

**Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum
Wydział Lekarski**

Inga Ludwin

**Występowanie i znaczenie klinicznie nietypowych komórek nabłonkowych szyjki
macicy.**

Praca doktorska

Promotor:

Prof.dr hab. med. Antoni Basta

Pracę wykonano w:

Klinice Ginekologii, Położnictwa i Onkologii
Collegium Medicum
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik jednostki:

Prof. dr hab. med. Antoni Basta

Kraków, rok 2006.

MOTTO:

„ Pierwsze obserwacje komórek raka w rozmazie z szyjki macicy wywołały dreszcz emocji, jakiego nie doznałem w całej mojej naukowej karierze.”

George Nicholas Papanicolaou „, The diagnostic value of vaginal smear in carcinoma of the uterus” Am J Obst Gyn, 1941,42:193:206

SPIS TREŚCI.

1. Wstęp	5
1.1. Zmiany przednowotworowe i rak szyjki macicy.....	5
1.2. Cytodiagnostyka ginekologiczna – systemy klasyfikacyjne.....	8
2. Cel pracy	30
3. Materiał i metodyka	31
3.1. Badanie cytologiczne.....	34
3.2. Badanie mikrobiologiczne.....	40
3.3. Badanie wirusologiczne (Hybrid Capture 2).....	41
3.4. Badanie kolposkopowe.....	43
3.5. Badanie histologiczne.....	44
3.6. Metody statystyczne.....	46
4. Wyniki	47
4.1. Materiał pracy – występowanie nietypowych komórek gruczołowych i płaskonabłonkowych.....	47
4.1.1. Występowanie AGC i ASC a wiek.....	49
4.1.2. Występowanie ASC i AGC a stan hormonalny.....	50
4.1.3. Występowanie ASC i AGC a czystość pochwy.....	52
4.2. Analiza cech cytopatologicznych w podgrupach nietypowych komórek gruczołowych i nietypowych komórek płaskonabłonkowych.....	54
4.3. Zależność pomiędzy infekcją HPV a obecnością nietypowych komórek gruczołowych i nietypowych komórek płaskonabłonkowych w rozmazach pochwowo-szyjkowych.....	78
4.3. Analiza przemian nietypowych komórek gruczołowych i nietypowych komórek płaskonabłonkowych w czasie trwania obserwacji.....	83

5. Omówienie wyników. Dyskusja	113
6. Wnioski	133
7. Streszczenie	135
8. Summary	141
9. Piśmiennictwo	146

1. WSTĘP.

1.1 Zmiany przednowotworowe i rak szyjki macicy.

Rak szyjki macicy na początku XXI wieku pozostaje nadal w wielu krajach najczęstszym nowotworem złośliwym kobiecego narządu rodowego. W Polsce wg. danych Krajowego Rejestru Nowotworowego sporządzanych rokrocznie na podstawie opracowań Centrum Onkologii w 2002 roku w populacji żeńskiej rak szyjki macicy zajmował drugie miejsce pod względem częstości występowania wśród nowotworów narządu rodowego, oraz piąte wśród wszystkich nowotworów złośliwych w populacji kobiecej (po raku sutka, płuca, jelita grubego i trzonu macicy)(67). Stanowi on 6,3% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe u kobiet. Standaryzowany współczynnik zachorowalności dla raka szyjki macicy w Polsce wynosił w 2002 roku 13,2/100 000 i jest szczególnie wysoki w południowych regionach Polski - w Małopolsce wynosił 14,5/100 000. Począwszy od 2000 roku obserwuje się obniżenie całkowitej liczby zgonów z powodu raka szyjki macicy przy utrzymujących się na stałym poziomie standaryzowanych współczynnikach zachorowań (67). Najbardziej narażona na zachorowanie i śmierć z powodu tego nowotworu jest populacja kobiet między 40 a 54 rokiem życia, oraz 65 i 74 rokiem życia, w których to przedziałach wiekowych współczynniki zachorowalności i śmiertelności są najwyższe. W większości krajów o dobrze rozwiniętej infrastrukturze podstawowej opieki medycznej rozpoznaje się stany przednowotworowe lub raka szyjki macicy w formie przedinwazyjnej, kiedy możliwość wyleczenia jest bardzo wysoka (9,26,86,129). W Polsce niestety rak szyjki macicy nadal rozpoznawany jest w wysokim stopniu zaawansowania klinicznego, najczęściej uniemożliwiającym skuteczne leczenie. Związane jest to przede wszystkim z niewielkim odsetkiem populacji żeńskiej objętej programem badań przesiewowych pod postacią corocznego badania cytologicznego. W Polsce corocznie z ponad 20 milionowej populacji

kobiet, która powinna być objęta badaniem cytologicznym wykonuje się je zaledwie u 400000 osób.

Rak rozwijający się w obrębie nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego część pochwową szyjki macicy, lub w obrębie nabłonka gruczołowego wyściełającego kanał szyjki macicy stanowi 95% wszystkich nowotworów złośliwych szyjki. Pozostałe 5% to nowotwory drobnokomórkowe (rak neuroendokryny, rakowiak, rak owsianokomórkowy, rak drobnokomórkowy bez ziarnistości neurosekrecyjnych lub reakcji argyrofilowej), mięsaki, chłoniaki i czerniak szyjki macicy (104).

W latach 70-tych i 80-tych dwudziestego wieku rak szyjki macicy stanowił ponad połowę wszystkich nowotworów złośliwych narządu rodowego (59%)(139). Jednak już w latach 80-tych ubiegłego stulecia w krajach wysoko rozwiniętych, szczególnie w krajach skandynawskich i Wielkiej Brytanii zauważono spadek udziału tego nowotworu zarówno pod względem zachorowalności jak i śmiertelności kobiet.

Widoczny spadek zachorowań na raka szyjki macicy, mniejszy odsetek postaci zaawansowanych i związany z tym spadek śmiertelności był możliwy dzięki zastosowaniu badań profilaktycznych polegających na wykrywaniu stanów przednowotworowych i wczesnoinwazyjnych postaci raka w trakcie masowych badań skринningowych. Dzięki corocznym badaniom profilaktycznym ryzyko zgonu z powodu raka szyjki macicy można zredukować nawet o około 70% (26,86,104).

Uzyskanie tak wysokiego obniżenia umieralności wynika z faktu, iż rak szyjki macicy rozwija się wieloetapowo i w ciągu stosunkowo długiego okresu czasu tzn. w ciągu kilku do kilkunastu lat (26,63,86,104,130). Dodatkowy wpływ ma łatwa dostępność szyjki do badań diagnostycznych (cytologiczno-kolposkopowych), dzięki czemu powstał jeden z najlepszych modeli obserwacji procesu karcynogenezy (36). Niestety wczesne etapy choroby

nowotworowej w obrębie dolnego odcinka narządu rodnego przebiegają najczęściej bez uchwytanych klinicznie objawów (36).

Wykorzystanie metod diagnostyki przesiewowej pod postacią corocznej cytologii nie tylko spowodowało znaczący spadek umieralności z powodu raka szyjki macicy w krajach o wysokim standardzie społecznym (USA, Skandynawia, Anglia), ale także obniżyło zachorowalność na ten typ nowotworu złośliwego. Należy zaznaczyć, iż w żadnym kraju nie udało się obniżyć wskaźników zachorowalności bez wprowadzenia szeroko rozpowszechnionych badań skринningowych obejmujących całą żeńską populację (26). Udowodniono również konieczność stosowania corocznych kontroli cytologicznych (26,104). Jakkolwiek próby wydłużenia okresu pomiędzy badaniami cytologicznymi kończyły się wzrostem liczby zgonów z powodu raka szyjki macicy oraz wzrostem stopnia zaawansowania w momencie postawienia rozpoznania (26).

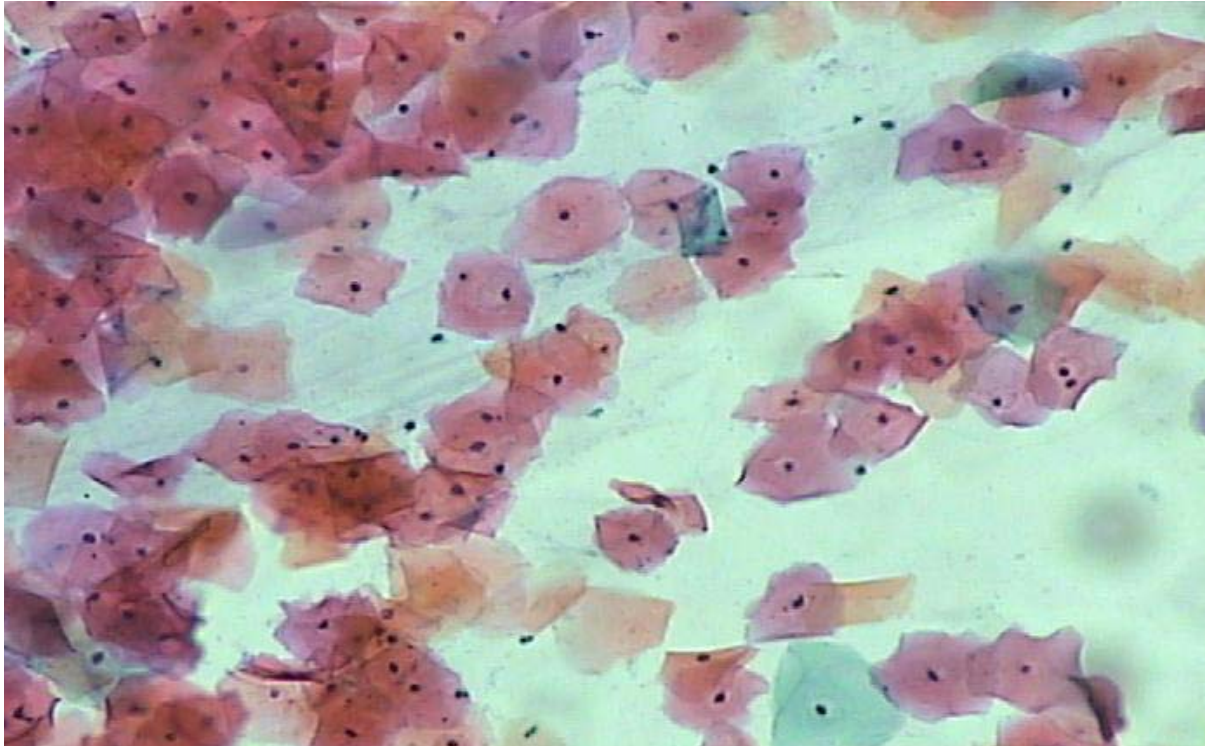
Podstawowym celem wdrożenia skринningu cytologicznego obejmującego badanie rozmazów pochwowo-szyjkowych jest wyodrębnienie kobiet z takimi nieprawidłowościami, które będą dobrym predyktorem ryzyka rozwoju raka szyjki macicy. Wczesne wdrożenie postępowania terapeutycznego, bądź tylko wprowadzenie bardziej intensywnej diagnostyki może w znacznym stopniu ograniczyć występowanie postaci klinicznej raka.

Cytologiczna diagnostyka przesiewowa zmierza do wykrycia choroby ograniczonej do nabłonka pokrywającego dolny odcinek narządu rodnego, czyli do wykrycia zmiany w formie przedinwazyjnej. Największą zagadką diagnostyczną, wzbudzającą również największe kontrowersje dotyczące możliwości dalszej diagnostyki i terapii, jest rozpoznanie w rozmazie komórek, które wyglądają na nieprawidłowe, podejrzane i nietypowe, lecz charakterystyka morfologiczna ich nieprawidłowości jest niewystarczająca, lub jest ich za mało by zdefiniować je jako komórki dysplastyczne, czy nowotworowe. Ich obecność w rozmazach cytologicznych opisywano jako komórki atypowe, nieprawidłowe, nietypowe,

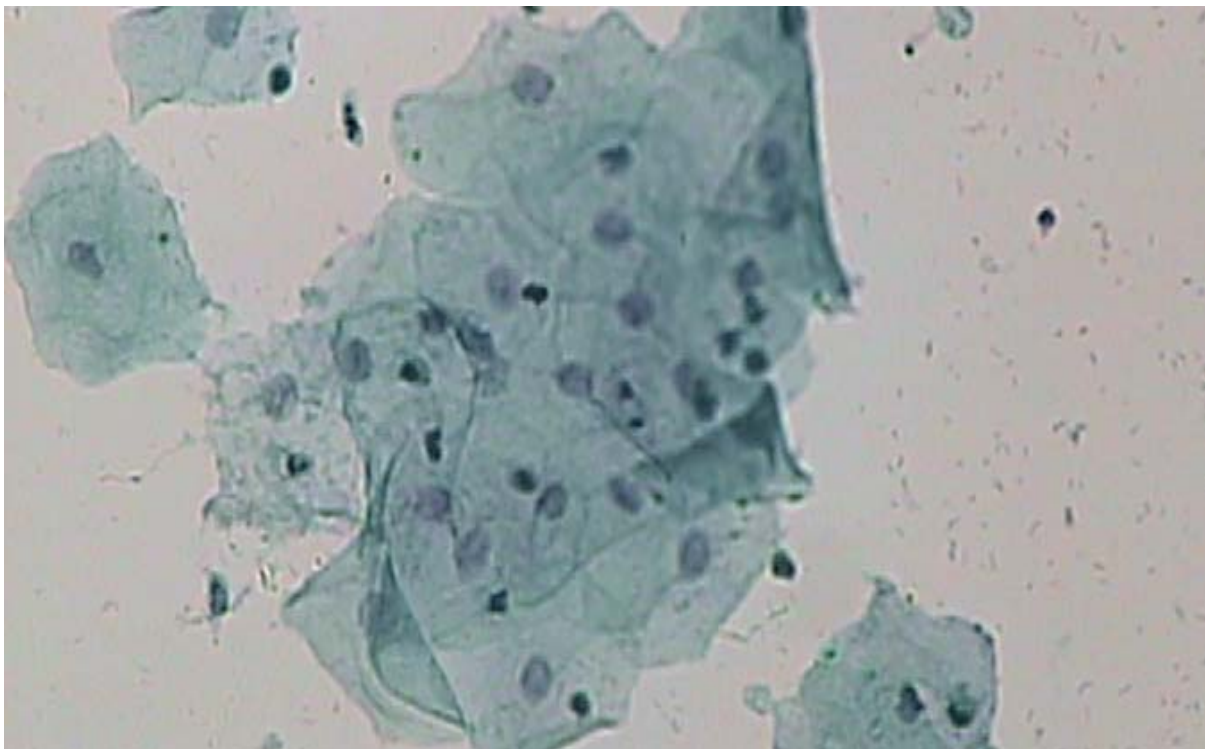
dyskariotyczne. Umieszczenie ich w II grupie w klasyfikacji Papanicolaou, która jest uważana za grupę niepodrzaną nie jest dobrym rozwiązaniem, gdyż nie jest ustalone ich znaczenie w procesie morfogenezy raka szyjki macicy, jak i postępowanie kliniczne w przypadkach ich obecności. Stąd niektóre klasyfikacje rozmazów cytologicznych jak np. system monachijski wydzieliły dla tych zmian osobną podgrupę. W ww systemie stworzonym w 1975 r wydzielono grupę III i IIID. Do grupy IIID zaliczono dysplazję małego i średniego stopnia, natomiast w grupie III umieszczono niejasne obrazy komórkowe będące wynikiem ciężkich zmian zapalnych lub zwyrodnieniowych, zmiany wsteczne mogące być wynikiem istniejącego stanu przednowotworowego, oraz te rozmazy pochodzące od kobiet w wieku okołomenopauzalnym, w których stwierdzano obecność komórek endometrialnych (106). Wprowadzony w 1988 r. nowy system klasyfikacji rozmazów cytologicznych zwany systemem Bethesda i jego kolejne modyfikacje dążą do lepszego zdefiniowania tych komórek i określenia ich znaczenia w patologii szyjki macicy, jak i ustalenia dalszego postępowania w tych przypadkach.

2. Cytodiagnostyka ginekologiczna. Systemy klasyfikacyjne.

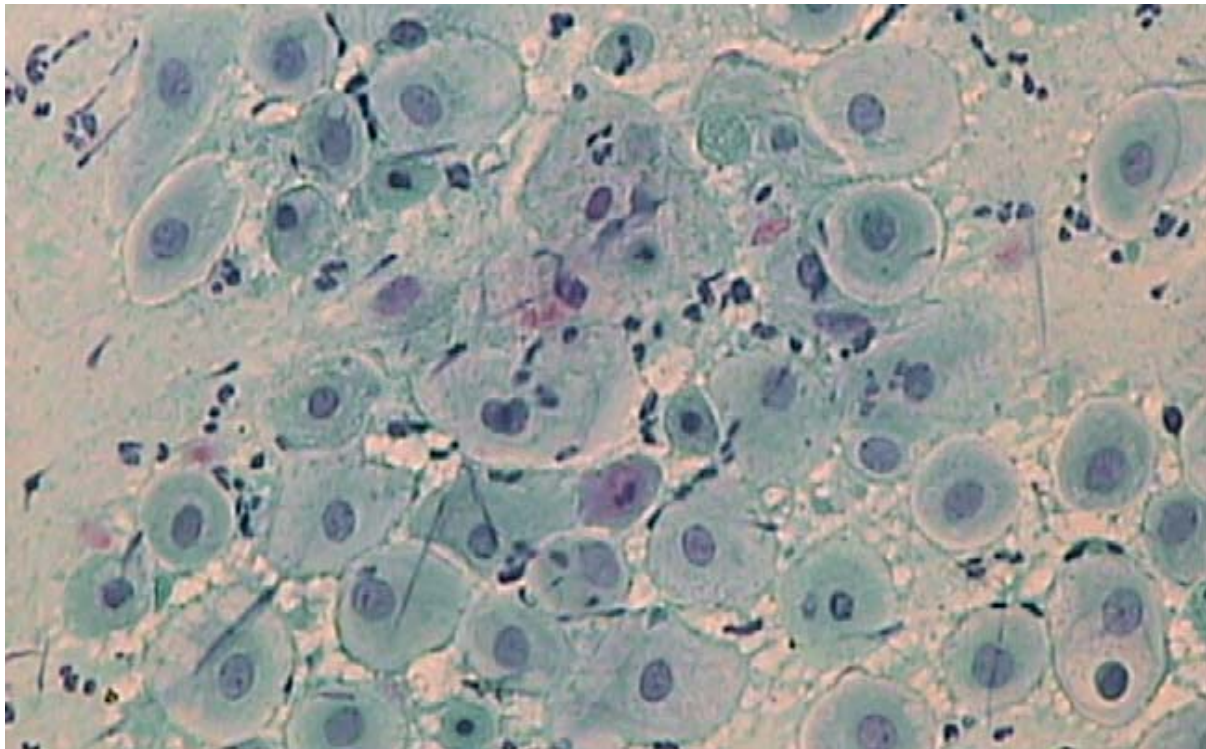
Cytodiagnostyka ginekologiczna opiera się na ocenie preparatów rozmazowych komórek złuszczonych jak i pobranych z powierzchni nabłonka pokrywającego dolny odcinek narządu rodno kobiety. Preparat rozmazowy powinien zawierać komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego tarczę części pochwowej szyjki macicy, oraz nabłonka jednowarstwowego gruczołowego wyścielającego kanał szyjki macicy. Nabłonek płaski (zwany również paraepidermoidalnym lub nierogowaciejącym) zbudowany jest z pięciu warstw, tj. z warstwy pierwszej zwanej podstawną, która przylega do błony podstawnej. Stanowią ją najmniejsze, owalne komórki o okrągłych jądrach. Druga warstwa to warstwa przypodstawna zbudowana z 2-3 rzędów owalnych komórek o stosunkowo dużych (9-11 mikronów) owalnych jądrach. Następną warstwą jest warstwa intermedialna, której komórki połączone są mostkami międzykomórkowymi, zawierają glikogen a ich jądra mają łądkowaty wygląd. W miarę dojrzewania komórki te tracą mostki międzykomórkowe. Ostatnią warstwę zwaną powierzchniową lub czynnościową stanowią największe prawidłowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego. To komórki superficjalne zawierające pyknotyczne jądro (9,81,82,135,136). Nabłonek gruczołowy szyjki macicy zbudowany jest w 95% z komórek wydzielających śluz oraz w 5% z komórek urzęsionych (9,81,82,135).



Ryc. 1. Prawidłowe komórki superficjalne. Charakterystyczne pyknotyczne jądra komórkowe.



Ryc.2. Prawidłowe komórki intermedialne. Okrągłe jądro komórkowe o jednorodnej chromatynie jądrowej



Ryc.3. Komórki warstwy przypodstawnej o okrągłym lub owalnym kształcie jądra komórkowego i komórki. Cjanochłonne zabarwienie cytoplazmy.



Ryc.4.Prawidłowe komórki endocerykalne. Charakterystyczny palisadowy układ grupy komórkowej.

Oglądając pod mikroskopem komórkę nabłonka wielowarstwowego płaskiego lub gruczołowego zdrowej kobiety widzimy ją w stanie normy - *euplazji*, czyli podstawowej aktywności charakterystycznej dla stanu fizjologii - wszystkie komórki pochodzące z określonej warstwy jednego typu tkanki są do siebie podobne (139). W stanach zaburzonej równowagi z otoczeniem wywołanych działaniem czynnika zewnętrznego powodującego wzrost aktywności (zmiany odczynowe i regeneracyjne), lub w związku z nowotworowym przekształceniem komórek obserwujemy w rozmazach cytologicznych różnego stopnia nasilenie nieprawidłowości dotyczących tylko niektórych lub wszystkich elementów komórki (79,81,82,135,146).

Podstawowym odniesieniem dla diagnostyki cytologicznej była wiedza oparta na diagnostyce histopatologicznej, w której to po raz pierwszy pojęcie atypii nabłonkowej wprowadził Hinselman w 1927 roku. Termin dysplazji został wprowadzony i rozpowszechniony przez Moricarda w 1952 roku (9). Prawie równocześnie zmiany dysplastyczne opisane zostały przez Reagana w 1953 roku jako niezróżnicowane proliferujące komórki warstwy bazalnej i rezerwowej. Stan ten określił rozrostem atypowym (136). W 1967 roku Richart w „The natural history of cervical intraepithelial neoplasia” zastąpił starą koncepcję przemian dysplazja-rak *in situ* pojęciem wewnątrz nabłonkowej neoplazji szyjki macicy (*Cervical Intraepithelial Neoplasia-CIN*). Według Światowej Organizacji Zdrowia jest to stan, w którym część warstw nabłonka płaskiego jest zastąpiona przez komórki wykazujące różne stopnie atypii (105).

Wewnątrz nabłonkowa neoplazja szyjki macicy charakteryzuje się zaburzeniami w dojrzewaniu nabłonka, anomaliami jądrowymi, różnego stopnia zatarciem warstwowości nabłonka i wzrostem aktywności mitotycznej, a więc dotyczy zarówno zmian komórkowych jak i architektoniki nabłonka. W zależności od stopnia nasilenia zmian wyróżnia się 3 stopnie wewnątrz nabłonkowej neoplazji. W przypadku CIN 1 zmiany komórkowe (atypia i

zwiększony indeks mitotyczny) dotyczą $\frac{1}{3}$ dolnej warstwy nabłonka. Ponieważ dojrzewanie i różnicowanie $\frac{2}{3}$ górnych warstw nabłonka jest prawidłowe stąd w rozmazach cytologicznych spotyka się tylko niewielką ilość komórek dysplastycznych. W CIN 2 nieprawidłowości te dotyczą $\frac{1}{2}$ do $\frac{1}{3}$ dolnych grubości nabłonka, natomiast w przypadku CIN 3 i CIS zaburzenie architektoniki z nieprawidłowościami komórkowymi dotyczy całej warstwy nabłonka.

Podczas oceny cytoonkologicznej rozmazu szyjkowego dokonuje się systematycznej charakterystyki trzech elementów budowy komórki nabłonkowej jako najmniejszej strukturalnej i funkcjonalnej jednostki żyjącego organizmu. Największe znaczenie mają zmiany stwierdzone w obrębie jądra komórkowego, jego wielkość, kształt, liczbę w obrębie pojedynczej komórki, rozkład chromatyny jądrowej, nasilenie jej zabarwienia, obecność jąderek. Drugim ocenianym elementem jest cytoplazma, jej ilość, sposób barwienia obecność struktur wewnątrzcytoplazmatycznych, oraz tak specyficznych zmian jak fagocytoza czy kanibalizm komórkowy (81,82,116,129,135).

Elementem ocenianym przez cytologa jest również ostrość granic błon komórkowych uważana za objaw dojrzałości komórkowej. Stopień upośledzenia ostrości granic komórkowych wzrasta wraz ze stopniem nasilenia atypowości komórki, w skupiskach komórek nowotworowych granice komórkowe mogą ulec całkowitemu zatarciu (44,81,82,129,130).

Pierwsze opisy komórek pochodzących z nabłonka wielowarstwowego płaskiego podał Pouchet w 1847 roku, charakteryzując zmiany, jakim podlegają one w trakcie cyklu jajnikowego (146). Cytodiagnostyka eksfoliatywna po raz pierwszy została opisana w 1926 roku w „La Presse Medicale” przez Aurela Babes’a ze szpitala Colthea w Bukareszcie. O kilka miesięcy wyprzedził on Georga Nicholasa Papanicolaou publikując wyniki swoich badań dotyczących zastosowania cytologii pochwowo-szyjkowej w wykrywaniu raka szyjki macicy. Jego doniesienie pozostało jednak bez echa w świecie naukowym. Za twórcę

cytodiagnostyki złuszczeniowej uznawany jest George Nicholas Papanicolaou, lekarz z Uniwersytetu Cornell w Stanach Zjednoczonych Ameryki. W 1928 roku prowadząc badania nad wpływem hormonów na wygląd komórek nabłonka pochwy przypadkowo odkrył możliwość rozpoznawania raka szyjki macicy na podstawie oceny mikroskopowej złuszczonych, luźno leżących komórek z tylnego sklepienia pochwy (36,97,98,99). Już w latach 50-tych XX wieku klasyfikacja cytologiczna wg Papanicolaou została szeroko rozpowszechniona, początkowo na kontynencie amerykańskim, a następnie w Europie dzięki opublikowaniu w 1943 r wspólnego dzieła Papanicolaou i Trauta pt „Diagnosis of Uterine Cancer by the vaginal Smears.” (98). W tym samym czasie kolposkopiści szwajcarscy i austriaccy zaczęli wykorzystywać cytologię szyjkową jako metodę diagnostyczną pozwalającą na wyodrębnienie grupy kobiet wymagających wykonania badania kolposkopowego (9,36,79). Wprowadzenie cytodiagnostyki pochwowo-szyjkowej jako metody skринningu raka szyjki macicy uznawane jest za jedno z największych osiągnięć medycyny XX wieku (9,26,33,81,82).

Stworzony przez Papanicolaou system klasyfikacyjny wyróżnia pięć grup (klas) cytologicznych. Rozmaz prawidłowy stanowi grupa I zawierająca prawidłowe komórki superficjalne i intermedialne z nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Obecność lub brak leukocytów w rozmazie zależy od fazy cyklu miesięczkowego, w którym pobrano rozmaz. Oceniane tło preparatu jest czyste. Do grupy II kwalifikowane są rozmazy zawierające komórki wszystkich warstw nabłonka płaskiego, w których obok prawidłowych komórek występują także komórki z towarzyszącymi zmianami wskazującymi na zapalenie, zmiany wsteczne, regenerację nabłonkową, metaplastyzę czy nadmierne rogowacenie. Obecne są także prawidłowe, lub zmienione zapalnie komórki nabłonka gruczołowego szyjki macicy, również komórki endometrialne, metaplastyczne, leukocyty, histiocyty, flora bakteryjna fizjologiczna i patologiczna, śluz. Dwie pierwsze grupy traktowane są jako rozmazy ujemne, czyli

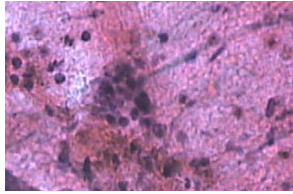
niepodejrzane. W grupie trzeciej obok prawidłowych lub zapalnie zmienionych komórek wszystkich warstw nabłonka wielowarstwowego płaskiego i komórek nabłonka gruczołowego występują komórki dysplastyczne. Do grupy IV zaliczane są rozmazy z komórkami jak w grupie trzeciej, w których dodatkowo stwierdza się niewielką liczbę komórek nowotworowych oraz krwinki czerwone. Grupa V obejmuje rozmazy z obecnością licznych komórek nowotworowych, czyli tych z atypią jądra i cytoplazmy oraz liczne krwinki czerwone (81,82). Dwie ostatnie grupy wchodzi w skład rozmazów podejrzanych o raka.

Klasyfikacja ta, choć nadal bardzo ważna staje się jednak coraz bardziej klasyfikacją o historycznym znaczeniu gdyż nie uwzględnia aktualnej wiedzy na temat procesów karcynogenezy w obrębie szyjki macicy (33,88,92,115,116,129).

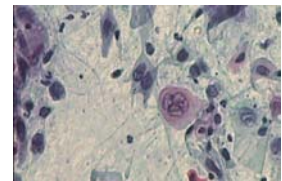
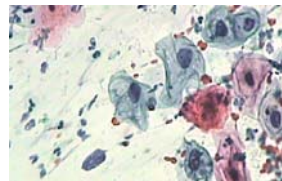
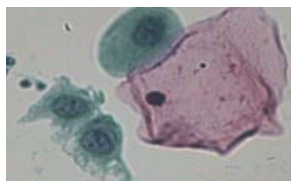
W oryginalnym systemie klasyfikacyjnym stworzonym przez Papanicolaou nieprawidłowe (w mianownictwie anglojęzycznym atypowe) komórki, które nie spełniały definicji „dysplastyczne” umieszczone zostały w kategorii „grupa II”. Kategoria ta obejmowała swym zasięgiem tak różnorodne zmiany jak te związane z infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego - koilocytoza (gr. II B), czy zmiany odczynowe i naprawcze związane z innymi patogennymi czynnikami infekcyjnymi i zapalnymi (IIA) (20,21).

Początkowo sądzono, iż komórki klasyfikowane jako nieprawidłowe łagodne komórki rozmazu i zaliczane do klasy II wg Papanicolaou wiążą się z łagodnymi zmianami. Dopiero późniejsze opracowania dowiodły, że mogą one być związane zarówno z procesami zapalnymi jak i nowotworowymi (33,49,53,54,100,101,129,135,136).

Nasilenie tych zmian umożliwia umiejscowienie komórki we właściwym punkcie diagramu przemian nowotworowych (145):



RETROPLAZJA



Diag.1. Przemiany komórki nabłonkowej szyjki macicy
 retroplazja – degeneracja i śmierć
 normoplazja - euplazja – stan homeostazy
 proplazja - hyperplazja, przerost
 paraplazja - dyskarjoza, dysplazja
 neoplazja – neotypia - przemiana nowotworowa

Obecnie istotne znaczenie dla klasyfikacji obrazów cytologicznych mają dane na temat procesu nowotworzenia a szczególnie roli infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego i zmian morfologicznych związanych z tą infekcją (5,6,10,22,23,26,28,29,30,35,45,50,55,56, 57,66,84,86,87,88,94,104,113,116,123,129,141,143). W ostatnich latach obserwuje się również wzrost postaci gruczołowej raka szyjki macicy z 5 do kilkunastu a nawet wg. nielicznych autorów do 20 procent, którego wykrywalność badaniem cytologicznym jest dużo niższa niż zmian płaskonabłonkowych (7,26,28,29,30,95,102,118).

Przede wszystkim klasyfikacja cytologiczna wg. Papanicolaou pomija znaczenie obecności subtelných zmian komórkowych dotyczących zarówno nabłonka płaskiego jak i gruczołowego, których nie można według niej zakwalifikować do grupy III. Natomiast włączenie ich do grupy II jest niebezpieczne dla pacjentki, gdyż w pewnym odsetku zmiany te

skrywają istotne klinicznie patologie i mogą ulec progresji do raka inwazyjnego. Dodatkowo klasyfikacja ta nie uwzględnia znaczenia infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego oraz zmian morfologicznych związanych z tym zakażeniem, którego związek z procesem karcynogenezy jest obecnie niekwestionowany. Brak w niej także logicznego ujęcia zmian dotyczących nabłonka gruczołowego (70,103,129,144).

Chęć ujęcia tych zagadnień w ramy klasyfikacyjne była przyczyną modyfikacji systemu oceny wg Papanicolaou, jak np. klasyfikacja wg mianownictwa monachijskiego opracowana przez Niemieckie Towarzystwo Cytologiczne obowiązująca do dnia dzisiejszego w krajach niemieckojęzycznej części Europy (26,44,81,82,146). W tym systemie oceny zmian cytologicznych wprowadzono subklasyfikację grupy trzeciej wydzielając w niej niejasne obrazy komórkowe spowodowane najprawdopodobniej przez ciężkie zmiany zapalne, zwyrodnieniowe, regeneracyjne zmiany wsteczne, które nie można jasno zdefiniować jako stan przedrakowy lub rak, oraz podgrupę IIID do której zaliczono rozmazy zawierające komórki dysplastyczne małego i średniego stopnia. Grupa rozmazów z komórkami dysplastycznymi dużego stopnia i raka *in situ* umieszczono w grupie IV. Wprowadzono również pojęcie grupy 0, w których znalazły się rozmazy nieczytelne ze względów technicznych, które powinny być według zaleceń powtórzone obligatoryjnie po 2 tygodniach (44).

Również Światowa Organizacja Zdrowia wprowadziła w 1978 roku odmienny system klasyfikacyjny stosując formę opisową (9,136,146).

Także w naszej Klinice od 40 lat stosuje się formę opisową, uwzględniającą jakość obrazu, oraz ocenę onkologiczną, zapalną i cytohormonalną rozmazu. Została ona sformułowana przez L. Krupińskiego. Uważał on, iż klasyczna klasyfikacja Papanicolaou powinna ulec modyfikacji, ze względu na wprowadzenie do cytodiagnostyki nowej terminologii (m.in. metaplazji i dysplazji) (69).

Kolejnym etapem w udoskonalaniu systemów oceny, a przede wszystkim w ich ujednoczeniu, było zaproponowanie całkowicie odmiennej klasyfikacji przez National Cancer Institute (NCI - Narodowy Instytut Raka) podjednostkę National Institute of Health w Stanach Zjednoczonych Ameryki. Punktem wyjścia dla powstania nowego systemu oceny było spotkanie w Bethesda, Maryland panelu ekspertów z dziedziny cytodiagnostyki, histopatologii i ginekologii onkologicznej (129).

