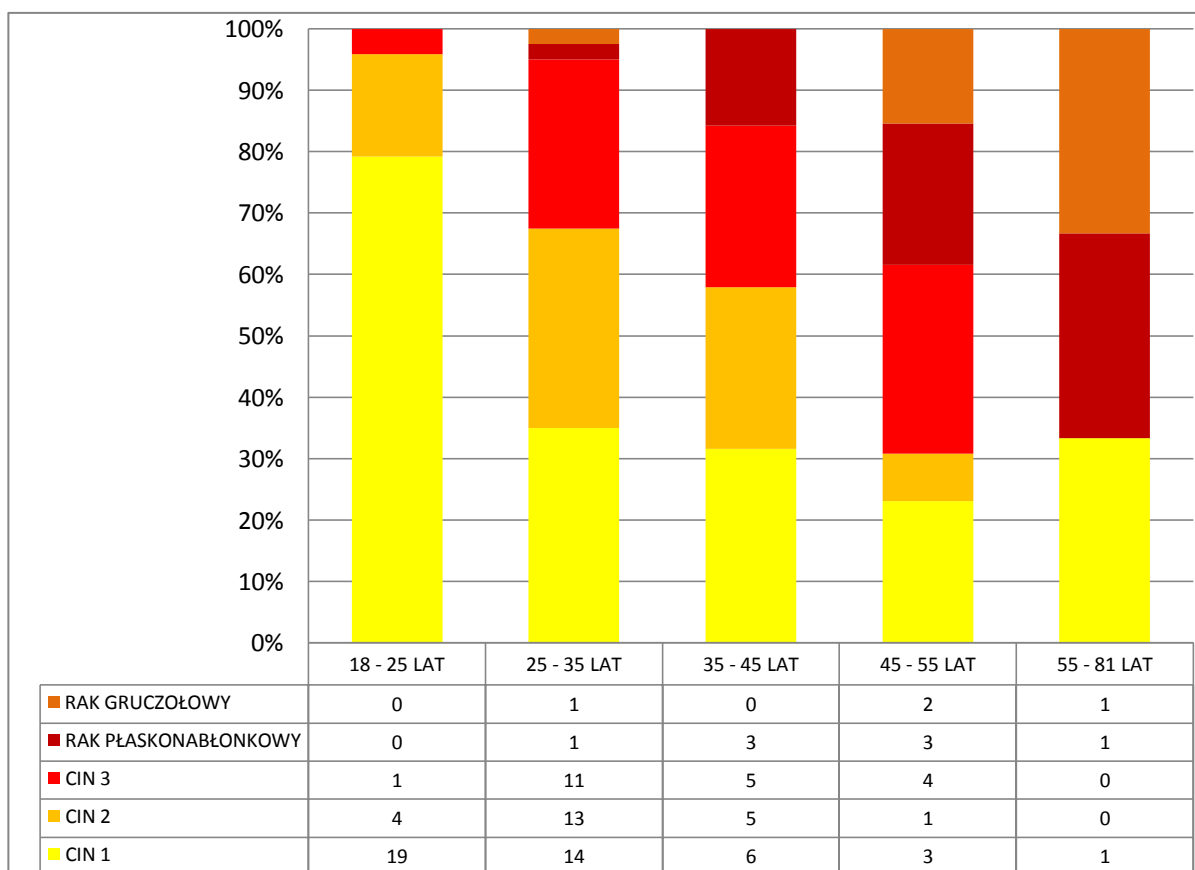


**Wykres 2. Udział procentowy poszczególnych rodzajów rozpoznanej patologii szyjki macicy w grupie badanej liczącej 94 pacjentki:**

- rak gruczołowy 4% - 4/94,
- rak płaskonabłonkowy 9% - 8/94,
- CIN 3 22% - 21/94,
- CIN 2 25% - 23/94,
- CIN 1 40% - 38/94.

Średnia wieku pacjentek w całej populacji pacjentek wynosiła 37,1 lat (minimalnie 18, maksymalnie 81, mediana 35). Całą populację pacjentek podzielono pod względem daty urodzenia na pięć grup wiekowych:

- do 25 roku życia – 46 kobiet – 16%,
- między 25, a 35 rokiem życia – 106 kobiet – 36%,
- między 35, a 45 rokiem życia – 74 kobiet – 25%,
- między 45, a 55 rokiem życia – 40 kobiet – 14%,
- powyżej 55 roku życia – 27 kobiet – 9%.

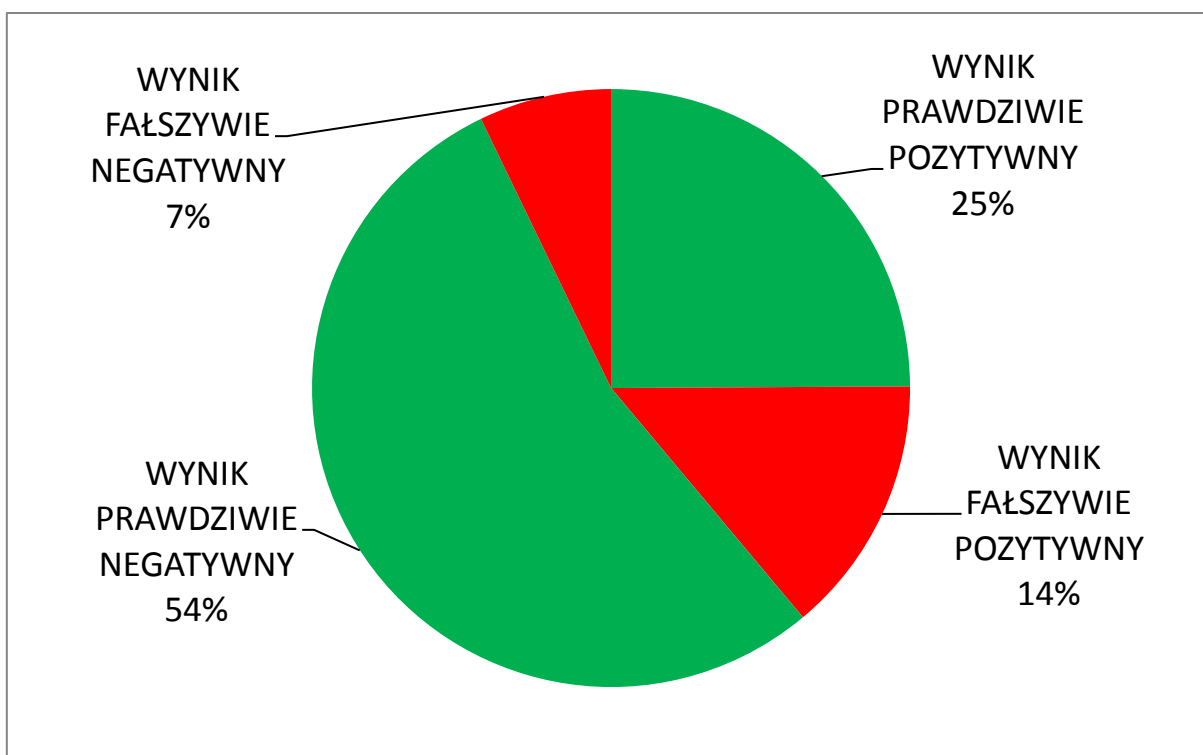


**Wykres 3. Udział procentowy poszczególnych rozpoznanych histopatologicznych: raka płaskonabłonkowego, raka gruczołowego, CIN 3, CIN 2 oraz CIN 1 w grupie badanej n=94/293 w zależności od wieku badanych kobiet.**

We wszystkich grupach wiekowych najczęstszym rozpoznaniem o charakterze neoplazji była śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy niskiego stopnia – CIN 1. W grupie pacjentek poniżej 35 roku życia, rozpoznanie CIN 1 stanowiło ponad 75% wszystkich rozpoznań nieprawidłowych. W tej samej grupie wiekowej nie rozpoznano ani jednego przypadku raka płaskonabłonkowego lub gruczołowego. Stwierdzono natomiast wzrost odsetka rozpoznań śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka płaskonabłonkowego szyjki macicy wraz z wiekiem badanych pacjentek (Wykres 3).

### 6.1. Wyniki metody optoelektronicznej.

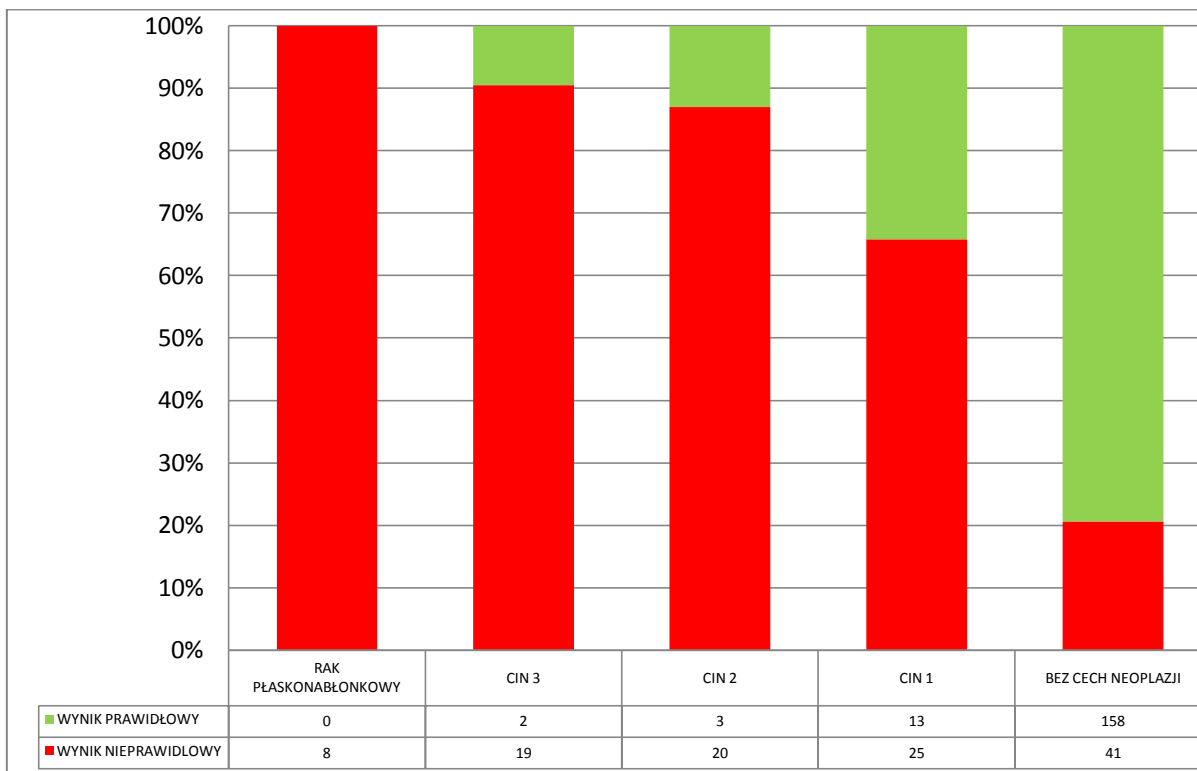
Odsetek wyników prawidłowych i nieprawidłowych dla metody optoelektronicznej przy punkcie odcięcia pNOR równym 0,5 wynosił odpowiednio 61% i 39%. Analiza wszystkich wyników uzyskanych metodą Truscreen oraz rozpoznań histopatologicznych wykazuje, że największy odsetek stanowiły wyniki optoelektroniczne prawdziwie negatywne oraz prawdziwie pozytywne, które wyniosły odpowiednio 54% i 25% całości. Odsetek wyników fałszywie pozytywnych wyniósł 14%, a fałszywie negatywnych 7% wszystkich badań (Wykres 4).



**Wykres 4. Udział procentowy wyników prawdziwie pozytywnych (n=73) i prawdziwie negatywnych (n=158) oraz fałszywie pozytywnych (n=41) i fałszywie negatywnych (n=21) otrzymanych w oparciu o metodę optoelektroniczną.**

Obniżenie wartości liczby pNOR poniżej wartości 0,5; odpowiednio do 0,45; 0,4; 0,35 itd. powodowało wzrost odsetka wyników fałszywie negatywnych, spadek czułości oraz wzrost swoistości w wykrywaniu patologii szyjki macicy. Podwyższenie wartości liczby pNOR, odpowiednio do 0,55; 0,6; 0,65 itd. wpłynęło na wzrost odsetka wyników fałszywie pozytywnych, wzrost czułości i spadek swoistości metody optoelektronicznej w wykrywaniu patologii szyjki macicy (Wykres 6).

Czułość metody optoelektronicznej ( $pNOR=0,5$ ) dla rozpoznania histopatologicznego śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy niskiego stopnia (CIN1) wynosiła 65,79% (Tabela 6). Metoda umożliwiła wykrycie 25 przypadków CIN 1 w grupie 38 kobiet z potwierdzonym rozpoznaniem ostatecznym śród nabłonkowej neoplazji niskiego stopnia (Wykres 5).



**Wykres 5. Udział procentowy wyników prawidłowych wykluczających patologię i nieprawidłowych wskazujących na obecność patologii (metoda optoelektroniczna,  $pNOR=0,5$ ) w przypadku następujących rozpoznań histopatologicznych: raka płaskonabłonkowego, CIN 3, CIN 2, CIN 1 oraz rozpoznań bez cech neoplazji.**

W przypadku zmian typu CIN 2 metodę optoelektroniczną charakteryzowała wyższa czułość w porównaniu do wykrycia CIN 1 i wynosiła 86,96% (Tabela 6). W populacji 23 kobiet z potwierdzonym rozpoznaniem CIN 2 metoda optoelektroniczna była źródłem trzech wyników fałszywie negatywnych (Wykres 5).

Dla zmian typu CIN 3 czułość metody optoelektronicznej została oceniona na 90,48 % (Tabela 6). Metoda umożliwiła wykrycie 19 przypadków CIN 3 w grupie 21 kobiet z potwierdzonym rozpoznaniem CIN 3 (Wykres 5). Czułość metody optoelektronicznej dla wykrycia raka płaskonabłonkowego została oszacowana na 100%. Metoda ta umożliwiła

wykrycie tylko jednej zmiany typu adenocarcinoma z czterech zmian tego typu potwierdzonych histopatologicznie w grupie badanych 293 kobiet (Tabela 6).

WYNIK BADANIA METODĄ OPTOELEKTRONICZNĄ	CIN 1	CIN 2	CIN 3	RAK PŁASKONABLON KOWY	RAK GRUCZOŁOWY
PRAWIDŁOWY	13	3	2	0	3
NIEPRAWIDŁOWY	25	20	19	8	1
<b>CZUŁOŚĆ</b>	<b>65,79 %</b>	<b>86,96 %</b>	<b>90,48 %</b>	<b>100%</b>	<b>25%</b>

Tabela 6. Czulość metody optoelektronicznej (pNOR=0,5) dla wykrywania CIN1, CIN2, CIN3 i raka płaskonablonkowego oraz gruczolowego.