Uwzględniając aktualny stan wiedzy na temat patofizjologii zmian w obrębie szyjki macicy i ujednoczając terminologię umożliwiającą porozumienie się klinicysty, cytologa i patomorfologa zaproponowano w 1988 roku standaryzację systemu klasyfikacji rozmazów pochwowo-szyjkowych tzn. opracowany przez NCI nowy system oceny nazwany systemem Bethesda. Zastosowanie nowego systemu klasyfikacji miało za zadanie uzyskanie jak najwięcej informacji o szyjce macicy z rozmazu pochwowo-szyjkowego oraz podniesienie trafności rozpoznania cytologicznego. Miało zapewnić łatwą i jasną komunikację pomiędzy cytodiagnostą, a prowadzącym pacjenta klinicystą oraz oceniającym preparat histologiczny patomorfologiem, wprowadzić rozpoznania, które były by czytelne, jednoznaczne i powtarzalne (114,115,116,129).

Nowa klasyfikacja wprowadziła też kilka rewolucyjnych zmian, które spotkały się jednak z dużym oporem i brakiem akceptacji klinicystów.

Klasyfikacja rozmazów cytologicznych wg. systemu Bethesda proponuje bardziej uproszczony podział zmian śródnabłonkowych wydzielając tylko dwie podgrupy. Pierwszą stanowią zmiany śródnabłonkowe małego stopnia (*Low Grade Squamous Intraepithelial Lesions* – LSIL), do których zaliczono zmiany morfologiczne związane z infekcją wirusem brodawczaka ludzkiego, atypię koilocytną, oraz z dysplazją małego stopnia. Grupę drugą określono jako zmiany śródnabłonkowe dużego stopnia (*High Grade Squamous*

Intraepithelial Lesions – HSIL), które obejmują dysplazję średniego, dużego stopnia i raka *in situ* których histologicznymi odpowiednikami są CIN2 i CIN3.

Klasyfikacja Bethesda spotkała się z dużą krytyką z kilku względów. Przede wszystkim zarzucono jej, iż podaje zbyt mało informacji klinicyście różnicując tylko dwa typy nieprawidłowości, podczas gdy część lekarzy zwłaszcza w Europie włącza inne postępowanie terapeutyczne w przypadkach CIN 2 niż CIN 3, czy raka *in situ*. Dodatkowo zarzucono błędne przeprowadzenie linii podziału na dwie grupy, opierając się na wynikach badań na temat historii naturalnej zmian wewnątrz nabłonkowych, z których wynikało, iż ewolucja nieleczonych zmian typu CIN1 i 2 jest bardziej zbliżona niż CIN2 i 3. Regresja nieleczonych CIN 1 dotyczy 42-57%, CIN2 34-43 %. Natomiast samoistną regresję CIN 3 określa się na 12-28% przypadków, chociaż większość klinicystów uważa, że w dużym odsetku przypadków nie jest to samoistna regresja, ale usunięcie całej zmiany z wycinkiem. Również odsetek progresji wewnątrz nabłonkowej neoplazji szyjki macicy bardziej zbliżony jest w CIN1 i CIN2 i wynosi odpowiednio 10 i 20% a w CIN 3 powyżej 50% przypadków (6,36,86,104,134).

Jednak ostatnie wyniki uzyskane w przeprowadzonym badaniu ALTS wykazały prawidłowy i powtarzalny sposób różnicowania pomiędzy dysplazją małego a dysplazją średniego stopnia w badaniu cytologicznym, podczas gdy możliwość różnicowania dysplazji średniego i dużego stopnia była utrudniona z wartością Kappa 0,28 (115,121,122,123,130, 132,137).

Dwustopniowy histologiczny podział wewnątrz nabłonkowej neoplazji szyjki macicy był już zresztą postulowany w 1977 roku przez Burghardt w „Diagnosis and treatment of microinvasive carcinoma of the cervix uteri”. Także twórca pojęcia CIN Richart w 1989 próbował dopasować klasyfikację CIN do cytologicznego systemu Bethesda (9). Fox proponuje połączenie CIN2 i 3 w jednym terminie dysplazji szyjki macicy, podczas gdy CIN1

jako zmiana najczęściej przemijająca związana w 89% z przejściową infekcją HPV ma ulec przemianowaniu do tzw. CIN granicznego (136). Przedstawione poniżej opinie wskazują, że podział ten nie rozwiązuje wszystkich trudności i zapewne będzie ulegał dalszym modyfikacjom.

Jeszcze więcej problemów sprawia klasyfikacja nieprawidłowości gruczołowych nabłonka szyjki macicy. Badanie Burghardta wskazuje, że około 90% przypadków zmian przednowotworowych i raka szyjki macicy pojawia się w obrębie tzw. pola gruczołowego szyjki macicy i strefy przejściowej. Strefa przejściowa nie zawsze jest możliwa do uwidocznienia na tarczy części pochwowej. W części przypadków ulega przemieszczeniu w głąb kanału szyjki, stąd 15-20% zmian płaskonabłonkowych (SIL – *Squamous Intraepithelial Lesion*) jest stwierdzanych w obrębie endocervix (135). Dla prawidłowej oceny cytologicznej szyjki macicy niezbędna jest obecność komórek gruczołowych. Komórki gruczołowe stwierdzane w rozmazach pochwowo-szyjkowych mogą pochodzić nie tylko z nabłonka gruczołowego szyjki macicy, ale także z endometrium, nabłonka pokrywającego jajowody, czy pojawić się w wyniku metaplastji jelitowej, a także być wynikiem przerzutowania z innych narządów (41,81,82, 136,146).

W przeciwieństwie do karcynogenezy dotyczącej przemian nabłonka płaskiego, nowotworzenie obejmujące jednowarstwowy nabłonek gruczołowy szyjki macicy nie jest dokładnie poznane. Pomimo wzrostu odsetka raków gruczołowych szyjki macicy w ostatnich dziesięcioleciach nadal pozostaje on stosunkowo rzadkim nowotworem. W rzeczywistości uzyskano bowiem spadek częstości występowania raka płaskonabłonkowego, co wskazuje na wydajność działań profilaktycznych, między innymi skrinningu cytologicznego. Dlatego część autorów uważa, że jest to względny wzrost częstości występowania raka gruczołowego wskazujący na niewydolność metod przesiewowych w zapobieganiu rozwojowi tego typu nowotworu, nie jest związany z rzeczywistym wzrostem zapadalności (43). W sprzeczności z

tym twierdzeniem pozostają wyniki badań ze Szwecji wskazujące na prawdziwy wzrost częstości zachorowań na raka gruczołowego szyjki macicy z 1,59/100000 osób /rok w 1950 r do 2,36/100000/rok w 1990 (26).

Dodatkowym utrudnieniem jest fakt, iż w blisko 50% zmianom przednowotworowym raka gruczołowego szyjki macicy towarzyszą nieprawidłowości dotyczące wielowarstwowego nabłonka płaskiego (129).

Jednocześnie problemem pozostaje brak jednoznacznego zdefiniowania atypii w przypadku tego nabłonka, w ujęciu cytologicznym i histopatologicznym. W 1975 roku wprowadzono pojęcie śródnabłonkowej neoplazji gruczołowej (*Cervical Intraepithelial Glandular Neoplasia* – CIGN). Próbując zastosować analogie do histopatologicznego podziału zmian przednowotworowych dotyczących wielowarstwowego nabłonka płaskiego podzielono CIGN na 3 stopnie CIGN1, CIGN2 i CIGN3. W Wielkiej Brytanii wprowadzono analogiczną do dwustopniowego podziału cytologicznego wg. systemu Bethesda histologiczną klasyfikację w postaci LCGIN (*low grade glandular intraepithelial neoplasia – gruczołowa śródnabłonkowa neoplazja małego stopnia*) oraz HCGIN (*high grade glandular intraepithelial neoplasia - gruczołowa śródnabłonkowa neoplazja dużego stopnia*).

Dowodzono, iż próby jakiegokolwiek podziału zmian przednowotworowych nabłonka gruczołowego szyjki macicy nie mają żadnego uzasadnienia klinicznego, a badania epidemiologiczne potwierdziły, iż średni wiek pacjentek z rakiem gruczołowym *in situ* jest taki sam jak kobiet z CIGN. Brak akceptacji nowej terminologii doprowadził do powstania swobodnego „tygla” rozpoznań dotyczących pojedynczej warstwy nabłonka i obejmującego zmiany o podobnym charakterze, a przyjmujących różne nazwy takie jak: wewnątrzszyjkowa dysplazja gruczołowa (Endocervical Glandular Dysplasia – EGD *Bousfield, Young, Clement, Scully*), wewnątrzszyjkowa atypia gruczołowa (Endocervical Glandular Atypia – EGA

Hopkins), atypowa hyperplazja wewnątrzszyjkowa (Atypical Endocervical Hyperplasia – AEH *Wright*), endodysplazja (*Jaworski*) (136).

Ostatecznie pojęcie wewnątrzszyjkowej dysplazji gruczołowej zostało zaaprobowane przez World Health Organisation i przez International Society of Gynecological Pathologists i stało się obowiązującym w nomenklaturze patologii dotyczących nabłonka gruczołowego.

Nie jest wiadomo, jakie jest prawdopodobieństwo progresji CIGN do raka inwazyjnego, nie jest również wiadomo czy wszystkie przypadki raka gruczołowego w swym rozwoju wychodzą ze zmian przedinwazyjnych.

Nowy system klasyfikacji nie tylko zmienił podejście do zmian objętych różnymi terminami w mianownictwie histologicznym i cytologicznym (dysplazji, wewnątrz nabłonkowej neoplazji szyjki macicy czy śródnabłonkowych zmian płaskonabłonkowych czy zmian gruczołowych) ale doprowadził także do pojawienia się nowego typu rozpoznań, takich jak atypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* - ASCUS) , czy atypowe komórki gruczołowe o nieokreślonym znaczeniu (*Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance* - AGUS). Powstała więc nowa grupa nieprawidłowości o niejasnym i już z samej nazwy wynikającym niewiadomym znaczeniu oraz trudnej do określenia prognoście. Obejmowały one wszystkie te zmiany dotyczące komórek gruczołowych i płaskonabłonkowych w których nasilenie nieprawidłowości było większe niż w zmianach odczynowych i reparacyjnych wywołanych zapaleniem czy wpływem czynników zewnętrznych, jednak nie na tyle duże i nie spełniające wszystkich kryteriów rozpoznania wewnątrz nabłonkowych zmian płaskonabłonkowych o charakterze dysplazji czy raka gruczołowego *in situ*.

Większość kontrowersji dotyczy mianownictwa: atypowe komórki płaskonabłonkowe czy atypowe komórki gruczołowe nie zaś samej definicji nieprawidłowości.

Słowo atypowe zarezerwowane do tej pory było w terminologii histopatologicznej, ale także cytologicznej dla komórek nowotworowych będąc ich synonimem.

Nie jest to po raz pierwszy pojawiający się problem dotyczący nomenklatury i zastosowania słowa atypowy. Termin atypia w piśmiennictwie jest używany dla określenia różnych stanów strukturalnych komórki nabłonka i całego nabłonka. Już w 1961 roku w monografii „Rak szyjki macicy” Widy-Wirski postulował zastąpienie słowa atypowy w stosunku do komórek nowotworowych pojęciem neotypowy, a zmiany strukturalne komórki dotyczące jądra komórkowego i cytoplazmy stwierdzane w przypadku rozrostów nowotworowych nazwał neotypią (145).

W piśmiennictwie angielskojęzycznym termin atypia nabłonkowa natomiast obejmowała szerokie spektrum nieprawidłowości dotyczących struktury komórki nabłonkowej, które odróżniały je od prawidłowej komórki, ale nie miały takiego nasilenia, które pozwoliłoby na rozpoznanie dysplazji bądź raka (146). Pod pojęciem tym rozumiano zmiany dotyczące głównie jądra komórkowego, najczęściej związane z zapaleniem, odczynem regeneracyjnym lub reparacyjnym, niektórymi stanami niedoborowymi (jak np. niedobór kwasu foliowego). Charakteryzowały się niewielkim powiększeniem jądra, bez hyperchromazji, z równomiernym rozproszeniem materiału chromosomalnego. W przypadku możliwości określenia przyczyny wystąpienia tych nieprawidłowości nie postulowano włączania postępowania, odbiegającego od tego obowiązującego w przypadkach normalnych rozmazów pochwowo-szyjkowych. W innym przypadku zalecano powtórzenie rozmazu cytologicznego.

System Bethesda 1988 wprowadził zunifikowaną terminologię, nie przedstawiając jednak specyficznych kryteriów morfologicznych dla poszczególnych nowych kategorii diagnostycznych. Do rozpoznań typu atypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu zaliczono zmiany nie stanowiące jakiegóż jednej odrębnej jednostki patologicznej ale

raczej spektrum zmian komórkowych o szerokim zakresie nieprawidłowości od tych bliskich zmianom łagodnym do przedinwazyjnych zmian nowotworowych (2,13,18). Jeszcze bardziej problematycznie przedstawiała się kwestia atypowych komórek gruczołowych o nieokreślonym znaczeniu. Wielu autorów sugerowało, iż podawane kryteria morfologiczne tej drugiej podgrupy są również charakterystyczne dla raka gruczołowego *in situ* (70,129). W 1991 roku po 2 latach doświadczeń w stosowaniu systemu Bethesda zaproponowano kilka modyfikacji dotyczących tych dwóch rozpoznań. Szeroki zakres nieprawidłowości i różnorodność zmian wchodzących w zakres ASCUS wskazywał na konieczność dalszego podziału tej kategorii. Dokonano tego na warsztatach w Bethesda w 1991 r tworząc zalecenie, iż w przypadku stwierdzenia w rozmazie atypowych komórek płaskonabłonkowych o nieokreślonym znaczeniu powinno się wykonać ich dalszą subkategoryzację na trzy podtypy:

- atypowe komórki o nieokreślonym znaczeniu najprawdopodobniej zmiany odczynowe (ASCUS favor reactive changes – *ASCUS FR*)

- atypowe komórki o nieokreślonym znaczeniu najprawdopodobniej zmiany przednowotworowe (*ASCUS favor premalignant ASCUS FP*)

- atypowe komórki o nieokreślonym znaczeniu niewyszczególnione inaczej (*ASCUS not otherwise specified ASCUS NOS*).

W przypadku zmian gruczołowych zalecano dalszy podział kategorii atypowe komórki gruczołowe o nieokreślonym znaczeniu na cztery podtypy:

- AGUS najprawdopodobniej endometrialne (*AGUS favor endometrial origin*)

- AGUS najprawdopodobniej odczynowe komórki endocerykalne (*AGUS favor reactive endocervical cells*)

- AGUS najprawdopodobniej nowotworowe komórki endocerykalne (*AGUS favor neoplastic endocervical cells*)

-AGUS inaczej niewyszczególnione (not otherwise specified). Do grupy AGUS zaliczono również cytologiczne podejrzenie raka gruczołowego wewnątrzszyjkowego *in situ*.

Zmiany te były spowodowane stwierdzeniem bardzo niskiej powtarzalności i zgodności stawianych rozpoznań między cytodiagnostami, zarówno w przypadkach atypowych komórek płaskonabłonkowych o nieokreślonym znaczeniu jak i atypowych komórek gruczołowych o nieokreślonym znaczeniu (73,125).

Podano 3 cechy w rozmazie cytologicznym jakie musiały spełniać atypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu:

- 2 do 3 krotne powiększenie jądra w stosunku do prawidłowej komórki warstwy pośredniej nabłonka wielowarstwowego płaskiego z obecnością prawidłowej, dojrzałej cytoplazmy typowej dla komórek intermedialnych,
- drobnoziarnista równomiernie rozłożona chromatyna, bez wyraźnie zaznaczonej hyperchromazji,
- gładkie i regularne granice błony jądrowej.

Jednocześnie część autorów zaliczało do grupy atypowych komórek płaskonabłonkowych o nieokreślonym znaczeniu czy atypowych komórek gruczołowych o nieokreślonym znaczeniu takie rozmazy w których występowały nieprawidłowości o nasileniu charakterystycznym dla dysplazji średniego i dużego stopnia (w przypadku ASCUS) czy raka gruczołowego (w przypadku AGUS) ale zmiany te dotyczyły jedynie pojedynczych (1-3) komórek w rozmazie (72,76,96,110,120).

Od chwili wprowadzenia nowych terminów diagnostycznych (ASCUS i AGUS) próbowano w wielu pracach wyjaśnić znaczenie obecności tego typu komórek w rozmazach pochwoowo-szyjkowych (1,2,13,15,16,17,18,21,24,32,38,40, 46,51,54,64,65,72,73,74,76,83, 96, 100,109,110,111,114,115,119,120,121,125,128,130,133,138,148,153).

Zasadniczym celem jest znalezienie odpowiedzi na pytanie: czy atypowe komórki płaskonabłonkowe i atypowe komórki gruczołowe są nieprawidłowościami, których obecność w rozmazie wskazuje na zwiększone ryzyko rozwoju zmian znaczących klinicznie, czy pod tak postawionym rozpoznaniem ukrywają się błędnie nierozpoznane, już istniejące nieprawidłowości, zarówno płaskonabłonkowe jak i gruczołowe, nawet pod postacią raka szyjki macicy, w tym raka inwazyjnego.

Podawana w literaturze częstość zmian typu SIL po rozpoznaniu ASCUS różni się w szerokim zakresie od 7 do 58%, w tym częstość LSIL od 7 do 25%, HSIL od 2,5 do 16,8%, raka szyjki macicy (w postaci *in situ* i inwazyjnej) od 0,14 do 0,46% (1,32,64,76,119,140, 148). W przypadku atypowych komórek gruczołowych o nieokreślonym znaczeniu podawany odsetek nieprawidłowości znaczących klinicznie jest jeszcze wyższy i wynosi od 17-52%, w tym CIN2 i CIN3 od 9,1-39,7%, raka gruczołowego szyjki macicy *in situ* od 1,2-7,9%, raka gruczołowego szyjki macicy w formie inwazyjnej od 3,2-9,4%, hyperplazji endometrium od 1,1-11,8% (31,40,59,83,153). Jednocześnie na podstawie wyników badań skriningowych obejmujących populację kobiet w Stanach Zjednoczonych oszacowano, iż ponad $\frac{1}{3}$ zmian o charakterze CIN2 lub o większym nasileniu zostaje stwierdzono w trakcie dalszych badań diagnostycznych populacji kobiet z atypowymi komórkami płaskonabłonkowymi o nieokreślonym znaczeniu w rozmazach szyjkowych.

Ostatecznie dziesięcioletnie doświadczenie z szeroko wprowadzonym (głównie w Stanach Zjednoczonych Ameryki) systemem Bethesda zaowocowało kolejnymi zmianami mianownictwa na warsztatach sponsorowanych przez National Cancer Institute w 2001 roku. Wprowadzono uproszczenie dotyczące subkategoryzacji atypowych komórek płaskonabłonkowych o nieokreślonym znaczeniu, zastępując je rozpoznaniem „atypowe komórki płaskonabłonkowe”. Definicja tej kategorii to zmiany cytologiczne sugerujące płaskonabłonkowe zmiany śródnabłonkowe (SIL – *squamous intraepithelial lesions*), które

jakościowo lub ilościowo są niewystarczające do rozstrzygającej interpretacji (129).

Wyeliminowano subkategorię ASCUS FR opierając się wynikach badań wielośrodkowych, w których stwierdzono, iż częstość występowania CIN2 i CIN3 oraz zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego o wysokim potencjale onkogennym u kobiet z tym podtypem ASCUS jest bardzo niska. Atypowe komórki płaskonabłonkowe podzielono na dwie podgrupy:

-atypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu (*Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance* - ASC-US)

-atypowe komórki płaskonabłonkowe – nie można wykluczyć HSIL. (*Atypical Squamous Cells Cannot Exclude HSIL* - ASC-H)

Jednocześnie należy podkreślić, iż jak podają sami twórcy nowej kategorii czyli atypowych komórek płaskonabłonkowych, powstała ona w celu umożliwienia interpretacji całego materiału utrwalonego na szkiełku a nie pojedynczej komórki nabłonka (129).

Podano również wytyczne dotyczące kontroli jakości oceny pracowni cytologicznych sugerując, iż odsetek atypowych komórek płaskonabłonkowych nie powinien przekraczać 5% wszystkich nieprawidłowych rozpoznań, oraz iż stosunek ASC:SIL powinien mieścić się w zakresie od 2:1 do 3:1(129).

Część patologów zajmujących się znaczeniem występowania nieprawidłowości pod postacią atypowych komórek płaskonabłonkowych, już po wprowadzeniu i zaadaptowaniu systemu Bethesda 2001 postulowało na podstawie swoich doświadczeń zmiany, dotyczące nomenklatury. Sherman i Schiffmann zalecają by wprowadzić w miejsce ASC-US podtyp ASC-L (atypowe komórki płaskonabłonkowe – sugerujące zmiany śródnabłonkowe małego stopnia) i utrzymać ASC-H (atypowe komórki płaskonabłonkowe - sugerujące zmiany śródnabłonkowe dużego stopnia). Punktem wyjścia tej propozycji był postulat iż nieprawidłowości komórek płaskonabłonkowych wskazują na rozwijającą się najprawdopodobniej nieprawidłowość o trudnym do określenia nasileniu (121).

Wprowadzone zmiany dotyczące atypowych komórek gruczołowych o nieokreślonym znaczeniu miały przede wszystkim na celu podkreślenie odmienności tej kategorii od atypowych komórek płaskonabłonkowych o nieokreślonym znaczeniu. Początkowo uważano bowiem, iż atypowe komórki gruczołowe analogicznie jak atypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu reprezentują przede wszystkim zmiany wynikające z nadmiernego wzrostu i odczynu powstałego w wyniku procesu zapalnego. Tymczasem doświadczenia wielu badań wskazywały, iż nawet w przypadku zmian określanych jako odczynowe czyli (AGUS FR) których wystąpienie w rozmazie łączono z toczącym się procesem zapalnym obejmującym dolny odcinek narządu rodnego w 9 do 39% znajdowano w dalszej diagnostyce nieprawidłowości o charakterze zmian śródnabłonkowych dużego stopnia. Zastąpiono więc termin atypowe komórki gruczołowe o nieokreślonym znaczeniu rozpoznaniem atypowe komórki gruczołowe (AGC), rezygnując z mylącego dodatku „o nieokreślonym znaczeniu” które sugerowało łagodny charakter tej zmiany. Pozostano przy konieczności subklasyfikacji AGC w zależności od podtypu nabłonka gruczołowego z którego pochodzi zmiana (endocerykalny czy endometrialny) opierając się na wynikach badań potwierdzających odmienną nieprawidłowości stwierdzanych w badaniach dodatkowych w zależności od podtypu nabłonka gruczołowego (147). W przypadku atypowych komórek gruczołowych wydzielono więc dwie podgrupy:

1. atypowe

- komórki endocerykalne niesklasyfikowane inaczej (*Atypical Endocervical Cells Not Otherwise Specified - NOS*)

- komórki endometrialne niesklasyfikowane inaczej (*Atypical Endometrial Cells Not Otherwise Specified – NOS*)

- komórki gruczołowe niesklasyfikowane inaczej (*Atypical Endometrial Cells Not Otherwise Specified – NOS*)

2. atypowe

- komórki endocerykalne prawdopodobnie nowotworowe (*Atypical Endocervical Cells Favor Neoplastic*)

- komórki gruczołowe prawdopodobnie nowotworowe (*Atypical Glandular Cells Favor Neoplastic*)

Uznano jednocześnie, iż opracowane kryteria diagnostyczne cytologicznego rozpoznania raka gruczołowego szyjki macicy w postaci *in situ* są na tyle dobrze zdefiniowane, oraz mają na tyle wysoką korelację z wynikami histopatologicznymi, iż można AIS (*Adenocarcinoma in situ*) wyodrębnić jako oddzielną grupę z kategorii atypowych komórek gruczołowych. Założenie to wydaje się jednak dyskusyjne, wzbudzać może bowiem kontrowersję w jaki sposób cytologicznie można określić inwazyjność nowotworu który rozwija się w obrębie jednowarstwowego nabłonka gruczołowego (129).

Dodatkowym problemem jest powtarzalność stawianego rozpoznania, zwłaszcza dotycząca atypowych komórek gruczołowych (124,125,151). W badaniach przeprowadzonych przez Raab'a zgodność pomiędzy doświadczonymi cytodiagnostami ginekologicznymi w ocenie rozmazów kwalifikowanych jako AGC wynosiła od 25-69% (73,108,109,110). Również w badaniach określających zgodność rozpoznania cytologicznego z wynikiem badania histopatologicznego wykazano, iż 41% cytodiagnostów zmiany o charakterze HSIL (CIN2/3 w badaniu histopatologicznym) klasyfikowało jako AGC, ale aż 89% nieprawidłowości, które w badaniu histopatologicznym rozpoznane były jako AIS w rozmazie pochwowo-szyjkowym przyporządkowano do grupy nietypowych komórek gruczołowych (73). Przedstawione powyżej tak duże rozbieżności w klasyfikacji atypowych komórek płaskonabłonkowych i gruczołowych oraz w ich znaczeniu klinicznym w pełni uzasadniają dalsze obserwacje morfologiczno-kliniczne tych wydzielonych w osobną grupę zmian w nowym systemie klasyfikacji rozmazów cytologicznych wg Bethesda.

2. CEL PRACY:

1. Określenie częstości występowania nietypowych komórek płaskonabłonkowych i gruczołowych w materiale rozmazowym.
2. Ocena zachowania się zmian typu nietypowe komórki płaskonabłonkowe i gruczołowe w czasie.
3. Określenie strategii postępowania diagnostyczno - terapeutycznego u kobiet z nietypowymi komórkami płaskonabłonkowymi i gruczołowymi szyjki macicy.

3. MATERIAŁ I METODYKA.

Materiał pracy stanowi 5000 kobiet uczestniczących w programie badań przesiewowych raka szyjki macicy organizowanym przez Klinikę Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w 2001 roku. Podstawą do zakwalifikowania kobiet do dalszego badania było stwierdzenie w szyjkowych rozmazach cytologicznych ocenianych według kryteriów morfologicznych systemu Bethesda atypowych komórek płaskonabłonkowych (ASC) oraz atypowych komórek gruczołowych (AGC) spełniających kryteria klasyfikacyjne systemu Bethesda 2001 podanych dla ASC (*Atypical Squamous Cells*) i AGC (*Atypical Glandular Cells*). W pracy odniesiono się jednak do mianownictwa polskiego zastępując określenia atypowe komórki gruczołowe i atypowe komórki płaskonabłonkowe określeniem nietypowe komórki odpowiednio gruczołowe czy płaskonabłonkowe. Związane jest to z zarezerwowaniem terminu atypia dla zmian nowotworowych w terminologii obowiązującej w krajach europejskich.

Za nietypowe komórki płaskonabłonkowe uznano takie, których budowa cechuje się nieprawidłowościami mogącymi sugerować obecność płaskonabłonkowych zmian śródnabłonkowych (SIL – *squamous intraepithelial lesion*), ale zarówno ich nasilenie ilościowe, jak i cechy jakościowe są niewystarczające dla postawienia ostatecznego rozpoznania. Odpowiada to ASC wg systemu Bethesda 2001 (129).

Za nietypowe komórki gruczołowe uznano takie, w których nasilenie atypii jądrowej przekracza zmiany charakterystyczne dla zmian odczynowych i reparacyjnych, brak jest jednak jednoznacznych cech cytologicznych pozwalających na rozpoznanie raka gruczołowego *in situ* lub raka gruczołowego inwazyjnego. Odpowiada to AGC wg systemu Bethesda 2001 (129).

Spośród 5000 kobiet objętych skrinnikiem cytologicznym wyselekcjonowano grupę 283 (5,66%) nieciężarnych kobiet w wieku od 25 do 65 roku życia z takimi rozpoznaniem: 248 (4,96%) z obecnymi w rozmazie nietypowymi komórkami płaskonabłonkowymi (ASC) oraz 35 z nietypowymi komórkami gruczołowymi (AGC).

Tab. 1. Odsetek ASC i AGC w badanym materiale (N=5000 kobiet).

Rodzaj zmiany	n	%
ASC	248	4,96
AGC	35	0,7
Razem	283	5,66

ASC – nietypowe komórki płaskonabłonkowe
AGC – nietypowe komórki gruczołowe
n - liczba obserwowanych przypadków w grupie badanej

W przypadku komórek nabłonka gruczołowego każdorazowo starano się ustalić typ nabłonka, z którego pochodzi zmiana, wydzielając podtyp endocerykalny wywodzący się z nabłonka walcowatego szyjki macicy oraz podtyp endometrialny z nabłonka gruczołowego błony śluzowej trzonu macicy.

U wszystkich badanych kobiet przez 3 lata w odstępach trzech miesięcznych wykonywano kontrolne badanie cytologiczne. W trakcie pierwszej wizyty pobrano wymazy pochwowo-szyjkowe do badań cytologicznych, bakteriologicznych oraz do badań molekularnych w kierunku infekcji HPV. Badania cytologiczne i wirusologiczne wykonywano w Pracowni Diagnostyki Cytologicznej i Molekularnej Kliniki Ginekologii Położnictwa i Onkologii CMUJ, a badanie biocenozy pochwy w Pracowni Bakteriologicznej Zakładu Diagnostyki Szpitala Uniwersyteckiego (Kierownik Zakładu: Prof.dr hab.med. Jerzy Naskalski).

W przypadku braku w dwóch kolejnych badaniach cytologicznych nieprawidłowości tj. nietypowych komórek płaskonabłonkowych (ASC) lub nietypowych komórek gruczołowych (AGC) kontynuowano kontrolę cytologiczną co 3 miesiące.

W przypadku utrzymywania się zmian o charakterze ASC i/lub AGC w rozmazach szyjkowych przez dwa kolejne badania lub, gdy stwierdzano progresję zmiany wykonywano badanie kolposkopowe szyjki macicy. U kobiet z nieprawidłowymi wynikami badania kolposkopowego pobierano wycinki celowane z tarczy części pochwowej połączone z wyłyżeczkowaniem kanału szyjki macicy, a u wszystkich pacjentek z nietypowymi komórkami gruczołowymi bez względu na wynik badania kolposkopowego wykonywano wyłyżeczkowanie frakcjonowane tj. kanału szyjki i jamy macicy. Ocenę histologiczną uzyskanego materiału wykonano w Katedrze Patomorfologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kierownik Katedry: Prof. dr hab.med. Jerzy Stachura).

U kobiet z dodatnim wynikiem badania histopatologicznego włączono odpowiednie postępowanie terapeutyczne, z wynikiem ujemnym kontynuowano kontrolę cytologiczną.

W trakcie ostatniego badania tj. po 36 miesiącach obserwacji ponownie pobierano wymazy z szyjki macicy na badanie w kierunku infekcji HPV.

Określono odsetek regresji, progresji oraz utrzymywania się zmian o charakterze nietypowych komórek płaskonabłonkowych i nietypowych komórek gruczołowych w ciągu trzyletniego okresu obserwacji.

Określono także cechy morfologiczne komórek, które ulegają progresji do śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy i raka, oraz współistnienie infekcji HPV o niskim i wysokim potencjale onkogennym z tym procesem. W oparciu o zachowanie się zmian typu ASC i AGC w czasie, oraz wyniki badań kolposkopowych, wirusologicznych, mikrobiologicznych i histologicznych określono strategie postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w tych stanach. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie.

3.1. Badanie cytologiczne.

Materiał do badania cytologicznego uzyskiwano ze sklepień pochwy i tarczy części pochwowej za pomocą szpatułki Ayre, oraz z kanału szyjki macicy przy użyciu szczoteczki Cytobrush®. Materiał rozprowadzano jednym pociągnięciem szczoteczki i szpatułki na osobnych szkiełkach podstawowych. Natychmiast po wykonaniu rozmazu umieszczano preparaty w utrwalaczu (mieszanka 1:1 eteru i 96% roztworu alkoholu etylowego) na 30 minut. W przypadku obecności krwi na szkiełku umieszczano je na 15 minut w preparacie Olsena. Barwienie wykonywano metodą Papanicolaou w modyfikacji Krupińskiego automatycznie przy użyciu komputerowego automatu do barwienia VARISTAIN®GEMINI firmy THERMO SHANDON.

Ocenę cytologiczną wykonano używając mikroskopów Axioscop 2 *plus* i Axioscop 2 MOT firmy Karl Zeiss. Dokumentację fotograficzną uzyskano przy użyciu aparatu fotograficznego Olympus oraz kamery TK-C1381 firmy JVC.

W skład oceny cytologicznej rozmazów pochwowo-szyjkowych pacjentek z nieprawidłowymi komórkami nabłonkowymi wchodziły: ocena onkologiczna, cytohormonalna, oraz ocena biocenozy pochwy.

1. Zastosowano podział rozmazów cytologicznych wg klasyfikacji Bethesda 2001

wyróżniając następujące grupy rozpoznania:

- I- rozmaz prawidłowy - brak cech śródnabłonkowej neoplazji
- II- rozmaz nieprawidłowy-nieprawidłowości komórek nabłonka

A. płaskiego

1. nietypowe komórki płaskonabłonkowe (ASC)

- a. nietypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu (ASC-US)

b. nietypowe komórki płaskonabłonkowe nie można
wykluczyć HSIL (ASC-H)

2. zmiany śródnabłonkowe małego stopnia (LSIL)
3. zmiany śródnabłonkowe dużego stopnia (HSIL)
4. rak płaskonabłonkowy

B. gruczołowego

1. nietypowe komórki gruczołowe (AGC)
 - a. endocerykonalne
 - b. endometrialne
2. rak gruczołowy

Każdy preparat, w którym stwierdzono nietypowe komórki płaskonabłonkowe, nietypowe komórki gruczołowe lub zmiany o wyższym nasileniu nieprawidłowości traktowano jako nadające się do oceny, bez względu na obecność lub brak elementów strefy transformacji, liczebność komórkową rozmazu czy obecność elementów utrudniających ocenę (leukocyty, histiocyty).

W przypadku AGC starano się określić typ nabłonka, z którego pochodziła podejrzana komórka lub grupy komórek, a więc czy punkt wyjścia miał miejsce w obrębie nabłonka gruczołowego szyjkowego czy nabłonka endometrialnego. W przypadku niemożności określenia pochodzenia klasyfikowano zmianę ogólnie jako nietypowe komórki gruczołowe.

W obu grupach (ASC i AGC) analizie poddano stopień nasilenia nieprawidłowości dotyczących jąder komórkowych oraz cytoplazmy.