WYNIK BADANIA METODĄ OPTOELEKTRONICZNĄ	LGSIL	HGSIL + RAK PŁASKONABLONKOWY
LICZBA OSTATECZNYCH ROZPOZNAŃ HISTOPATOLOGICZNYCH	38	52
WYNIKI POZYTYWNE DODATNIE	25	47
<b>CZUŁOŚĆ</b>	<b>65,79%</b>	<b>90,38%</b>

Tabela 7. Czulość metody optoelektronicznej (pNOR=0,5) dla wykrywania zmian niskiego (LGSIL) i wysokiego (HGSIL) stopnia wraz z rakiem płaskonablonkowym.



Czułość metody optoelektronicznej dla wykrycia zmian śród nabłonkowych niskiego stopnia w obrębie nabłonka płaskiego – Low Grade - LGSIL (CIN1) została oszacowana na 65,79% (95% CI; 0,49 – 0,80), a dla zmian wysokiego stopnia – High Grade - HGSIL (CIN 2, CIN 3) oraz raka płaskonabłonkowego 90,38% (95% CI; 0,79 – 0,97) (Tabela 7). Metoda optoelektroniczna umożliwiła detekcję tylko jednego przypadku raka gruczołowego. Wszystkie cztery przypadki raka gruczołowego rozwijały się w obrębie nabłonka kanału szyjki macicy.

Swoistość metody optoelektronicznej użytej do potwierdzenia braku patologii szyjki macicy wyniosła 78,89 % (95% CI; 0,73 – 0,84) (Tabela 8).

	<b>Czułość dla zmian LGSIL</b>	<b>Czułość dla zmian HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego</b>	<b>Swoistość</b>
<b>Metoda optoelektroniczna</b>	65,79%	90,38	<b>78,89%</b>
<b>Cytodiagnostyka</b>	<b>97,37%</b>	96,15%	43,00%
<b>Badanie Molekularne</b>	68,42%	92,31%	63,32%
<b>Kolposkopia</b>	84,85%	<b>100%</b>	54,00%

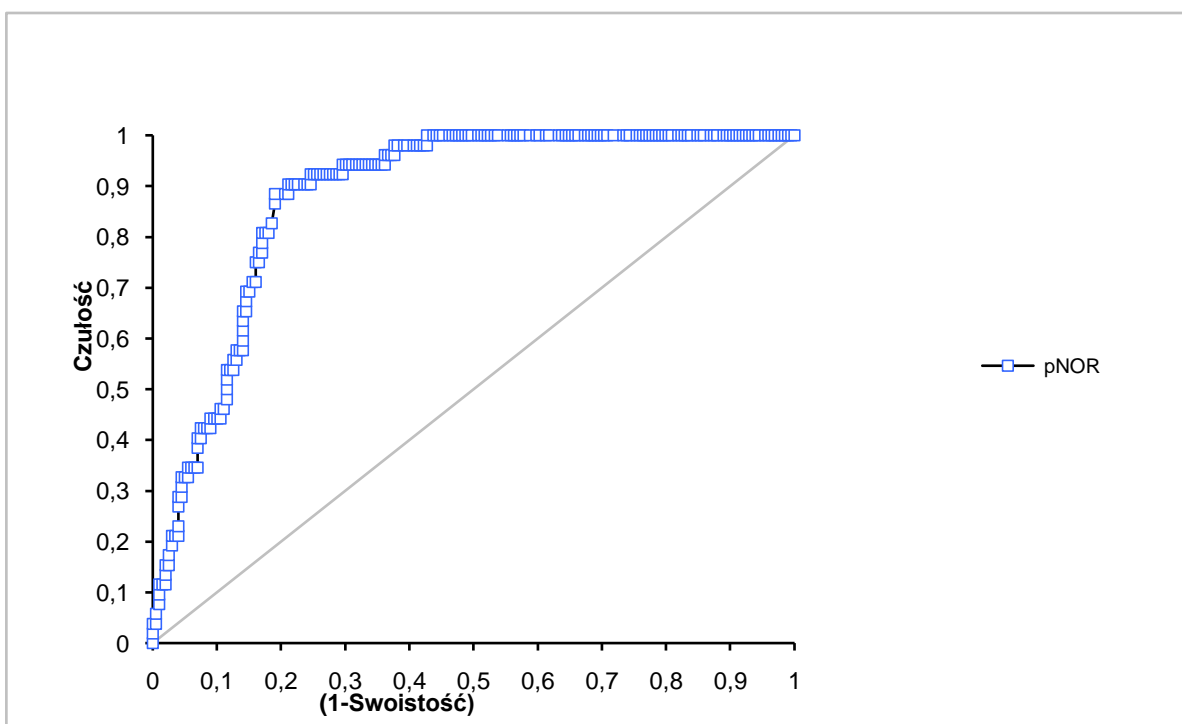
**Tabela 8. Zestawienie czułości oraz swoistości poszczególnych narzędzi diagnostycznych: metody optoelektronicznej, cytodiagnostyki, badania molekularnego oraz badania kolposkopowego.**

Czułość metody optoelektronicznej dla wykrycia wszystkich patologii w obrębie nabłonka płaskiego, z wykluczeniem patologii w obrębie nabłonka gruczołowego została oszacowana na 80% (95% CI; 0,70 – 0,87). Pozytywna wartość predykcyjna tego testu diagnostycznego wynosiła 63% (95% CI; 0,54-0,72), a negatywna wartość predykcyjna 90% (95% CI; 0,84 – 0,94) .

W celu oceny przydatności metody optoelektronicznej do wykrywania zmian wysokiego stopnia (HGSIL) oraz raka płaskonabłonkowego wykreślono krzywą ROC (Receiver Operating Characteristic) (Wykres 6). Pole pod krzywą wyniosło 0,88 (95% CI; 0,84-0,92), co świadczy o wysokiej wartości diagnostycznej tego testu do wykrywania zmian typu - HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego (Tabela 9).

	Pole pod krzywą ROC
<b>Metoda optoelektroniczna</b>	0,88
<b>Cytodiagnostyka</b>	0,85
<b>Kolposkopia</b>	0,91

**Tabela 9. Porównanie pola pod krzywą ROC metody optoelektronicznej, cytodiagnostyki oraz badania kolposkopowego (dotyczy tylko patologii nabłonka paraepidermalnego).**

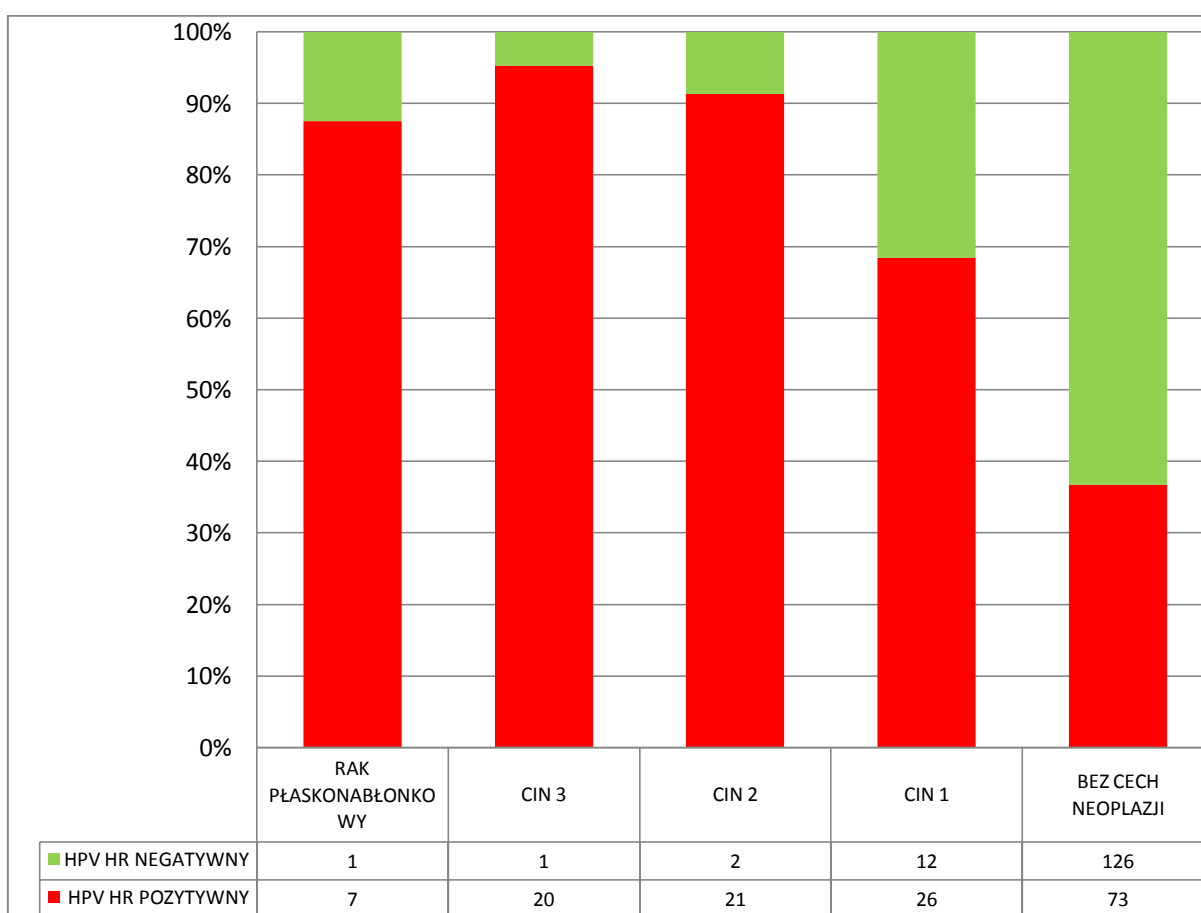


**Wykres 6. Krzywa ROC dla metody optoelektronicznej użytej do wykrywania zmian – HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego.**

## 6.2. Wyniki metody molekularnej.

Czułość metody molekularnej identyfikującej onkogenne typy wirusa HPV użytej do wykrycia śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy niskiego stopnia (CIN 1) wynosiła 68,43%. Metoda umożliwiła wykrycie 26 przypadków rzeczywistej patologii typu LGSIL w grupie 38 kobiet z potwierdzonym ostatecznym rozpoznaniem histopatologicznym CIN 1 (Wykres 7).

W przypadku zmian typu CIN 2 metoda molekularna charakteryzowała się wyższą czułością, która została oszacowana na 91,30%. W populacji 23 kobiet z rozpoznaniem CIN 2 i dodatnim wynikiem testu na obecność DNA HPV HR uzyskano dwa wyniki fałszywie negatywne (Wykres 7).



**Wykres 7. Wyniki testu molekularnego PCR identyfikującego obecność onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego dla następujących rozpoznań histopatologicznych: raka płaskonabłonkowego, CIN 3, CIN 2, CIN 1 oraz rozpoznań bez cech neoplazji.**

Dla zmian typu CIN 3 czułość metody molekularnej została oceniona na 95,24 %. Metoda umożliwiła wykrycie 20 przypadków rzeczywistej patologii w grupie 21 chorych kobiet z rozpoznaniem CIN 3 (Wykres 7). Czuość metody molekularnej dla rozpoznania raka płaskonabłonkowego została oszacowana na 87,50%, u jednej z pacjentek wynik badania metodą molekularną na 13 onkogennych typów wirusa był negatywny (Wykres 7).

Test na obecność onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego – DNA HPV HR umożliwił wykrycie **wszystkich, czterech przypadków raka gruczołowego (adenocarcinoma)** w obrębie błony śluzowej szyjki macicy.

<b>WYNIK BADANIA METODĄ MOLEKULARNĄ PCR</b>	<b>LGSIL</b>	<b>HGSIL + RAK PŁASKONABŁONKOWY</b>
<b>LICZBA OSTATECZNYCH ROZPOZNAŃ HISTOPATOLOGICZNYCH</b>	38	52
<b>WYNIKI POZYTYWNE DODATNIE</b>	26	48
<b>CZUŁOŚĆ</b>	<b>68,42%</b>	<b>92,31%</b>

**Tabela 10. Czuość metody molekularnej identyfikującej trzynaście typów onkogennych wirusa brodawczaka ludzkiego, użytej do wykrycia zmian niskiego (LGSIL) i wysokiego (HGSIL) stopnia wraz z rakiem płaskonabłonkowym.**

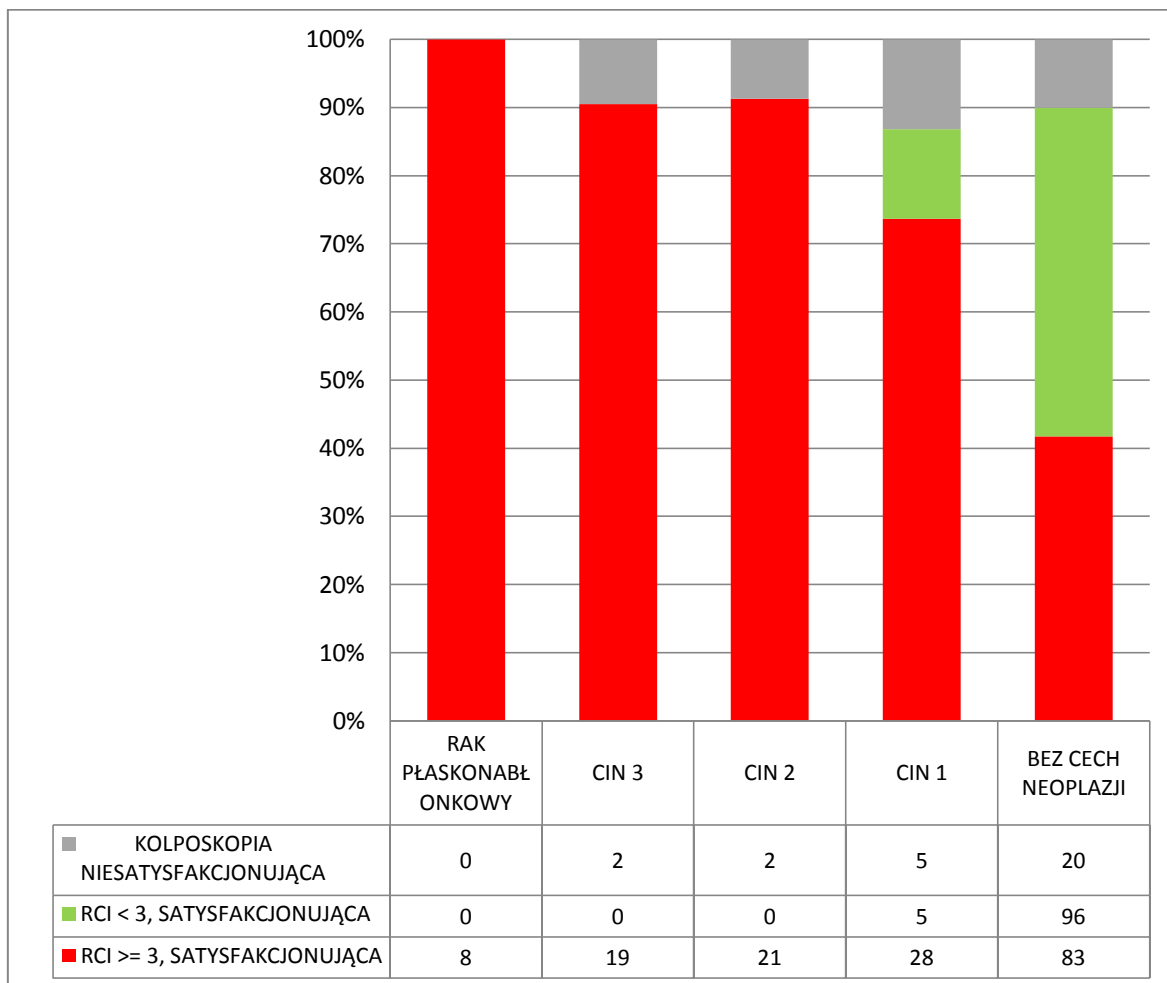
Czuość metody molekularnej PCR użytej dla wykrycia zmian śródnabłonkowych niskiego stopnia w obrębie nabłonka płaskiego – Low Grade - LGSIL (CIN1) została oszacowana na 68,42% (95% CI; 0,51 – 0,82) a dla zmian wysokiego stopnia – High Grade - HGSIL (CIN 2, CIN 3) wraz z rakiem płaskonabłonkowym 92,31% (95% CI; 0,81 – 0,98) (Tabela 10). Metoda molekularna umożliwiła wykrycie wszystkich przypadków raka gruczołowego. Swoistość metody molekularnej PCR identyfikującej

obecność trzynastu typów onkogennych wirusa brodawczaka ludzkiego użytej do wykrycia patologii szyjki macicy wyniosła 63,32 % (95% CI; 0,56 – 0,70) (Tabela 8).