W zakresie jądra oceniono obecność:

- zwiększonego stosunku jądrowo-cytoplazmatycznego (N/C),
- nadmierną barwliwość jąder,
- nieregularności błon jądrowych,

- nierównomierności rozkładu chromatyny,
- obecności powiększonych jąder.

W zakresie cytoplazmy oceniono:

- obecność wakuoli,
- gęstość cytoplazmy,
- wybarwienie cytoplazmy.

Zgodnie z kryteriami podanymi dla ASC w systemie Bethesda 2001 rozmaz klasyfikowano jako nietypowe komórki płaskonabłonkowe gdy nieprawidłowe komórki posiadały trzy cechy: pochodziły z nabłonka wielowarstwowego płaskiego, miały zwiększony stosunek jądro-cytoplazmatyczny oraz niewielkiego nasilenia nadbarwliwość jąder, nieregularność chromatyny i obecność kilku jąder w obrębie pojedynczej komórki.

Za kryteria diagnostyczne nietypowych komórek płaskonabłonkowych o nieokreślonym znaczeniu (ASC-US) uznawano:

- wielkość jądra komórkowego 2,5-3-krotnie większa od prawidłowej komórki płaskonabłonkowej z warstwy pośredniej.
- niewielkiego stopnia wzrost stosunku powierzchni jądra do powierzchni komórki.
- niewielkiego stopnia hyperchromazja oraz nieregularność w rozkładzie chromatyny i kształcie jądra
- nieprawidłowości jądrowe związane z gęstą oranżochłonną cytoplazmą

W grupie nietypowych komórek płaskonabłonkowych wyodrębniono również podgrupę nietypowych komórek płaskonabłonkowych które posiadały pojedynczą patologię lub zespół nieprawidłowości morfologicznych analogicznych jak w zmianach śródnabłonkowych dużego stopnia, jednak pod względem jakościowym lub ilościowym cechy te były niewystarczające do rozpoznania HSIL. (ASC-H - *atypical squamous cells – can not exclude HSIL*). Wyselekcjonowano tu zespół cech cytologicznych takich jak

- występowanie komórek pojedynczo lub w małych skupiskach nieprzekraczających 10 komórek.
- wielkość tych komórek odpowiada wielkości komórek metaplastycznych a ich jądra odpowiadają $1\frac{1}{2}$ do $2\frac{1}{2}$ wielkości jądra prawidłowej komórki metaplastycznej,
- stosunek jądro-cytoplazmatyczny jest przybliżony do tego w komórkach o charakterze dla HSIL.

Za kryteria diagnostyczne nietypowych komórek gruczołowych uznano:

1. w przypadku komórek pochodzenia endocerykalnego:

- występowanie komórek w grupach i pasmach z widocznym stłoczeniem i nakładaniem się na siebie jąder komórkowych
- z powiększeniem jąder komórkowych 3-5 razy w stosunku do prawidłowej komórki endocerykalnej
- z niewielkim nasileniem zmienności kształtu i wielkości jądra
- z umiarkowaną hyperchromazją
- z obecnością jąderek
- występowanie komórek w których ilość cytoplazmy może być dość duża, ale stosunek jądro-cytoplazmatyczny jest zwiększony
- z wyraźnymi granicami komórkowymi

2. w przypadku komórek pochodzenia endometrialnego:

- komórki występujące w grupach 5-10 komórkowych
- z niewielkiego stopnia powiększeniem jądra w stosunku do normalnej komórki endometrialnej
- z umiarkowaną hyperchromazją
- z małymi jąderkami
- z niewielkiego stopnia wakuolizacją cytoplazmy

- ze słabo widocznymi granicami komórkowymi.

Poddano analizie zespół cech morfologicznych w poszczególnych rozmazach, oraz ustalono ich stopień nasilenia w zależności od stwierdzenia progresji zmiany i ich nasilenie w grupie, w której progresji nie stwierdzano w dalszym badaniu w stosunku do tych, u których wystąpiły klinicznie znaczące nieprawidłowości zarówno w rozmazach z ASC jak i AGC.

Każdy nieprawidłowy rozmaz cytologiczny dokumentowano w formie fotografii cyfrowych.

2. Kryteria oceny cytohormonalnej: w ocenie cytohormonalnej wyróżniano fazy: estrogeną, lutealną, oraz atrofię. W przypadku nieprawidłowych rozmazów atroficznych materiał do badania pobierano po raz drugi po jednotygodniowej dopochwowej terapii estradiolem (Vagifem 0,025mg).

3. Do identyfikacji flory pochwy stosowano kryteria morfologiczne systemu Bethesda rozpoznając:

- zakażenie *Trichomonas vaginalis*: kryteria rozpoznania – owalne, okrągłe, lub gruszkowatego kształtu cjanochłonne organizmy, o jądrze bladym, umieszczonym ekscentrycznie, z obecnością eozynochłonnych ziarnistości cytoplazmatycznych.
- drobnoustroje grzybicze, morfologicznie należące do *Candida spp.* – kryteria rozpoznania – pselodostrzepki barwiące się eozynochłonne do szarobrazowego koloru
- zmiany flory sugerujące bacterial vaginosis – kryteria rozpoznania – podłoże pokryte cienką warstwą ziarniniaków i pałeczek, komórki powierzchniowe nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokryte przez warstwę bakterii przysłaniającą błonę komórkową tzw. clue-cells, wyraźny brak pałeczek kwasu mlekowego.
- florę odpowiadającą *Actinomyces spp.* – kryteria rozpoznania – gęste grupki nitkowatych drobnoustrojów, z towarzyszącymi na obwodzie skupiskami leukocytów, ostra odpowiedź zapalna z polimorficznymi leukocytami.

- zmiany komórkowe związane z zakażeniem *Herpes simplex* – kryteria rozpoznania –
mocno zaznaczona błona jądrowa poprzez peryferyczne przemieszczenie chromatyny,
gęste eozynochłonne wtręty wewnątrzjądrowe otoczone przez przejrzystą przestrzeń
(„halo”), komórki wielojądrowe.

3.2. Badanie mikrobiologiczne.

Jałową drewnianą szpatułką pobrano z tylnego sklepienia pochwy treść biologiczną, którą rozprowadzano na szkiełku podstawowym, utrwalano nad płomieniem i barwiono metodą Grama. Ocenę dokonywano wykorzystując czterostopniowy podział czystości pochwy wg. Manu af Heurlina. W ten sam sposób pobierano kontrolny wymaz do oceny bakteriologicznej na końcu obserwacji.

Czterostopniowy podział stopni czystości pochwy wg Manu af Heurlina ocenia florę bakteryjną pochwy, uwzględniając także infekcje grzybiczą i rzęsistkową, oraz obecność leukocytów i zachowanie się komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego pokrywającego nabłonek pochwy (81,82).

Pierwszy stopień czystości pochwy wg Manu af Heurlina cechuje obecność wyłącznie pałeczek kwasu mlekowego w dużej ilości oraz złuszczonych komórek nabłonkowych przy braku leukocytów oraz innego typu bakterii. W stopniu drugim obok występujących obficie pałeczek kwasu mlekowego stwierdza się również niewielką ilość pałeczek Gram-ujemnych oraz pojedyncze leukocyty. Charakterystycznym dla stopnia trzeciego jest obecność licznie występujących bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, dużej liczby leukocytów oraz komórek nabłonka wielowarstwowego płaskiego pochodzących z głębszych warstw. W stopniu trzecim występują pojedyncze pałeczki Döderlina. W stopniu czwartym stwierdza się zupełny brak pałeczek kwasu mlekowego przy bardzo obfitej mieszanej florze bakteryjnej oraz nielicznych komórkach nabłonka pochwy. Leukocyty pokrywają często całe pole widzenia (81,82).

3.3. Badanie wirusologiczne (Hybrid Capture 2).

U każdej kobiety zakwalifikowanej do badanej grupy w trakcie pierwszej wizyty oraz w trakcie wizyty końcowej pobierano materiał do badania w kierunku zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego. Treść komórkową z tarczy części pochwowej i kanału szyjki macicy pobierano przy użyciu zestawu Digene Cervical Sampler (Digene Cervical Brush i Specimen Transport Medium firmy Digene) w celu wykonania mikroplótkowej hybrydyzacji ze wzmocnieniem sygnału z użyciem chemiluminescencji dla jakościowej oceny osiemnastu typów ludzkiego wirusa brodawczaka ludzkiego (Hybrid Capture II HPV test firmy Digene). Test Hybrid Capture II pozwala na identyfikację materiału genetycznego wirusa brodawczaka ludzkiego (HPV) osobno dla typów o wysokim oraz średnim potencjale onkogennym [typ B] tj. typy 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,68 oraz o niskim potencjale onkogennym [typ A] tj. typy 6,11,42,43,44. Pobrany materiał przechowywano w formie zamrożonej w temperaturze minus 20 stopni Celsjusza.

Przed rozpoczęciem badania rozmrażano próbki w temperaturze 20-25° C przez 30 minut. Każdorazowo przygotowywano kontrolę negatywną (3 próbki), oraz kalibrator pozytywny dla wirusów o niskim potencjale onkogennym (3 próbki) jak i dla wirusów o wysokim i średnim potencjale onkogennym (3 próbki), a także dołączano po jednej próbce kontroli jakości przeprowadzonego badania.

Po dodaniu do każdej próbki, kontroli negatywnej i kalibratorów odczynnika denaturującego (roztwór zasady sodowej – NaOH) umieszczano materiał w łaźni wodnej w temperaturze 65°C na okres 45 minut – w trakcie inkubacji następowała denaturacja materiału biologicznego.

Kolejny etap polegał na hybrydyzacji zdenaturowanego DNA ze zbuforowanym roztworem zawierającym komplementarne RNA tj. z sondami specyficznymi dla wirusów o wysokim i średnim potencjale onkogennym oraz z sondami RNA dla wirusów o niskim

potencjale onkogennym. Utworzone hybrydy DNA-RNA inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 65 stopni przez kolejne 60 minut.

Do kompleksu hybrydu DNA-RNA w badanym materiale biologicznym dodawano specyficzne dla niego przeciwciała monoklonalne znakowane fosfataza alkaliczna w roztworze z azydkiem sodu. Następnie po wypłukaniu każdej mikropłytki dodawano do niej substrat chemiluminescencyjny (CDP-StarTM z Emerald II). Po 15 minutach dokonywano odczytu wyników badania w luminometrze (DML2000TMLuminometer).

Ostatnim etapem procedury była walidacja testów i interpretacja wyników. Wynik podawano we względnych jednostkach światła (RLU- relative light unit) – których wysokość jest wprost proporcjonalna do ilości wirusowego DNA w badanym materiale.

3.4. Badanie kolposkopowe.

U kobiet objętych badaniem, u których w dwóch kolejnych rozmazach szyjkowych stwierdzano nietypowe komórki płaskonabłonkowe (ASC) lub nietypowe komórki gruczołowe, a także w przypadkach z progresją zmiany wykonywano badanie kolposkopowe

Oceny kolposkopowej szyjki macicy dokonywano za pomocą kolposkopu Leisegang z zakresem powiększeń 4-80 razy, po uprzednim przemyciu szyjki macicy 0,9% roztworem soli fizjologicznej. Do kontrastowania powierzchni nabłonkowej użyto 3% wodny roztwór kwasu octowego, oraz roztwór jodu w jodku potasu w celu wykonania próby Schillera.

Dokumentacji przeprowadzonych obrazów kolposkopowych dokonywano w formie opisowej, stosując mianownictwo wg International Federation of Cervical Pathology and Colposcopy (IFCPC):

- I. Prawidłowe obrazy kolposkopowe, do których zaliczono pierwotny nabłonek wielowarstwowy płaski, nabłonek gruczołowy oraz strefę transformacji
- II. Nieprawidłowe obrazy kolposkopowe takie jak: płaski biały nabłonek po próbie z kwasem octowym, gęsty biały nabłonek po próbie z kwasem octowym, mozaika, punkcikowanie, obszary jodonegatywne, obszary częściowo jodopoztywne.
- III. Obrazy kolposkopowe sugerujące raka inwazyjnego
- IV. Niesatysfakcjonujące obrazy kolposkopowe, kiedy nie udało się uwidocznić połączenia między nabłonkiem wielowarstwowym płaskim a nabłonkiem gruczołowym, oraz w przypadkach zapalenia lub atrofii o dużym nasileniu.
- V. Różne obrazy takie jak: kłykciny, keratosis, nadżerka, zapalenie, atrofia, polipy.

Obrazy podejrzane dokumentowano przy użyciu kamery cyfrowej.

3.5. Badanie histologiczne.

Materiał do badania histologicznego pobierano u kobiet, u których stwierdzano ASC w dwóch kolejnych badaniach cytologicznych i u których w badaniu kolposkopowym obecne były obrazy nieprawidłowe. Pobierano u nich wycinki celowane, oraz łyżeczkowano kanał szyjki. W przypadkach, w których badaniem kolposkopowym nie udało się uwidocznić granicy międzynabłonkowej każdorazowo łyżeczkowano kanał szyjki. W grupie kobiet z ASC, u których badanie kolposkopowe nie wykazywało nieprawidłowości bądź zmian podejrzanych, a granica międzynabłonkowa była widoczna odstępowano od pobrania materiału histologicznego i kontynuowano kontrolę cytologiczną w odstępach trzech miesięcznych. Prawidłowy wynik badania histopatologicznego traktowany był jako ostateczna weryfikacja.

Natomiast w grupie pacjentek z AGC utrzymującymi się dwukrotnie w rozmazie cytologicznym po wykonaniu badania kolposkopowego, którego wynik był pozytywny pobierano wycinki celowane z tarczy części pochwowej, oraz bez względu na wynik badania kolposkopowego dodatkowo wykonywano wyłyżeczkowanie kanału szyjki i jamy macicy w każdym przypadku.

W przypadku prawidłowego wyniku badania histologicznego kontynuowano kontrolę cytologiczną.

W przypadkach progresji do zmian o charakterze CIN lub raka bądź stwierdzenia w materiale histologicznym nieprawidłowości nabłonka gruczołowego wymagających leczenia włączano w obu grupach odpowiednie postępowanie terapeutyczne zgodne z wytycznymi obowiązującymi w Klinice Ginekologii, Położnictwa i Onkologii CM UJ. U kobiet, u których w wyniku przeprowadzonych procedur wykryto zmianę nowotworową i przeprowadzono leczenie operacyjne, uzyskanie wyniku badania histologicznego traktowano jako punkt końcowy obserwacji. Pacjentki te zostały objęte opieką Kliniki Onkologii, Położnictwa i

Onkologii gdzie prowadzono dalsze leczenie celowane oraz onkologiczną kontrolę cytologiczną. Również kobiety, u których wynik badania był prawidłowy, bądź wykazywał zmianę o nasileniu klinicznym nie wymagającym leczenia wyłączano z dalszej obserwacji grup badanych, traktując wynik badania histologicznego jako końcowy punkt obserwacji. Do zakończenia 36 miesięcznej obserwacji kontynuowano u nich kontrolę cytologiczną .

Ocena histologiczna uzyskanego materiału została wykonana w Katedrze Patomorfologii Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (Kierownik katedry: Prof. dr hab. med. Jerzy Stachura).

3.6. Metody statystyczne.

Wiek kobiet w grupach ASC i AGC oraz w podgrupach ASC-US i ASC-H oraz AGC podtyp endocerykalny i AGC podtyp endometrialny porównano testem t-studenta. Wpływ stanu hormonalnego oraz typu flory pochwy na obecność badanych grup AGC i ASC oraz poszczególnych podgrup (ASC-US i ASCH dla nietypowych komórek płaskonabłonkowych oraz AGC podtyp endocerykalny i AGC podtyp endometrialny dla AGC) porównano za pomocą testu Chi². W celu porównania zależności między występowaniem podtypów AGC a infekcją wysoko i niskoonkogennymi wirusami brodawczaka ludzkiego użyto test Chi², natomiast wpływ wieku na obecność zakażenia HPV w całej grupie AGC oraz w poszczególnych podgrupach oceniono testem t-studenta. Znaczenie poszczególnych cech cytopatologicznych w grupie ASC i AGC oraz w ich podgrupach w przewidywaniu wystąpienia nieprawidłowości w dalszym postępowaniu oceniono testem Chi².

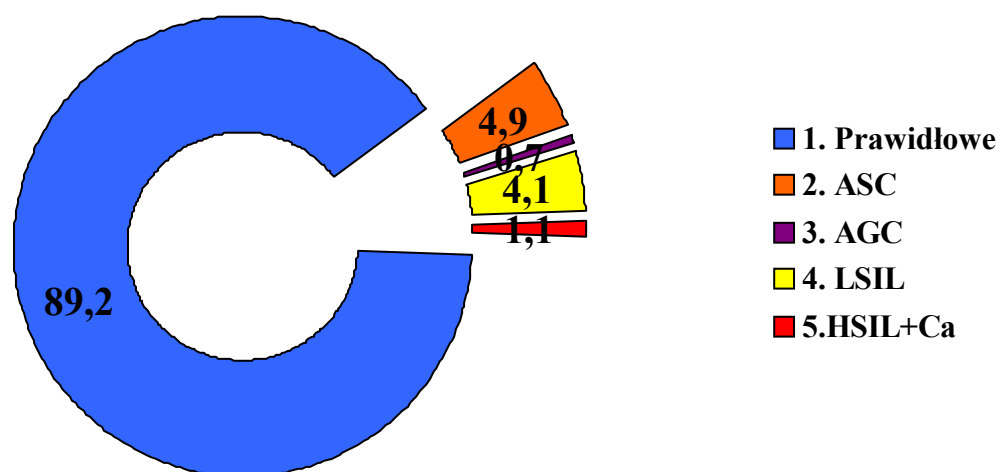
Regresja ASC i AGC oraz wydzielonych podtypów komórek w czasie w zależności od analizowanego parametru (stan hormonalny, biocenoza) przedstawiono w postaci wykresów przedstawiających trend obserwowanych zmian w czasie, a do oceny istotności wpływu analizowanego parametru użyto testu Chi². Uzyskane wyniki przedstawiono w formie tabel i wykresów zawierających częstości występowania poszczególnych cech w zależności od analizowanych podgrup oraz średnie wartości wieku w zależności od analizowanych podgrup co obrazowało wpływ wieku na zmienną decydującą o przydziale do danej podgrupy.

Częstość regresji, progresji oraz utrzymywania się nieprawidłowości w trakcie 36 miesięcznej obserwacji oceniono testem Chi². Test ten służył również do porównania istotności wpływu zakażenia HPV (podtypów wysoko- i niskoonkogennych) na wystąpienie progresji zmiany w obu badanych podgrupach. Za statystycznie znamienne przyjęto te różnice dla których poziom „p” był mniejszy lub równy 0,05. Obliczenia wykonano z użyciem pakietu statystycznego Statistica 6.0.

4. WYNIKI.

4.1. Materiał pracy.

Procentowy rozkład wyników badań cytologicznych w 5000 populacji kobiet objętej programem badań przesiewowych zobrazowano na diagramie 2.



Diag.2. Wyniki badań cytologicznych w ramach programu przesiewowego w kierunku raka szyjki macicy (w procentach).

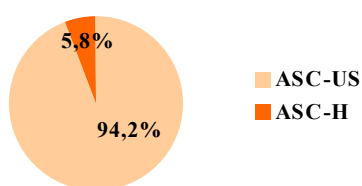
- 1 – prawidłowy wynik badania cytologicznego
- 2 – ASC - nietypowe komórki płaskonabłonkowe
- 3 – AGC - nietypowe komórki gruczołowe
- 4 – LSIL - zmiany śródnabłonkowe małego stopnia
- 5 - HSIL+Ca - zmiany śródnabłonkowe dużego stopnia oraz rak szyjki macicy (HSIL-1%, Ca-0,1%)

W grupie 5000 kobiet, u których wykonano badanie cytologiczne w ramach programu przesiewowego w kierunku raka szyjki macicy, u 248 (4,9%) stwierdzono obecność nietypowych komórek płaskonabłonkowych (ASC) oraz u 35 (0,7%) obecność nietypowych komórek gruczołowych (AGC).

Spośród 248 kobiet, u których w rozmazach cytologicznych stwierdzono ASC, z dalszej analizy wykluczono 8 z powodu stwierdzonych w wywiadzie nieprawidłowości we wcześniejszych badaniach cytologicznych, oraz 33 ze względu na odmowę udziału w

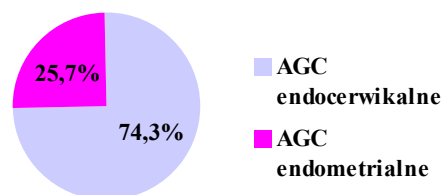
badaniu. Ostatecznie badana grupa z ASC liczyła 207 (4,14%) kobiet, a grupa z AGC 35 (0,7%) kobiet. Spośród 207 kobiet z ASC w pierwszym badaniu cytologicznym u 195 (94,2%) stwierdzono nietypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu (ASC-US) a u 12 (5,8%) nietypowe komórki płaskonabłonkowe, u których nie można wykluczyć HSIL (ASC-H) (Diag.3).

W grupie 35 kobiet z AGC w pierwszym badaniu cytologicznym u 26 (74,3%) stwierdzono nietypowe komórki gruczołowe endocerykalne, natomiast u 9 (25,7%) nietypowe komórki gruczołowe endometrialne (Diag.4).



Diag.3

Rozkład procentowy podgrup ASC
ASC-US - nietypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu
ASC-H - nietypowe komórki płaskonabłonkowe nie można wykluczyć HSIL

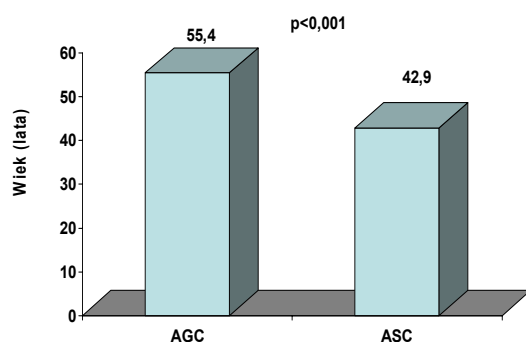


Diag.4.

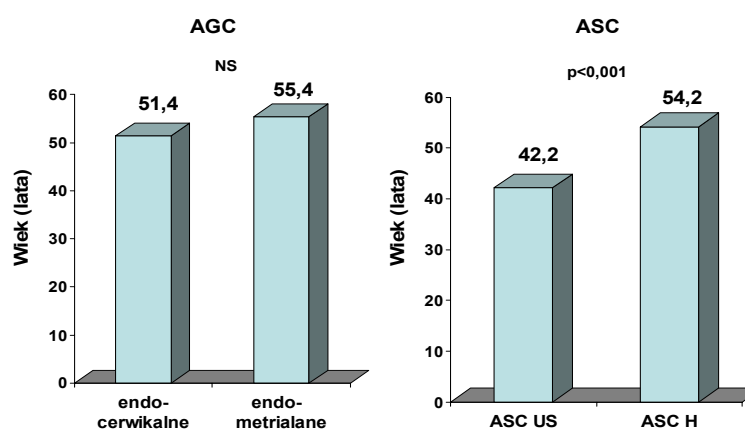
Rozkład procentowy podgrup AGC
AGC- nietypowe komórki gruczołowe

4.1.1. Występowanie AGC i ASC a wiek kobiet.

Średni wiek kobiet z AGC wynosił 55,4 lat (min.41 lat max.65 lat) i był statystycznie istotnie wyższy, od średniego wieku kobiet z ASC, który wynosił 42,9 lat (min.25 lat, max. 65 lat) (Ryc.5). W grupie kobiet z ASC średni wiek kobiet z ASC-US wynosił 42,2 lata a więc był istotnie statystycznie niższy w stosunku do średniego wieku kobiet z ASC-H, który wynosił 54,2 lat. Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnych różnic w wieku kobiet w grupie AGC w zależności od rodzaju komórek gruczołowych tj. endocerywikalnych i endometrialnych (Ryc.6). Porównanie wieku pacjentek w grupie kobiet z ASC oraz AGC przedstawiono na ryc.5 i 6.



Ryc.5. Porównanie wieku kobiet w grupach ASC i AGC (Test t-studenta).



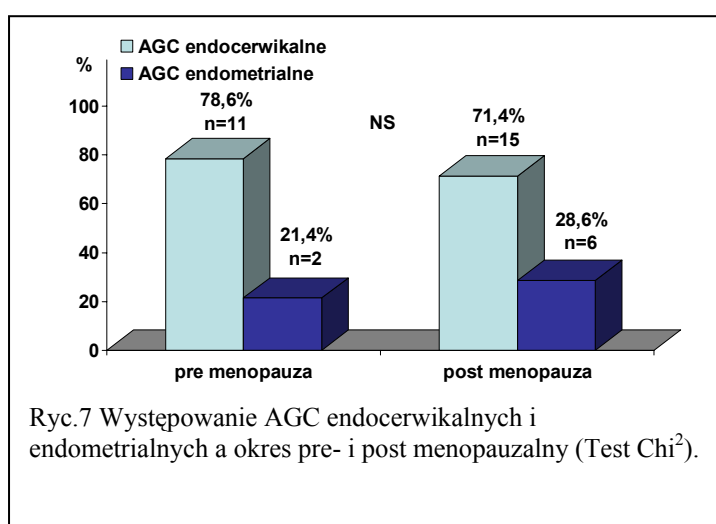
Ryc.6. Porównanie wieku kobiet z AGC i ASC w zależności od zróżnicowania nabłonkowego nieprawidłowych komórek (Test t-studenta).

ASC-US – nietypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu

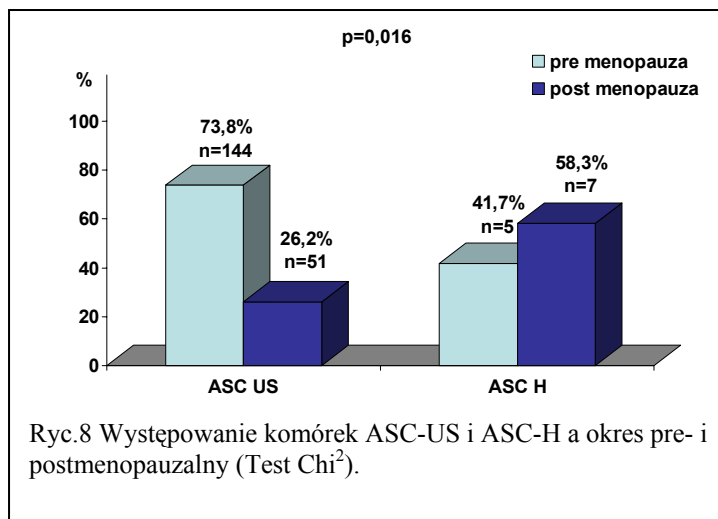
ASC-H – nietypowe komórki płaskonabłonkowe nie można wykluczyć HSIL

4.1.2. Występowanie AGC i ASC a stan hormonalny.

Nie stwierdzono wpływu reakcji hormonalnej na obecność AGC i ASC w rozmazach pochwowo szyjkowych. W grupie kobiet z AGC u 21 (60%) stwierdzono estrogeną reakcję nabłonka pochwy, a u 14 (40%) atrofię. W obu podgrupach AGC dominowała reakcja estrogena. Nie stwierdzono by atrofia nabłonków pochwy powodowała częstsze występowanie któregoś z podtypów AGC. Natomiast zarówno u kobiet znajdujących się w okresie pomenopauzalnym jak i u tych, które naturalnie miesiączkowały częściej występowały AGC endocerykalne (Ryc.7).



U kobiet z ASC u 173 (83,6%) oceniono reakcję pochwy jako estrogeną a u 34 (16,4%) stwierdzono atrofię nabłonka. Stwierdzono, iż ASC-US znacznie częściej występują u kobiet będących w okresie premenopauzalnym, natomiast u kobiet po menopauzie częściej występują nieprawidłowości o charakterze ASC-H ($p=0,016$) – Ryc. 8. Nie stwierdzono by atroficzny odczyn pochwy był czynnikiem powodującym pojawienie się ASC w rozmazie.



4.1.2. Występowanie AGC i ASC a stan czystości pochwy.

Nie stwierdzono statystycznie znamiennego wpływu nieprawidłowej flory bakteryjnej pochwy na występowanie AGC w tym podtypów endocerykalnych i endometrialnych (Tab. 3). W przypadku stwierdzenia AGC, oceniona biocenoza pochwy w trakcie pierwszej wizyty kontrolnej u 23 (65,7%) kobiet była prawidłowa (I i II stopień czystości pochwy), natomiast u 12 (34,3%) stwierdzano nieprawidłową florę bakteryjną z towarzyszącymi markerami odczynu zapalnego (III i IV stopień czystości pochwy).

Tab. 3. Biocenoza pochwy w grupie pacjentek z AGC szyjki macicy.

Badanie	AGC	n	Biocenoza		Test Chi ² P
			Flora prawidłowa	Flora nieprawidłowa	
I	2A	26	16 (61,5%)	10 (38,5%)	NS
	2B	9	7 (77,8%)	2 (22,2%)	

I- ocena stopnia czystości pochwy w momencie włączenia do grupy badanej

2A- AGC podtyp endocerykalny

2B - AGC podtyp endometrialny

n-liczebność badanej grupy

Flora prawidłowa - I i II^o czystości pochwy

Flora nieprawidłowa – III i IV^o czystości pochwy

U kobiet z ASC w rozmazach pochwowo-szyjkowych wyniki biocenozy pobranej w trakcie pierwszej wizyty kontrolnej przedstawiały się następująco: w grupie 207 kobiet u 157 (75,8%) stwierdzono fizjologiczną florę pochwy, natomiast u 50 (24,1%) kobiet stwierdzono florę patologiczną. Biorąc pod uwagę podział na podgrupy ASC-US i ASC-H stwierdzono wyższy odsetek obecności flory fizjologicznej w grupie kobiet z ASC-US tj. u 151(77,4%) w stosunku do 44 (22,6%) w porównaniu do grupy ASC-H, w której ilość kobiet z florą prawidłową był taki sam (6 kobiet tj. 50%), jak tych, u których stwierdzono florę nieprawidłową (6 kobiet tj. 50%). Różnica ta była istotna statystycznie (Tab 4.).

Tab. 4. Biocenoza pochwy w grupie pacjentek z ASC szyjki macicy

Badanie	ASC	n	Biocenoza		Test Chi ² p
			Flora prawidłowa	Flora nieprawidłowa	
I	US	195	151 (77,4%)	44 (22,6%)	0,03
	H	12	6 (50%)	6 (50%)	

I - ocena stopnia czystości pochwy w momencie włączenia do grupy badanej

ASC - nietypowe komórki płaskonabłonkowe

US - nietypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu

H - nietypowe komórki płaskonabłonkowe nie można wykluczyć HSIL

n - liczebność badanej grupy

Flora prawidłowa - I i II^o czystości pochwy

Flora nieprawidłowa – III i IV^o czystości pochwy

4.4. Analiza cech cytopatologicznych w podgrupach nietypowych komórek gruczołowych i nietypowych komórek płaskonabłonkowych.

W grupie AGC w analizie nieprawidłowości dotyczących struktury jądra komórkowego najczęściej (u 33 kobiet tj. w 94,3%) stwierdzanym odchyleniem od normy był zwiększony stosunek jądro- cytoplazmatyczny (N/C). Występował on u wszystkich 5 (100%) pacjentek z nieprawidłowościami nabłonka gruczołowego, u których w trakcie 3-letniej obserwacji klinicznej stwierdzono istotne klinicznie nieprawidłowości (rak endometrium, atypowy rozrost endometrium w badaniu histopatologicznym). Obecny był jednak również w 4 (80%) rozmazach szyjkowych kobiet, u których stwierdzono polipy szyjkowe, u wszystkich 7 (100%) kobiet z nieprawidłowościami, które ostatecznie okazały się mieć swe źródło w nabłonku wielowarstwowym płaskim, oraz u 17 (94,4%) kobiet, u których w ciągu całego okresu obserwacji nie stwierdzono w kolejnych badaniach nieprawidłowości. Różnice te nie były istotne statystycznie.

Nieregularność błony jądrowej stwierdzono jedynie w 2 (5,7%) rozmazach w tym w 1 przypadku nabłonka gruczołowego (rak endometrium) i 1 nabłonka wielowarstwowego płaskiego (CIN2 w badaniu histologicznym).

Nakładanie się jąder komórkowych, nieprawidłowy kształt jąder oraz hyperchromazję stwierdzano w tych rozmazach AGC, u których w dalszym postępowaniu diagnostycznym wykryto nieprawidłowości nabłonka wielowarstwowego płaskiego. W tym nakładanie się jąder komórkowych występowało w tej grupie AGC u 4 (57,1%), nieprawidłowy kształt jądra u 7 (100%), a hyperchromazja u 5 (71,4%) kobiet. Ww cech nie stwierdzono w żadnym przypadku w rozmazach kobiet z AGC, u których w dalszym postępowaniu wykryto nieprawidłowości nabłonka gruczołowego pod postacią polipów szyjkowych (różnica pomiędzy poszczególnymi grupami była istotna statystycznie odpowiednio na poziomie $p=0,001$, $p=0,001$ i $p<0,001$).

Zwiększona barwliwość jądra komórkowego była jedynie charakterystyczna dla tych AGC, które w dalszym badaniu okazywały się nieprawidłowościami dotyczącymi nabłonka wielowarstwowego płaskiego (5–71,4%). Również niejednorodny układ chromatyny jądrowej stwierdzany był w tej samej podgrupie komórek, ale zaledwie u 1 (16,7%) kobiety, co nie dawało znamienności statystycznej. Nakładanie się jąder stwierdzono również u 2 (40%) kobiet, u których w dalszym badaniu stwierdzono zmiany gruczołowe o wysokim nasileniu nieprawidłowości (1 rak endometrium, 1 atypowy złożony rozrost endometrium w rozpoznaniu histologicznym, w cytologii podtypy endometrialne AGC). Powiększone jąderka nie stanowiły cechy o istotności statystycznej - były obecne u 2 (11,1%) kobiet u których w dalszej obserwacji nie stwierdzono nieprawidłowości, u 1 (14,3%) z nieprawidłowościami nabłonka wielowarstwowego płaskiego, oraz u 1 (20%) z nieprawidłowościami nabłonka gruczołowego o charakterze polipów szyjkowych. Cytoplazma najczęściej miała charakter piankowaty (30 – 85,7% AGC). Gęstą cytoplazmę stwierdzono w 5 (14,3%) rozmazach. Cecha ta była charakterystyczna dla AGC, w których w dalszej obserwacji stwierdzano nieprawidłowości nabłonka płaskiego. Stwierdzono ją w 4 (57,1%) przypadkach, w tym w 1 był to CIN2 i 3 przypadkach CIN3 w badaniu histologicznym. W 1 (20%) przypadku cecha ta pojawiła się w grupie kobiet z AGC endometrialnymi, u której w badaniu histopatologicznym stwierdzono raka endometrium. Różnice te były istotne statystycznie dla $p=0,01$.