Czułość metody molekularnej PCR użytej do wykrywania wszystkich patologii w obrębie nabłonka płaskiego, z wykluczeniem patologii w obrębie nabłonka gruczołowego została oszacowana na 82.22% (95% CI; 0,73 – 0,89). Pozytywna wartość predykcyjna tego testu diagnostycznego wynosiła 50% (95% CI; 0,42 – 0,59), a negatywna wartość predykcyjna 89% (95% CI; 0,82 – 0,93).

### 6.3. Wyniki oceny kolposkopowej.

Pacjentki z niesatysfakcjonującą kolposkopią wykluczono z analizy czułości i swoistości metody oraz wyznaczania krzywej ROC.



**Wykres 8. Wyniki badania kolposkopowego ocenianego według RCI – Reid Scale Index; (kolposkopia niesatysfakcjonująca, RCI<3, RCI>=3) dla następujących rozpoznań histopatologicznych: raka płaskonabłonkowego, CIN 3, CIN 2, CIN 1 oraz rozpoznań bez patologii szyjki macicy.**

Czułość kolposkopii w satysfakcjonujących warunkach badania, ocenianej według skali Reida w przypadku rozpoznania histopatologicznego śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy niskiego stopnia (CIN 1) wyniosła 84,85% (Wykres 8).

W przypadku zmian typu CIN 2, CIN 3 oraz raka płaskonabłonkowego metoda charakteryzowała się wyższą czułością, która została oszacowana na 100% (Wykres 8).

Czułość metody kolposkopowej dla wykrywania zmian śród nabłonkowych niskiego stopnia w obrębie nabłonka płaskiego – Low Grade - LGSIL (CIN 1) została oszacowana na 84,85% (95% CI; 0,68 – 0,94), a dla zmian wysokiego stopnia – High Grade - HGSIL (CIN 2, CIN 3) wraz z rakiem płaskonabłonkowym 100% (95% CI; 0,93 – 1,0) (Tabela 11). Metoda ta umożliwiła detekcję dwóch przypadków raka gruczołowego. Swoistość kolposkopii ocenianej według skali Reida wyniosła 54% (95% CI; 0,47 – 0,62) (Tabela 8).

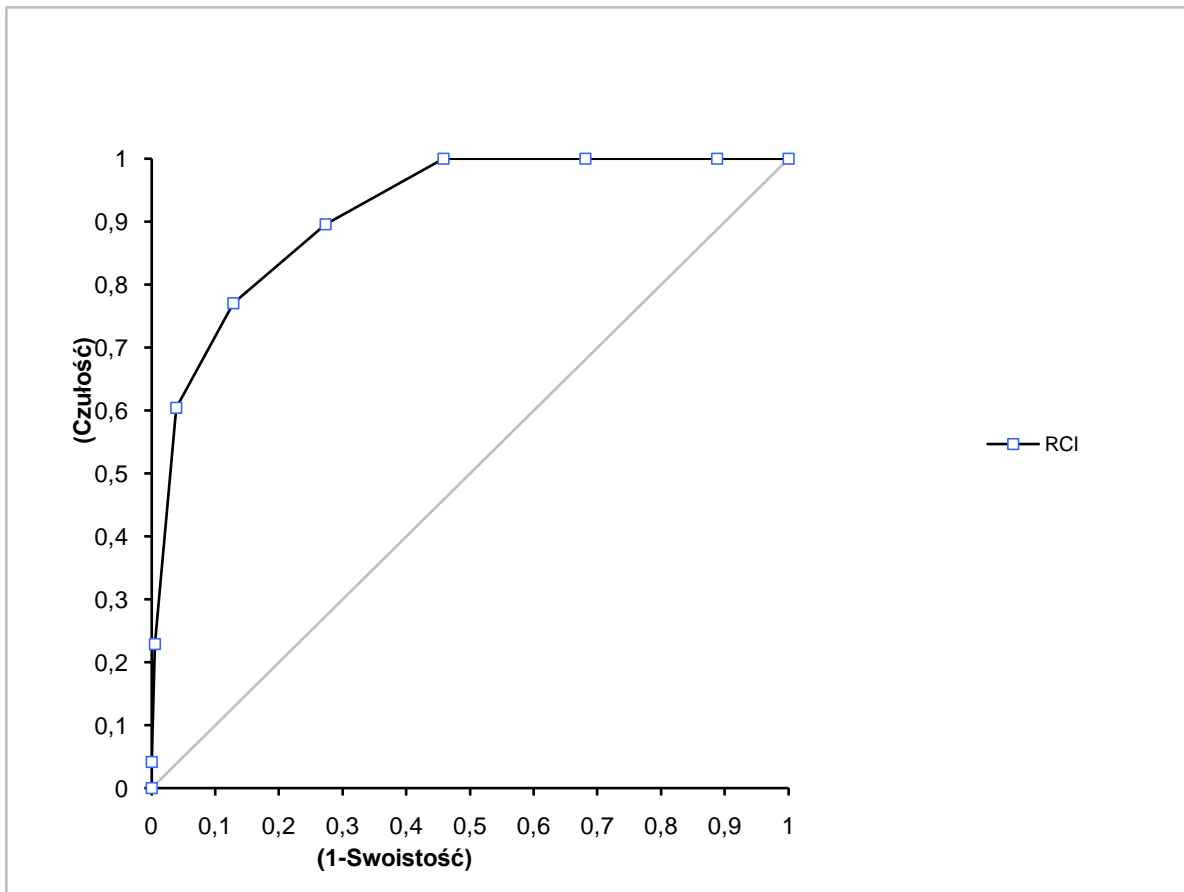
<b>WYNIK BADANIA KOLPOSKOPOWEGO</b>	<b>LGSIL</b>	<b>HGSIL + RAK PŁASKONABŁONKOWY</b>
<b>LICZBA OSTATECZNYCH ROZPOZNAŃ HISTOPATOLOGICZNYCH</b>	33	48
<b>WYNIKI POZYTYWNE DODATNIE</b>	28	48
<b>CZUŁOŚĆ</b>	<b>84,85%</b>	<b>100%</b>

**Tabela 11. Czułość kolposkopii ocenianej według skali Reida dla wykrywania zmian niskiego (LGSIL) i wysokiego (HGSIL) stopnia wraz z rakiem płaskonabłonkowym. Pacjentki z niesatysfakcjonującą kolposkopią zostały wykluczone z analizy.**

Czułość badania kolposkopowego dla wszystkich patologii w obrębie nabłonka płaskiego, z wykluczeniem patologii w obrębie nabłonka gruczołowego została oszacowana na 93,83% (95% CI; 0,86 – 0,98). Pozytywna wartość predykcyjna tego testu diagnostycznego wynosiła 48% (95% CI; 0,40-0,56), a negatywna wartość predykcyjna 95% (95% CI; 0,89 – 0,99).

W celu oceny przydatności badania kolposkopowego dla wykrywania zmian – HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego wykreślono krzywą ROC (Wykres 9). Pole pod krzywą wyniosło 0,91 (95% CI; 0,87-0,95) co świadczy o wysokiej wartości

diagnostycznej tego testu do wykrywania zmian wysokiego stopnia (HGSIL) wraz z rakiem płaskonabłonkowym (Tabela 9).



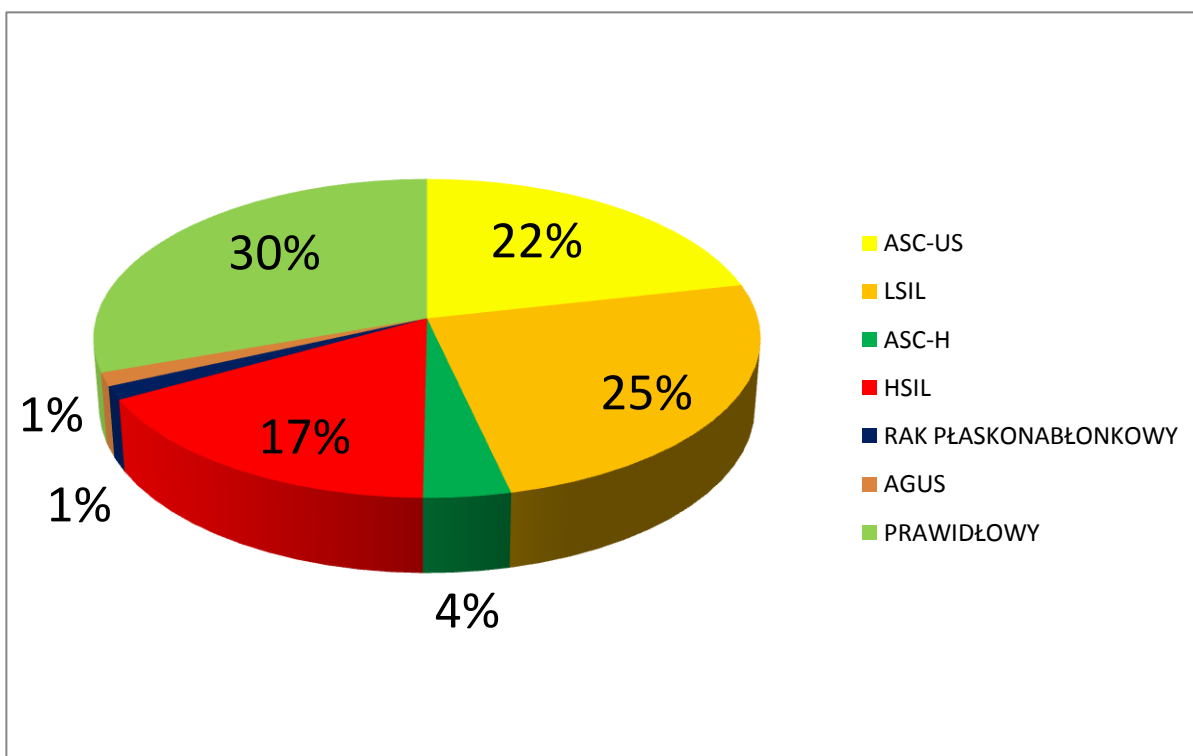
**Wykres 9. Krzywa ROC dla badania kolposkopowego użytego do wykrywania zmian – HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego. Pacjentki z niesatysfakcjonującą kolposkopią zostały wykluczone z analizy.**



#### 6.4. Wyniki cytodiagnostyki.

Odsetek nieprawidłowych rozpoznań cytologicznych uzyskanych w wyniku powtórnego retestu cytologicznego wykonanego w PPSM, w grupie 293 badanych kobiet wyniósł 69,62% (204/293) (Wykres 10). Wyniki uszeregowano w zależności od rozpoznania cytologicznego na:

- 63 pacjentki z rozpoznaniem cytologicznym ASC-US,
- 73 pacjentki z rozpoznaniem cytologicznym LSIL,
- 11 pacjentek z rozpoznaniem cytologicznym ASC-H,
- 49 pacjentki z rozpoznaniem cytologicznym HSIL,
- 4 pacjentki z rozpoznaniem cytologicznym raka płaskonabłonkowego,
- 4 pacjentki z rozpoznaniem cytologicznym AGUS,
- 89 pacjentek z prawidłowym wynikiem badania cytologicznego.



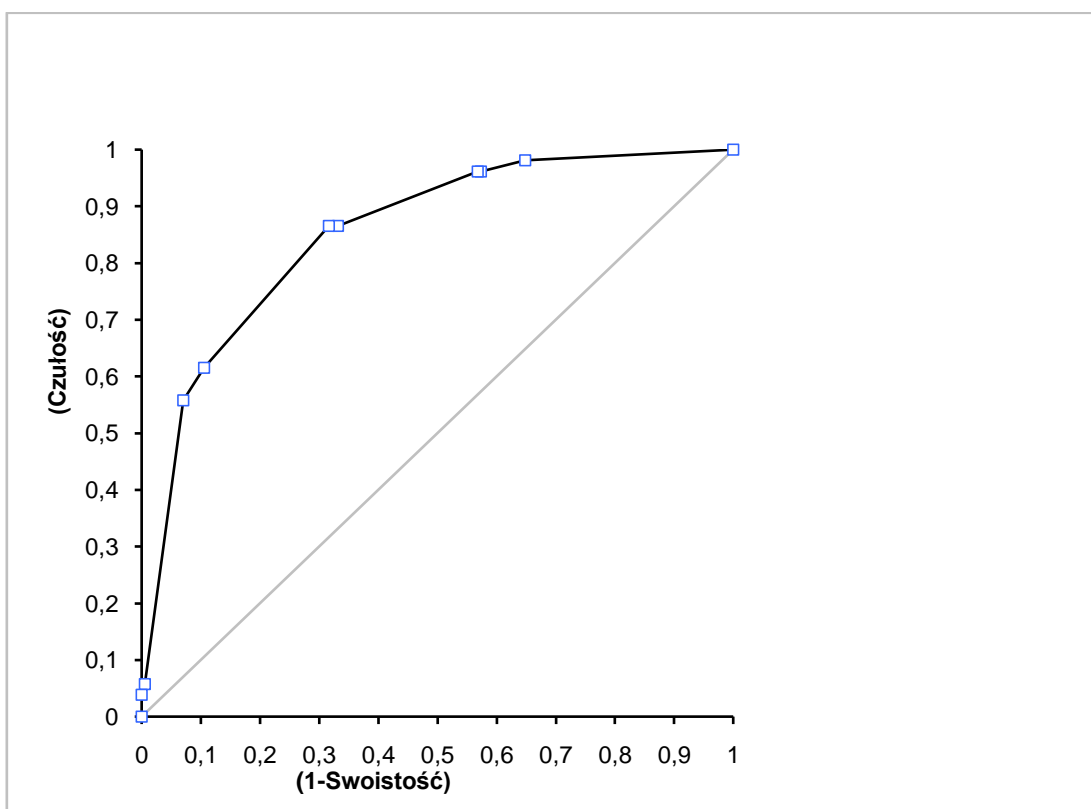
**Wykres 10. Udział procentowy poszczególnych rozpoznań cytologicznych w całej populacji badanej:**

- ASCUS 22% - 63/293,
- LSIL 25% - 73/293,
- ASC-H 4% - 11/293,
- HSIL 17% - 49/293,

- Raka płaskonabłonkowego 1% - 4/293,
- AGUS 1% - 4/293,
- Prawidłowy wynik badania cytologicznego 30% - 89/293.

Czułość cytodiagnostyki dla wykrywania zmian śródnabłonkowych niskiego stopnia w obrębie nabłonka płaskiego – Low Grade - LGSIL (CIN 1) została oszacowana na 97,37% (95% CI; 0,86 – 0,99), a dla zmian wysokiego stopnia – High Grade - HGSIL (CIN 2, CIN 3) wraz z rakiem płaskonabłonkowym 96,15% (95% CI; 0,87 – 0,99). Swoistość cytodiagnostyki ocenianej według TBS wyniosła 43% (95% CI; 0,36– 0,50) (Tabela 8). Cytodiagnostyka umożliwiła detekcję trzech przypadków raka gruczołowego.

Czułość cytodiagnostyki użytej do wykrywania patologii w obrębie nabłonka płaskiego, z wykluczeniem patologii w obrębie nabłonka gruczołowego została oszacowana na 96,67% (95% CI; 0,91 – 0,99) (Tabela 8). Pozytywna wartość predykcyjna tego testu diagnostycznego wynosiła 44% (95% CI; 0,37-0,51), a negatywna wartość predykcyjna 97% (95% CI; 0,90 – 0,99).



**Wykres 11. Krzywa ROC dla cytodiagnostyki użytej dla wykrywania zmian – HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego.**

W celu oceny przydatności cytodiagnostyki dla wykrywania zmian – HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego wykreślono krzywą ROC (Wykres 11). Pole pod krzywą wyniosło 0,85 (95% CI; 0,80-0,91) co świadczy o wysokiej wartości diagnostycznej tego testu do wykrywania zmian wysokiego stopnia (HGSIL) wraz z rakiem płaskonabłonkowym (Tabela 9).

### 6.5. Wyniki testu połączonego ( metoda optoelektroniczna i molekularna).

Czułość testu połączonego dla wykrywania zmian śródnabłonkowych niskiego stopnia w obrębie nabłonka płaskiego – Low Grade - LGSIL (CIN 1) została oszacowana na 84,21% (95% CI; 0,69 – 0,94), a dla zmian wysokiego stopnia – High Grade - HGSIL ( CIN 2, CIN 3) wraz z rakiem płaskonabłonkowym 100% (95% CI; 0,93 – 1,0). Swoistość testu połączonego wyniosła 52,26 (95% CI; 0,45– 0,59). **Zastosowanie testu połączonego umożliwiło wykrycie wszystkich czterech przypadków raka gruczołowego, zlokalizowanych w obrębie kanału szyjki macicy.**

## 7. Dyskusja.

Celem wdrażania nowych metod diagnostyki stanów przedrakowych szyjki macicy jest precyzyjniejsza identyfikacja pacjentek z neoplazją, poprzez uniknięcie błędu ludzkiego dzięki wprowadzeniu automatyzacji oraz zwiększenie czułości i swoistości diagnostycznej. Dodatkową zaletą metody optoelektronicznej używanej do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy jest możliwość otrzymywania wyniku w czasie rzeczywistym, co umożliwi redukcję liczby kontrolnych wizyt diagnostycznych, przyspiesza postawienie rozpoznania ostatecznego i rozpoczęcie leczenia. Docelowo wdrożenie nowoczesnej metody optoelektronicznej do standardowego postępowania diagnostycznego radykalnie obniży koszty prowadzenia programu profilaktyki raka szyjki macicy.

Opublikowane przez Browna w 2000 roku wyniki badań z wykorzystaniem „The University of Sheffield Device” potwierdziły przydatność metody elektrycznej (jednej ze składowych optoelektroniki) w wykrywaniu patologii w obrębie nabłonka wielowarstwowego płaskiego szyjki macicy. Urządzenie to ocenia impedancję, na którą składa się pojemność i oporność elektryczna nabłonka szyjki macicy. Czułość i swoistość powyższej diagnostyki dla wykrywania zmian o charakterze CIN i raka płaskonabłonkowego szyjki macicy wynosiły 75% i 71%.<sup>74</sup>

Kontynuując poszukiwanie nowych metod diagnostycznych zapoczątkowane przez Browna w roku 2003 przeprowadzono sześćośrodkowe badanie kliniczne w celu potwierdzenia przydatności prototypowego systemu Cerviscan wykorzystującego technikę fluorescencji i spektroskopii u kobiet z nieprawidłowymi wynikami badania cytologicznego. W grupie 97 pacjentek, Cerviscan charakteryzował się czułością osiągającą 88% i swoistością rzędu 80% w wykrywaniu CIN.<sup>75</sup>

Ostatnio opublikowano podsumowanie drugiej fazy badania klinicznego, która miała na celu weryfikację zbioru danych i procedur badania pacjentek.<sup>76</sup> Uznano, iż badanie było zadowalające jako pilotażowe, a opracowany w celach diagnozy algorytm pozwalał na precyzyjniejszą identyfikację prawidłowego nabłonka jednowarstwowego. Metoda okazała się nieskuteczna przy identyfikacji prawidłowego nabłonka wielowarstwowego. Analiza efektów wykorzystania fluorescencji i zmian parametrów odbitego światła po zetknięciu z prawidłowym i zmienionym nabłonkiem szyjki macicy dała bardzo obiecujące efekty. Niewątpliwie istnieje potrzeba dalszych badań, aby tego

typu metodykę zastosować do identyfikacji zmian patologicznych szyjki macicy w sensie wykorzystania klinicznego.

W pracy z 2001 roku opublikowanej przez Nordstroma i współp. potwierdzono przydatność urządzenia Colpoprobe, wykorzystującego laser fluorescencyjny w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Badanie przeprowadzano w grupie kobiet z nieprawidłowym wynikiem badania cytologicznego, po aplikacji roztworu wodnego kwasu octowego na powierzchnię szyjki macicy. Metoda charakteryzowała się 91% czułością i 93% swoistością dla wykrywania zmian CIN2 i CIN3. Dla rozpoznania histopatologicznych CIN 1 wynosiła odpowiednio 86% i 87%.<sup>77</sup>

W roku 2004 Huh i współp. zastosowali bezdotykowe urządzenie steroskopowe in vivo, w celu rozpoznania zmian w obrębie nabłonka wielowarstwowego płaskiego szyjki macicy. Przy pomocy nowatorskiego urządzenia wykorzystującego fluorescencję i szerokopasmowe widma światła białego odbitego od tkanki prawidłowej i patologicznie zmienionej przebadano 604 kobiety, diagnozowane w sześciu niezależnych ośrodkach badawczych. Zbiór statystycznie istotnych danych powstał w oparciu o fluorescencję i widma charakterystyczne dla komórek nabłonka szyjki macicy pobudzonych przez światło białe. Otrzymane wyniki zostały porównane z rozpoznaniem histopatologicznymi. Po dokonaniu ponad 10 000 pomiarów stworzono algorytm, który według autorów osiągał czułość rzędu 90 % w wykrywaniu patologii szyjki macicy. Uznano, iż podwyższając próg klasyfikacji, metoda charakteryzowała się aż o 33% wyższą czułością niż tradycyjne badanie kolposkopowe.<sup>78</sup>

Kolejnym urządzeniem wykorzystującym fluorescencję tkankową jest wielomodułowy hiperspektralny system obrazowy (MHI), w którym sondę montuje się do przystosowanego wziernika dopochwowego. Jest ona przyłączona poprzez włókna optyczne do ksenonowej lampy łukowej w celu oświetlenia szyjki przez zróżnicowane długości fal. Sonda ta jest także wyposażona w detektor sygnałów emitowanych oraz odbitych. Urządzenie wymaga aplikacji roztworu wodnego kwasu octowego na powierzchnię szyjki macicy. Badanie zajmuje średnio 6 minut, w czasie których dokonują się cykle pomiarów spektralnych szyjki.

Testy kliniczne MHI obejmowały kobiety z nieprawidłowymi wynikami badania cytologicznego lub pacjentki, skierowane na badanie kontrolne po leczeniu zmian onkologicznych. Po przebadaniu 111 kobiet, uzyskana czułość metody dla rozpoznania

zmian typu CIN 3 była porównywalna z czułością cytodiagnostyki, przy dostosowaniu progu rozpoznania dla MHI, tak aby swoistość odpowiadała swoistości cytodiagnostyki. Czulość i swoistość wielomodułowego hiperspektralnego systemu obrazowego zostały obliczone na odpowiednio 97% i 70%.<sup>79</sup> W publikacji Ferris i współp. z 2001 roku, czulość i swoistość badania cytologicznego wynosiły 72% oraz 70%.

W roku 2002 i 2003 Georakoudi i współp. oraz Drezek i współp. przeprowadzili diagnostykę z zastosowaniem trójmodułowego systemu spektroskopowego (TMS) u 44 kobiet z nieprawidłowym wynikiem badania cytologicznego. Wstępne wyniki badań wydawały się być zachęcające. Do dnia dzisiejszego metoda ta nie została oficjalnie zarejestrowana i dopuszczona do użytku klinicznego.<sup>80</sup> Metodą diagnostyczną umożliwiającą, tak jak optoelektronika otrzymanie wyniku w czasie rzeczywistym jest THE FORTH / Crete device.

Oba urządzenia Truscreen oraz FORTH są w chwili obecnej jedynymi komercyjnie dostępnymi urządzeniami typu „real time device”. System THE FORTH wykorzystuje światło białe w celu uzyskania obrazu szyjki, w czasie 10 minut po aplikacji roztworu kwasu octowego. Urządzenie nie posiada sondy dopochwowej. System kolposkopowy jest połączony ze źródłem światła halogenowego, automatycznym dozownikiem kwasu octowego, kamerą oraz komputerem. THE FORTH wykorzystuje przetwarzanie cyfrowe do wzmocnienia kontrastu obrazu wybielonego nabłonka oraz parametrów fali światła odbitego przez powierzchnię nabłonka. W miarę prowadzenia pojedynczego badania rejestruje się z częstotliwością, co 10 sekund, kolejne 10 serii sekwencji złożonych z omówionych powyżej składowych. Końcowy wynik testu stanowi zamknięty zbiór danych zawierający różne intensywności światła rozproszonego przez powierzchnię diagnozowanego nabłonka. Zarejestrowane zmiany tworzą podstawę oceny ilościowej dynamiki interakcji pomiędzy nabłonkiem szyjki macicy i aplikacją roztworu wodnego kwasu octowego.<sup>81</sup> Urządzenie FORTH w znaczący sposób ułatwia lokalizację śródnabłonkowej neoplazji. Wieloośrodkowa praca Balas i współp. potwierdziła wysoką przydatność urządzenia FORTH do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy. W publikacji wykreślono krzywą ROC dla powyższego narzędzia diagnostycznego. Do interpretacji krzywej ROC obliczono pole pod krzywą, które wyniosło 0,844, co świadczy o znacznej wartości diagnostycznej testu do wykrywania zmian o charakterze śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy. W cytowanej pracy iloraz

diagnostyczny szans dla THE FORTH wyniósł 11,81, dla badania kolposkopowego 7,91, a dla cytodiagnostyki tylko 6,88.<sup>82 83</sup>

Pierwsze doniesienie o przydatności metody optoelektronicznej z zastosowaniem urządzenia Polarprobe przedstawił Coppleson w 1994 roku. Badacz ten jest dziś powszechnie uznawany za jednego z twórców współczesnej kolposkopii. Jego wytyczne dotyczące kwalifikacji i warunków do wykonania badania czyli tzw „warunki Copplesona” obowiązują do dzisiaj w niezmienionym kształcie. Zastosowanie właśnie przez Copplesona metody optoelektronicznej do wykrywania neoplazji na zasadzie konkurencyjności z kolposkopią i cytologią jest bardzo wymowne. Badaniem Copplesona objęto grupę 183 ochotniczek w wieku między 20, a 50 rokiem życia. Kryterium włączającym był nieprawidłowy wynik badania cytologicznego lub kolposkopowego. Czulość metody optoelektronicznej dla identyfikacji zmian typu CIN 1 wyniosła 88%, dla CIN 2 i CIN 3 91%, a dla raka inwazyjnego 99%. Swoistość metody optoelektronicznej przy zastosowaniu urządzenia Polarprobe dla rozpoznań prawidłowego nabłonka wielowarstwowego płaskiego, gruczołowego oraz fizjologicznej metaplazji wyniosła odpowiednio 94% dla zmian typu CIN 1, 97% dla zmian typu CIN 2, CIN 3 i 86% dla raka inwazyjnego.<sup>84</sup>

Uzyskane w ramach niniejszej pracy wyniki są zgodne szczególnie w zakresie czulości z doniesieniem Copplesona i potwierdzają przewagę metody optoelektronicznej - Truscreen nad tradycyjną cytodiagnostyką w procesie wykrywania patologii szyjki macicy.

Czulość metody optoelektronicznej dla zmian typu LGSIL w niniejszej pracy została oszacowana na 65,79%, a w pracy Copplesona na 88%, dla zmian typu HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego na 90,38%, a w pracy Copplesona na 94%.

W badaniach wieloośrodkowych przeprowadzonych w Australii i Wielkiej Brytanii czulość optoelektronicznego wykrywania zmian niskiego stopnia w obrębie nabłonka wielowarstwowego płaskiego została oszacowana na 67% (95% CI; 0,63 – 0,70), a dla zmian wysokiego stopnia 70% (95% CI; 0,67 – 0,74). Dla porównania czulość tradycyjnej cytodiagnostyki oceniono na 45% (95% CI; 0,41 – 0,49) dla LGSIL i 69% (95% CI; 0,65 – 0,72) dla HGSIL.<sup>85</sup> Czulość cytodiagnostyki wykazana w ramach przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy badań dla zmian typu LGSIL jest wyższa i wynosi 97,37% (95% CI; 0,86 – 0,99), a dla zmian typu HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego została oszacowana na 96,15% (95% CI; 0,87 – 0,99). W cytowanej publikacji Singera i wspóln.



swoistość metody optoelektronicznej oraz cytodiagnostyki użytej do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy wyniosła odpowiednio 81% (95% CI; 0,78 – 0,84) i 95% (95% CI; 0,94 – 0,96). Czulość testu połączonego czyli cytodiagnostyki i metody optoelektronicznej dla zmian typu LGSIL wyniosła 87% (95% CI; 0,84 – 0,89), dla zmian typu HGSIL 93% (95% CI; 0,91 – 0,95). Swoistość powyższego testu połączonego została oszacowana na 80% (95% CI; 0,76 – 0,84).