We wszystkich podgrupach AGC z wyjątkiem tych, u których w dalszych badaniach stwierdzano raka endometrium lub atypowy złożony rozrost endometrium częściej komórki miały układ grupowy, a nie występowały pojedynczo w rozmazie (Tab.5). Różnice te były istotne statystycznie.

W ocenie układów komórkowych najczęściej występującą cechą w przypadku AGC, u których nie stwierdzano patologii bądź były to zmiany nieistotne klinicznie był układ „plastra miodu”. Układu tego nie przyjmowały w żadnym przypadku komórki, u których dalsza

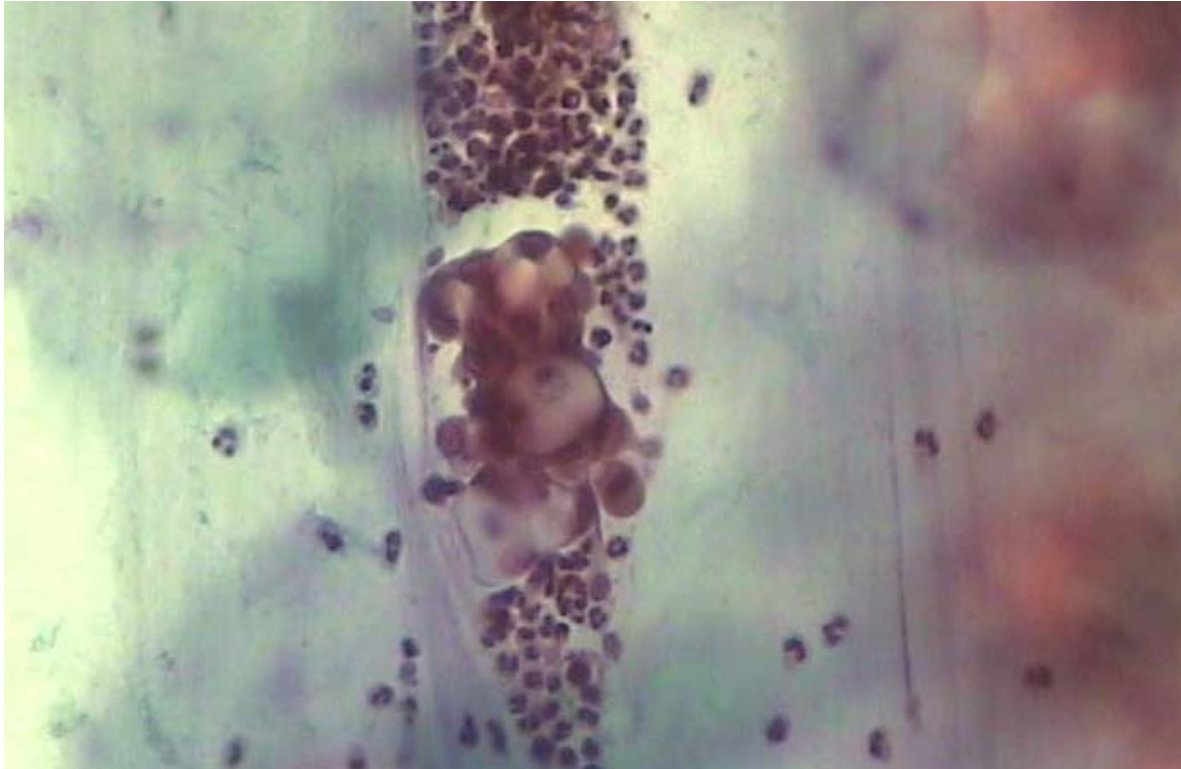
diagnostyka wykazała obecność raka gruczołowego endometrium i atypowy złożony rozrost endometrium ($p < 0,001$). Wzajemne nawarstwienie komórek oraz peryferyjny układ jąder komórkowych występował tylko w przypadku tych AGC, u których stwierdzano w dalszym badaniu nieprawidłowości ($p = 0,001$). Cechy te nie pozwalały jednak na rozróżnienie punktu wyjścia nieprawidłowości (nabłonek płaski czy gruczołowy) ani ocenić istotności klinicznej patologii. Wyodrębniały jednak grupę kobiet z AGC, u których w ciągu całego okresu obserwacji nie stwierdzano nieprawidłowości od tych, u których stwierdzono utrzymywanie się bądź progresję nieprawidłowości ($p = 0,001$).

Poligonalny kształt komórki stwierdzono u wszystkich AGC, które okazały się pochodzić z nabłonka wielowarstwowego płaskiego (7-20%). Natomiast owalny kształt komórki był charakterystyczny dla zmian, które w dalszym badaniu dotyczyły nabłonka gruczołowego (10-28,6%). Różnica była istotna statystycznie $p < 0,001$. Owalny kształt AGC wystąpił również u 18 (51,4%) kobiet, u których w trakcie 36 miesięcznej obserwacji nie stwierdzono patologii. Również u wszystkich 18 (100%) kobiet z tej grupy oraz z grupy z nieprawidłowościami nabłonka płaskiego (7-100%) stwierdzono w rozmazach obecność prawidłowych komórek gruczołowych, natomiast u kobiet, u których w dalszym postępowaniu stwierdzono obecność zmian gruczołowych o charakterze raka lub atypowego rozrostu endometrium u 3 (60%) obecne były prawidłowe komórki gruczołowe, natomiast u 2 (40%) nie znaleziono ich w rozmazie. Nie stwierdzono obecności prawidłowych komórek gruczołowych w przypadku tych kobiet, u których dalsze postępowanie diagnostyczne wykazało obecność polipów szyjkowych. Różnica ta była statystycznie znamienna przy $p < 0,001$. Analizowane cechy budowy AGC oraz ich układu i liczebności w rozmazach szyjkowych przedstawiono w tabeli 5.

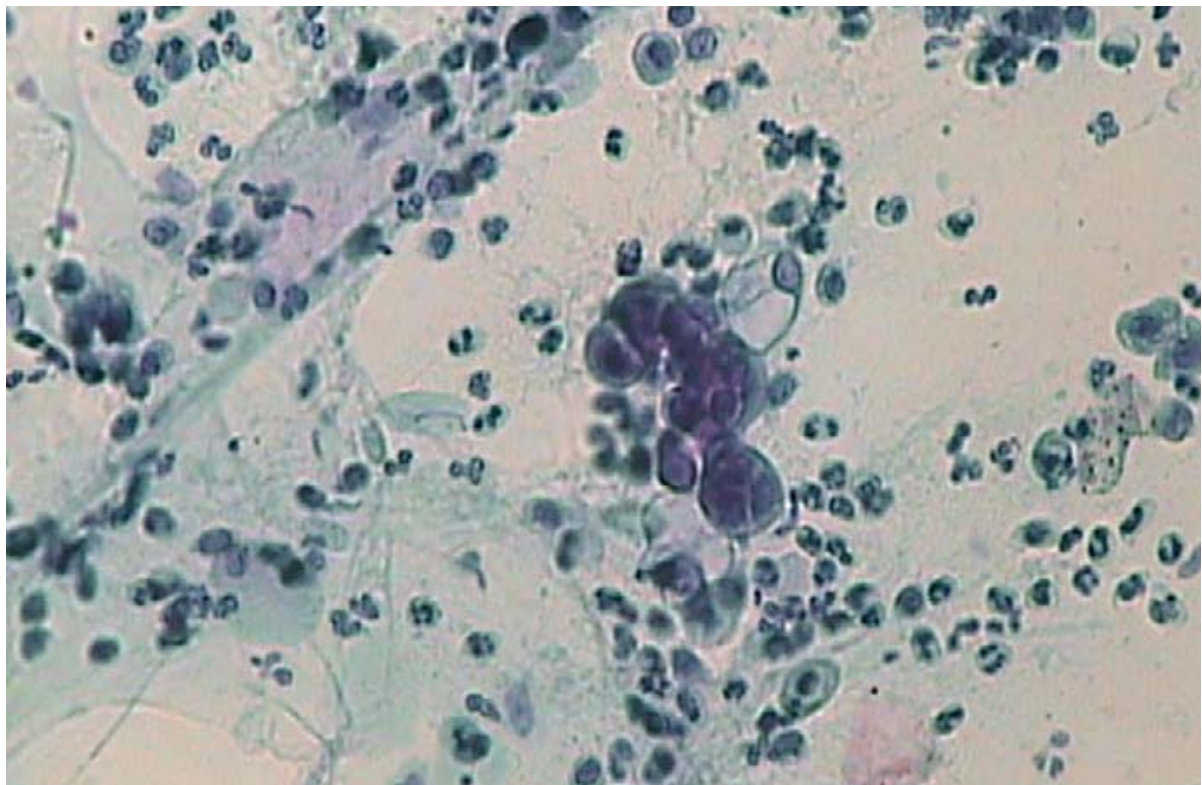
Tab. 5. Rozkład ocenianych cech cytopatologicznych w badanej grupie AGC.

Oceniany element Komórki		A		B						Test Chi ² p
		Norma		CIN		Polip szyjkowy		Rak gruczołowy endometrium Rozrost atypowy złożony endometrium		
		N=18		N=7		N=5		N=5		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Jądro komórkowe	zwiększony N/C	17	94,4	7	100	4	80	5	100	NS
	nieregularność błony	0	0	1	14,3	0	0	1	20	NS
	hyperchromazja	0	0	5	71,4	0	0	0	0	<0,001
	niejednorodna chromatyna	0	0	1	14,3	0	0	0	0	NS
	powiększone jąderka	2	11,1	1	14,3	1	20	0	0	NS
	nakładanie się jąder	0	0	4	57,1	0	0	2	40	0,003
	kształt jądra	0	0	7	100	0	0	1	20	<0,001
Cytoplazma	gęsta	0	0	4	57,1	0	0	1	20	0,003
	piankowata	18	100	3	42,1	5	100	4	80	
Układ komórek	pojedyncze	1	5,6	3	42,9	1	20	3	60	00,36
	grupowe	17	94,4	4	57,1	4	80	2	40	
Architektura układów komórko- wych	plaster miodu	18	100	3	42,9	3	60	0	0	<0,001
	rozety	0	0	0	0	2	40	1	10	0,024
	palisady	0	0	1	14,3	0	0	0	0	NS
	utrata biegunowości	0	0	2	28,5	0	0	0	0	0,008
	nakładanie się komórek	0	0	4	57,1	4	80	2	40	0,001
	peryferyjny układ jąder	0	0	3	42,9	1	20	4	80	0,001
Kształt komórki	owalny	18	100	0	0	5	100	5	100	<0,001
	poligonalny	0	0	7	100	0	0	0	0	
Liczba nieprawidło- wych komórek	pojedyncze	0	--	4	57,1	0	0	0	0	0,001
	grupy	18	100	3	42,9	5	100	5	100	
Obecność prawidłowych komórek	tak	18	100	7	100	0	0	3	60	<0,001
	nie	0	--	0	--	5	100	2	40	

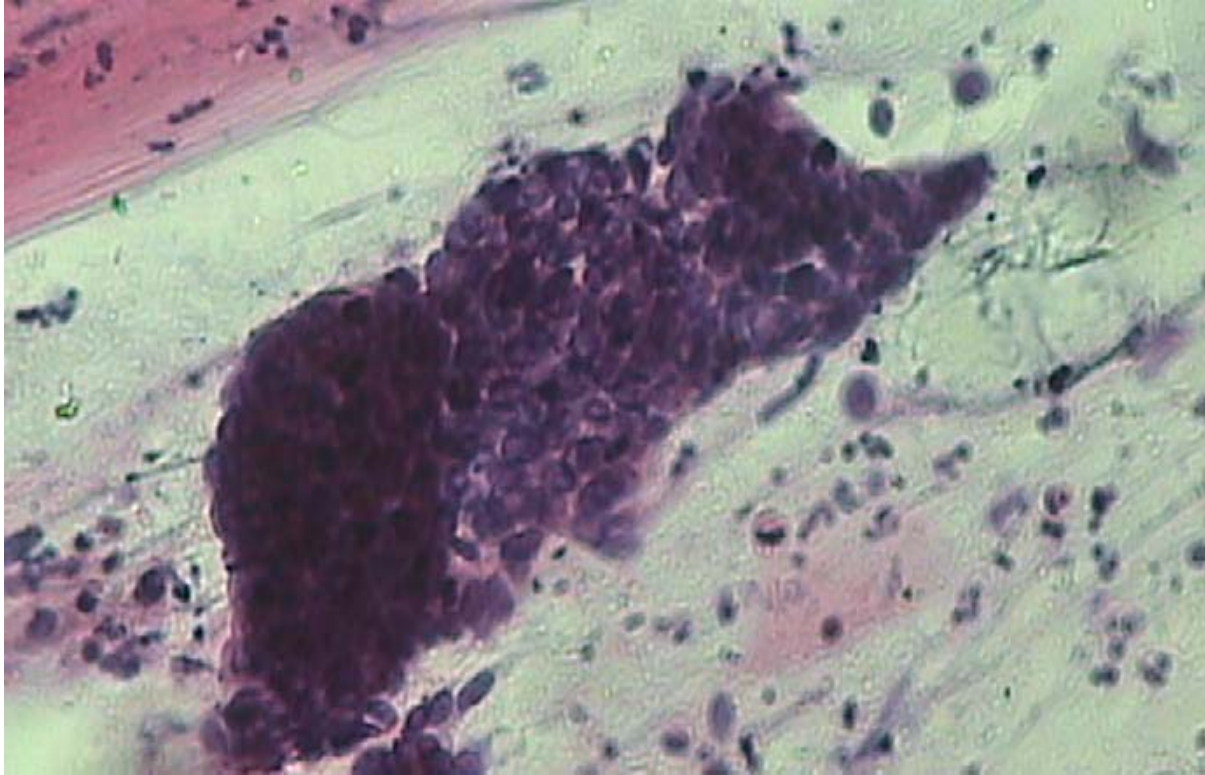
A- grupa bez nieprawidłowości w trakcie obserwacji. B- grupa ze stwierdzanymi nieprawidłowościami w dalszym postępowaniu diagnostycznym



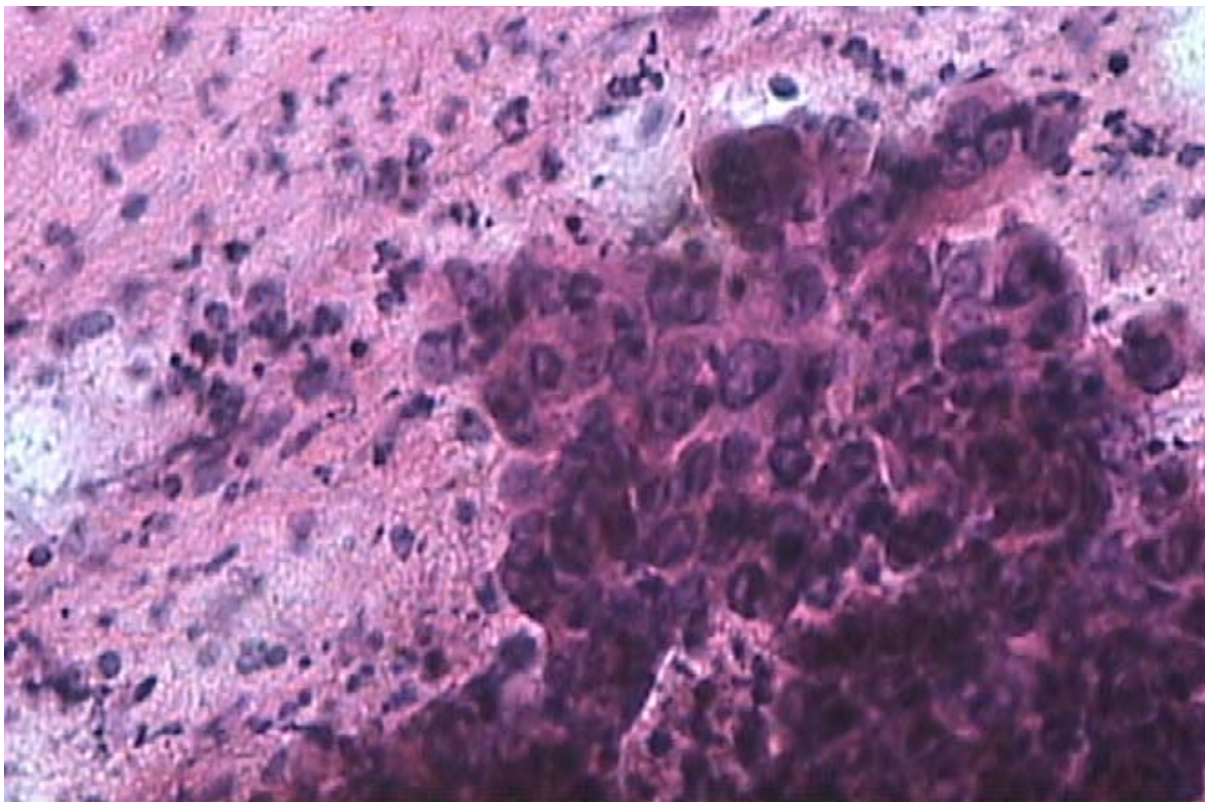
Ryc.9. AGC podtyp endocerykalny. Grupa kilkukomórkowa, z niewielkiego stopnia powiększeniem jąder komórkowych. Wyraźnie zwakuolizowana cytoplazma. Badanie wirusologiczne negatywne. Kolposkopia, histologia - polip szyjkowy.



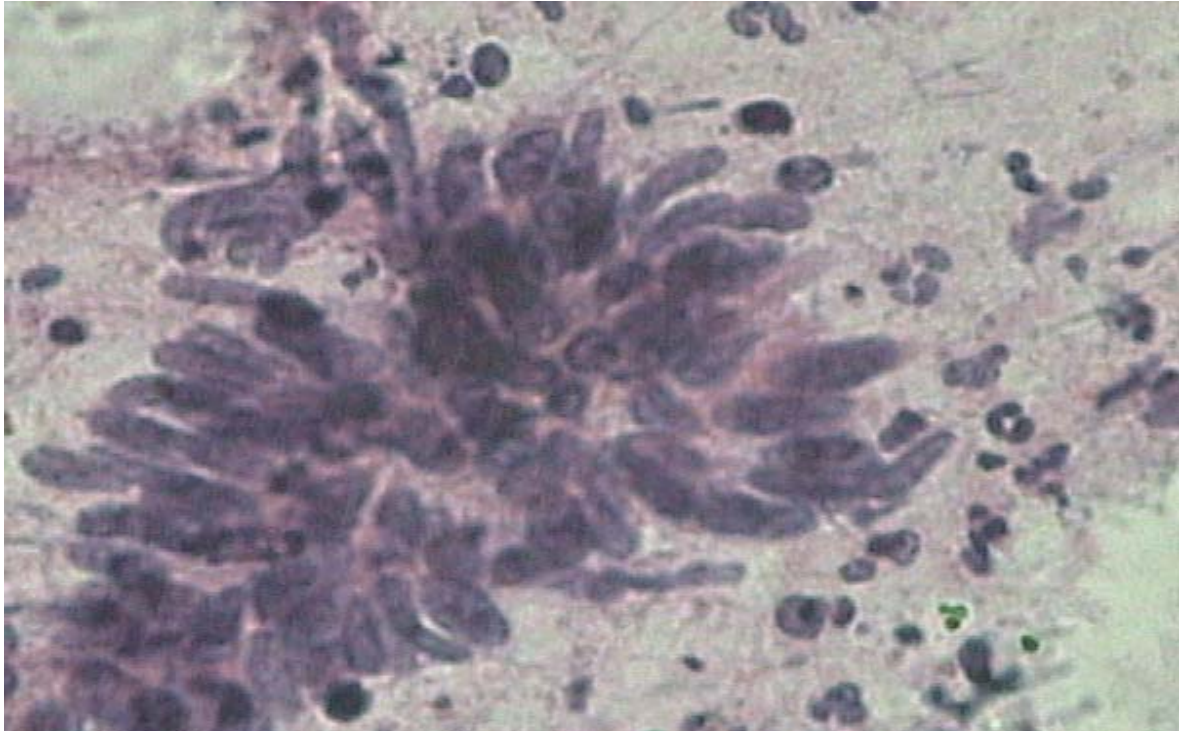
Ryc. 10. AGC podtyp endometrialny. Kilkukomórkowa grupa o zatartych granicach międzykomórkowych. Badanie wirusologiczne pozytywne. Kolposkopia – prawidłowe obrazy kolposkopowe. Histologia – rak gruczołowy endometrium.



Ryc.11. AGC, podtyp endometrialny. Duże jądra komórkowe, zwiększony stosunek N/C, nieregularna błona jądrowa, niewidoczna cytoplazma i granice błony komórkowej. Kolposkopia – prawidłowe obrazy kolposkopowe. Histologia – rak endometrium



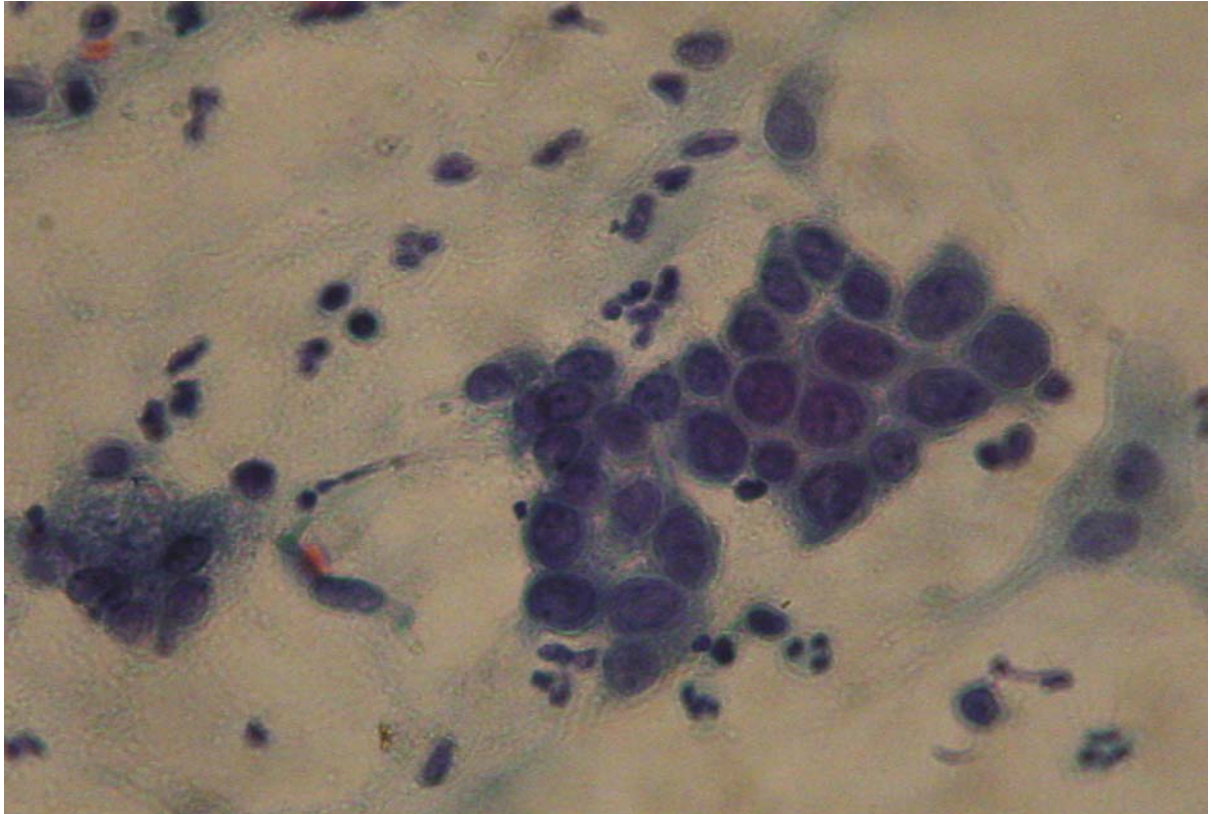
Ryc.12. AGC podtyp endometrialny. Zwiększony stosunek N/C, nakładanie się jąder komórkowych. Kolposkopia – obrazy niesatysfakcjonujące niewidoczna granica miedzynabłonkowa. Histologia – rak gruczołowy endometrium.



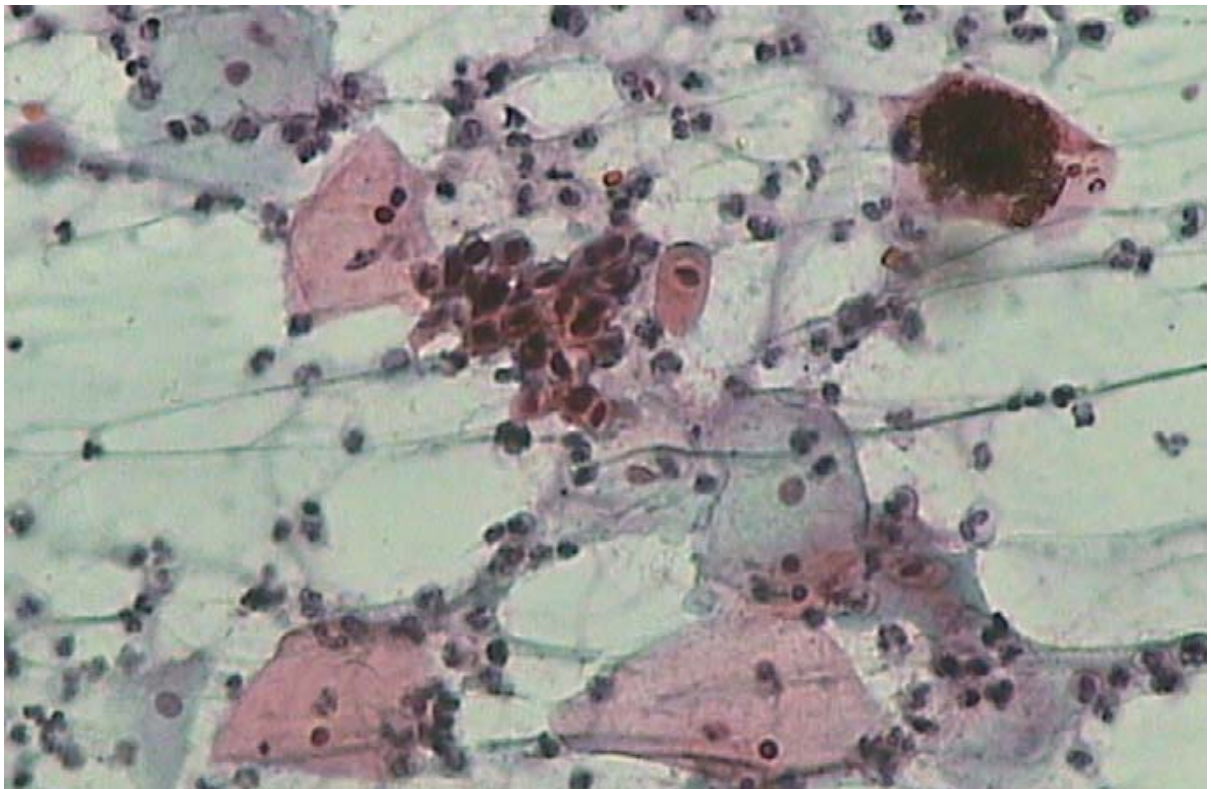
Ryc.13. AGC podtyp endocerykalny. Komórki w układzie grupowym w formie pasm ze stłoczeniem komórek. Widoczne nakładanie się jąder komórkowych. Jądra są przesunięte ku obwodowi o niewielkiej hyperchromazji. Zwiększony stosunek N/C, granice komórkowe są zatarte. Badanie wirusologiczne - wysokoonkogenne HPV. Kolposkopia - nieprawidłowe obrazy kolposkopowe charakterystyczne dla CIN i raka. Histologia - CIN 3.



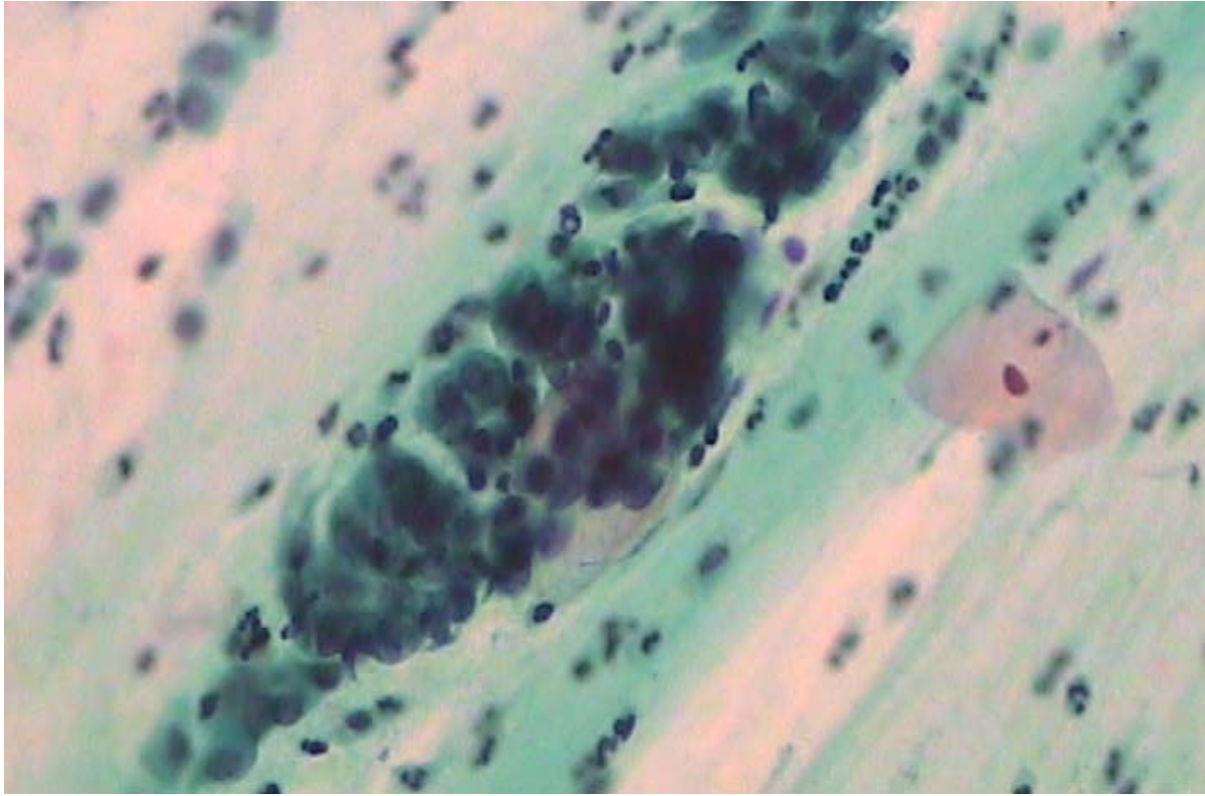
Ryc. 13a. Ta sama pacjentka. Kolposkopia.



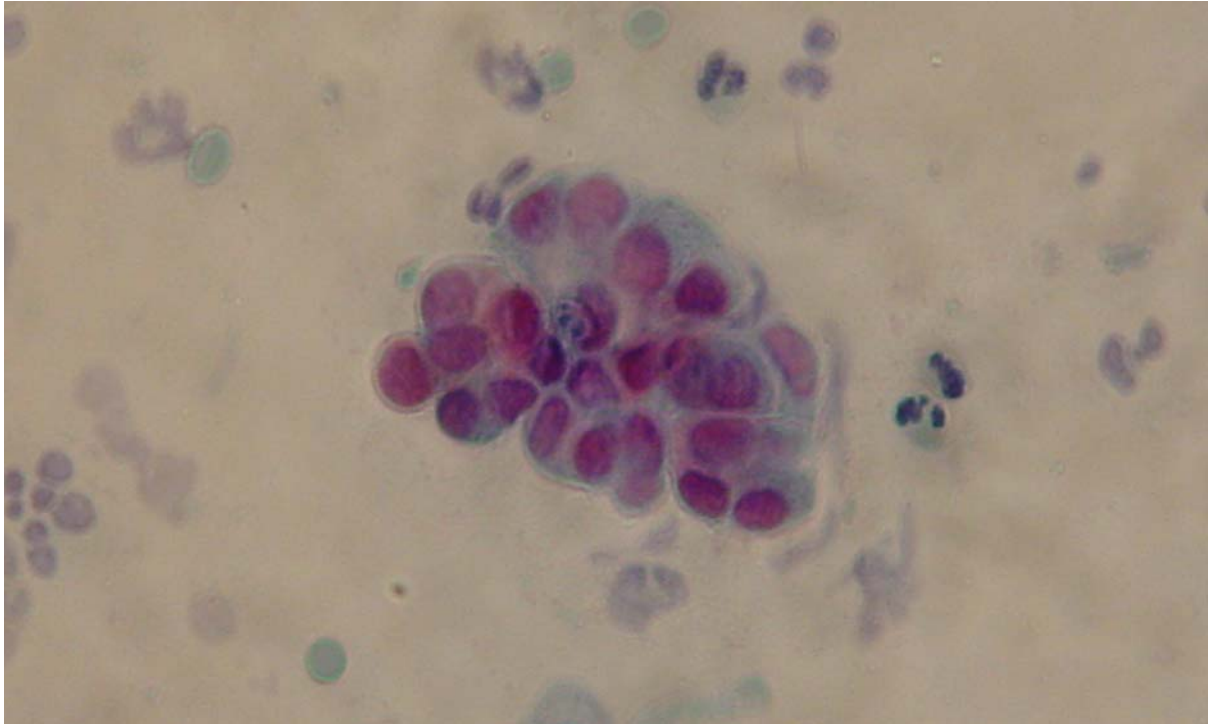
Ryc. 14. AGC podtyp endometrialny. Znacznego stopnia powiększenie jąder ze zwiększonym stosunkiem N/C. Prawie niewidoczna cytoplazma. W części komórek wyraźna niejednorodność chromatyny. Kolposkopia – nieprawidłowe obrazy kolposkopowe. Histologia - CIN3.