W pracy Copplesona i współp. z 1994 roku wykorzystano prototypowe urządzenie optoelektroniczne (Polarprobe). Czulość diagnostyki optoelektronicznej z wykorzystaniem sondy Polarprobe dla wykrycia śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy niskiego stopnia wyniosła 85%, dla śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy średniego i wysokiego stopnia została oszacowana na 90%, a dla raka inwazyjnego szyjki macicy na 99%. Zastosowany w badaniach system Truscreen jest technologicznym rozwinięciem urządzenia Polarprobe wykorzystywanego do badań przez Copplesona.<sup>87</sup>

W 1997 roku Mould i współp. opracowali ankietę, oceniającą komfort 152 kobiet w trakcie pobierania tradycyjnego wymazu cytologicznego oraz w trakcie badania metodą optoelektroniczną. Większość pacjentek uznała metodę optoelektroniczną za bardziej przyjazną kobiecie, komfortową i niebolesną.<sup>86</sup> Prawie 98% badanych kobiet za główną zaletę metody uznało możliwości uzyskania wyniku badania w czasie rzeczywistym.<sup>11</sup> Dla porównania żadna z pacjentek biorących udział w badaniach realizowanych na potrzeby niniejszej pracy nie zgłosiła dolegliwości bólowych w trakcie badania urządzeniem Truscreen.

Uzyskana w ramach przeprowadzonych przez nasz ośrodek badań w 2008 roku czulość metody optoelektronicznej w procesie wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy niskiego stopnia (CIN1) wynosiła 53,33%. W przypadku zmian typu CIN 2 metoda charakteryzowała się wyższą czulością, która została oszacowana na 80%. Dla zmian typu CIN 3 i raka płaskonabłonkowego czulość metody optoelektronicznej została oceniona na 100%. Swoistość optoelektroniki dla identyfikacji kobiet bez patologii szyjki macicy wyniosła 84%.<sup>87</sup>

Czulość metody optoelektronicznej w badanej na potrzeby niniejszej pracy populacji dla identyfikacji zmian śródnabłonkowych wysokiego stopnia – HGSIL ( CIN 2, CIN 3) oraz raka płaskonabłonkowego wynosiła 90,38% (95% CI; 0,79 – 0,97). Znamienny jest fakt, że metoda optoelektroniczna umożliwiła detekcję tylko jednego z czterech

przypadków raka gruczołowego szyjki macicy. Dla porównania test na obecność onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego – DNA HPV HR umożliwił wykrycie wszystkich, czterech przypadków raka gruczołowego (adenocarcinoma), wewnątrzkanałowego raka szyjki macicy. Swoistość metody optoelektronicznej użytej do potwierdzenia braku patologii szyjki macicy wyniosła 78,89 % (95% CI; 0,73 – 0,84).

Otrzymane wyniki potwierdzają przydatność diagnostyki optoelektronicznej wykrywaniu stanów przedrakowych i raków inwazyjnych w obrębie nabłonka wielowarstwowego płaskiego szyjki macicy. Pole pod krzywą ROC dla metody optoelektronicznej wyniosło 0,88 (95% CI; 0,84-0,92), co świadczy o wysokiej wartości diagnostycznej tego testu do wykrywania zmian typu - HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego. Otrzymana krzywa ROC potwierdziła, iż najlepszym punktem odcięcia dla wyników prawidłowych i nieprawidłowych jest liczba pNOR równa 0,5. Przyjęcie takich wartości progowych pNOR pozwala na uzyskanie optymalnych parametrów czułości i swoistości metody optoelektronicznej dla wykrywania zmian typu HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego szyjki macicy. Wstępne wyniki zespołu chińskich badaczy potwierdzają, że najlepszym punktem odcięcia jest wartość progowa pNOR równa 0,5. W pracy Zhanga i współp. czułość metody optoelektronicznej w badaniu obejmującym 391 kobiet dla identyfikacji zmian śródnabłonkowych wysokiego stopnia oraz raka płaskonabłonkowego wyniosła 76,47%. Swoistość optoelektroniki dla identyfikacji kobiet bez patologii szyjki macicy wyniosła 77,27%.<sup>88</sup>

Wprowadzona w zeszłym wieku cytodiagnostyka jako podstawa badań przesiewowych w celu wykrycia CIN przyczyniła się do znacznego spadku zachorowalności i umieralności na raka szyjki macicy. Dane z Narodowego Instytutu Raka potwierdzają spadek umieralności na raka szyjki macicy o blisko 70% w przeciągu ostatnich 70 lat.<sup>89</sup> Jako narzędzie diagnostyczne, cytodiagnostyka spełnia do dnia dzisiejszego wszystkie kryteria testu przesiewowego i jest stosowana powszechnie w badaniach profilaktycznych. Istotną wadą cytodiagnostyki jest wysoki odsetek wyników fałszywie negatywnych, szacowany, w niektórych doniesieniach do blisko 50%.<sup>90</sup> Za tak wysoki odsetek wyników fałszywie negatywnych może odpowiadać nieprawidłowa technika pobierania materiału, błędna ocena oraz wewnątrzkanałowa lokalizacja patologii szyjki macicy. Czułość i swoistość przeciętnej konwencjonalnej cytodiagnostyki w wykrywaniu zmian o charakterze neoplazji według danych Nanda i wsp. wynosi

odpowiednio 47% i 95%.<sup>91</sup> Kolejną wadą cytodiagnostyki jest niska czułość w wykrywaniu zmian zlokalizowanych w obrębie endocervix.<sup>92</sup>

Cox i wspólnie oszacowali czułość oraz swoistość cytodiagnostyki opartej o klasyfikację TBS na 60 % i 70 % dla rozpoznań cytologicznych ASCUS i SIL.<sup>93</sup> W metaanalizie Bolicka i wspólnie czułość konwencjonalnego rozmazu cytologicznego została oszacowana na 85,6%. W tej samej publikacji czułość płynnej cytologii była nieznacznie wyższa i wynosiła 94,2%. Swoistość cytodiagnostyki konwencjonalnej, jak i płynnej wynosiła 57,7%.<sup>94</sup>

W niniejszej pracy odsetek nieprawidłowych wyników cytologicznych wyniósł blisko 70%. Wynikało to z pewnością z faktu, że do grupy badanej włączono pacjentki które zgłosiły się do Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy (PPSM) celem weryfikacji nieprawidłowego wyniku cytologicznego. Wobec braku pewności, co do jakości i wiarygodności tych rozpoznań cytologicznych, niezależnie pobierano w PPSM dodatkowy wymaz cytologiczny. Czułość cytodiagnostyki realizowanej w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy według założeń obowiązujących w Unii Europejskiej (kontrola wewnętrzna, zewnętrzna, nadzór patomorfologa) ocenianej według TBS dla wykrywania zmian typu Low Grade oszacowano na 97,37%, dla High Grade i raka płaskonabłonkowego na 96,15%. Natomiast swoistość wyniosła tylko 43%. Przyjęcie norm oceny wymazu cytologicznego zalecanych w programach profilaktycznych krajów UE, a szczególnie wtórny retest rozmazów cytologicznych w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy wykonywany na potrzeby niniejszej pracy miał niewątpliwy wpływ na wysoką wartość czułości w wykrywaniu patologii szyjki macicy. Cytodiagnostyka umożliwiła detekcję trzech przypadków raka gruczołowego. W pracy Lee i wspólnie czułość cytodiagnostyki w wykrywaniu raka gruczołowego szyjki macicy została oceniona na 55 – 78 %.<sup>95</sup> Zastosowanie szczoteczek endocerykalnych oraz płynnego podłoża wpływa znacząco na wzrost czułości cytologii eksfoliatywnej w wykrywaniu zmian typu AIS.<sup>96</sup>

Oszacowanie pola pod krzywą ROC, które dla cytodiagnostyki realizowanej w PPSM i użytej do wykrywania patologii szyjki macicy wynosiło 0,85. Potwierdziło to wysoką wartość diagnostyczną metody do wykrywania zmian wysokiego stopnia oraz raka szyjki macicy.

Jednakże należy zarazem stwierdzić, że otrzymane dane charakteryzują się wysokim odsetkiem fałszywie dodatnich wyników oceny wyników cytologicznych. Wskazuje to na

niską swoistość cytodiagnostyki wynoszącej tylko 43% i generowanie wysokich kosztów związanych z dalszą diagnostyką u pacjentek z nieprawidłowym wynikiem badania.

Przykład PPSM wskazuje, że realizowanie zarówno skutecznego skriningu cytologicznego, jak i precyzyjnych wybiórczych badań cytologicznych w celu identyfikacji pacjentek z patologią szyjki macicy wymaga znacznego nakładu kosztów, czasu, szkolenia, zakupu sprzętu itp.

Każdy tego typu ośrodek powinien posiadać wewnętrzny system kontroli oceny preparatów cytologicznych oraz podlegać nadzorowi starszego cytotechnika z wieloletnim stażem pracy. Ostatecznie nieprawidłowe wyniki rozpoznań cytologicznych powinny być konsultowane przez doświadczonego lekarza patomorfologa. Przyjęcie takich zasad przy realizacji cytodiagnostyki pozwala na uzyskanie optymalnych wartości czułości i swoistości w wykrywaniu patologii szyjki macicy.

Współczesny rozwój biologii molekularnej, jak również wysoka korelacja między przetrwałym zakażeniem HPV, a rozwojem patologii szyjki macicy przyczyniły się do powstania nowych technik diagnostycznych. Zastosowanie testów molekularnych identyfikujących DNA HPV HR umożliwiło nie tylko wykrywanie patologii ale również wskazanie kobiet należących do grup podwyższonego ryzyka rozwoju i progresji środnabłonkowej neoplazji szyjki macicy.

W pracy Francesco z 2008 roku, czułość testu molekularnego PCR na obecność DNA trzynastu onkogennych typów wirusa HPV dla zmian typu CIN 1 wynosiła 59%, dla zmian typu CIN 2 i CIN 3 odpowiednio 92% i 90%. Czułość metody PCR dla zmian High Grade została obliczona na 90% (95% CI; 0,85 – 0,95). Swoistość wynosiła 41% (95% CI; 0,32 – 0,52). Dla porównania czułość konkurencyjnego testu Hybrid Capture 2 dla zmian High Grade została obliczona na 87% (95% CI; 0,81 – 0,93). Swoistość wynosiła 41% (95% CI; 0,32 – 0,52).<sup>97</sup>

W badanej na potrzeby niniejszej pracy populacji czułość metody molekularnej PCR użytej dla wykrycia zmian wysokiego stopnia – HGSIL (CIN 2, CIN 3) wraz z rakiem płaskonabłonkowym wyniosła 92,31% (95% CI; 0,81 – 0,98). Metoda molekularna umożliwiła wykrycie wszystkich przypadków raka gruczołowego. Swoistość metody molekularnej PCR identyfikującej obecność trzynastu typów onkogennych wirusa brodawczaka ludzkiego użytej do wykrycia patologii szyjki macicy oszacowano na 63,32 %

(95% CI; 0,56 – 0,70). Uzyskane w ramach realizacji badań wyniki opisujące przydatność testu na obecności DNA HPV HR w wykrywaniu patologii szyjki macicy są porównywalne z doniesieniami światowymi, uwagę zwraca stosunkowo wysoka swoistość.<sup>98 99</sup>

Koncepcja połączenia dwóch testów diagnostycznych, a mianowicie cytodiagnostyki i testów na obecność DNA onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego zwiększyło czułość wykrycia CIN, zmniejszając zarazem o kilkanaście procent swoistość. Wdrożenie do diagnostyki testu wykrywającego transkrypty mRNA onkogennych typów wirusa i jego użycie razem z cytodiagnostyką powinno wpłynąć znacząco na wzrost czułości i swoistości w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy. Przeprowadzone badania potwierdzają wzrost czułości i spadek swoistości testu połączonego dla cytodiagnostyki i badania metodą identyfikacji DNA HPV HR. Jak już wspomniano powyżej prawidłowość ta jest zgodna z większością doniesień z literatury światowej.<sup>100</sup>

Należy jednak zaznaczyć, że zastosowanie łączne dwóch testów przesiewowych: cytodiagnostyki oraz badania molekularnego na obecność DNA onkogennych typów wirusa HPV pomimo obniżenia swoistości, może zwiększyć czułość badań profilaktycznych do 93 – 100%.<sup>101</sup>

W ostatnich latach Ferreccio i współp. opublikowali prace oceniającą czułość testów połączonych w wykrywaniu zmian typu CIN oraz raka szyjki macicy. Czułość pojedynczej konwencjonalnej cytologii wyniosła 63%. Połączenie tradycyjnej cytologii z cytologią płynną lub z testem na obecność onkogennych typów wirusa HPV spowodowała wzrost czułości do 87% dla zmian o charakterze CIN 3 i 91 % dla raka płaskonabłonkowego. Warto zaznaczyć, iż czułość cytologii LBC i testu molekularnego zastosowanego niezależnie i pojedynczo wynosiły odpowiednio 86% i 85%.<sup>102</sup>

Wyniki uzyskane w ramach przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy badań potwierdzają także wysoką czułość testu połączonego, składającego się z metody optoelektronicznej oraz z badania molekularnego PCR. Zastosowanie testu połączonego umożliwiło wykrycie czterech przypadków raka gruczołowego, zlokalizowanych w obrębie kanału szyjki macicy. Czułość powyższego testu dla zmian LGSIL została obliczona na 84,21%, a dla zmian HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego na 100%. Swoistość wyniosła tylko 52,26%. Stosunkowo niska swoistość wynika z faktu częstego

występowania incydentalnej infekcji HPV bez współistniejącej patologii szyjki macicy, szczególnie u kobiet przed 30 rokiem życia. Zapowiadane szerokie zastosowanie w niedalekiej przyszłości testu wykrywającego transkrypty wirusa HPV, powinno w znaczący sposób wpłynąć na podwyższenie swoistości badania molekularnego na obecność mRNA HPV, a tym samym zredukować koszty związane z weryfikacją nieprawidłowych wyników cytologicznych.

Czułość metody kolposkopowej w grupie badanej dla wykrywania zmian śródnabłonkowych niskiego stopnia w obrębie nabłonka płaskiego – LGSIL (CIN 1) została oszacowana na 84,85% (95% CI; 0,68 – 0,94), a dla zmian wysokiego stopnia – HGSIL (CIN 2, CIN 3) wraz z rakiem płaskonabłonkowym na 100% (95% CI; 0,93 – 1,0). Metoda ta umożliwiła detekcję dwóch z czterech przypadków raka gruczołowego. Swoistość kolposkopii ocenianej według skali Reida wyniosła 54% (95% CI; 0,47 – 0,62). Przeprowadzona na potrzeby niniejszej pracy diagnostyka kolposkopowa charakteryzowała się wysoką czułością oraz niższą swoistością w stosunku do danych pochodzących z innych publikacji. Diagnostyka kolposkopowa charakteryzowała się największym polem pod krzywą ROC, które wyniosło 0,91 (95% CI; 0,87-0,95), co potwierdza wysoką wartość diagnostyczną tej metody w wykrywaniu zmian wysokiego (HGSIL) wraz z rakiem płaskonabłonkowym.