Ryc.15. AGC podtyp endometrialny. Gęsta cytoplazma, poligonalne komórki zachodzące na siebie. Zwiększony stosunek N/C, dużego stopnia hyperchromazja. Nieregularna błona jądrowa. Nieprawidłowy kształt jądra. Badanie wirusologiczne – pozytywne (oba podtypy wirusa). Kolposkopia - obraz wskazujący na CIN 3. Histologia - CIN3



Ryc.16 AGC edocerwikalne. Niewidoczne granice komórkowe. Piankowa cytoplazma. Nieznacznie powiększone jądra komórkowe. Regularny układ chromatyny. Brak nieprawidłowości w badaniach kontrolnych.



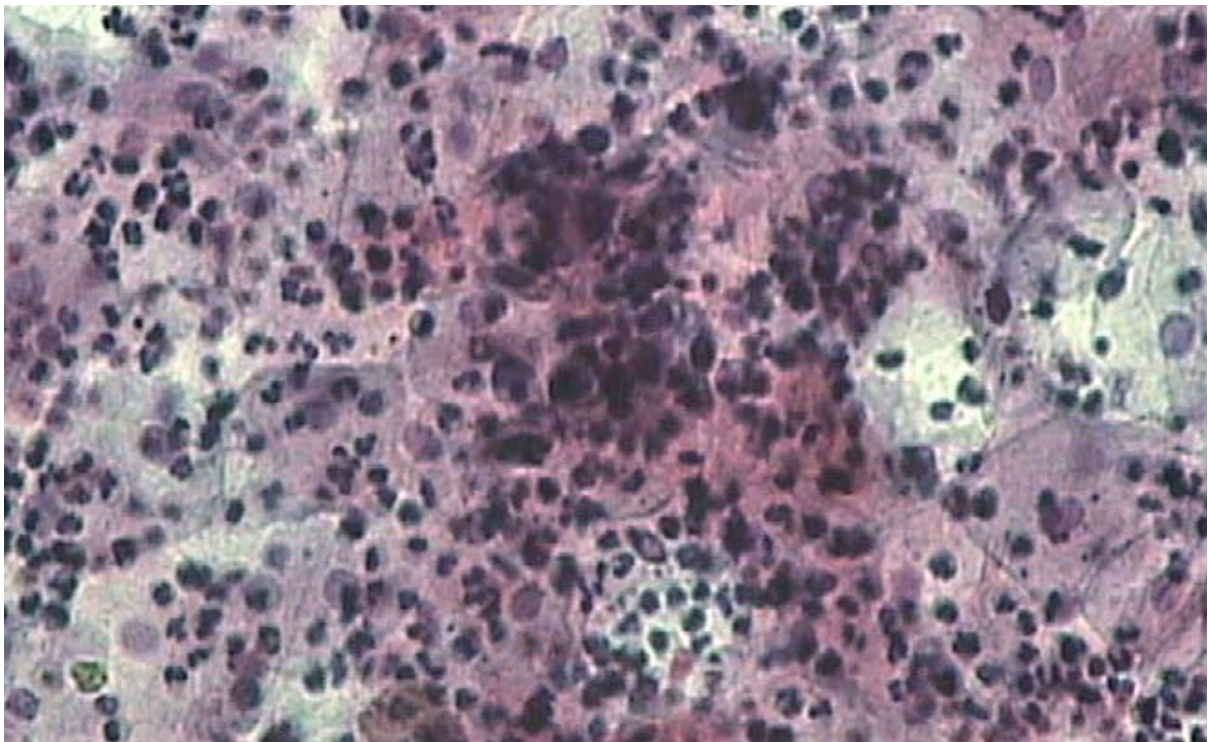
Ryc.17. AGC podtyp endocerykalny. Powiększony stosunek N/C, regularny rozkład chromatyny jądrowej, jądra owalne, równe granice błony jądrowej. Kolposkopia i histologia – polip szyjkowy.



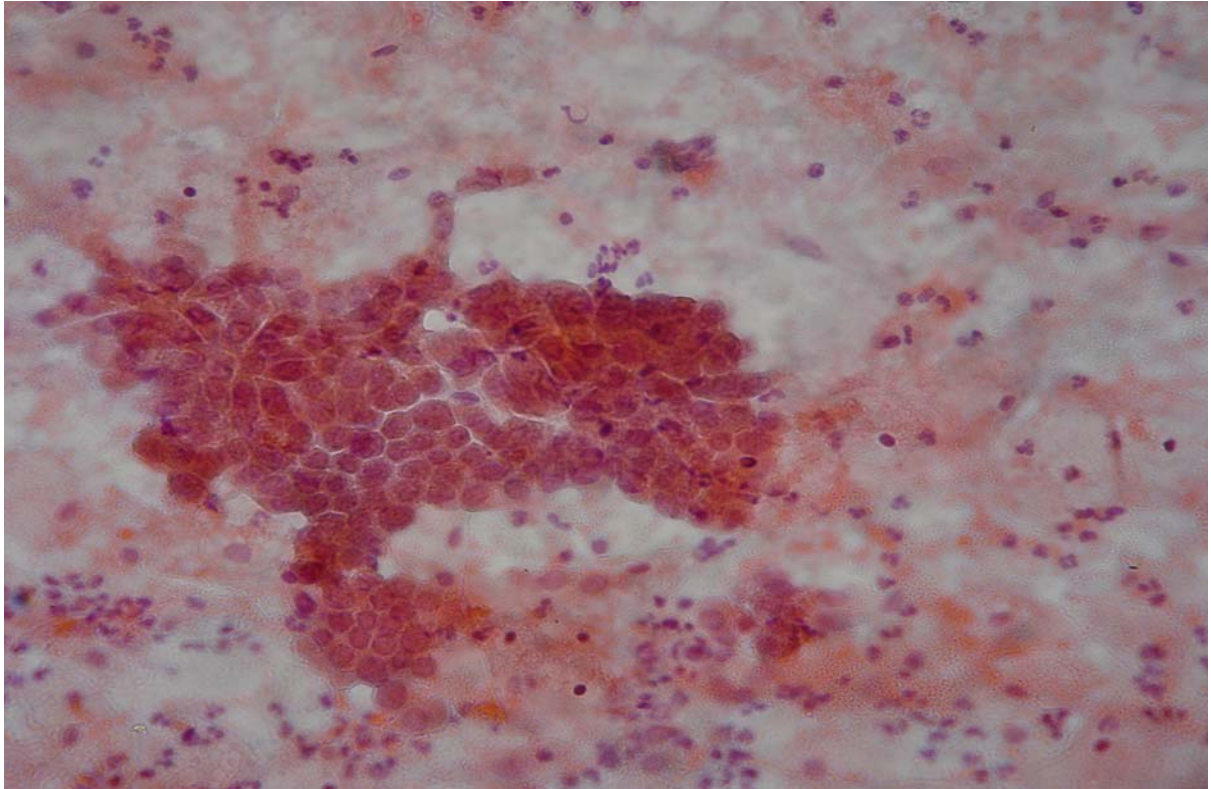
Ryc. 17a. Ta sama pacjentka. Kolposkopia.



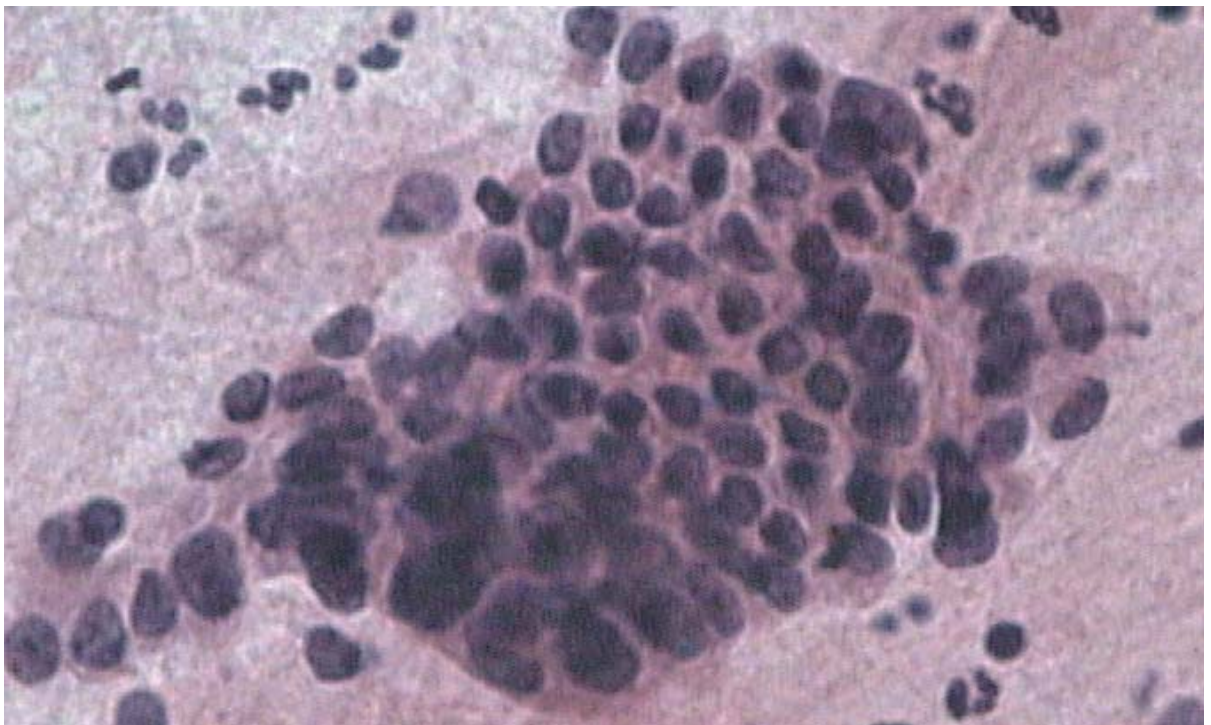
Ryc.18 AGC podtyp endoceryikalny. Okrągłe lub owalne jądra komórkowe o równomiernym rozkładzie chromatyny. Brak nieprawidłowości w badaniach kontrolnych.



Ryc.19. AGC, podtyp endoceryikalny. W centrum obrazu widoczne nieprawidłowe komórki o powiększonych jądrach, niewielkiej ilości piankowej cytoplazmy. Wyraźna hyperchromazja. Brak nieprawidłowości w kolposkopii i histologii.



Ryc.20. AGC podtyp endocerykalny. Powiększone jądra, bardzo skąpa, ale piankowata cytoplazma. Stłoczenie komórek. Zachowany układ „plastra miodu”, zwiększony stosunku N/C. Brak nieprawidłowości w trakcie 3 letniego okresu dalszej obserwacji.



Ryc.21 AGC podtyp endocerykalny. Powiększone jądra, zwiększony stosunek N/C widoczny w komórkach w dolnej części zdjęcia. Komórki zachodzą na siebie Piankowata, skąpa cytoplazma. Brak nieprawidłowości w trakcie 3 letniego okresu dalszej obserwacji.

Analogicznie jak w grupie AGC, również w przypadku ASC najczęściej stwierdzaną nieprawidłowością był zwiększony stosunek jądrowo-cytoplazmatyczny (N/C). Wzrost N/C w ASC w cytologicznych rozmazach pochwowo-szyjkowych wystąpił bowiem u 158 (100%) kobiet u których nie stwierdzono patologii w trakcie 3 letniej obserwacji klinicznej, u 29 (90,6%) kobiet z nieprawidłowościami typu CIN1, oraz u 17 (100%) kobiet ze stwierdzoną w dalszym postępowaniu diagnostycznym nieprawidłowością o nasileniu \geq CIN2.

W przypadku kobiet z ASC, u których w dalszym postępowaniu stwierdzono zmiany o charakterze \geq CIN2 częściej niż u tych, u których stwierdzono CIN 1, lub nie stwierdzono patologii występowała w rozmazach cytologicznych nadbarwliwość jądra komórkowego - u 10 (58,8%) kobiet, nieregularność błony jądrowej u 10 (58,8%) kobiet oraz nierównomierne rozmieszczenie chromatyny jądrowej u 7 (41,2%) ($p < 0,001$). Ww. cechy niezmiernie rzadko były stwierdzane w rozmazach kobiet z ASC u których nie wykryto nieprawidłowości w trakcie obserwacji w tym hyperchromazja u 3 (1,9%) a niejednorodna chromatyna u 2(1,3%) kobiet.

W ocenie cytoplazmy, najbardziej charakterystyczną w badaniu cytologicznym dla zmian \geq CIN2 była skąpa cytoplazma – u 15 (88,2%) kobiet, a dla zmian typu CIN1 jej pomarańczowe zabarwienie w metodzie Papanicolaou w modyfikacji Krupińskiego, które wystąpiło u 7 (21,9%) kobiet. Zarówno w przypadkach ASC, u których obserwacja nie wykryła nieprawidłowości (143 tj. 90,6%), jak i u tych, u których nieprawidłowości miały charakter CIN1 (22 tj. 68,8%) stwierdzano prawidłową cytoplazmę. Prawidłowa cytoplazma obecna była tylko w 1 (5,9%) przypadku ASC, w którym stwierdzono nieprawidłowości \geq CIN2.

Istotnym statystycznie markerem progresji ASC do zmian \geq CIN2 było stwierdzenie owalnych, pojedynczo występujących nieprawidłowych komórek, podczas gdy w przypadku

remisji nieprawidłowości bądź występowania zmian o charakterze CIN1 najczęściej stwierdzano układ grupowy, oraz poligonalny kształt komórki ($p < 0,001$) (Tab.6).

U 124 (59,9%) kobiet w rozmazach szyjkowych liczba nietypowych komórek płaskonabłonkowych nie przekraczała 10, natomiast większe liczebności nieprawidłowych komórek stwierdzono w 83 (40,1%) przypadkach. Nie stwierdzono jednak by liczebność ASC była istotnie statystycznie różna w grupach kobiet, u których nie stwierdzono patologii, a tymi, u których wykryto CIN1 lub zmiany \geq CIN2 w trakcie trwania obserwacji klinicznej.

Analizowane cechy budowy całej grupy ASC oraz ich układu i liczebności w rozmazach szyjkowych przedstawiono w tabeli 6, natomiast występowanie omawianych cech w zależności od podtypu komórek (ASC-US czy ASC-H) przedstawiono w tabelach 7 i 8.

Tab. 6 Rozkład ocenianych cech cytopatologicznych w badanej grupie ASC

Oceniany element komórki		A		B				Test Chi ² p
		Prawidłowy		CIN1		≥ CIN2		
		N=158		N=32		N=17		
		n	%	n	%	n	%	
Jądro komórkowe	powiększone jądro	158	100	29	90,6	17	100	<0,001
	nieregularność błony	0	--	1	3,1	10	58,8	<0,001
	hyperchromazja	3	1,9	7	21,9	10	58,8	<0,001
	niejednorodna chromatyna	2	1,3	8	25,0	7	41,2	<0,001
Cytoplazma	prawidłowa	143	90,6	22	68,8	1	5,9	<0,001
	skąpa	14	8,8	3	9,4	15	88,2	
	oranzofilna	1	0,6	7	21,9	1	5,9	
Układ komórek	grupowe	152	96,2	18	56,3	4	23,5	<0,001
	pojedyncze	6	3,8	14	43,7	13	76,5	
Kształt komórki	poligonalny	157	99,4	31	96,9	1	5,9	<0,001
	owalny	1	0,6	1	3,1	16	94,1	
Liczba nieprawidłowych komórek	powyżej 10	62	39,2	15	46,9	6	35,3	NS
	poniżej 10	96	60,8	17	53,1	11	64,7	

A- grupa bez nieprawidłowości w trakcie obserwacji

B- grupa ze stwierdzanymi nieprawidłowościami w dalszym postępowaniu diagnostycznym

Tab. 7 Rozkład ocenianych cech cytopatologicznych w badanej grupie ASC-US

Oceniany element komórki		A		B				Test Chi ² p
		Norma		CIN 1		≥ CIN2		
		N=153		N=31		N=11		
		n	%	n	%	n	%	
Jądro komórkowe	powiększone jądro	153	100	28	90,3	11	100	<0,001
	nieregularność błony	0	0	0	0	4	36,4	<0,001
	hyperchromazja	2	1,3	6	19,4	5	45,5	<0,001
	niejednorodna chromatyna	2	1,3	8	25,8	4	36,4	<0,001
Cytoplazma	prawidłowa	139	91	21	66,7	1	9,1	<0,001
	skąpa	14	9	3	9,7	9	81,8	
	oranżofilna	0	0	7	22,6	1	9,1	
Układ komórek	grupowe	148	96,8	18	58,1	4	36,4	<0,001
	pojedyncze	5	3,2	13	41,9	7	63,6	
Kształt komórki	poligonalny	152	99,4	30	96,8	1	9,1	<0,001
	owalny	1	0,6	1	3,2	10	90,9	
Liczba nieprawidłowych komórek	powyżej 10	60	39,4	14	45,2	4	36,4	NS
	poniżej 10	93	60,6	17	54,8	7	63,6	

A- grupa bez nieprawidłowości w trakcie obserwacji

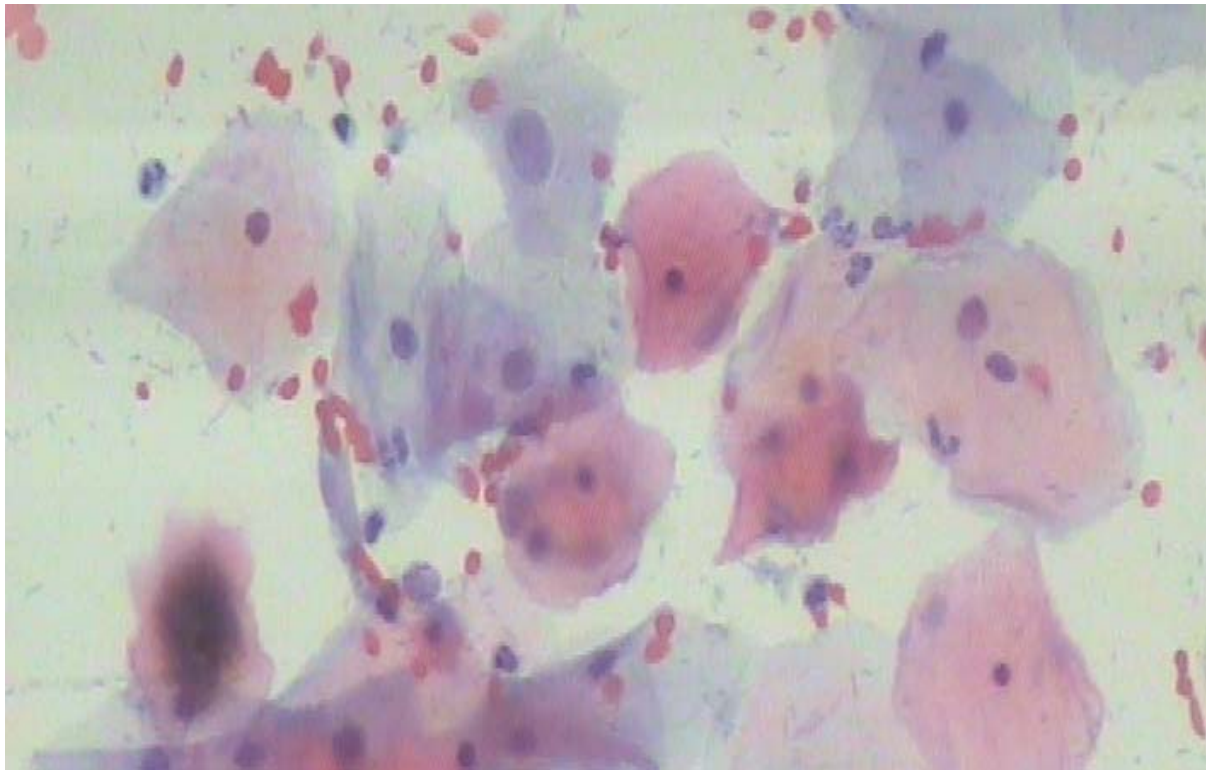
B- grupa ze stwierdzanymi nieprawidłowościami w dalszym postępowaniu diagnostycznym

Tab. 8. Rozkład ocenianych cech cytopatologicznych w badanej grupie ASC-H

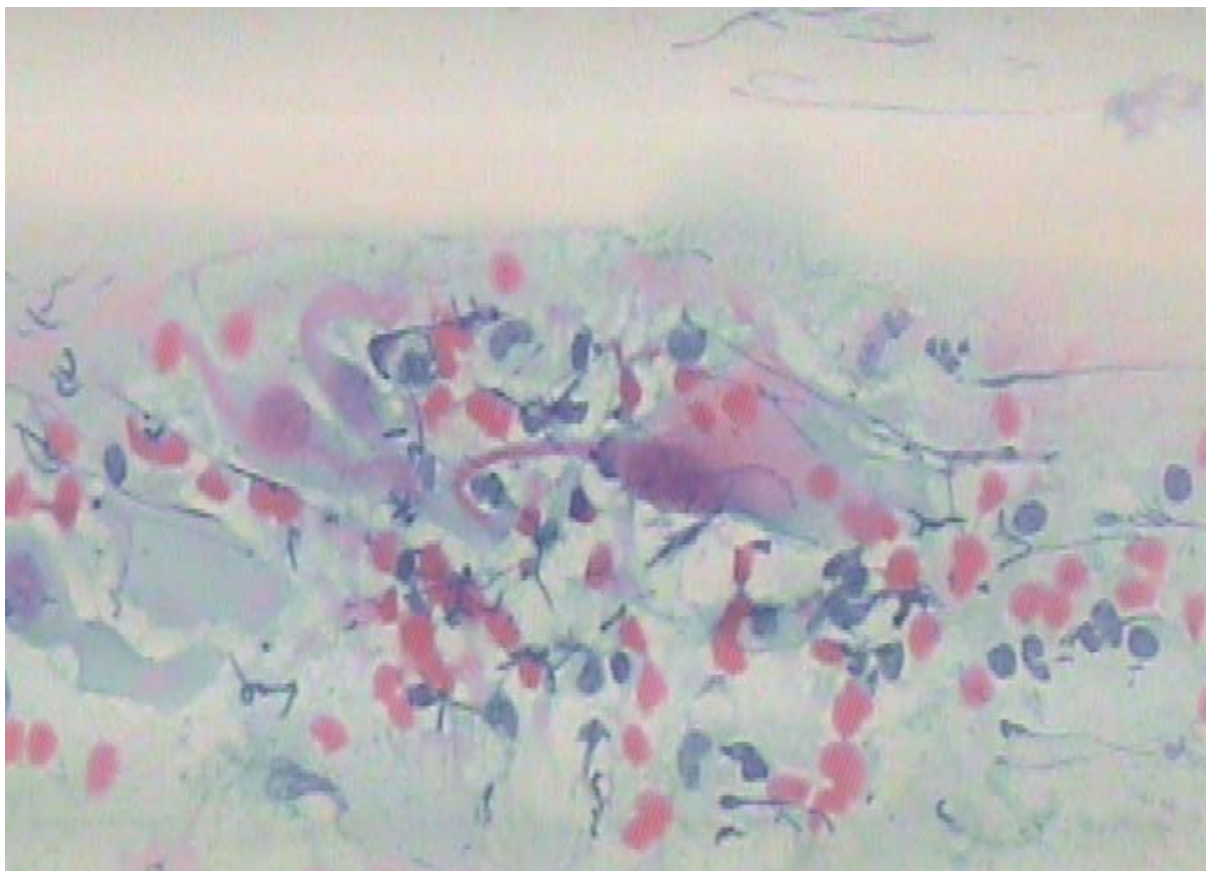
Oceniany element komórki		A		B			
		Norma		CIN1		≥ CIN2	
		N=5		N=1		N=6	
		n	%	n	%	n	%
Jądro komórkowe	powiększone jądro	5	100	1	100	6	100
	nieregularność błony	0	0	1	100	6	100
	hyperchromazja	1	20	1	100	5	83,3
	niejednorodna chromatyna	0	0	0	0	3	50
Cytoplazma	prawidłowa	4	80	1	100	0	0
	skąpa	0	0	0	0	6	100
	oranżofilna	1	20	0	0	0	0
Układ komórek	grupowe	4	80	0	0	0	0
	pojedyncze	1	20	1	100	6	100
Kształt komórki	poligonalny	5	100	1	100	0	0
	owalny	0	0	0	0	6	100
Liczba nieprawidłowych komórek	powyżej 10	2	40	1	100	2	33,3
	poniżej 10	3	60	0	0	4	66,7

A- grupa bez nieprawidłowości w trakcie obserwacji

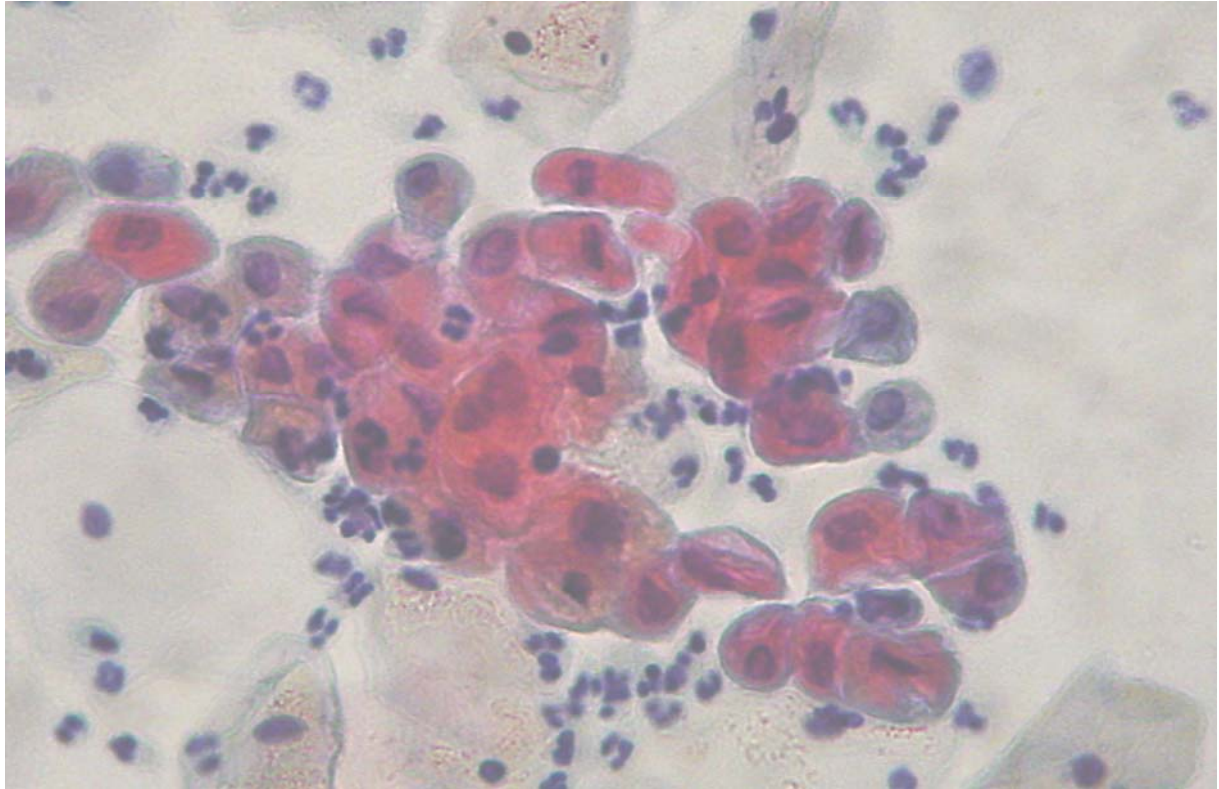
B- grupa ze stwierdzanymi nieprawidłowościami w dalszym postępowaniu diagnostycznym



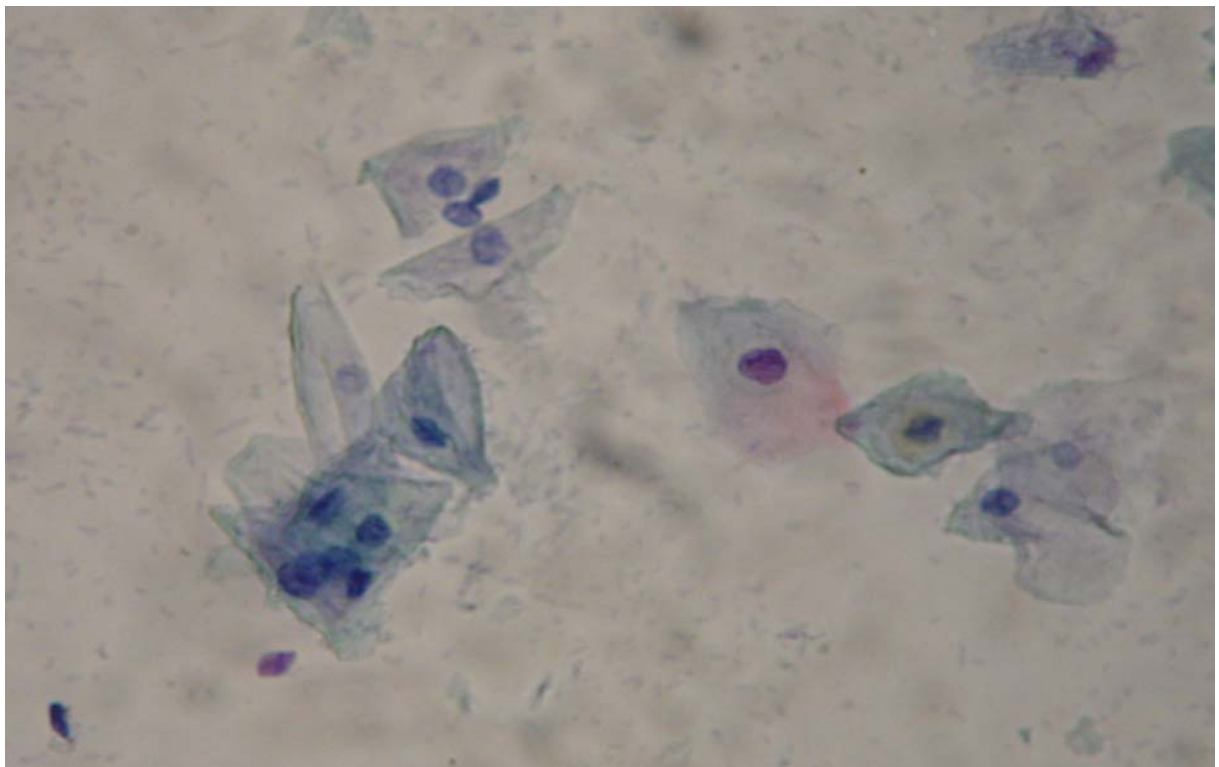
Ryc.22. ASC-US Komórka wielkością odpowiada komórce intermedialnej, kształt poligonalny, 3x powiększenie jądra w stosunku do normalnej komórki pośredniej. Brak nieprawidłowości w trakcie 3-letniego okresu dalszej obserwacji



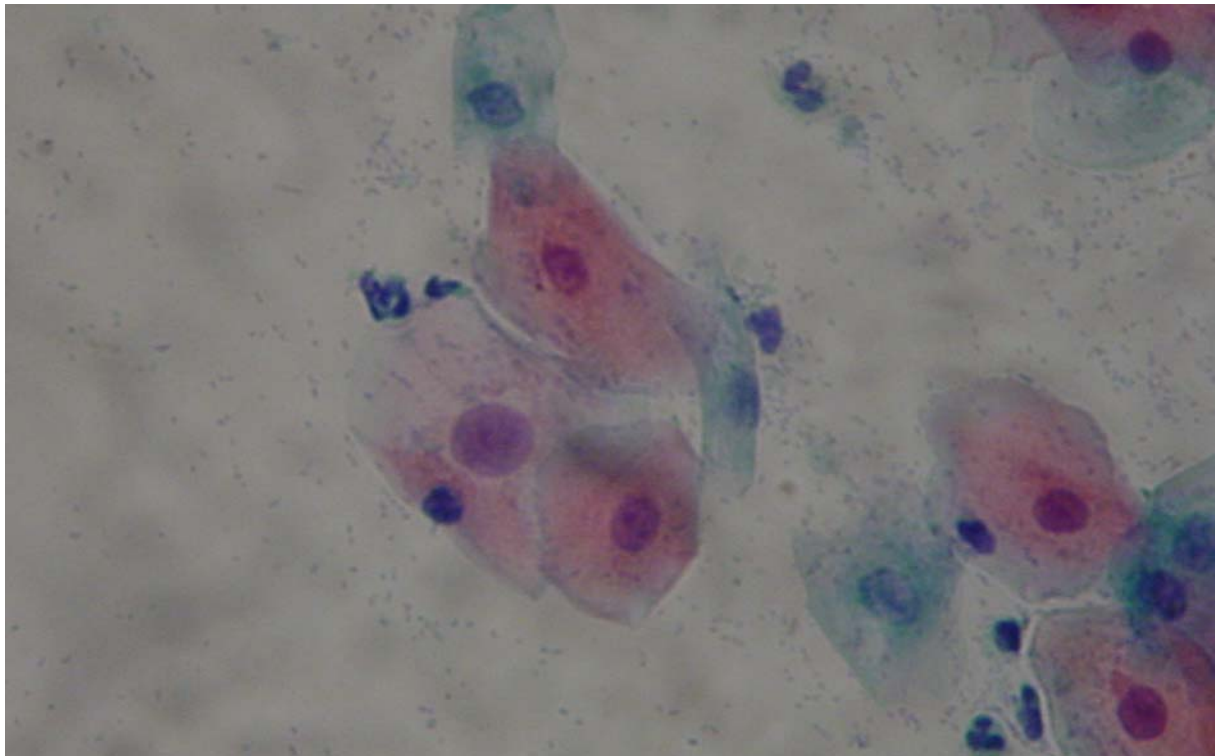
Ryc.23. ASC-US. Nieprawidłowa komórka o zatartej granicy błony komórkowej. 2,5 x powiększenie jądra stosunku do prawidłowej komórki pośredniej. Jednorodna chromatyna. Brak nieprawidłowości w trakcie 3-letniego okresu dalszej obserwacji.



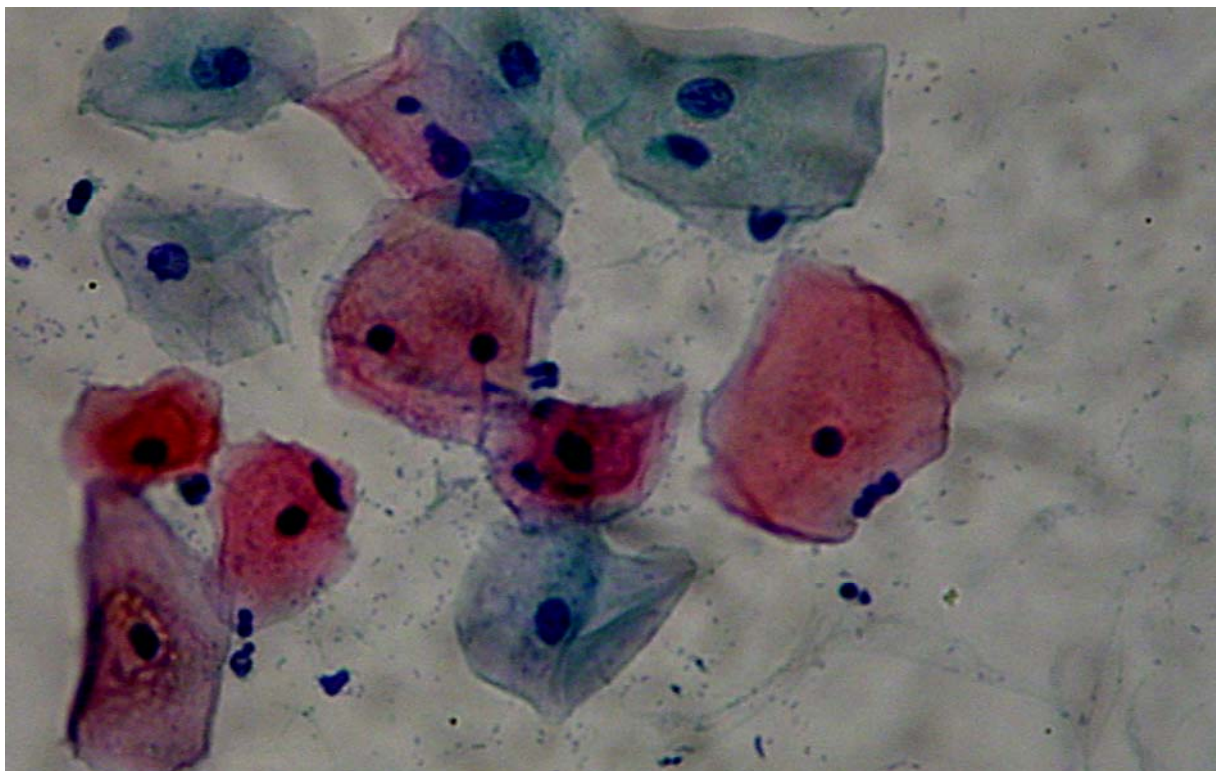
Ryc.24. ASC-US. Zwiększony stosunek N/C. Powiększone jądra z nieregularną błoną komórkową, hyperchromazją i nieregularnością chromatyny jądrowej. Charakterystyczna Oranżofilna cytoplazma. Kontrolna cytologia – LSIL.



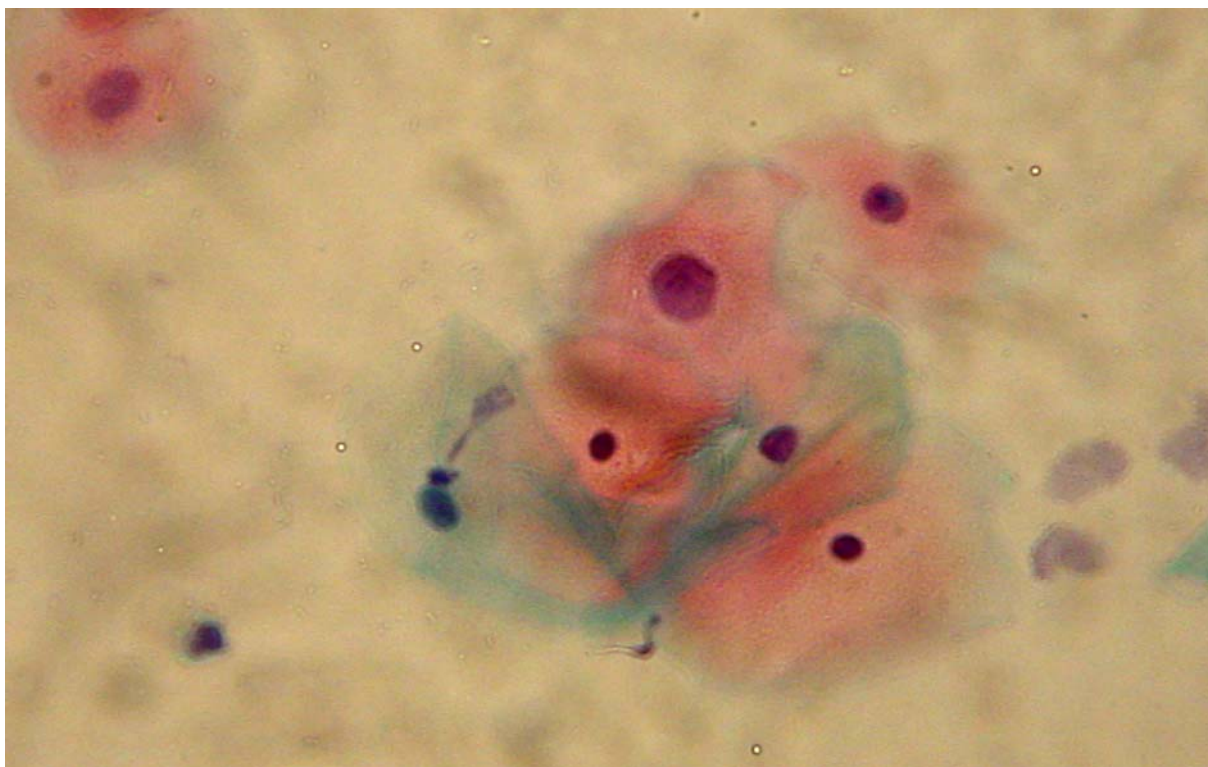
Ryc. 25. ASC-US. Komórka z jądrem o nieznacznej nieregularności chromatyny. Jądro 2x większe od jądra widocznych komórek intermedialnych. Brak nieprawidłowości w trakcie 3-letniego okresu dalszej obserwacji.



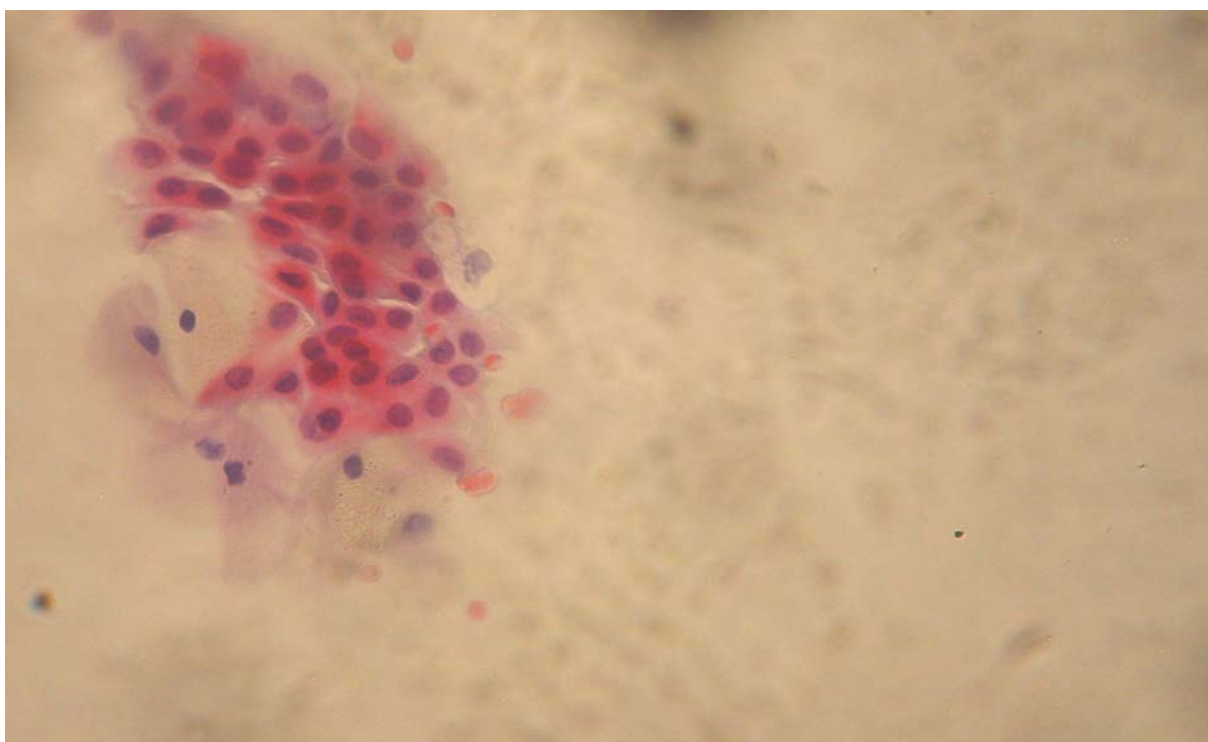
Ryc.26. ASC-US. Komórka z wyraźnie powiększonym jądrem i zwiększonym stosunkiem N/C. Sąsiednie komórki z niewielkiego stopnia nieregularnością chromatyny. Kształt jąder okrągły, gładkie, równe granice błony jądrowej. Kolposkopia - zmiany odpowiadające CIN1. Histologia – CIN1



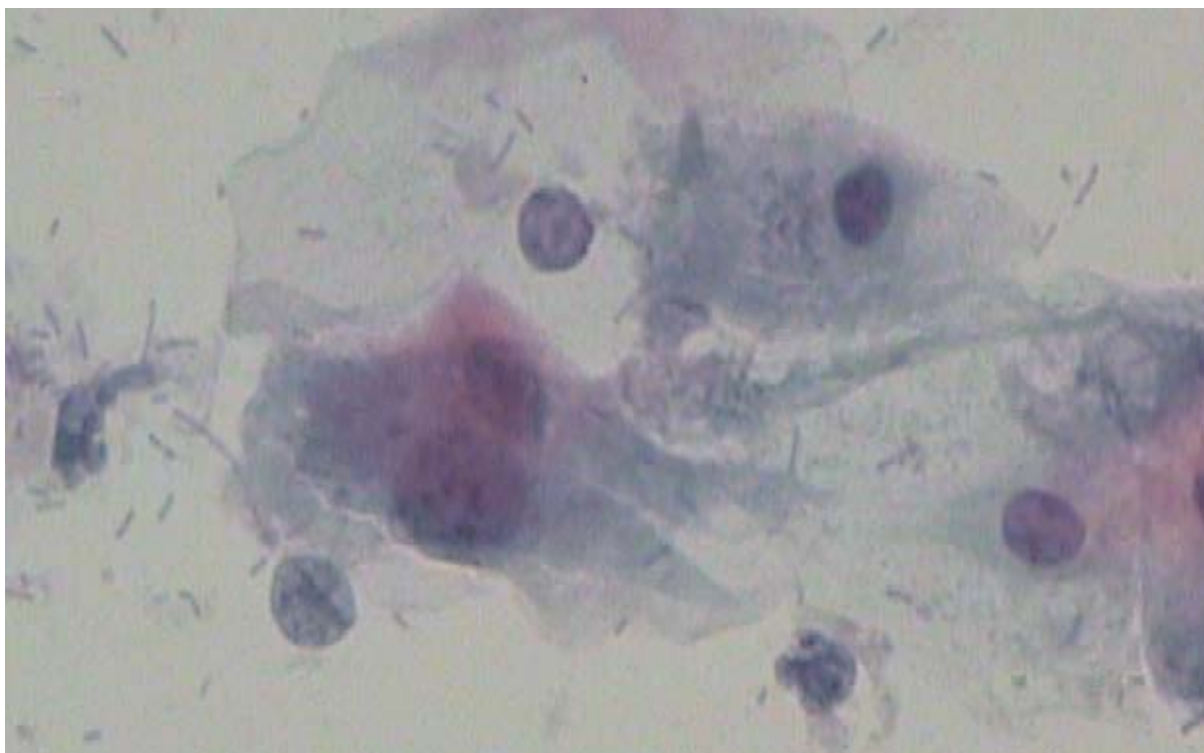
Ryc.27. ASC-US. Widoczne w rozmazie szyjkowym nieprawidłowe komórki o powiększonych hyperchromatycznych jądrach, z widoczną w dwóch komórkach niejednorodną chromatyną jądrową, halo wokółjądrowe w niewielkiej komórce superficjalnej o niewielkim nasileniu. Kolposkopia - zmiany charakterystyczne dla zakażenia HPV i CIN1.



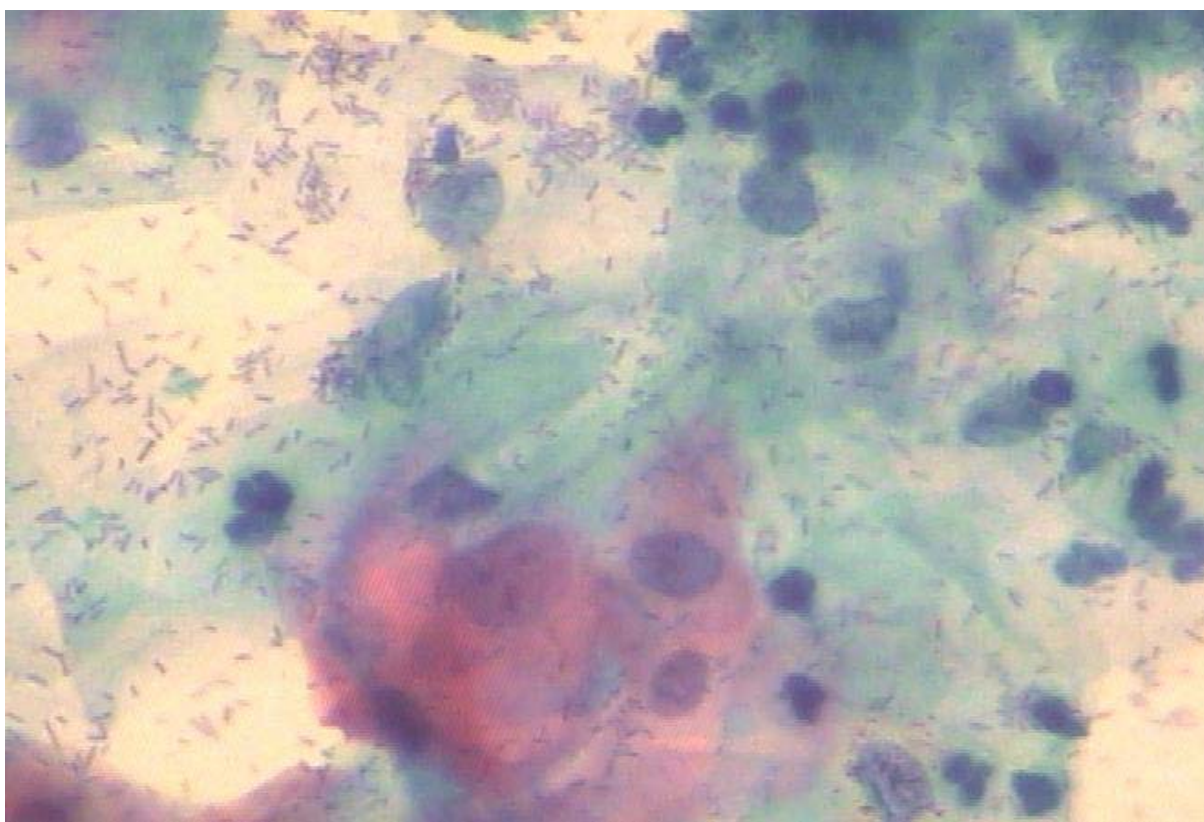
Ryc. 28. ASC-US Powiększone jądro komórkowe 3x w stosunku do komórki intermedialnej. Kuliste jądro, niewielkiego stopnia nieregularność w rozkładzie chromatyny. Brak nieprawidłowości w ciągu 3-letniego okresu dalszej obserwacji.



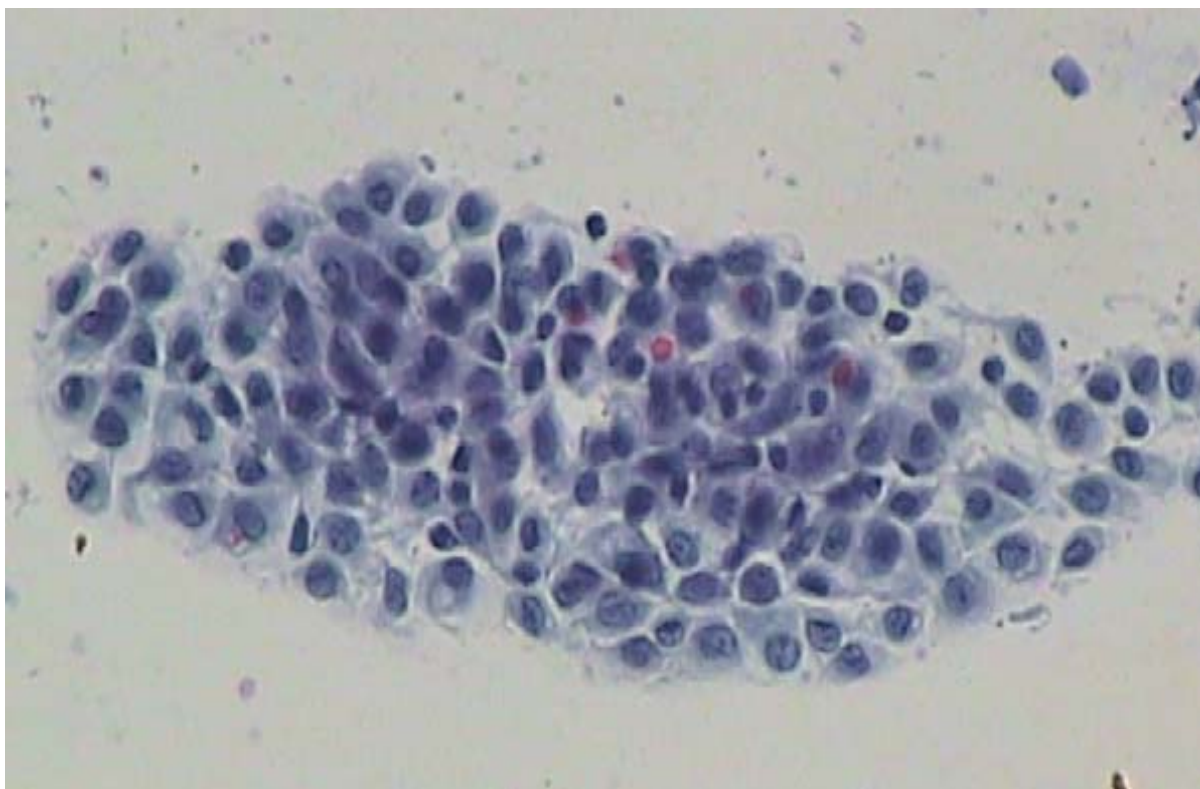
Ryc.29 ASC-US Powiększone jądra, zwiększony stosunek N/C. W części komórek wyraźna hyperchormazja i niejednorodna chromatyna. W przewodzie okrągły kształt jąder. Oranżofilna cytoplazma. Badanie wirusologiczne - pozytywne (wysokoonkogenny podtyp HPV). Kolposkopia - zmiany podejrzane o CIN. Histologia - CIN1. Regresja w trakcie 3 letniego okresu obserwacji bez leczenia.



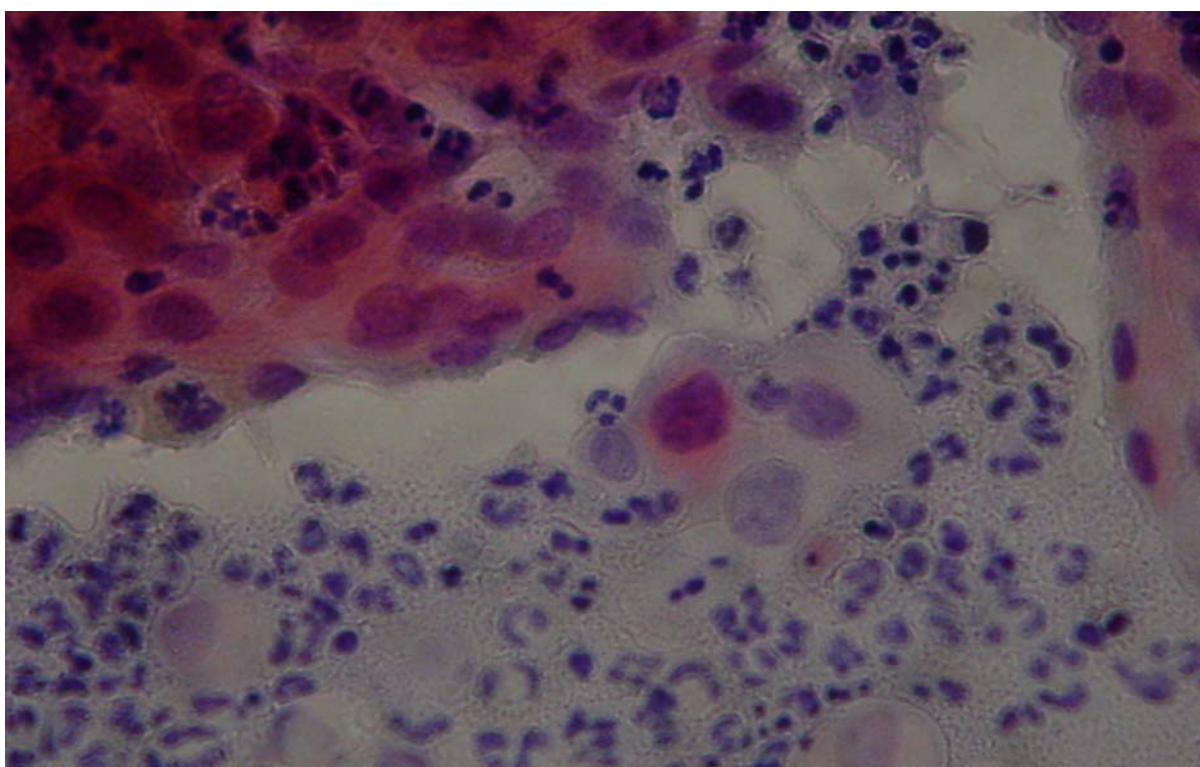
Ryc.30. ASC-US. Jądro komórkowe większe 3x od jądra prawidłowej komórki intermedialnej. Okrągłe jądro o gładkich granicach, nieznacznej niejednorodności chromatyny. W kolejnych badaniach cytologicznych nie stwierdzono nieprawidłowości. Badanie wirusologiczne negatywne.



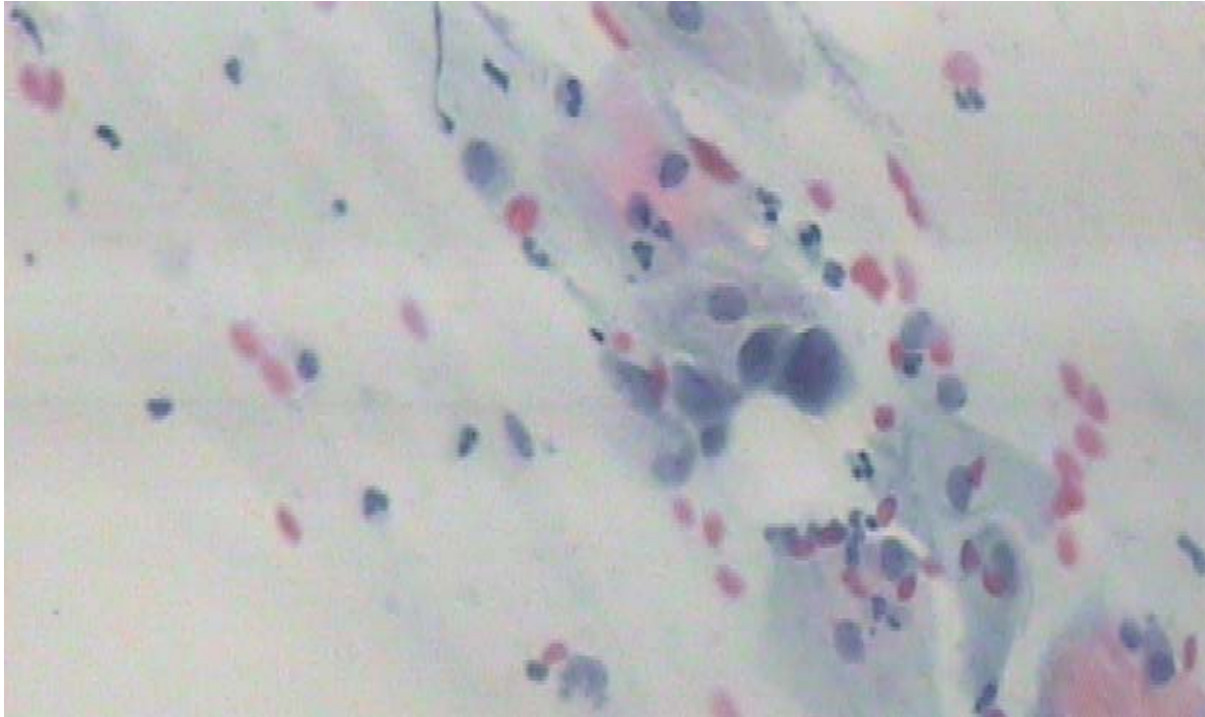
Ryc.31. ASC-US. Jądra komórkowe 3x powiększone w stosunku do prawidłowej komórki intermedialnej. Ovalne jądro o gładkich granicach. W kolejnych badaniach cytologicznych nie stwierdzono nieprawidłowości. Badanie wirusologiczne negatywne.



Ryc.32. ASC-H. Wielkością odpowiadają komórkom metaplastycznym. Nieregularnie rozmieszczona chromatyna, zwiększony stosunek N/C. Poligonalny kształt komórek. Prawidłowe wyniki kontrolnych badań cytologicznych. Badanie wirusologiczne negatywne.



Ryc.33. ASC-H. Atrofia. Powiększone jądro komórkowe o niejednorodnej chromatynie i nieregularnych brzegach. Niejednolicie barwiąca się, skąpa ilość cytoplazmy. Rozmyte granice ściany komórkowej. Kolposkopia-obrazy podejrzane o CIN. Histologia - CIN2.



Ryc. 34. ASC-H. Widoczne dwie okrągłe pojedyncze komórki z niewielką ilością skąpej cytoplazmy, ze znacznie powiększonym stosunkiem N/C. Jądra hyperchromatyczne z niewielkim nasileniem niejednorodności chromatyny i owalnym regularnym kształcie. Kolposkopia-obrazy podejrzane o CIN. Histologia - CIN2.

4.3. Zależność pomiędzy infekcją HPV a obecnością nietypowych komórek gruczołowych i nietypowych komórek płaskonabłonkowych w rozmazach pochwowo-szyjkowych.

W grupie kobiet z AGC w rozmazach pochwowo-szyjkowych w trakcie rozpoczęcia obserwacji klinicznej u 15 (42,9%) wynik badania był pozytywny a u 20 (57,1%) kobiet nie stwierdzono obecności materiału genetycznego wirusa brodawczaka ludzkiego. Spośród 15 kobiet z pozytywnym wynikiem badania w kierunku DNA wirusa HPV u 11 (73,3%) infekcja dotyczyła podtypów wysokoonkogennych, u 3 (20%) nisko onkogennych, a u 1 (6,7%) kobiety stwierdzono infekcję oboma typami wirusa. U 26 kobiet z AGC endocerykalnymi u 4 (15,4%) stwierdzono infekcję wirusami o wysokim potencjale onkogennym, u 3 (11,5%) o niskim potencjale onkogennym, a u 19 nie stwierdzono zakażenia. Spośród 9 kobiet z AGC podtyp endometrialny u 7 (77,8%) stwierdzono zakażenie wirusami wysoko onkogennymi, u 1 (11,1%) infekcję mieszaną, natomiast w 1 (11,1%) przypadku badanie wirusologiczne było negatywne. Znamienne częściej infekcja wirusami wysoko onkogennymi stwierdzana była w grupie pacjentek z AGC endometrialnymi niż endocerykalnymi.

Po 36 miesięcznym okresie obserwacji pobrano wymaz do badania wirusologicznego u wszystkich kobiet. Stwierdzono obecność DNA HPV u 6 (17,1%) kobiet. W grupie AGC podtyp endometrialny stwierdzono wyższy odsetek zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego. Po zakończeniu obserwacji u 4 (44,4%) z 9 kobiet z AGC podtyp endometrialny, w porównaniu do 2 (7,7%) z 26 osobowej grupy z AGC endocerykalnymi wykryto materiał DNA HPV tej samej grupy onkogennej co w trakcie badania wstępnego. U wszystkich 18 kobiet, u których 36 miesięczna obserwacja cytologiczna była ujemna wynik końcowego badania wirusologicznego był negatywny. Różnice w rozkładzie odsetkowym infekcji HPV w grupach AGC zarówno przed jak i po zakończeniu obserwacji były statystycznie istotne co przedstawiono w tabeli 9.

Tab. 9. Infekcja HPV w grupach AGC w momencie rozpoczęcia obserwacji klinicznej i po jej zakończeniu.

Badanie	AGC	n	HPV					Test Chi ² p<
			Brak	Wp	Np	Wp+Np	Σ HPV	
I	2A	26	19 (73,1%)	4 (15,4%)	3 (11,5%)	0	7	0,001
	2B	9	1 (11,1%)	7 (77,8%)	0	1 (11,1%)	8	
II	2A	26	24 (92,3)	2 (7,7%)	0	0	2	0,017
	2B	9	5 (55,6%)	4 (44,4%)	0	0	4	
II*	2A	18	18 (100%)	0	0	0	0	**
	2B	0	0	0	0	0	0	

I - w momencie rozpoczęcia obserwacji klinicznej

II - po zakończeniu obserwacji klinicznej.

II* - grupa kobiet u których nie stwierdzono nieprawidłowości w badaniu cytologicznym

AGC – nietypowe komórki gruczołowe

2A - nietypowe komórki gruczołowe podtyp endocerykalny

2B - nietypowe komórki gruczołowe podtyp endometrialny

n- liczebność grupy

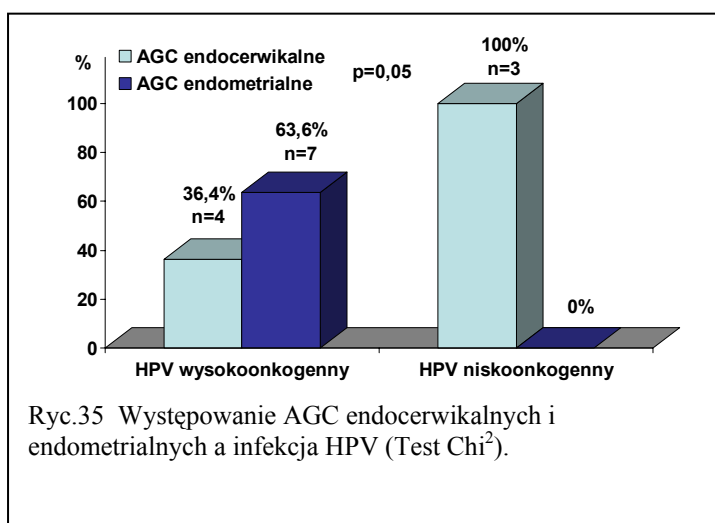
Wp – infekcja HPV o wysokim potencjale onkogenym

Np – infekcja HPV o niskim potencjale onkogenym

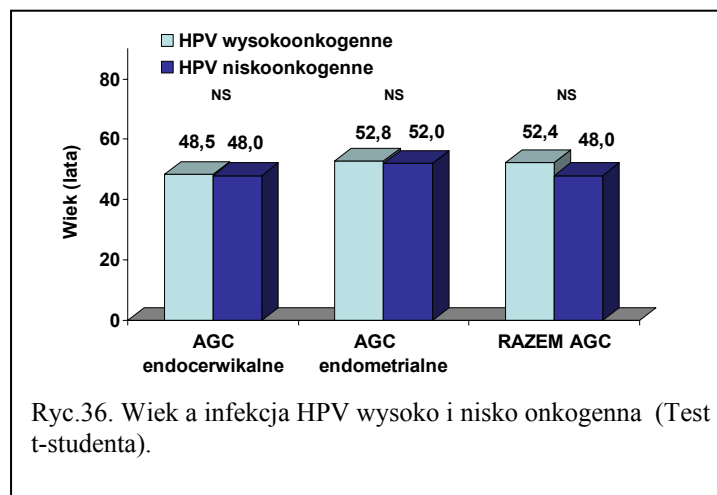
Wp+Np – infekcja mieszana HPV

** brak możliwości obliczenia istotności statystycznej ze względu na brak liczebności

Na ryc.35 przedstawiono porównanie częstości towarzyszącej infekcji HPV w poszczególnych grupach AGC z uwzględnieniem podziału na podtypy onkogenne wirusa. Stwierdzono, iż istnieje różnica znamienna statystycznie pomiędzy podgrupami AGC a typem infekcji.



Nie stwierdzono zależności pomiędzy wiekiem kobiet a obecnością zakażenia wirusami wysokoonkogennymi lub nisko onkogennymi w całej grupie kobiet z AGC, jak i w podgrupach AGC endocerykalnych i AGC endometrialnych (Ryc.36).



W grupie kobiet z ASC w chwili rozpoczęcia obserwacji infekcję wirusem brodawczaka ludzkiego stwierdzono u 88 (42,5%) kobiet. Zarówno w grupie kobiet z ASC-US jak i ASC-H częściej była to infekcja wirusami wysoko onkogennymi: odpowiednio stwierdzona u 39 (20%) kobiet z ASC-US i u 8(66,6%) kobiet z ASC-H. Infekcja wirusami nisko onkogennymi stwierdzona została u 29 (14,9%) kobiet z ASC-US, nie stwierdzono natomiast materiału DNA wyłącznie nisko onkogennych wirusów HPV u kobiet z ASC-H. U 10 (5,1%) kobiet z ASC-US i u 2 (16,7%) z ASC-H wystąpiła infekcja mieszana, zarówno wysoko- jak i nisko onkogennym typem wirusa. Stwierdzono, iż w przypadku ASC-US u 117 tj. 60% kobiet nie stwierdzano zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego, podczas gdy u kobiet z ASC-H wynik ujemny testu Hybrid Capture II był jedynie u 2 tj.16,7% kobiet. Drugie badanie wirusologiczne było ujemne u 197 (95,2%) kobiet, w tym u 187 (95,9%) z ASC-US oraz u 10 (83,3%) z ASC-H. U 8 (4,1%) kobiet z ASC-US wynik badania wirusologicznego był dodatni w tym u 7(3,6%) było to zakażenie wirusami o wysokim potencjale onkogennym a u 1 (0,5%) wirusami nisko onkogennymi. W grupie ASC-H u 2

(16,7%) kobiet stwierdzono DNA wirusa brodawczaka ludzkiego i były to wirusy wyłącznie o wysokim potencjale onkogennym. W grupie 158 kobiet z ASC, u których w trakcie całego badania nie stwierdzono nieprawidłowości w badaniach dodatkowych u 157 (99,4%) wynik końcowego badania wirusologicznego był ujemny, a zaledwie w 1 przypadku stwierdzono materiał DNA podtypu wysokoonkogennego HPV (Tab. 10).