Według światowych publikacji kolposkopia charakteryzuje się wyższą czułością niż cytodiagnostyka. Ocena kolposkopowa szyjki macicy nie jest zalecana do identyfikacji zmian zlokalizowanych głęboko wewnątrzkanałowo. Warunkiem uznania kolposkopii za badanie diagnostyczne jest całkowite uwidocznienie strefy przekształceń. W pracy z 1995 roku opublikowanej przez Fahey czułość kolposkopii dla wykrywania patologii szyjki macicy wahała się w granicach od 11% do 99%, swoistość powyższego narzędzia diagnostycznego została oszacowana w granicach od 14% do 91%.<sup>103</sup> W publikacji Massada czułość kolposkopii do wykrycia zmian neoplastycznych szyjki macicy wyniosła 89%, a swoistość 53%.<sup>104</sup> Według danych opracowanych przez Mitchella czułość i swoistość omawianego narzędzia diagnostycznego do wykrywania patologii szyjki macicy zostały ocenione odpowiednio na 79% i 76%.<sup>105</sup> Wysoką czułość badania kolposkopowego w wykrywaniu patologii szyjki macicy wykazaną w ramach niniejszej pracy uzyskano dzięki przestrzeganiu dwóch zasad. Po pierwsze, właściwej ocenie warunków do wykonania badania tylko tam gdzie były satysfakcjonujące. Po drugie,

zastosowaniu skali Reida, która pozwoliła na obiektywizację kwalifikacji wskazań do biopsji ( $\geq 3$ pkt RCI).

W pracy wielośrodkowej ogłoszonej przez Ferency podczas sympozjum Eurogin w 2008 roku, oceniono czułość biopsji celowanej wykonywanej pod kontrolą kolposkopii względem konizacji diagnostycznej szyjki macicy. Aż u 15 % pacjentek z potwierdzonym histopatologicznie brakiem patologii szyjki macicy lub z rozpoznaniem histopatologicznym CIN 1 postawiono rozpoznanie CIN 3 w oparciu o ocenę histopatologiczną materiału pochodzącego z konizacji diagnostycznej. Czułość biopsji celowanej do identyfikacji patologii szyjki macicy oszacowano na niespełna 40% w porównaniu do ostatecznego rozpoznania histopatologicznego po analizie stożka konizacyjnego.<sup>106</sup>

Cytowana powyżej publikacja potwierdza konieczność dodatkowej weryfikacji pacjentek, u których dwa nieinwazyjne testy diagnostyczne przyniosły skrajne rozbieżne wyniki. Konizacja diagnostyczna wykonana w takiej sytuacji może umożliwić sformułowanie prawidłowego, ostatecznego rozpoznania i wykryć skutecznie patologię szyjki macicy.

W przeprowadzonych przez nasz ośrodek badaniach metoda optoelektroniczna charakteryzuje się wyższą swoistością w wykrywaniu zmian nabłonka płaskiego szyjki macicy od cytodiagnostyki, badania molekularnego na obecność DNA HPV HR oraz badania kolposkopowego. Pod względem czułości dla identyfikacji zmian HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego, metoda optoelektroniczna nieznacznie ustępuje miejsca pozostałym narzędziom diagnostycznym.

Niewątpliwą zaletą metody optoelektronicznej jest obiektywizacja wyników czyli wykluczenie potencjalnych błędów ludzkich, które często mają wpływ na wartość diagnostyczną, szczególnie metod subiektywnych takich jak kolposkopia. Dodatkowo wykonywanie kolposkopii wymaga wieloletniej praktyki i ciągłego szkolenia, co i tak nie zawsze gwarantuje pewność rozpoznań. W pełni zautomatyzowane, obiektywne badanie optoelektroniczne realizowane w czasie rzeczywistym jest tanie i nie wymaga doświadczenia klinicznego od osoby je wykonującej. Maksymalne uproszczenie techniki badawczej przy jednoczesnym podwyższeniu czułości i swoistości testu diagnostycznego może zdecydować o upowszechnieniu metody optoelektronicznej w programie profilaktyki onkologicznej.

Na podstawie przeprowadzonych badań należy jednak stwierdzić, że metoda optoelektroniczna wydaje się być nieprzydatna w skutecznym wykrywaniu patologii szyjki macicy przy niemożliwości uwidocznienia całej powierzchni tarczy szyjki macicy, wraz ze strefą przekształceń. Sytuacja taka zachodzi często w okresie 3 miesięcy po zabiegach operacyjnych na szyjce (biopsja, konizacja itp.), w ciąży czy w okresie połogu, po radio i fototerapii, a także w przypadku stwierdzenia zmian krwawiących i w obecności dużych torbieli Nabotha.

Diagnostyka optoelektroniczna nie rozwiązuje niestety w pełni kwestii pewnego wykrywania patologii w obrębie nabłonka gruczołowego kanału szyjki macicy. W sytuacji gdy śródnabłonkowa neoplazja zlokalizowana jest w endocervix, optoelektronika podlega niestety tym samym ograniczeniom co cytodiagnostyka i kolposkopia. Stąd wniosek, że test optoelektroniczny powinien być wykonywany łącznie z testem molekularnym na obecność DNA HPV HR. Połączenie diagnostyki optoelektronicznej z molekularnym testem na obecność DNA HPV HR powinno w istotny sposób podwyższyć czułość wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy zbliżając ją do wartości 100%.

Na uwagę zasługuje fakt, iż urządzenia Truscreen oraz FORTH są w chwili obecnej jedynymi komercyjnie dostępnymi urządzeniami typu „real time device”. Obie metody umożliwiają otrzymanie wyniku badania w czasie rzeczywistym. Wadą urządzenia FORTH jest konieczność aplikacji roztworu wodnego kwasu octowego na powierzchnię szyjki macicy, czego nie wymaga technologia Truscreen. Z tego względu zastosowanie w praktyce urządzenia FORTH jest bardziej czasochłonne oraz mniej komfortowe dla pacjentek. Natomiast wadą urządzenia Truscreen jest konieczność stosowania jednorazowych nakładek na sondę diagnostyczną. Jednorazowa cena urządzenia FORTH wynosi obecnie 20 000 EUR, a Truscreena 4 000 EUR. Do kosztów użytkowania Truscreena należy jednak doliczyć koszt jednorazowej nakładki – SUS, który aktualnie w roku 2010 wynosi 8 EUR. Natomiast do kosztów jednorazowego badania systemem FORTH należy doliczyć cenę zużytego kwasu octowego oraz jednorazowego podajnika wraz z cewnikiem.

Nowe technologie diagnostyczne, coraz częściej wykorzystują biosensory, które w oparciu o analizę właściwości biofizycznych i biochemicznych nabłonka szyjki macicy określają parametry fizjologiczne lub patofizjologiczne. Dzięki powstaniu różnorodnych zbiorów danych i algorytmów opisanych powyżej technik, umożliwiają one



zakwalifikowanie określonego profilu biofizycznego lub biochemicznego do odpowiedniej grupy patologii. Biosensory optyczne mierzą zmiany fluorescencji, charakteryzują modyfikację wiązki odbitego światła oraz rozproszenia w obrębie tkanek, w zależności od długości fali świetlnej. Biosensory elektryczne określają impedancję tkanki poprzez pomiar oporu czynnego i biernego. Krzywa przepływu ładunku elektrycznego przez tkankę zależy od właściwości dielektrycznych jej struktur. Urządzenia, umożliwiające otrzymanie wyników w czasie rzeczywistym, można podzielić na dwie główne kategorie – przeznaczone do masowego skринingu oraz do weryfikacji nieprawidłowych wyników cytologicznych. Aktualnie uważa się, iż technologie które nie wykorzystują wodnego roztworu octowego oraz pełnoprzekrojowego obrazu, są przeznaczone do badań przesiewowych.

Do grupy prototypowych testów skринingowych zalicza się:

- urządzenie optoelektroniczne – TruScreen,
- prototypowe urządzenie Uniwersytetu Sheffield.

Urządzenia diagnostyczne zapewniają lepszą ocenę topografii nabłonków szyjki macicy oraz przekazują dane z biosensora odnośnie lokalizacji patologii.

Do grupy urządzeń diagnostycznych zalicza się:

- Cerviscan,
- Colpoprobe,
- system MHI,
- system TMS,
- FORTH.

Nowe osiągnięcia w technologii sensorycznej i w zaawansowanym systemie przetwarzania danych umożliwiają zautomatyzowanie procesu identyfikacji nieprawidłowego nabłonka szyjki macicy. Automatyzacja przynosi korzyści w ramach podwyższonej standaryzacji oraz kontroli jakości badań przesiewowych i diagnostycznych.

Metody umożliwiające uzyskanie wyniku w czasie rzeczywistym w znaczący sposób skracają czas uzyskania ostatecznej diagnozy oraz ewidentnie minimalizują liczbę

wymaganych wizyt kontrolnych. Oczekuje się, iż te korzyści przyspieszą dalszy rozwój badań nad tego typu technologią diagnostyczną. Już dziś można stwierdzić, że urządzenia typu „real time device” mają szansę stać się trwałym elementem badań przesiewowych oraz diagnostyki śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy.

Zastosowanie zautomatyzowanej diagnostyki optoelektronicznej w regionach świata pozbawionych dostępności do opieki lekarskiej np. na kontynencie afrykańskim oraz w Ameryce Południowej może w znaczący sposób obniżyć zachorowalność i umieralność na raka szyjki macicy. Elementem decydującym o szybkim i szerokim wdrożeniu tego typu diagnostyki jest fakt, że operatorem urządzenia nie musi być wysoko wykwalifikowany lekarz. Badanie może z powodzeniem wykonać osoba, która potrafi pobrać wymaz cytologiczny czyli pielęgniarka lub położna. Wynik badania jest standaryzowany i automatyczny. W trakcie pierwszej wizyty umożliwia natychmiastowe zakwalifikowanie kobiety do dalszej diagnostyki i wykonania badania kolposkopowego oraz celowanych wycinków lub decyduje o kontroli za kilka lat przy prawidłowym wskazaniu badania. Umożliwia znaczące skrócenie czasu jaki upływa od nieprawidłowego wyniku badania przesiewowego do postawienia ostatecznego rozpoznania histopatologicznego. W wielu krajach rozwijających się, ze względu na brak pracowni cytologicznych, wykwalifikowanego personelu oraz systemu badań przesiewowych metoda optoelektroniczna może się okazać diagnostyką z wyboru, szybką do wdrożenia i taną w realizacji.

W takich krajach Unii Europejskiej jak Wielka Brytania oraz Włochy metoda optoelektroniczna jest stosowana zamiennie z cytodiagnostyką. W roku 2009 Federacja Rosyjska nabyła około 150 systemów Truscreen oraz zorganizowała szereg spotkań dotyczących prewencji raka szyjki macicy oraz diagnostyki przy użyciu optoelektroniki. W chwili obecnej trwają badania kliniczne z zastosowaniem powyższej metody w Turcji. Od około trzech lat trwa ekspansja diagnostyki optoelektronicznej używanej do wykrywania patologii szyjki macicy w krajach azjatyckich. W wielu gabinetach lekarskich pacjentki mają możliwość wyboru pomiędzy tradycyjnym pobraniem wymazu cytologicznego, a diagnostyką optoelektroniczną.

Zarówno przedstawione wyniki badań jak i coraz liczniejsze doniesienia z literatury światowej przekonują, że metoda optoelektroniczna może stać się uznanym, obiektywnym narzędziem diagnostycznym, służącym do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki

macicy i raka płaskonabłonkowego szyjki macicy oraz weryfikacji nieprawidłowych wyników cytologicznych.

## 8. Wnioski.

Metodę optoelektroniczną cechuje wysoka przydatność w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy powstającej w obrębie nabłonka paraepidermalnego oraz raka płaskonabłonkowego szyjki macicy.

1. Otrzymane parametry czułości i swoistości metody optoelektronicznej potwierdzają wysoką wartość diagnostyczną testu dla wykrywania zmian typu HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego szyjki macicy.

2. Liczba graniczna pNOR równa 0,5 pozwala na uzyskanie optymalnych parametrów czułości i swoistości metody optoelektronicznej dla wykrywania zmian typu HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego szyjki macicy.

3. Metoda optoelektroniczna użyta do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji obecnej w nabłonku paraepidermalnym i raka płaskonabłonkowego szyjki macicy charakteryzuje się wyższą swoistością od cytodiagnostyki, badania molekularnego na obecność DNA HPV HR oraz badania kolposkopowego.

4. Czułość optoelektroniki w detekcji patologii nabłonka wielowarstwowego płaskiego jest nieznacznie niższa w porównaniu z cytodiagnostyką, testem na obecność DNA HPV HR oraz kolposkopią.

## Streszczenie

### Wstęp:

Dziedziną, która bardzo dynamicznie wkracza w profilaktykę i diagnostykę śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy jest biofizyka. Jedną z najbardziej obiecujących koncepcji biofizycznego programu wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy jest metoda optoelektroniczna.

### Cele:

Ocena czułości i swoistości metody optoelektronicznej użytej do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy.

Określenie zależności pomiędzy liczbą graniczną pNOR, a czułością i swoistością metody optoelektronicznej.

Porównanie czułości i swoistości metody optoelektronicznej użytej do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka szyjki macicy w porównaniu do cytodiagnostyki, testu molekularnego na obecność DNA HPV HR oraz oceny kolposkopowej szyjki macicy.

### Material i metodyka:

Przebadano 293 pacjentki w Klinice Onkologii Ginekologicznej oraz w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno - Położniczo Szpitala Klinicznego w Poznaniu, które zgłosiły się z powodu nieprawidłowego wyniku badania cytologicznego.

U pacjentek wykonano następujące badania diagnostyczne: badanie metodą optoelektroniczną, wymaz cytologiczny, test na obecność DNA HPV HR, badanie kolposkopowe i badanie histopatologiczne materiału biopsyjnego. W badaniu wykorzystano system diagnostyczny wykorzystujący metodę optoelektroniczną – Truscreen.

### Wyniki:

Czułość metody optoelektronicznej dla zmian typu LGSIL została oszacowana na 65,79%, a dla zmian typu HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego 90,38%. Swoistość metody optoelektronicznej użytej do potwierdzenia braku patologii szyjki macicy wyniosła 78,89 %.

Pole pod krzywą ROC dla metody optoelektronicznej wyniosło 0,88 (95% CI; 0,84-0,92), co świadczy o wysokiej wartości diagnostycznej tego testu do wykrywania zmian typu - HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego.

**Wnioski:**

Metodę optoelektroniczną cechuje wysoka przydatność w wykrywaniu śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy powstającej w obrębie nabłonka paraepidermalnego oraz raka płaskonabłonkowego szyjki macicy.

Liczba graniczna pNOR równa 0,5 pozwala na uzyskanie optymalnych parametrów czułości i swoistości metody optoelektronicznej dla wykrywania zmian typu HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego szyjki macicy.

Metoda optoelektroniczna użyta do wykrywania śródnabłonkowej neoplazji obecnej w nabłonku paraepidermalnym i raka płaskonabłonkowego szyjki macicy charakteryzuje się wyższą swoistością od cytodiagnostyki, badania molekularnego na obecność DNA HPV HR oraz badania kolposkopowego.

Czułość optoelektroniki w detekcji patologii nabłonka wielowarstwowego płaskiego jest nieznacznie niższa w porównaniu z cytodiagnostyką, testem na obecność DNA HPV HR oraz kolposkopią.

**Słowa kluczowe: metoda optoelektroniczna, śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy, profilaktyka raka szyjki macicy.**

## Summary

### Introduction:

Biophysics is becoming an important factor in the prevention and diagnostics of cervical intraepithelial neoplasia. One of the most promising concepts of the biophysical program of the diagnostics of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer is the optoelectronic method.