Tab. 10. Infekcja HPV w grupach ASC w momencie rozpoczęcia obserwacji klinicznej i po jej zakończeniu.

Badanie	ASC	n	HPV					Test Chi ² p
			Brak	Wp	Np	Wp+Np	ΣHPV	
I	US	195	117(60,0%)	39(20,0%)	27(13,9%)	12 (5,1%)	78 (40%)	<0,002
	H	12	2 (16,7%)	8 (66,6%)	0	2 (16,7)	10 (83,3%)	
II	US	195	187 (95,9%)	7 (3,6%)	1 (0,5%)	0	8 (4,1%)	NS
	H	12	10 (83,3%)	2 (16,7%)	0	0	2 (16,7%)	
II*	US	153	152 (99,3%)	1(0,7%)	0	0	0	NS
	H	5	5 (100%)	0	0	0	0	

I-w momencie rozpoczęcia obserwacji klinicznej

II-po zakończeniu obserwacji klinicznej,

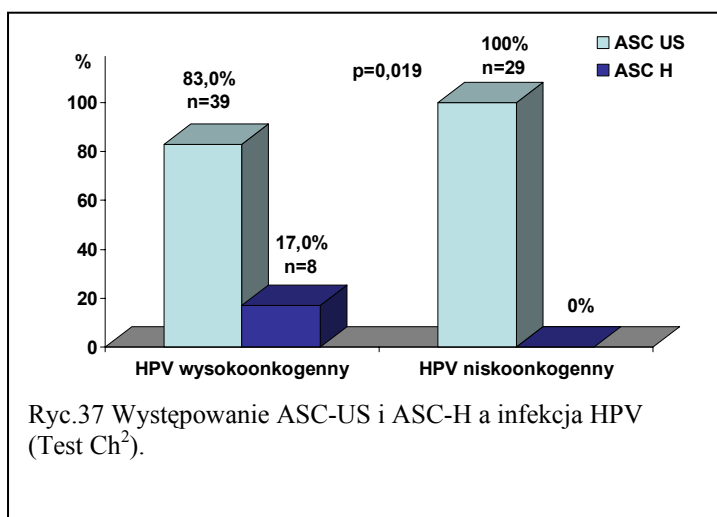
II*- grupa ASC, u której nie stwierdzono nieprawidłowości

n-liczebność grupy

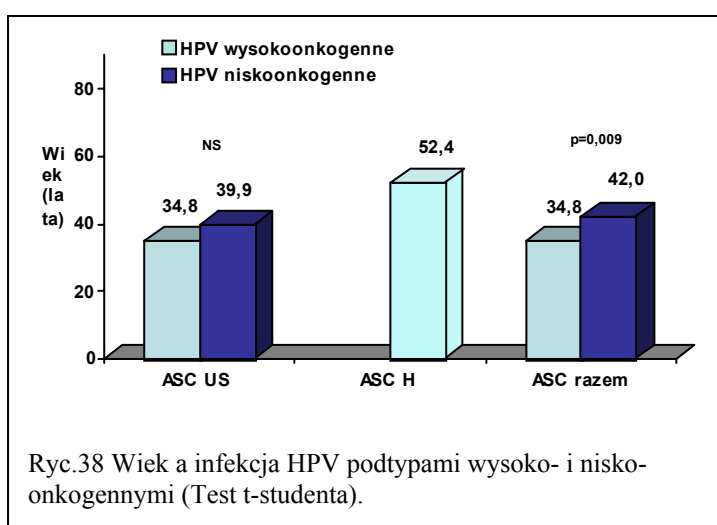
Wp – infekcja HPV o wysokim potencjale onkogennym,

Np – infekcja HPV o niskim potencjale onkogennym

Stwierdzono, iż zakażenie niskoonkogennym podtypem wirusa występuje znacznie częściej u kobiet z ASC-US. W przypadku ASC-H dominowało zakażenie wirusami o wysokim potencjale onkogennym, nie stwierdzono natomiast zakażenia wyłącznie wirusami o niskim potencjale onkogennym (Ryc.37)



Średnia wieku kobiet z ASC i towarzyszącą infekcją wirusami wysokoogennymi była niższa w porównaniu z tymi, u których stwierdzono zakażenie niskoogennymi typami wirusów (34,8 vs.42,0 lat). Różnica ta była istotna statystycznie. Nie stwierdzono by różnica wieku pomiędzy kobietami z infekcją wysokoogennymi a niskoogennymi podtypami wirusa w podgrupie ASC-US była znamienna statystycznie (Ryc.38).



4.2 Analiza przemian nietypowych komórek gruczołowych i nietypowych komórek płaskonabłonkowych w czasie trwania obserwacji.

Zachowanie się nietypowych komórek gruczołowych w trakcie 12 kolejnych obserwacji cytologicznych wykonywanych co 3 miesiące przedstawia tabela 11.

Tab.11. Wyniki badań cytologicznych w ciągu 36-miesięcznej obserwacji u kobiet z AGC.

K	N	Wyniki badań cytologicznych						
		Prawidłowy	AGC	ASC	LSIL	HSIL	AGC +ASC	AGC +LSIL
1	35	14 (40%)	13 (37,14%)	3 (8,57%)	1 (2,86%)	3 (8,57%)	1 (2,86%)	0
2	17	15 (88,23%)	1 (5,88%)	0	0	0	1 (5,88%)	0
3	15	14 (93,33%)	1 (6,67%)	0	0	0	0	0
4	15	13 (86,66%)	2 (13,33%)	0	0	0	0	0
5	14	12 (85,71%)	2 (14,28%)	0	0	0	0	0
6	13	12 (92,3%)	1 (7,69%)	0	0	0	0	0
7	12	12 (100%)	0	0	0	0	0	0
8	12	12 (100%)	0	0	0	0	0	0
9	12	12 (100%)	0	0	0	0	0	0
10	12	12 (100%)	0	0	0	0	0	0
11	12	12 (100%)	0	0	0	0	0	0
12	12	12 (100%)	0	0	0	0	0	0

K - kontrolne badanie cytologiczne wykonywane w odstępach 3 miesięcznych

N - liczba kobiet zgłaszających się na kontrolne badanie cytologiczne.

AGC – nietypowe komórki gruczołowe

ASC - nietypowe komórki płaskonabłonkowe

LSIL – zmiany śródnabłonkowe małego stopnia

HSIL – zmiany śródnabłonkowe dużego stopnia

W grupie kobiet z AGC w trakcie pierwszej kontroli cytologicznej wykonanej po 3 miesiącach u 14 (40%) kobiet stwierdzono prawidłowy wynik badania cytologicznego.

Utrzymywanie się zmian o charakterze AGC stwierdzono u 13 (37,14%) kobiet natomiast u 1 (2,86%) kobiety z grupy AGC w rozmazie stwierdzono jednocześnie obecność AGC oraz ASC. U 3 (8,57%) kobiet stwierdzono nieprawidłowości typu ASC, u 1 (2,86%) LSIL i u 3 (8,57%) HSIL. W sumie u 7 (20%) kobiet z grupy AGC w trakcie pierwszego kontrolnego badania cytologicznego stwierdzono nieprawidłowości dotyczące wyłącznie nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Zgodnie z przyjętą metodologią badania u 21 (60%) kobiet, u

których w rozmazie cytologicznym stwierdzono utrzymywanie się nieprawidłowości bądź stwierdzono zmianę o większym nasileniu wykonano kolposkopię. We wszystkich przypadkach utrzymywania się AGC wyłyżeczkowano kanał szyjki i jamę macicy, a w przypadkach nieprawidłowości w obrazie kolposkopowym pobrano wycinki z tarczy części pochwowej. Prawidłowe obrazy kolposkopowe w klasyfikacji IFCPC stwierdzono w 6 (28,57%) przypadkach. Nieprawidłowe obrazy kolposkopowe stwierdzono w 7 (33,33%) przypadkach, a w 8 (38,1%) przypadkach obraz kolposkopowy zaliczono do „obrazów różnych” obejmujących zmiany typu zapalnego, polipy, atrofię. Materiał histologiczny oceniono u 18 kobiet, gdyż u 3 kobiet z ASC stwierdzonymi po 3 miesiącach od włączenia do badania w grupie AGC wynik badania kolposkopowego był prawidłowy. U 4 kobiet stwierdzono obecność polipów szyjkowych, u 3 CIN1, u 1 CIN2, u 3 CIN3, u 4 raka gruczołowego endometrium, natomiast u 3 wynik badania histopatologicznego był prawidłowy. Pacjentki te wyłączono z dalszej obserwacji cytologicznej AGC, jako zweryfikowane histologicznie. Zastosowano u nich postępowanie terapeutyczne odpowiednie dla stwierdzonej nieprawidłowości zgodne ze standardami obowiązującymi w Klinice Ginekologii, Położnictwa i Onkologii. Kontynuowano u nich cytologiczną kontrolę onkologiczną w odstępach 3-miesięcznych. W sumie u 15 (42,86%) kobiet z 35 osobowej grupy AGC po 3 miesiącach obserwacji stwierdzono nieprawidłowości potwierdzone w badaniu histologicznym.

Drugą kontrolą cytologiczną objęto 17 kobiet. U 15 (88,23%) wynik badania cytologicznego był prawidłowy, natomiast u 1 (5,88%) stwierdzono obecność AGC podtyp endocerykalny, oraz u 1 (5,88%) kobiety jednocześnie obecność w rozmazie AGC endocerykalnych i ASC. U 2 ww kobiet wykonano kolposkopię, w którym w obu przypadkach obraz oceniono jako obrazy różne wg. IFCPC (1 – atrofia, 1 polip szyjkowy). Badanie histologiczne u pierwszej z ww kobiet było prawidłowe, natomiast u kobiety z

jednoczesną obecnością AGC endocerykalnego i ASC w rozmazie stwierdzono obecność polipa szyjkowego. Kobiety te wyłączono z dalszej obserwacji AGC, jako zweryfikowane histologicznie.

W trakcie trzeciej wizyty kontrolnej u 14 (93,33%) kobiet nie stwierdzono nieprawidłowości w cytologicznym badaniu kontrolnym, natomiast u 1 (6,67%) po 3 miesięcznej przerwie ponownie w rozmazie pojawiły się AGC podtypu endometrialny. W czwartym badaniu kontrolnym u 13 (86,66%) kobiet wynik badania cytologicznego był prawidłowy, natomiast u 2 (13,34%) stwierdzono AGC, w tym w 1 przypadku AGC endometrialne i w 1 AGC endocerykalne. W wykonanym badaniu kolposkopowym u kobiety z dwukrotnie stwierdzonym AGC endometrialnym rozpoznano nieprawidłowe obrazy kolposkopowe. Wynik badania histopatologicznego u tej pacjentki stwierdzał obecność rozrostu złożonego atypowego endometrium. W trakcie 5 wizyty badanie cytologiczne wykonano u 14 kobiet, stwierdzając u 12 (85,71%) prawidłowy wynik badania cytologicznego, natomiast u 2 (14,28%) AGC endocerykalne, w tym u 1 kobiety utrzymywanie się nieprawidłowości. Wykonane u niej badanie kolposkopowe zakwalifikowano do „obrazów różnych” (zapalenie) wg IFCPC, a wynik badania histologicznego był prawidłowy. Szósta wizyta kontrolna wykazała utrzymywanie się nieprawidłowości o charakterze AGC endocerykalnych u 1 (7,69%) kobiety, podczas gdy u 12 (92,3%) wynik badania cytologicznego był prawidłowy. Wykonana w 1 przypadku kolposkopia została zakwalifikowana jako atrofia, a wynik badania histologicznego był prawidłowy. Od 7 wizyty kontrolnej do końca obserwacji u wszystkich 12 obserwowanych pacjentek wyniki badań cytologicznych były prawidłowe.

Występowanie poszczególnych nieprawidłowości w kolejnych rozmazach pochwo-szyjkowych w poszczególnych podgrupach AGC przedstawiono w tabelach 12 i 13. (AGC endocerykalne Tab.12 i AGC endometrialne Tab.13)

Tab.12. Wyniki badań cytologicznych w kolejnych badaniach kontrolnych w grupie kobiet z AGC endocerywikalnymi.

K	N	Wyniki badań cytologicznych							
		Prawidłowy	AGC – 2A	AGC – 2B	ASC	LSIL	HSIL	AGC +ASC	AGC +LSIL
1	26	13-50%	7-26,92%	1-3,85%	3-11,54%	1-3,85%	0	1-3,85%	0
2	16	15-93,75%	1-6,25%	0	0	0	0	0	0
3	14	14-100%	0	0	0	0	0	0	0
4	14	13-92,85%	1-7,14%	0	0	0	0	0	0
5	14	12-85,71%	2-14,28%	0	0	0	0	0	0
6	13	12-92,30%	1-7,70%	0	0	0	0	0	0
7	12	12-100%	0	0	0	0	0	0	0
8	12	12-100%	0	0	0	0	0	0	0
9	12	12-100%	0	0	0	0	0	0	0
10	12	12-100%	0	0	0	0	0	0	0
11	12	12-100%	0	0	0	0	0	0	0
12	12	12-100%	0	0	0	0	0	0	0

K - kontrolne badanie cytologiczne wykonywane w odstępach 3 miesięcznych

N - liczba kobiet z AGC podtyp endocerywikalny zgłaszających się na kontrolne badanie cytologiczne.

AGC-2A- nietypowe komórki gruczołowe endocerywikalne

AGC-2B- nietypowe komórki gruczołowe endometrialne.

ASC - nietypowe komórki płaskonabłonkowe

LSIL – zmiany śródnabłonkowe małego stopnia

HSIL – zmiany śródnabłonkowe dużego stopnia

Tab.13. Wyniki badań cytologicznych w kolejnych badaniach kontrolnych w grupie kobiet z AGC endometrialnymi.

K	N	Wyniki badań cytologicznych							
		norma	AGC – 2A	AGC – 2B	ASC	LSIL	HSIL	AGC +ASC	AGC +LSIL
1	9	1 -11,11%	0	5 -55,56%	0	0	3 -33,33%	0	0
2	1	1-100%	0	0	0	0	0	0	0
3	1	0	0	1 -100%	0	0	0	0	0
4	1	0	0	1 -100%	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N - liczba kobiet z AGC podtyp endometrialny zgłaszających się na kontrolne badanie cytologiczne.

W grupie 35 kobiet z AGC w pierwszym badaniu cytologicznym u 18 (51,4%) nie stwierdzono żadnych nieprawidłowości podczas całego okresu obserwacji, natomiast u 17 (48,6%) obecne były nieprawidłowości nabłonka gruczołowego i wielowarstwowego płaskiego. U 10 (28,6%) kobiet dodatkowe postępowanie diagnostyczne wykazało obecność patologii dotyczących nabłonka gruczołowego. W 4(11,4%) przypadkach stwierdzono raka gruczołowego endometrium, natomiast w 1(2,9%) przypadku rozrost atypowy złożony błony śluzowej trzonu macicy. Nieprawidłowości te stwierdzono u kobiet, u których rozpoznano AGC podtyp endometrialny. U 5 (14,3%) kobiet z AGC stwierdzono obecność polipa szyjkowego – we wszystkich przypadkach dotyczyło to AGC podtyp endocerykalny. U 7 (20%) kobiet stwierdzono zmiany dotyczące w rzeczywistości nabłonka wielowarstwowego płaskiego w tym u 3 kobiet z grupy AGC endocerykalnych stwierdzono CIN1, natomiast w podgrupie AGC endometrialnych u 1 kobiety stwierdzono CIN2 i u 3 CIN3. Wszystkie nieprawidłowości o nasileniu \geq CIN2 wykryte zostały w grupie AGC endometrialnych.

Porównanie stwierdzanych w trakcie 36 miesięcznej obserwacji nieprawidłowości w grupie AGC przedstawiono w tabeli 14.

Tab. 14. Charakterystyka nieprawidłowości w punkcie końcowym obserwacji u pacjentek z AGC w rozmarze szyjkowym.

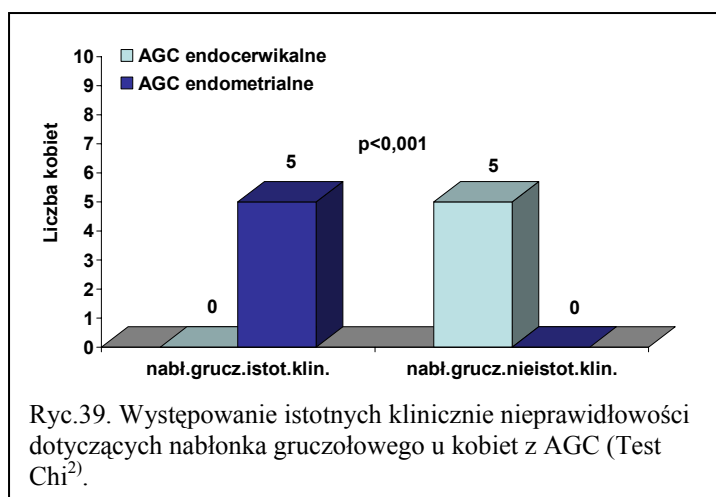
Ocena AGC – wynik końcowy	AGC-2A		AGC-2B		Razem AGC	
	n	%	n	%	n	%
Wynik prawidłowy	18	69,2	0	0	18	51,4
Rak gruczołowy endometrium, Rozrost atypowy endometrium	0	0	5	55,6	5	14,3
Polip szyjkowy	5	19,2	0	0	5	14,3
CIN2 i CIN3	0	0	4	44,4	4	11,4
CIN1	3	11,6	0	0	3	8,6
RAZEM	26	100	9	100	35	100

AGC-nietypowe komórki gruczołowe

AGC-2A-nietypowe komórki gruczołowe endocerykalne

AGC-2B-nietypowe komórki gruczołowe endometrialne.

W grupie AGC, u których w dalszym postępowaniu stwierdzono patologię nabłonka gruczołowego wykazano, iż w statystycznie wyższym odsetku przypadków ($p < 0,001$) zmiany zakwalifikowane jako AGC podtyp endometrialny wiązały się z nieprawidłowościami o wyższym stopniu nasilenia klinicznego, w tym aż w 44,44% przypadków miały charakter raka gruczołowego endometrium, a 11,11% rozrostu złożonego atypowego endometrium. W podgrupie AGC podtyp endocerkikalny częściej występowały zmiany o charakterze polipów szyjkowych. Różnicę w występowaniu klinicznie istotnych nieprawidłowości przedstawiono na Ryc.39.



Analiza zachowania się AGC w czasie wykazała, iż regresja częściej występuje u kobiet z AGC podtyp endocerkikalny – w trakcie pierwszej wizyty kontrolnej nie stwierdzono utrzymywania się nieprawidłowości u 13 (50%) kobiet z tej grupy w stosunku do 1 (11,1%) kobiety z AGC podtyp endometrialny. U 8 (30,8%) kobiet z AGC podtyp endocerkikalny i u 5 (55,6%) kobiet z AGC podtyp endometrialny stwierdzono utrzymywanie się nieprawidłowości w trakcie pierwszego cytologicznego badania kontrolnego, natomiast progresja dotyczyła 5 (19,2%) kobiet z AGC endocerkikalnymi i 3 (33,3%) kobiet z AGC endometrialnymi. Różnica ta była jednak istotna statystycznie tylko dla wartości z pierwszej wizyty kontrolnej ($p = 0,003$).

Częstość regresji, utrzymywania się stanu stacjonarnego oraz progresji zmian w badaniach cytologicznych w grupie kobiet z AGC przedstawiono w tabeli 15. Z analiz kolejnych kontrolnych cytologii w wyznaczonych odstępach czasowych wyłączano kobiety, u których zgodnie z protokołem postępowania przeprowadzono weryfikację histologiczną i ew. włączono postępowanie terapeutyczne. Kontynuowano u nich kontrolę cytologiczną co trzy miesiące a uzyskane wyniki badań przedstawiono w osobnej tabeli (Tab.17).

Tab.15 Zachowanie się zmian typu AGC w rozmazach cytologicznych w trakcie 36 miesięcznej obserwacji.

K	AGC	N	Regresja		Stan stacjonarny		Progresja		Test Chi ² p
			n	%	n	%	N	%	
1	2A	26	13	50,0	7	30,8	5	19,2	0,003
	2B	9	1	11,1	6	55,6	3	33,3	
2	2A	16	15	93,8	1	6,2	0	0	NS
	2B	1	1	100,0	0	0	0	0	
3	2A	14	14	100,0	0	0	0	0	NS
	2B	1	1	100,0	0	0	0	0	
4	2A	14	13	92,9	1	7,1	0	0	NS
	2B	1	0	0	1	100	0	0	
5	2A	14	12	85,7	2	14,3	0	0	NS
	2B	1	0	0	1	100	0	0	
6	2A	12	92,3	1	7,7	0	0	0	NS
	2B	0	0	0	0	0	0	0	
7	2A	12	12	100	0	0	0	0	NS
	2B	0	0	0	0	0	0	0	
8	2A	12	12	100	0	0	0	0	NS
	2B	0	0	0	0	0	0	0	
9	2A	12	12	100	0	0	0	0	NS
	2B	0	0	0	0	0	0	0	
10	2A	12	12	100	0	0	0	0	NS
	2B	0	0	0	0	0	0	0	
11	2A	12	12	100	0	0	0	0	NS
	2B	0	0	0	0	0	0	0	
12	2A	12	12	100	0	0	0	0	NS
	2B	0	0	0	0	0	0	0	

K-kontrolne badanie cytologiczne wykonywane w odstępach 3 miesięcznych

N-liczba kobiet z AGC zgłaszających się na kontrolne badanie cytologiczne z wyłączeniem kobiet poddanych leczeniu chirurgicznemu

AGC-2A-nietypowe komórki gruczołowe endocerykalne

AGC-2B-nietypowe komórki gruczołowe endometrialne

Tab. 16 Weryfikacja histologiczna AGC.

K	AGC	N	Regresja		Progresja	
			n	%	n	%
1	2A	10	3	30	7 (3CIN1,4 polipy szyjkowe)	70
	2B	8	0	0	8(1CIN2, 3CIN3, 4 raki endometrium)	100
2	2A	2	1	50	1(1 polip szyjkowy)	50
	2B	0	0	0	0	0
3	2A	0	0	0	0	0
	2B	0	0	0	0	0
4	2A	0	0	0	0	0
	2B	1	0	0	1 (rozrost atypowy złożony endometrium)	100
5	2A	1	1	100	0	0
	2B	0	0	0	0	0
6	2A	1	1	100	0	0
	2B	0	0	0	0	0
7	2A	0	0	0	0	0
	2B	0	0	0	0	0
8	2A	0	0	0	0	0
	2B	0	0	0	0	0
9	2A	0	0	0	0	0
	2B	0	0	0	0	0
10	2A	0	0	0	0	0
	2B	0	0	0	0	0
11	2A	0	0	0	0	0
	2B	0	0	0	0	0
12	2A	0	0	0	0	0
	2B	0	0	0	0	0

N-liczna kobiet z AGC, u których wykonano badanie histologiczne zgodnie z protokołem badania

Tab. 17 Obserwacja cytologiczna kobiet wyłączonych z grupy badanej AGC u których nastąpiła progresja zmiany po weryfikacji histologicznej w kolejnych miesiącach.

K	N	Wyniki badań cytologicznych						
		Prawidłowy	AGC	ASC	LSIL	HSIL	AGC +ASC	AGC +LSIL
6mies	18	14 (77,8%)	1(5,6%)	0	2 (11%)	0	0	1(5,6%)
9mies	20	17 (85%)	1 (5%%)	0	2 (10%)	0	0	0
12mies	20	18 (90%)	1 (5%)	0	1(5%)	0	0	0
15mies	21	20 (95,2%)	1 (4,8%)	0	0	0	0	0
18mies	22	21 (95,5%)	1 (4,5%)	0	0	0	0	0
21mies	23	22 (95,7%)	1 (4,3%)	0	0	0	0	0
24mies	23	22 (95,7%)	1 (4,3%)	0	0	0	0	0
27mies	23	23(100%)	0	0	0	0	0	0
30mies	23	23(100%)	0	0	0	0	0	0
33mies	23	23(100%)	0	0	0	0	0	0
36mies	23	23(100%)	0	0	0	0	0	0

W badanej 35 osobowej grupie u 18 kobiet z AGC, u których w dalszym postępowaniu w trakcie całej obserwacji nie stwierdzono nieprawidłowości, u 15 (83,3%) wynik badania wirusologicznego był ujemny, u 2(11,8%) stwierdzono zakażenie wirusami wysokoonkogennymi, a w 1 (5,6%) przypadku wirusami nisko onkogennymi. W grupie 7 kobiet, u których stwierdzono nieprawidłowości nabłonka wielowarstwowego płaskiego u 1 (14,3%) badanie wirusologiczne było ujemne, u 6 (85,7%) kobiet obecny był DNA wirusów o wysokim potencjale onkogennym. W grupie kobiet z nieprawidłowościami dotyczącymi nabłonka gruczołowego w przypadku zmian o charakterze polipów szyjkowych u 4 (80%) badanie wirusologiczne było ujemne, u 1 (20%) stwierdzono zakażenie wirusami o niskim potencjale onkogennym, natomiast w przypadku zmian o charakterze raka endometrium i rozrostu atypowego błony śluzowej macicy u wszystkich 5 (100%) stwierdzono DNA wirusów o wysokim potencjale onkogennym. W 1 (20%) przypadku infekcja miała charakter mieszany. Zależność pomiędzy typem infekcji wirusowej a rodzajem zmiany stwierdzanej w

badaniach kontrolnych przedstawiono w tabeli 18 – ogólnie dla AGC i tabelach 19 i 20 dla poszczególnych podtypów.

Tab. 18. Typ infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego a rodzaj nieprawidłowości w badaniu końcowym w całej grupie pacjentek z AGC.

Ocena końcowa	N	HPV								Test Chi ² p
		Brak		Wp		Np		Wp+Np		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Norma	18	15	83,3	2	11,1	1	5,6	0	0	0,001
CIN1, CIN2, CIN3	7	1	14,3	6	85,7	0	0	0	0	
Polipy szyjkowe	5	4	80	0	0	1	20	0	0	
Rak szyjki macicy, rozrost atypowy złożony endometrium	5	0	0	4	80	0	0	1	20	

N - liczebność grupy

Wp - infekcja HPV o wysokim potencjale onkogennym

Np - infekcja HPV o niskim potencjale onkogennym

Tab.19. Typ infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego a rodzaj nieprawidłowości w podgrupie AGC endocerykalnych.

Ocena końcowa	N	HPV								Test Chi ² p
		Brak		Wp		Np		Wp+Np		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Norma	18	15	83,3	2	11,1	1	5,6	0	0	NS
CIN1	3	1	33,3	2	66,7	0	0	0	0	
Polip szyjkowy	5	4	80	0	0	1	20	0	0	
Rak gruczołowy, rozrost atypowy złożony błony śluzowej	0	--	--	--	--	--	--	--	--	

Tab. 20. Typ infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego a rodzaj nieprawidłowości w podgrupie AGC endometrialnych.

Ocena końcowa	N	HPV								Test Chi ² p
		Brak		Wp		Np		Wp+Np		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Norma	0	--	--	--	--	--	--	--	--	NS
CIN2 i CIN3	4	0	0	4	100	0	0	0	0	
Polip szyjkowy	0	--	--	--	--	--	--	--	--	
Rak gruczołowy, rozrost atypowy złożony endometrium	5	0	0	4	100	0	0	1	20	

Nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu typu reakcji hormonalnej na obecność i przemiany AGC w czasie 3-letniego okresu obserwacji (Tab. 21).

Tab. 21 Zależność pomiędzy typem reakcji hormonalnej a remisją AGC w rozmazach cytologicznych.

K	Badanie cytologiczne				Test Chi ² p
	Reakcja estrogenna		Atrofia		
	n/N	%	n/N	%	
1	9/21	42,9	5/14	35,7	NS
2	9/11	81,8	6/6	100	NS
3	8/9	88,9	6/6	100	NS
4	7/9	77,8	6/6	100	NS
5	6/8	75	6/6	100	NS
6	6/7	85,7	6/6	100	NS
7	6/6	100	6/6	100	NS
8	6/6	100	6/6	100	NS
9	6/6	100	6/6	100	NS
10	6/6	100	6/6	100	NS
11	6/6	100	6/6	100	NS
12	6/6	100	6/6	100	NS

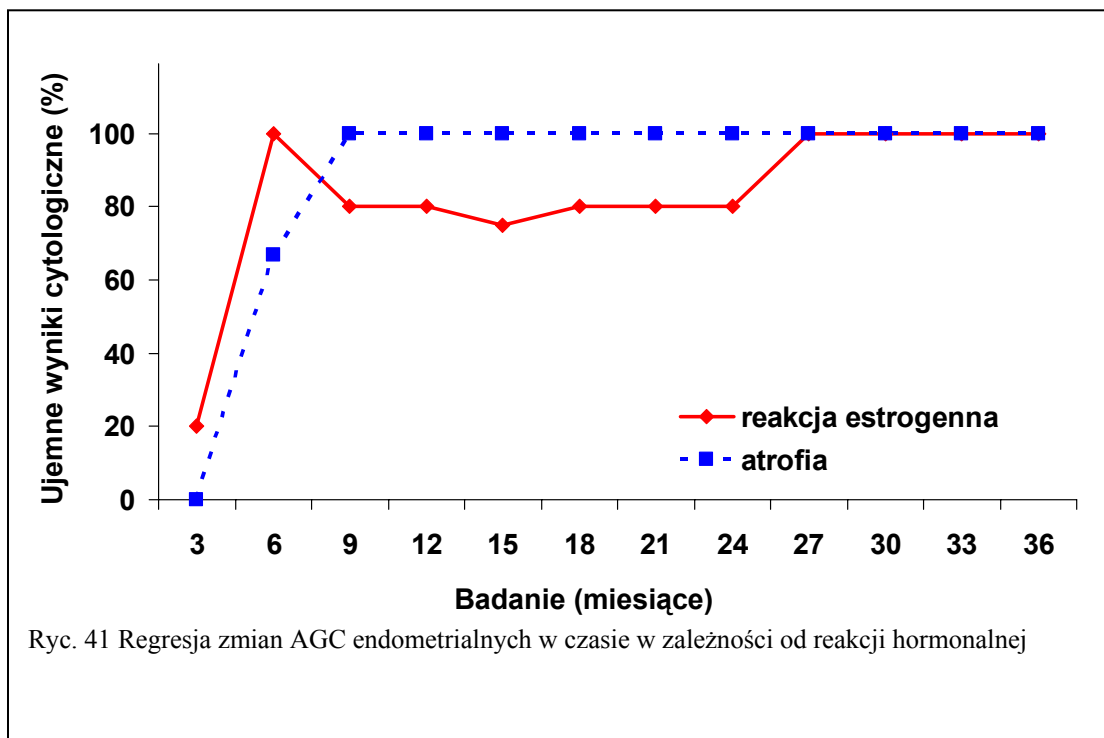
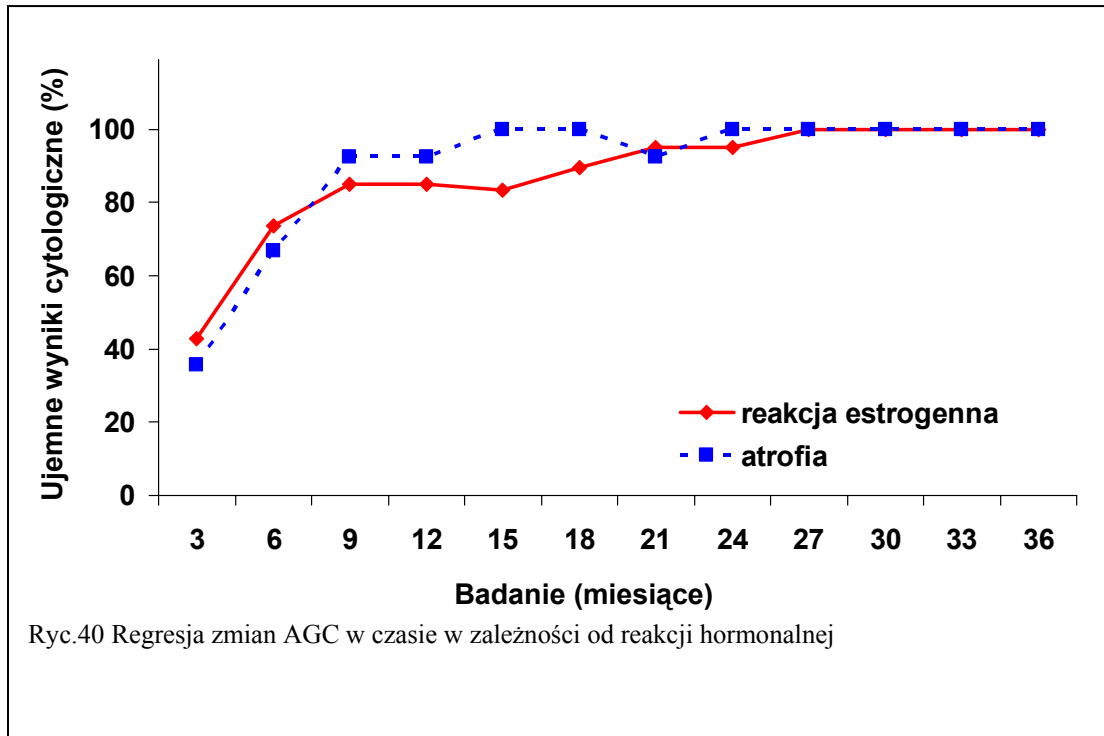
K - badanie kontrolne w 3 miesięcznych odstępach czasowych

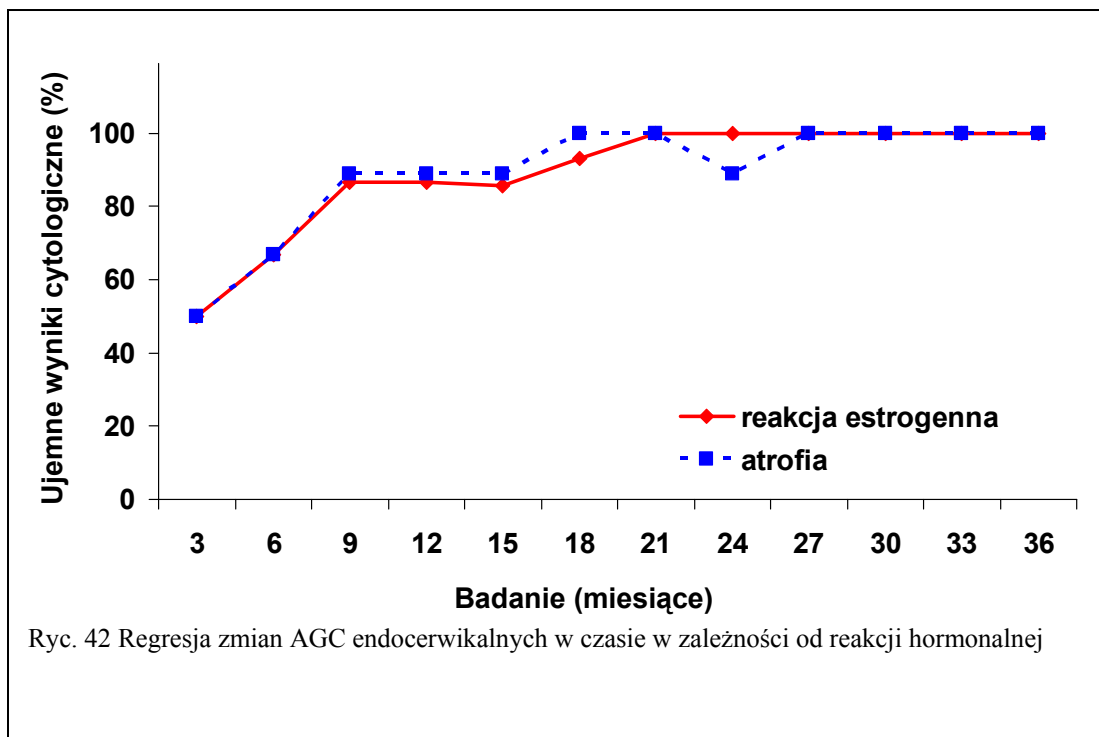
n - wynik prawidłowy w badaniu cytologicznym

N - grupa wszystkich kobiet z daną reakcją hormonalną

NS - nieistotnie statystycznie

Regresję AGC w czasie 36 miesięcznej obserwacji w zależności od reakcji hormonalnej przedstawiono na Ryc.40. Ryc. 41 i 42 przedstawiają zachowanie się poszczególnych podgrup tzn. AGC endometrialnych i endocerkwikalnych.