### Objectives:

Evaluation of sensitivity and specificity of the optoelectronic method in the detection of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer.

The objective of the paper was to determine the correlation between the pNOR number and sensitivity/ specificity of the optoelectronic method.

Sensitivity and specificity of the optoelectronic method, used for the detection of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer compared with cytodiagnosics, molecular DNA HPV HR test as well as colposcopic evaluation of cervix.

### Material and method:

The study included 293 patients with abnormal cervical cytology result, examined in the Laboratory of Pathophysiology of Uterine Cervix in Gynecology and Obstetrics Clinical Hospital of Karol Marcinkowski University of Medical Sciences. The study included following examinations: examination with the use of the optoelectronic method, repeated cytology, DNA HPV HR test, colposcopic examination and histopathologic biopsy. The examination included diagnostic system, using the optoelectronic method – Truscreen.

### Results:

The specificity of the optoelectronic method for LGSIL was estimated to 65.70%, for HGSIL and squamous cell carcinoma of cervix amounted to 90.38%. The specificity of the optoelectronic method, used to confirm lack of cervical pathology was estimated to 78.89%.

The field under the ROC curve for the optoelectronic method was estimated to 0.88 (95% CI; 0.84-0.92), which shows high diagnostic value of the test in the detection of HGSIL and squamous cell carcinoma.

### Conclusions:

The optoelectronic method is characterised by high usefulness in the detection of cervical intraepithelial neoplasia, present in the squamous epithelium and squamous cell

carcinoma of cervix. The pNOR number equals 0.5, allows to obtain best sensitivity and specificity parameters of the optoelectronic method for the detection of HGSIL and squamous cell carcinoma.

The optoelectronic method, used for the detection of HGSIL and squamous cell carcinoma of cervix is characterised by higher specificity then cytology, DNA HPV HR test and colposcopic examination.

The sensitivity of the optoelectronic method in the detection of HGSIL as well as of squamous cell carcinoma is insignificantly lower then cytology, DNA HPV HR test and colposcopy.

**Key words: the optoelectronic method, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer prevention.**



**Spis tabel:**

Tabela 1. Czynniki ryzyka i ich wpływ na powstanie raka szyjki macicy u kobiet zakażonych onkogennym typem wirusa HPV .....	11
Tabela 2. Klasyfikacja rozmazów cytologicznych według Papanicolaou.....	19
Tabela 3. Nowe narzędzia diagnostyczne do wykrywania śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy.....	26
Tabela 4. Klasyfikacja obrazów kolposkopowych (Barcelona 2003). .....	44
Tabela 5. Skojarzony indeks kolposkopowy Reida.....	45
Tabela 6. Czulość metody optoelektronicznej dla wykrywania CIN1, CIN2, CIN3 i raka płaskonabłonkowego oraz gruczolowego.....	56
Tabela 7. Czulość metody optoelektronicznej dla wykrywania zmian niskiego (LGSIL) i wysokiego (HGSIL) stopnia wraz z rakiem płaskonabłonkowym .....	56
Tabela 8. Zestawienie czulości oraz swoistości poszczególnych narzędzi diagnostycznych: metody optoelektronicznej, cytodiagnostyki, badania molekularnego oraz badania kolposkopowego.....	57
Tabela 9. Porównanie pola pod krzywą ROC metody optoelektronicznej, cytodiagnostyki oraz badania kolposkopowego.....	58
Tabela 10. Czulość metody molekularnej PCR identyfikującej trzynaście typów onkogennych wirusa brodawczaka ludzkiego, użytej do wykrycia zmian niskiego (LGSIL) i wysokiego (HGSIL) stopnia wraz z rakiem płaskonabłonkowym.....	60
Tabela 11. Czulość kolposkopii ocenianej według skali Reida dla wykrywania zmian niskiego (LGSIL) i wysokiego (HGSIL) stopnia wraz z rakiem płaskonabłonkowym .....	63

**Spis wykresów:**

Wykres 1. Udział procentowy poszczególnych rozpoznań histopatologicznych oraz pacjentek, u których wykluczono patologię szyjki macicy w całej populacji badanej. ....	50
Wykres 2. Udział procentowy poszczególnych rodzajów rozpoznanej patologii szyjki macicy w grupie badanej liczącej 94 pacjentki. ....	51
Wykres 3. Udział procentowy poszczególnych rozpoznań histopatologicznych: raka płaskonabłonkowego, raka gruczołowego, CIN 3, CIN 2 oraz CIN 1 w grupie badanej liczącej 94 pacjentki w zależności od wieku badanych kobiet. ....	52
Wykres 4. Udział procentowy wyników prawdziwie pozytywnych (n=73) i prawdziwie negatywnych (n=158) oraz fałszywie pozytywnych (n=41) i fałszywie negatywnych (n=21) otrzymanych w oparciu o metodę optoelektroniczną. ....	54
Wykres 5. Udział procentowy wyników prawidłowych i nieprawidłowych (metoda optoelektroniczna, pNOR=0.5) w przypadku następujących rozpoznań histopatologicznych: raka płaskonabłonkowego, CIN 3, CIN 2, CIN 1 oraz rozpoznań bez cech neoplazji. ....	55
Wykres 6. Krzywa ROC dla metody optoelektronicznej użytej do wykrywania zmian – HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego. ....	58
Wykres 7. Wyniki testu molekularnego PCR identyfikującego obecność onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego dla następujących rozpoznań histopatologicznych: raka płaskonabłonkowego, CIN 3, CIN 2, CIN 1 oraz rozpoznań bez cech neoplazji. ....	59
Wykres 8. Wyniki badania kolposkopowego ocenianego według skali Reida ( kolposkopia niesatysfakcjonująca, RCI<3, RCI>=3) dla następujących rozpoznań histopatologicznych: raka płaskonabłonkowego, CIN 3, CIN 2, CIN 1 oraz rozpoznań bez patologii szyjki macicy. ....	62
Wykres 9. Krzywa ROC dla badania kolposkopowego użytego do wykrywania zmian – HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego. Pacjentki z niesatysfakcjonującą kolposkopią zostały wykluczone z analizy. ....	64
Wykres 10. Udział procentowy poszczególnych rozpoznań cytologicznych w całej populacji badanej. ....	65
Wykres 11. Krzywa ROC dla cytodiagnostyki użytej dla wykrywania zmian – HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego. ....	66

**Spis fotografii:**

Fotografia 1. Strefa przekształceń (zona transformata) – połączenie nabłonka gruczołowego i wielowarstwowego płaskiego w obrębie szyjki macicy - (prof. H. Kędzia, Pracownia Patomorfologiczna GPSK UM Poznań). .....	13
Fotografia 2. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy małego stopnia – CIN 1 - (prof. H. Kędzia, Pracownia Patomorfologiczna GPSK UM Poznań). .....	14
Fotografia 3. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy średniego stopnia – CIN 2 - (prof. H. Kędzia, Pracownia Patomorfologiczna GPSK UM Poznań). .....	15
Fotografia 4. Śródnabłonkowa neoplazja szyjki macicy dużego stopnia – CIN 3 - (prof. H. Kędzia, Pracownia Patomorfologiczna GPSK UM Poznań). .....	16
Fotografia 5. Widoczne silne zbielenie nabłonka wielowarstwowego płaskiego po próbie z 3-5% roztworem kwasu octowego. Histologicznie potwierdzona zmiana typu CIN 2. ....	42
Fotografia 6. Widoczne jasnożółte pole po próbie Schillera z płynem Lugola. Histologicznie potwierdzona zmiana typu CIN 2. ....	43

**Spis rycin:**

Rycina 1. Schemat przechodzenia wiązki świetlnej przez nabłonek wielowarstwowy płaski szyjki macicy.....	28
Rycina 2. Impedancja prawidłowego nabłonka wielowarstwowego płaskiego i śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy.....	29
Rycina 3. Urządzenie optoelektroniczne Truscreen (A) oraz jednorazowa końcówka typu SUS (B).....	35
Rycina 4. Schemat przedstawiający prawidłowe skanowanie informacji z tarczy szyjki macicy.....	36
Rycina 5. Wydruk standardowego wyniku badania optoelektronicznego .....	37
Rycina 6. Dekoder wyników metody optoelektronicznej .....	38
Rycina 7. Schemat działania urządzenia optoelektronicznego.....	39
Rycina 8. Standardowy protokół badania kolposkopowego, wykorzystywanego w PPSM GPSK – Poznań .....	46

**Wykaz skrótów:**

ACA – adenocarcinoma,

AGUS - atypical glandular cells of undetermined significance,

APC - antigen presenting cell,

ASC - atypical squamous cells,

ASC-H - atypical squamous cells, cannot exclude HSIL,

ASC-US - atypical squamous cells of undetermined significance,

CA – carcinoma,

CIN - cervical intraepithelial neoplasia,

CIS - carcinoma in situ,

DNA - deoxyribonucleic acid,

GPSK - Ginekologiczno - Położniczy Szpital Kliniczny,

GRE - glucocorticoid responsive element,

HBV- hepatitis B virus,

HCV - hepatitis C virus,

HIV - human immunodeficiency virus,

HSIL - high-grade squamous intraepithelial lesion,

HSV – herpes simplex virus,

HPV - human papillomavirus,

IARC – International Agency for Research on Cancer

LBC - liquid base cytology,

LCR - long control region,

LSIL - low-grade squamous intraepithelial lesion,

mRNA - messenger ribonucleic acid,

PCR - polymerase chain reaction,

pNOR – probability of normal,

PPSM - Pracownia Patofizjologii Szyjki Macicy,

RCI – Reid scale index,

ROC – Receiver Operating Characteristic Curve ( krzywa ROC),

STD - sexual transmitted disease,

TBS - The Bethesda System,

UE – Unia Europejska,

WHO - World Health Organization.

- 
- <sup>1</sup> Parkin D, Pisani P, Frelay J. Estimates of the worldwide frequency of 18 major cancers in 1985. *Int J Cancer*. 1993, 54, 594–606.
- <sup>2</sup> Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów. Krajowy Rejestr Nowotworów. <http://epid.coi.waw.pl/krn/>.
- <sup>3</sup> Parkin D. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006, 118, 3030-3044.
- <sup>4</sup> Arbyn M, Raifu AO, Autier P, [et al.]. Burden of cervical cancer in Europe: estimates for 2004. *Ann Oncol*. 2008, 19, 1030.
- <sup>5</sup> Ferley J, [et al.]. IARC Cancer Base No. Version 2.0. Lyon, France: IARC Press, 2004.
- <sup>6</sup> Basse E, Ekpo M, Abasiatai A. Female genital tract malignancies in Uyo, South-South Nigeria. *Niger Postgrad Med J*. 2007, 14, 134-136.
- <sup>7</sup> Ferris DG, Cox T, O'Connor D. [et al.]. *Modern Colposcopy, textbook and atlas*, Wyd. 1 ASCCP, Kendall/Hunt Publishing Company, 2004, 68.
- <sup>8</sup> Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol Oncol*. 2007, 107, S2-S5.
- <sup>9</sup> Lin H, Chen S, Jeng S, [et al.]. A project to improve the screening rate of pap smears for cervical cancer. *Hu Li za Zhi*. 2007, 54, 62-69.
- <sup>10</sup> Wronkowski Z, Zwierko M. *Epidemiologia raka szyjki macicy*. W: *Szczepienia przeciw HPV. Profilaktyka raka szyjki macicy i innych zmian związanych z zakażeniami HPV*. Pod red. Majewskiego S, Sikorskiego M. Lublin: Wydaw. Czelej, 2006, 21-52.
- <sup>11</sup> Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów. Krajowy Rejestr Nowotworów. <http://epid.coi.waw.pl/krn/>.
- <sup>12</sup> Bielska-Lasota M, Inghelmann R, van de Poll-Franse L, [et al.]. Trends in cervical cancer survival in Europe, 1983-1994: a population based study. *Gynecol Oncol*. 2007, 105, 609-619.
- <sup>13</sup> Kędzia W, Zwierko M. *Epidemiologia raka szyjki macicy*. W: *Ginekologia Onkologiczna*. Pod red. Markowska J. Wyd. 2. T. 1. Wrocław: Wydaw. Med. Urban & Partner, 2006, 1, 501-512.
- <sup>14</sup> Kędzia W, Schmidt M, Poręba E, [et al.]. Identyfikacja wirusów brodawczaka ludzkiego w 414 przypadkach raka inwazyjnego szyjki macicy u kobiet z regionu wielkopolskiego w powiązaniu z badaniami immunohistochemicznymi. *Ginekol Pol*. 2005, 76, 584-554.
- <sup>15</sup> Walboomers J, Jacobs M, Marcel M, [et al.]. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. 1999, 189, 12-19.

- 
- <sup>16</sup> Mitchell M, Tortolero-Luna G, Wright T, [et al.]. Cervical human papillomavirus infection and intraepithelial neoplasia: a review. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1996, 21, 17-25.
- <sup>17</sup> Centers for Disease Control and Prevention. Rockville, Md, CDC National Prevention Information Network. 2004.
- <sup>18</sup> Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 1997, 102, 3-8.
- <sup>19</sup> Kjaer S, Chackerian B, van den Brule A, [et al.]. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001, 10, 101–106.
- <sup>20</sup> Winer R, Lee S, Hughes J, Adam D, [et al.]. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003, 157, 218–226.
- <sup>21</sup> Smith E, Ritchie J, Yankowitz J, [et al.]. Human papillomavirus prevalence and types in newborns and parents: concordance and modes of transmission. *Sex Transm Dis.* 2004, 31, 57–62.
- <sup>22</sup> Ferenczy A, Bergeron C, Richart R. Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital human papillomavirus infections. *Obstet Gynecol.* 1989, 74, 950–954.
- <sup>23</sup> Roden R, Lowy D, Schiller J. Papillomavirus is resistant to desiccation. *J Infect Dis.* 1997, 176, 1076–1079.
- <sup>24</sup> Diagnostyka, profilaktyka i wczesne wykrywanie raka szyjki macicy -rekomendacje Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego Poznań, dnia 7 lipca 2006 r.
- <sup>25</sup> Kędzia W. Etiopatogeneza raka szyjki macicy. W: *Ginekologia Onkologiczna*. Pod red. Markowska J. Wyd.2. T. 1. Wrocław: Wydaw. Med. Urban & Partner, 2006, 44, 511 – 520.
- <sup>26</sup> Syrjanen K. Human Papillomavirus infection of the female genital tract. *Cytopathology* 1991, 2, 225-227.
- <sup>27</sup> Syrjanen K. Papillomavirusreviews, current research on papilomaviruses. W:*Natural history of genital human papillomavirus infections*. C Lacey. Leeds medical Information, Leeds University Press, Leeds, 1996,189.



- 
- <sup>28</sup> Nakagawa S, Yoshikawa H, Onda T [et al.]. Type of human papillomavirus is related to clinical features of cervical carcinoma. *Cancer*. 1996,78,1935-1941.
- <sup>29</sup> Kędzia W. Analiza czynników komórkowych i ustrojowych w procesie kancerogenezy komórek nabłonka paraepidermalnego szyjki macicy zakażonych wirusem brodawczaka ludzkiego. Rozprawa habilitacyjna, 2003.
- <sup>30</sup> Kędzia W. Goździcka – Józefiak A. Mechanizm kancerogenezy zachodzący w komórkach nabłonka paraepidermalnego szyjki macicy zakażonych przewlekłe onkogennymi typami wirusa brodawczaka ludzkiego. *Ginekol Pol*. 2007,78, 701-708.
- <sup>31</sup> Au W, Abdou-Salama S, Sierra-Torres C [et al.]. Environmental risk factors and molecular intervention of cervical cancer. *Int J Hyg Environ Health*. 2007, 210, 671-678.
- <sup>32</sup> Franco E, Duarte-Franco D, Ferenczy A, [et al.]. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*. 2001, 164, 1017-1025.
- <sup>33</sup> Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C [et al.]. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001, 93, 315-318.
- <sup>34</sup> Tavassoli E, Deville P. Pathology and Genetics. Tumor of breast and female genital organs. World Health Organization classification of tumours. IARS Press Lyon 2003.
- <sup>35</sup> Bręborowicz J, Breborowicz D. Patologia nowotworów szyjki macicy. W: *Ginekologia Onkologiczna*. Pod red. Markowska J. Wyd.2. T. 1. Wrocław: Wydaw. Med. Urban & Partner, 2006, 49, 553 – 556.
- <sup>36</sup> Harch KD. Handbook of colposcopy: diagnosis and treatment of lower genital tract neoplasia and HPV infections. Boston, MA, Little Brown, 1989.
- <sup>37</sup> Pund E, Nieburgs H, Nettles J, [et al.]. Preinvasive carcinoma of the cervix uteri: seven Cases in which it was detected by examination of routine endocervical smears. *Arch Pathol Lab Med*. 1947, 44 ,571-577.
- <sup>38</sup> Koss L, Steward F, Foote F, [et al.]. Some histopathological aspects of behavior of epidermoid carcinoma in situ and related lesions of the uterine cervix: a long- term prospective study. *Cancer* 1963, 16, 1160-1211.
- <sup>39</sup> Richart R. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia . *Clin. Obstet Gynecol*. 1968, 10 , 748.
- <sup>40</sup> Bręborowicz J, Breborowicz D. Patologia nowotworów szyjki macicy. W: *Ginekologia Onkologiczna*. Pod red. Markowska J. Wyd.2. T. 1. Wrocław: Wydaw. Med. Urban & Partner, 2006, 49, 553 – 556.

- 
- <sup>41</sup> Iftner T. Papillomaviruses genomes: sequence analysis related to the functional aspects. Papillomaviruses and Human Cancer. CRC Press 1990, Boca Raton, FL, 181-202.
- <sup>42</sup> Doorbar J. The papillomavirus life cycle. J Clin Virol. 2005, 32, 7-15.
- <sup>43</sup> Werness B, Levine A, Howley P. Association of human papillomavirus type 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 1990, 248, 76-79.
- <sup>44</sup> Doorbar J. Molecular biology of human papilloma virus infection and cervical cancer. Clin Sci. 2006, 110, 525- 541.
- <sup>45</sup> Goździcka-Józefiak A, Kwaśniewska A. Onkogenne właściwości ludzkiego wirusa brodawczaka. Profilaktyka pierwotna i wtórna raka szyjki macicy, diagnostyka i leczenie 2008,19-26.
- <sup>46</sup> Zur Hausen H. Oncogenic DNA viruses. Oncogene 2001, 20, 7820-7823.
- <sup>47</sup> Zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. Curr Top Microbiol Immunol. 1994, 186, 131-156.
- <sup>48</sup> Kitchener H, Castle O, Cox J. Achievements and limitation of cervical cytology screening. Vaccine. 2006, 24, 63-70.
- <sup>49</sup> Papanicolaou GN. A new procedure for the staining of vaginal smears. Science. 1942, 95, 438 – 439.
- <sup>50</sup> Nanda K, McCrory D, Myers E, [et al.]. Accuracy of the Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical abnormalities: a systematic review. Ann Intern Med. 2000, 132, 810-819.
- <sup>51</sup> Renshaw A. Rescreening in cervical cytology for quality control. When bad data is worse than no data or what work, what doesn't, and why. Clin Lab Med. 2003, 23, 695-708.
- <sup>52</sup> Bartlett J, Stirling D. A short history of the Polymerase Chain Reaction. Methods Mol. Biol. 2003, 226, 3-6.
- <sup>53</sup> Amplicor Human Papilloma Virus (HPV) test – informacja o produkcji firmy Roche.
- <sup>54</sup> Brown B, Tidy J, Boston K [et al.]. Relation between tissue structure and imposed electrical current flow in cervical neoplasia. Lancet. 2000, 355, 892–895.
- <sup>55</sup> Drezek R, Richards-Kortum R, Brewer M [et al.]. Optical imaging of the cervix. Cancer. 2003, 98, 2015–2027.
- <sup>56</sup> Burke L, Modell M, Niloff J [et al.]. Identification of squamous intraepithelial lesions: fluorescence of cervical tissue during colposcopy. J Low Genit Tract Dis. 1999, 3, 159–162.

- 
- <sup>57</sup> Ferris D, Lawhead R, Dickman E [et al.]. Multimodal hyperspectral imaging for the non-invasive diagnosis of cervical neoplasia. *J Low Genit Tract Dis*. 2001, 5, 65–72.
- <sup>58</sup> Georgakoudi I, Sheets E, Muller MG [et al.]. Trimodal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precancers in vivo. *Am J Obstet Gynecol*. 2002, 186, 374–382.
- <sup>59</sup> Balas C. A novel optical imaging method for the early detection, quantitative grading, and mapping of cancerous and precancerous lesions of cervix. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2001, 48, 96–104.
- <sup>60</sup> Fricke H, Morse S. The electric capacity of tumors of the breast. *J Cancer Res*. 1926, 10, 340-76.
- <sup>61</sup> Langman L, Burr H. A technique to aid in the detection of malignancy of the female genital tract. *Am J Obstet Gynecol*. 1949, 57, 274-81.
- <sup>62</sup> Karen Canfell, Carl Chow. Real-time devices for the screening and diagnosis of cervical neoplasia. Part 6B Cervical neoplasia: screening. *The Cervix*, 2nd Edition 2006.
- <sup>63</sup> Abdul S, Brown B, Milnes P, [et al.]. The use of electrical impedance spectroscopy in the detection of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 2006, 16, 1823–32.
- <sup>64</sup> Stoy R, Foster K, Schwan H. Dielectric properties of mammalian tissues from 0.1 to 100 MHz: a summary of recent data. *Phys Med Biol*. 1982, 27, 501–13.
- <sup>65</sup> Jones D, Smallwood R, Hose D, [et al.]. Modelling of epithelial tissue impedance measured using three different designs of probe. *Physiol Meas*. 2003, 24, 605–23.
- <sup>66</sup> Singer A, Copleston M, Canfell K, [et al.]. A real time optoelectronic device as an adjunct to the Pap smear for cervical screening: a multicenter evaluation. *Int J Gynecol Cancer*. 2003, 13, 804–811.
- <sup>67</sup> Copleston M, Reid B, Skladnev V, [et al.]. An electronic approach to the detection of pre-cancer and cancer of the uterine cervix: a preliminary evaluation of Polarprobe. *Int J Gynecol Cancer*. 1994, 4, 79—83.
- <sup>68</sup> Quek S, Mould T, Canfell K, [et al.]. The Polarprobe-Emerging Technology for Cervical Cancer Screening. 1998, 27, 5.
- <sup>69</sup> Copleston M, Canfell K, Skladnev V. The Polarprobe - An instantaneous optoelectronic approach to cervical screening. *CME J Gynecol Oncol*. 2000, 5, 31-8.
- <sup>70</sup> <http://www.rochediagnostics.pl>

- 
- <sup>71</sup> Burghardt E, Pickel H, Giverdi F. Special colposcopic techniques in colposcopy cervical pathology. Textbook and Atlas. Stuttgart-new York: Thieme. 1998,114.
- <sup>72</sup> Maddox P, Szarewski A, Dysson J, [et al.]. Cytokeratin expresion and acetowhite change in cervical epithelium. *J Clin Pathol.* 1994, 47, 15.
- <sup>73</sup> Basta A, Jach R. Kolposkopia w diagnostyce CIN i raka szyjki macicy. Profilaktyka pierwotna i wtórna raka szyjki macicy, diagnostyka i leczenie. 2008,58-68.
- <sup>74</sup> Brown B, Tidy J, Boston K, [et al.]. Relation between tissue structure and imposed electrical current flow in cervical neoplasia. *Lancet.* 2000, 355, 892–895.
- <sup>75</sup> Drezek R, Richards-Kortum R, Brewer M [et al.]. Optical imaging of the cervix. *Cancer.* 2003, 98, 2015–2027.
- <sup>76</sup> Narh A, Rivoire K, Chang S, [et al.]. A pilot study for a screening trial of cervical fluorescent spectroscopy. *Int J Gynecol Cancer.* 2004, 14, 1097-1107.
- <sup>77</sup> Nordstrom R, Burke L, Niloff J, [et al.]. Identification of cervical interapitheliale neoplasia (CIN) using UV-excited fluorescence and diffuse-reflectance tissue spectroscopy. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2001, 29,118-127.
- <sup>78</sup> Huh W, Cestero R, Garcia F, [et al.]. Optical detection of high grade cervical intraepithelial neoplasia in vivo: results of a 604 patient study. *Am J Obstet Gynecol.* 2004, 90, 1249-1257.
- <sup>79</sup> Ferris D, Lawhead R, Dickman E, [et al.]. Multimodal hyperspectral imaging for the non-invasive diagnosis of cervical neoplasia. *J Low Genit Tract Dis.* 2001, 5, 65–72.
- <sup>80</sup> Georgakoudi I, Sheets E, Muller MG [et al.]. Trimodal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precancers in vivo. *Am J Obstet Gynecol.* 2002, 186, 374–382.
- <sup>81</sup> Balas C, [et al.]. In Vivo Molecular Imaging of Cervical Neoplasia Using Acetic Acid as Biomarker. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics.* 2008, 14, 29-42.
- <sup>82</sup> Balas C. A novel optical imaging method for the early detection, quantitative grading, and mapping of cancerous and precancerous lesions of cervix. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.* 2001, 48, 96–104.
- <sup>83</sup> Balas C, [et al.]. In vivo detection and staging of epithelial dysplasias and malignancies based on the quantitative assessment of acetic acid-tissue interaction kinetics. *J Photochem Photobiol B.* 1999. 53, 153-157.

- 
- <sup>84</sup> Coppleson M, Reid B, Skladnev V, [et al.]. An electronic approach to the detection of pre-cancer and cancer of the uterine cervix: a preliminary evaluation of Polarprobe. *Int J Gynecol Cancer*. 1994, 4, 79—83.
- <sup>85</sup> Singer A, Coppleson M, Canfell K, [et al.]. A real time optoelectronic device as an adjunct to the Pap smear for cervical screening: a multicenter evaluation. *Int J Gynecol Cancer*. 2003, 13, 804–811.
- <sup>86</sup> Mould T, Quek S, Lovegrove J, [et al.]. The acceptability of cytological screening for cervical cancer compared to a new electronic screening device - the Polarprobe, Proceedings of the EUROGIN Third International Congress, 1997, Paris. European Research Organization on Genital Infection and Neoplasia.
- <sup>87</sup> Pruski D, Kędzia W, Przybylski M, [et al.]. Assesment of real optoelectronic method in the detection of cervical intraepithelial neoplasia. *Ginekol Pol*. 2008, 79, 342-6.
- <sup>88</sup> Zhang W, Liu Z, Li J, [et al.]. Evaluation of a real-time, optoelectronic device ‘TruScreen’ as a primary screening tool for cervical cancer Centre of Early Diagnosis and Early Treatment for Cervical carcinoma, Shenzhen Hospital of Beijing University, China [www.polartechnics.info](http://www.polartechnics.info).
- <sup>89</sup> Rock C, Michael C, Reynolds R, [et al.]. Prevention of cervix cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000, 33, 169-185.
- <sup>90</sup> Chew G, Cruickshank M. Human papillomavirus as a risk assessment. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2001, 15, 759-768.
- <sup>91</sup> Nanda K, McCrory D, Myers E, [et al.]. Accuracy of Papanicolaou test in screening for and follow-up of cervical cytologic abnormalities: a systematic review. *Ann Intern Med*. 2000, 132, 810-819.
- <sup>92</sup> Chew G, Cruickshank M. Human papillomavirus as a risk assessment. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2001, 15, 759-768.
- <sup>93</sup> Cox J, Lornicz A, Schiffman M, [et al.]. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol*. 1995, 172, 946-954.
- <sup>94</sup> Bolick D, Hellman D. Laboratory implementation and efficacy assessment of ThinPrep cervical screening system. *Acta Cyto*. 1998, 42, 209-213.
- <sup>95</sup> Lee K, Minter L, Granter S. Papanicolaou smear sensitivity for adenocarcinoma in situ of the cervix: a study of 34 cases. *Am. J. Clin. Pathol*. 1997, 107, 30-35.

- 
- <sup>96</sup> Ashfaq R, Gibbons D, Vela C, [et al.]. ThinPrep Pap Test. Accuracy for glandular disease. *Acta Cytol.* 1999, 43, 81-85.
- <sup>97</sup> Francesco M, Gargiulo F, Schreiber C, [et al.]. Comparison of the AMPLICOR human papilloma virus test and the hybrid capture 2 assay for detection of high-risk human papillomavirus in women with abnormal PAP smear. *J Virol Methods.* 2008, 147, 10-17.
- <sup>98</sup> Schiffman M, Khan M, Solomon D, [et al.]. A study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests. *J Natl Cancer Inst.* 2005, 97, 147-50.
- <sup>99</sup> Melkert P, Hopman E, van den Brule A, [et al.]. Prevalence of HPV in cytologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer.* 1993, 53, 919-23.
- <sup>100</sup> Kotloff K, Wasserman S, Russ K, [et al.]. Detection of genital human papillomavirus and associated cytological abnormalities among college women. *Sex Transm Dis.* 1998, 25, 243-50.
- <sup>101</sup> Knapp P, [et al.]. *Zasady wczesnego wykrywania raka szyjki macicy. W: postepy w ginekologii i położnictwie. Pr. zbior. pod red. Spaczyński M. Poznań: Polskie Towarzystwo Ginekologiczne, 2006, 287-295. XXIX Kongres Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego, 2006, Poznań.*
- <sup>102</sup> Ferreccio C, Bratti M, Sherman M, [et al.]. A comparison of single and combined visual, cytologic, and virologic tests as screening strategies in a region at high risk of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarker Prev.* 2003, 12, 815-823.
- <sup>103</sup> Fahey M, Irwing L, Macaskill P. Meta-analysis of Pap test accuracy. *Am J Epidemiol.* 1995, 141, 680-689.
- <sup>104</sup> Massad L, Collins Y. Strength of correlations between colposcopic impression and biopsy histology. *Gynecol Onco.* 2003, 89, 424-428.
- <sup>105</sup> Mitchell M. The accuracy of colposcopy. *Clin Consult Obstet Gynecol.* 1994, 6, 70-73.
- <sup>106</sup> Stoler M, Ferenczy A, Ronnett B [et al.]. Colposcopy – Performance to predict histology: The international experience. *Eurogin.* 2008, Nicea.