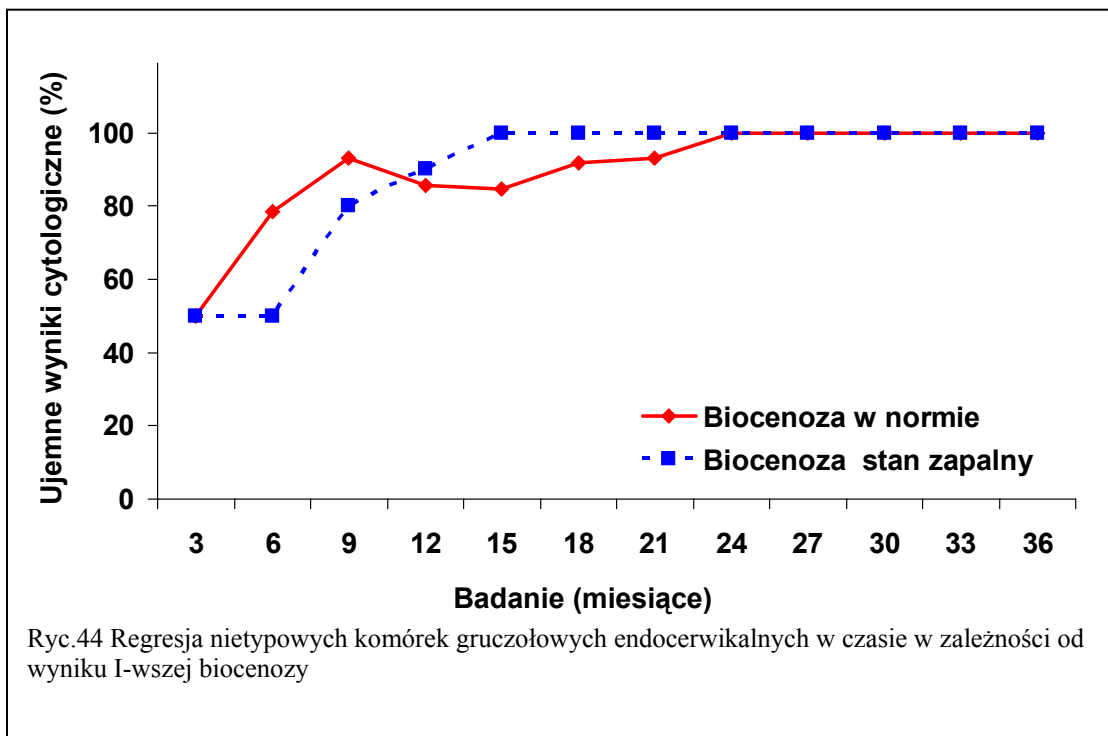
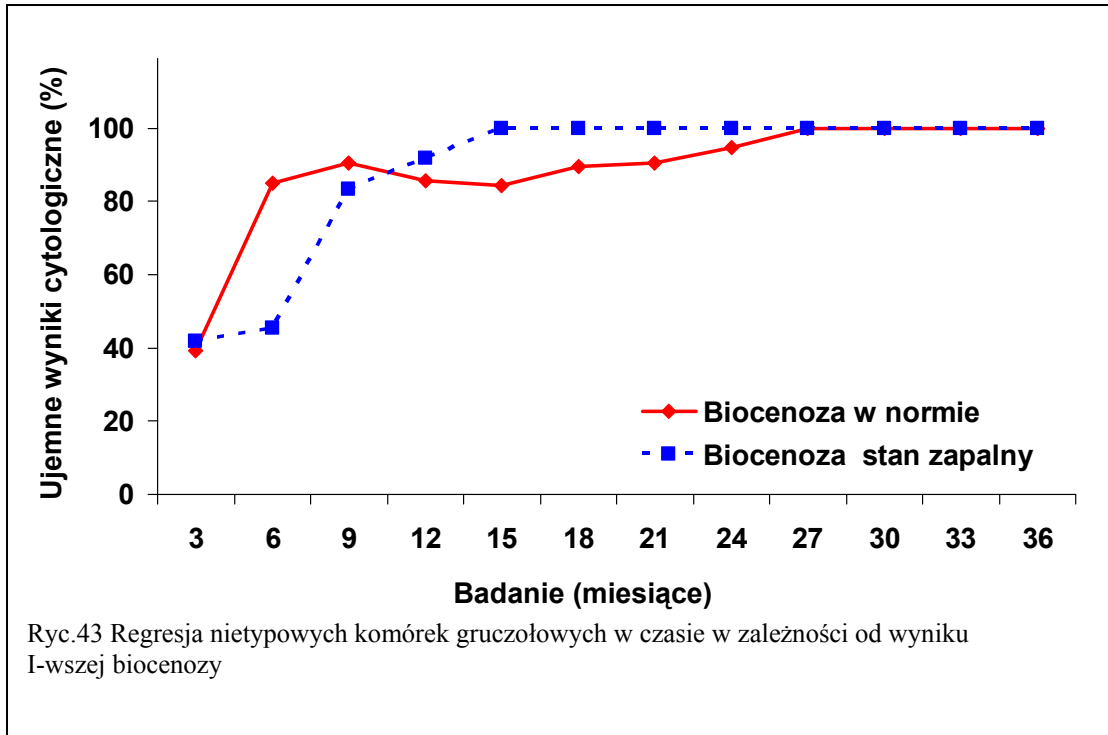


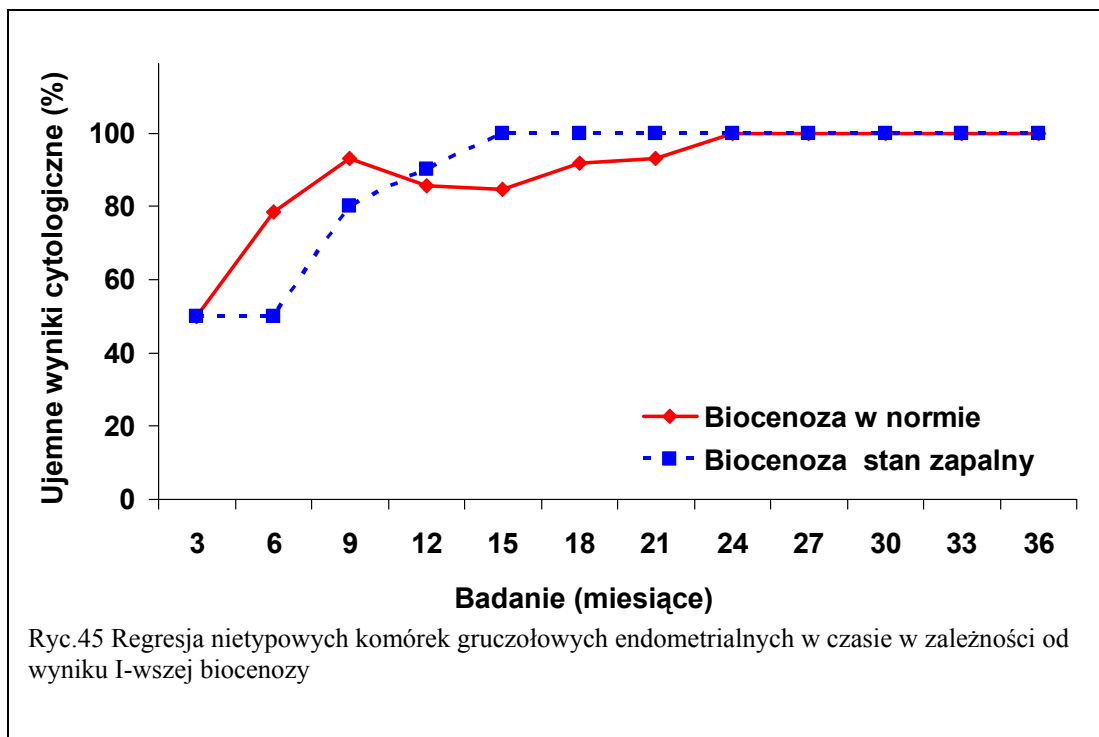
Zależność pomiędzy stopniem czystości pochwy a regresją AGC w czasie przedstawiono w tabeli 22 oraz na rycinach 43, 44, 45.

Tab.22 Wpływ biocenozy na regresję nieprawidłowości o charakterze nietypowych komórek gruczolowych w kolejnych badaniach cytologicznych.

K	Wynik prawidłowy badania cytologicznego				Test Chi ² p
	Flora prawidłowa		Flora nieprawidłowa		
	n/N	%	n/N	%	
1	9/23	39,1	5/12	41,7	NS
2	17/20	85,0	5/11	45,5	0,02
3	19/21	90,5	10/12	83,3	NS
4	18/21	85,7	11/12	91,7	NS
5	16/19	84,2	11/11	100	NS
6	17/19	89,5	11/11	100	NS
7	19/21	90,5	12/12	100	NS
8	18/19	94,7	8/8	100	NS
9	17/17	100	10/10	100	NS
10	18/18	100	11/11	100	NS
11	15/15	100	7/7	100	NS
12	22/22	100	13/13	100	NS

K-badanie kontrolne w odstępach 3-miesięcznych
 Flora prawidłowa - I i II^o czystości pochwy
 Flora nieprawidłowa - III i IV^o czystości pochwy.
 n- liczba pacjentek z prawidłowym wynikiem badania cytologicznego
 N- całkowita liczebność grupy





Zachowanie się ASC w trakcie 12 kolejnych obserwacji cytologicznych

wykonywanych co 3 miesiące przedstawia tab. 23.

Tab.23 Rozkład wyników badań cytologicznych ciągu 36-miesięcznej obserwacji u kobiet z ASC

K	n	Norma	ASC	LSIL	HSIL
1	207	119 - 57,5%	59 - 28,5%	21 - 10,1%	8 - 3,9%
2	166	164 - 98,79%	2 - 1,21%	0	0
3	149*	143 - 95,97%	6 - 4,03%	0	0
4	160	159 - 99,38%	1 - 0,62%	0	0
5	160	159 - 99,38%	1 - 0,62%	0	0
6	159	156 - 98,1%	3 - 1,9%	0	0
7	159	157 - 98,7%	2 - 1,3%	0	0
8	149*	149 - 100%	0	0	0
9	159	159 - 100%	0	0	0
10	155*	155 - 100%	0	0	0
11	146*	145 - 99,32	0	1 - 0,68%	0
12	158	158-100%	0	0	0

K - kontrolne badanie cytologiczne wykonywane w odstępach 3 miesięcznych

n- liczba kobiet z ASC zgłaszających się na kontrolne badanie cytologiczne

ASC - nietypowe komórki płaskonabłonkowe

LSIL – zmiany śródnabłonkowe małego stopnia

HSIL – zmiany śródnabłonkowe dużego stopnia

*na 3, 8, 10 i 11 wizycie nie zgłosiło się odpowiednio 17, 10, 4, 13 kobiet (okres między kontrolnymi cytologiami nie był dłuższy niż 6 miesięcy)

W trakcie pierwszej kontroli cytologicznej u 119 (57,5%) kobiet stwierdzono prawidłowy wynik badania cytologicznego. Utrzymywanie się zmian o charakterze ASC stwierdzono u 59 (28,5%) kobiet, u 21(10,1%) stwierdzono obecność w rozmazie LSIL, a u 8 (3,9%) HSIL. W sumie u 88 (42,5%) kobiet z grupy ASC w trakcie pierwszego kontrolnego badania cytologicznego stwierdzono nieprawidłowości dotyczące nabłonka wielowarstwowego płaskiego. U wszystkich 88 kobiet, u których wykazano powtórne występowanie ASC, lub zmiany o większym nasileniu wykonano badanie kolposkopowe. W 47(53,4%) przypadkach wynik badania kolposkopowego był prawidłowy, w 40 (45,5%) stwierdzono nieprawidłowe obrazy kolposkopowe, w 1 (1,1%) przypadku stwierdzono obraz sugerujący obecność raka inwazyjnego. U 41 kobiet pobrano materiał do badania histologicznego. U 25 kobiet zdiagnozowano CIN1, u 8 CIN2, u 7 CIN3, a u 1 raka płaskonabłonkowego szyjki macicy. Zweryfikowaną histologicznie grupę kobiet wyłączono z dalszej obserwacji cytologicznej ASC. Zostały one poddane leczeniu oraz dalszej kontroli onkologicznej, a wyniki badań cytologicznych w tej grupie przedstawiono w tabeli 29.

Drugą kontrolą cytologiczną objęto 166 kobiet. U 164 (98,79%) wynik badania cytologicznego był prawidłowy, u 2(1,21%) stwierdzono obecność ASC (ASC-US). U 2 kobiet, u których stwierdzono ponowne pojawienie się w rozmazie ASC wykonano badanie kolposkopowe, w których stwierdzono prawidłowe obrazy kolposkopowe. W trakcie trzeciej wizyty kontrolnej badanie cytologiczne wykonano u 149 kobiet, gdyż 13 nie zgłosiło się na wizytę kontrolną. U 143 (95,97%) nie stwierdzono nieprawidłowości w badaniu cytologicznym, u 6 (4,03%) obecne były ASC w tym u 1 ASC-H i u 5 ASC-US. U 6 ww. kobiet kolposkopia wykazała obecność nieprawidłowych obrazów kolposkopowych, a w materiale z biopsji celowanych stwierdzono: u 5 kobiet z ASC-US CIN1, a w 1 przypadku z obecnością ASC-H CIN2.

Czwartym badaniem kontrolnym objęto 160 kobiet. U 159 (99,38%) kobiet wynik badania cytologicznego był prawidłowy, natomiast u 1(0,62%) stwierdzono ASC. Wykonana kolposkopia nie ujawniła patologii. W trakcie 5 wizyty badanie cytologiczne wykonano u 160 kobiet, stwierdzając u 159 (99,38%) prawidłowy wynik badania cytologicznego, natomiast u 1 (0,62%) ASC. U kobiety, u której stwierdzono ASC (podtyp ASC-H) w wykonanym badaniu kolposkopowym stwierdzono nieprawidłowe obrazy kolposkopowe, a w wycinkach celowanych CIN1. Szósta wizyta kontrolna wykazała ponowne pojawienie się nieprawidłowości o charakterze ASC (podtyp ASC-US) u 3 (1,9%) kobiet, podczas gdy u 156 (98,1%) wynik badania cytologicznego był prawidłowy. W trakcie 7 wizyty poza utrzymywaniem się ASC (podtyp ASC-US) u 2 (1,26%) kobiet, rozmazy pochwowo-szyjkowe pozostałych 157 (98,74%) kobiet objętych badaniem nie wykazało patologii. U kobiet z ASC utrzymującym się w badaniu cytologicznym wykonano badanie kolposkopowe, które nie wykazało odchyłeń od stanu prawidłowego. Na 8 i 9 wizycie badanie cytologiczne nie wykazało nieprawidłowości u 159 (100%) przebadanych kobiet. Na 10 wizytę nie zgłosiły się 4 kobiety, a u pozostałych 155 (100%) wynik badania był prawidłowy. Na 11 wizycie kontrolnej wykonano cytologię u 146 kobiet (13 nie zgłosiło się na badanie kontrolne). U 145 wynik badania cytologicznego był ujemny, a w 1 przypadku stwierdzono LSIL, potwierdzony w badaniach kolposkopowych – nieprawidłowe obrazy kolposkopowe, a następnie w badaniu histologicznym (CIN1). Po 36 miesiącach od rozpoczęcia obserwacji u 158 (100%) kobiet nie stwierdzono nieprawidłowości w badaniu cytologicznym. Występowanie poszczególnych nieprawidłowości w kolejnych rozmazach szyjkowych w poszczególnych podgrupach ASC przedstawiono w tabelach (ASC-US Tab.24 i ASC-H Tab.25).

Tab.24 Wyniki badań cytologicznych w kolejnych badaniach kontrolnych w grupie kobiet z ASC-US

K	N	Wyniki badań cytologicznych				
		Prawidłowy	ASC- US	ASC- H	LSIL	HSIL
1	195	114 - 58,5%	56 - 58,7%	0	20 -10,3%	5 -2,5%-
2	159	157 -98,7 %	2- 1,3%	0	0	0
3	145	140 -96,6 %	5- 3,4%	0	0	0
4	154	153 – 99,4%	1-0,6%	0	0	0
5	154	154 - 100%	0	0	0	0
6	154	151-98,1%	3-1,9%	0	0	0
7	154	152-98,7%	2 – 1,3%	0	0	0
8	144	144 - 100%	0	0	0	0
9	154	154 - 100%	0	0	0	0
10	150	150- 100%	0	0	0	0
11	141	140-99,3%	0	0	1-0,7%	0
12	153	153 - 100%	0	0	0	0

K - kontrolne badanie cytologiczne wykonywane w odstępach 3 miesięcznych

N- liczba kobiet z ASC zgłaszających się na kontrolne badanie cytologiczne

Tab.25 Wyniki badań cytologicznych w kolejnych badaniach kontrolnych w grupie kobiet z ASC-H

K	N	Wyniki badań cytologicznych				
		Prawidłowy	ASC US	ASC H	LSIL	HSIL
1	12	5 (41,7%)	0	3 (25,0%)	1 (8,3%)	3 (25,0%)
2	7	7(100%)	0	0	0	0
3	4	3(75%)	0	1(25%)	0	0
4	5	5 (100%)	0	0	0	0
5	6	5(83,3%)	0	1(16,7%)	0	0
6	5	5 (100%)	0	0	0	0
7	5	5 (100%)	0	0	0	0
8	5	5 (100%)	0	0	0	0
9	5	5(100%)	0	0	0	0
10	5	5 (100%)	0	0	0	0
11	5	5 (100%)	0	0	0	0
12	5	5 (100%)	0	0	0	0

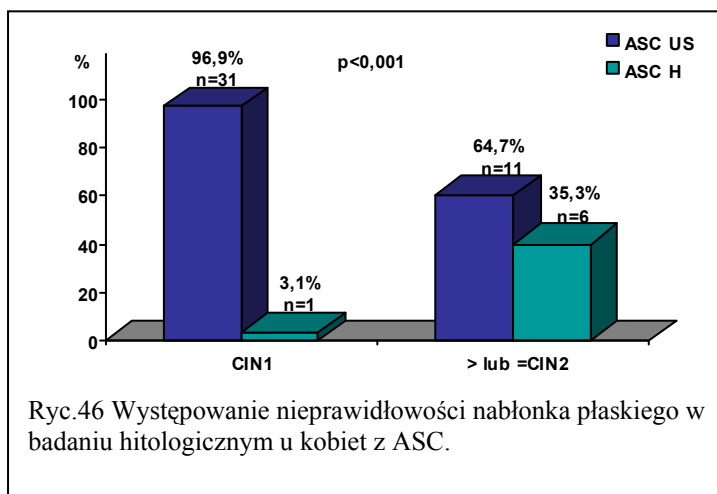
W grupie pacjentek z ASC po zakończeniu obserwacji u 158 (76,3%) nie stwierdzono patologii. U 32 kobiet (15,5%) w wyniku przeprowadzonych procedur diagnostycznych

stwierdzono nieprawidłowości dotyczące nabłonka wielowarstwowego płaskiego pod postacią CIN1, natomiast u 17 kobiet (8,2%) nieprawidłowości o charakterze CIN 2, CIN 3 i raka płaskonabłonkowego. U żadnej z pacjentek nie stwierdzono patologii dotyczącej nabłonka gruczołowego. Wyniki analizy dotyczącej patologii nabłonka przedstawiono w tabeli 26. U 11 (5,6%) kobiet z ASC-US spośród 195 osobowej grupy stwierdzono nieprawidłowości \geq CIN2, w porównaniu do 6 (50%) kobiet z dwunastoosobowej grupy kobiet z ASC-H. W grupie z ASC-US w 7 przypadkach stwierdzono CIN2, a w 4 CIN3. U kobiet z ASC-H u 2 zdiagnozowano CIN2, u 3 CIN3 i u 1 raka płaskonabłonkowego szyjki macicy. Spośród 32 CIN1 stwierdzonych w grupie ASC, 31 (96,9%) stwierdzono w podgrupie ASC-US.

Tab. 26. Charakterystyka nieprawidłowości w punkcie końcowym obserwacji u kobiet z nietypowymi komórkami płaskonabłonkowymi w rozmazie szyjkowym.

Ocena zmiany – wynik końcowy	ASC-US		ASC-H		Razem ASC	
	n	%	n	%	n	%
Wynik prawidłowy	153	78,5	5	41,7	158	76,3
CIN1	31	15,9	1	8,3	32	15,5
\geq CIN2	11	5,6	6	50	17	8,2
RAZEM	195	100	12	100	207	100

Porównanie graficzne nieprawidłowości stwierdzanych u kobiet z ASC pod względem znaczenia klinicznego, z uwzględnieniem wydzielonych podtypów ASC-US i ASC-H przedstawiono na Ryc.46.



Częstość regresji, utrzymywania się stanu stacjonarnego oraz progresji zmian w badaniach cytologicznych w grupie kobiet z ASC przedstawiono w Tab.27. Z analiz kolejnych kontrolnych cytologii w wyznaczonych trzechmiesięcznych odstępach czasowych wyłączano kobiety, u których zgodnie z protokołem postępowania przeprowadzono weryfikację histologiczną. Odsetek regresji i progresji w grupie ASC na podstawie weryfikacji histologicznej przedstawiono w osobnej tabeli (Tab.28). W tej grupie kontynuowano kontrolę cytologiczną – wyniki przedstawiono w tabeli (Tab.29).

Tab. 27. Zachowanie się zmian typu ASC w trakcie 36 miesięcznej obserwacji.

K	ASC	N	Regresja		Stan stacjonarny		Progresja		Test Chi ²
			n	%	n	%	n	%	p
1	US	195	114	58,5	56	28,7	25	12,8	NS
	H	12	5	41,7	3	25,0	4	33,3	
2	US	159	157	98,7	2	1,3	0	0	NS
	H	7	7	100	0	0	0	0	
3	US	145	140	96,6	5	3,4	0	0	<0,001
	H	4	3	75	1	25	0	0	
4	US	159	153	96,2	1	3,8	0	0	NS
	H	6	6	100	0	0	0	0	
5	US	154	154	100	0	0	0	0	NS
	H	6	5	83,3	1	16,7	0	0	
6	US	154	151	98,1	3	1,9	0	0	NS
	H	5	5	100	0	0	0	0	
7	US	154	152	98,7	2	1,3	0	0	NS
	H	5	5	100	0	0	0	0	
8	US	144	144	100	0	0	0	0	NS
	H	5	5	100	0	0	0	0	
9	US	154	154	100	0	0	0	0	NS
	H	5	5	100	0	0	0	0	
10	US	150	150	100	0	0	0	0	NS
	H	5	5	100	0	0	0	0	
11	US	141	140	99,3	0	0	1	0,7	NS
	H	5	5	100	0	0	0	0	
12	US	153	153	100	0	0	0	0	NS
	H	5	5	100	0	0	0	0	

ASC-US-nietypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu

ASC -H-nietypowe komórki płaskonabłonkowe nie można wykluczyć HSIL

NS-nieistotne statystycznie

Tab. 28 Weryfikacja histologiczna ASC.

K	ASC	N	Regresja		Progresja	
			n	%	n	%
1	US	36	0	0	36(25 CIN1, 7 CIN2, 4 CIN3)	100
	H	5	0	0	5 (1 CIN2, 3CIN3, 1 rak płaskonabłonkowy)	100
2	US	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0
3	US	5	0	0	5 (5CIN1)	100
	H	1	0	0	1 (1 CIN2)	100
4	US	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0
5	US	0	0	0	0	0
	H	1	0	0	1 (1 CIN1)	100
6	US	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0
7	US	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0
8	US	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0
9	US	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0
10	US	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0
11	US	1	0	0	1 (1 CIN1)	100
	H	0	0	0	0	0
12	US	0	0	0	0	0
	H	0	0	0	0	0

N-liczba kobiet z ASC, u których wykonano badanie histologiczne zgodnie z protokołem badania

Tab.29 Obserwacja cytologiczna kobiet wyłączonych z grupy badanej ASC po weryfikacji histologicznej w kolejnych miesiącach.

K	N	Wyniki badań cytologicznych			
		Prawidłowy	ASC	LSIL	HSIL
6mies	41	25 - 61%	2-4,9%	14-34,1%	0
9mies	37*	35 -94,6%	0	2 -5,4%	0
12mies	40*	39 – 97,5%	1-2,5%	0	0
15mies	43*	41-95,3	1-2,35%	1-2,35%	0
18mies	48*	45-93,7%	2-4,2%	1-2,1%	0
21mies	42*	42 -100%	0	0	0
24mies	49	49 -100%	0	0	0
27mies	49	48-97,9%	1-2,1%	0	0
30mies	49	48-97,9%	0	1-2,1%	0
33mies	49	47-95,9%	0	2-4,1%	0
36mies	49	47-95,9%	0	2-4,1%	0

* 4 , 5 , 4, 2 , 6 nie zgłosiły się na kontrolę.

Spośród 17 kobiet z nieprawidłowościami \geq CIN2 z grupy ASC u 17(100%) stwierdzono zakażenie wirusem HPV w tym najczęściej dotyczyło to podtypów o wysokim potencjale onkogennym – u 13 kobiet (76,5%), u 3 (17,6%) stwierdzono infekcję oboma typami, natomiast tylko u 1 (5,9%) niskoonkogenne wirusy HPV (Tab.31). Różnica ta była istotna statystycznie ($p \leq 0,001$). U kobiet z nieprawidłowościami \leq CIN2 infekcję wirusem HPV stwierdzono u 27 (84,4%), w tym u 14 (43,8%) była to infekcja wirusami wysokoonkogennymi, u 8 (25%) niskoonkogennymi, a u 5 (15,6%) mieszana. U kobiet, u których nie stwierdzono nieprawidłowości u 114 (72,2%) nie wykryto DNA HPV, u 20 (12,7%) materiał genetyczny wirusów wysokoonkogennych, u 18 (11,4%) niskoonkogennych a u 6 (3,7%) oboma typami wirusa. (Tab.30).

Tab. 30. Typ infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego a rodzaj nieprawidłowości w badaniu końcowym w całej grupie pacjentek z ASC.

Ocena końcowa	N	HPV								Test Chi ² p
		Brak		Wp		Np		Wp+Np		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Norma	158	114	72,2	20	12,7	18	11,4	6	3,7	<0,001
CIN1	32	5	15,6	14	43,8	8	25	5	15,6	
≥CIN2	17	0	0	13	76,5	1	5,9	3	17,6	

N - liczebność grupy

Wp – infekcja HPV o wysokim potencjale onkogennym

Np – infekcja HPV o niskim potencjale onkogennym

Zależność pomiędzy typem infekcji wirusowej a rodzajem zmiany stwierdzanej w badaniach kontrolnych dla podgrup ASC-US i ASC-H przedstawiono w tabelach 31 i 32.

Tab. 31. Typ infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego a rodzaj nieprawidłowości w badaniu końcowym w podgrupie ASC-US.

Ocena końcowa	N	HPV								Test Chi ² p
		Brak		Wp		Np		Wp+Np		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
Norma	153	112	73,2	17	11,1	18	11,8	6	3,9	<0,001
CIN1	31	5	16,1	14	45,2	8	25,8	4	12,9	
≥CIN2	11	0	0	8	72,7	1	11,1	2	22,2	

Tab. 32. Typ infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego a rodzaj nieprawidłowości w badaniu końcowym w podgrupie ASC-H (zbyt mała liczebność dla ustalenia istotności statystycznej różnic).

Ocena końcowa	N	HPV							
		Brak		Wp		Np		Wp+Np	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Norma	5	2	40	3	60	0	0	0	0
CIN1	1	0	0	0	0	0	0	1	100
≥CIN2	6	0	0	5	83,3	0	0	1	16,7

Spośród 34 kobiet z ASC, u których stwierdzono atrofię w rozmazie pochwowo-szyjkowym u 27 (79,4%) nie stwierdzono utrzymywania się nieprawidłowości na pierwszej wizycie kontrolnej, natomiast u 173 kobiet, u których reakcja pochwy oceniona została jako estrogenna u 92(53,2%) stwierdzono regresję nieprawidłowości. Jedynie w trakcie pierwszej wizyty kontrolnej różnica ta była istotna statystycznie na poziomie istotności $p=0,001$. Nie stwierdzono istotnego statystycznie wpływu typu reakcji hormonalnej na zachowanie się ASC w trakcie dalszego 3-letniego okresu obserwacji (Tab. 33).

Tab. 33 Zależność pomiędzy typem reakcji hormonalnej w rozmazie cytologicznym a regresją ASC.

K	Badanie cytologiczne				p
	Reakcja estrogenna		Atrofia		
	n/N	%	n/N	%	
1	92/173		27/34		0,001
2	137/138		27/28		NS
3	117/121		26/28		NS
4	133/133		26/27		NS
5	132/133		27/27		NS
6	129/132		27/27		NS
7	130/132		27/27		NS
8	125/125		24/24		NS
9	132/132		27/27		NS
10	130/130		25/25		NS
11	120/121		25/25		NS
12	131/131		27/27		NS

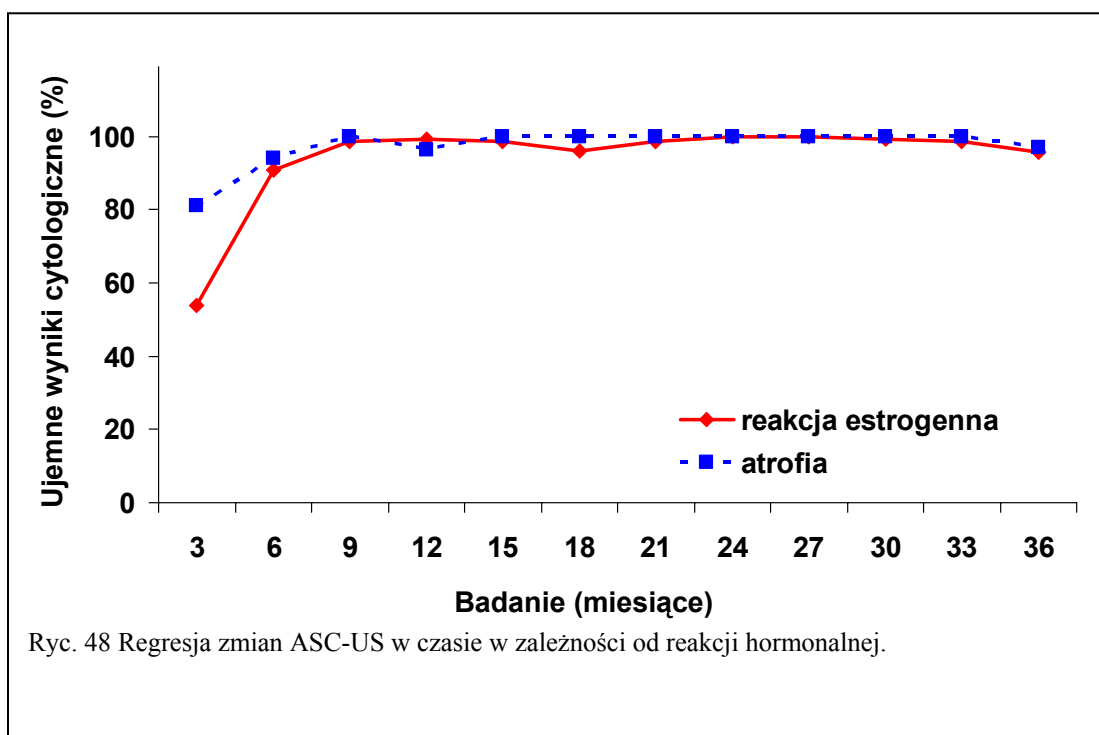
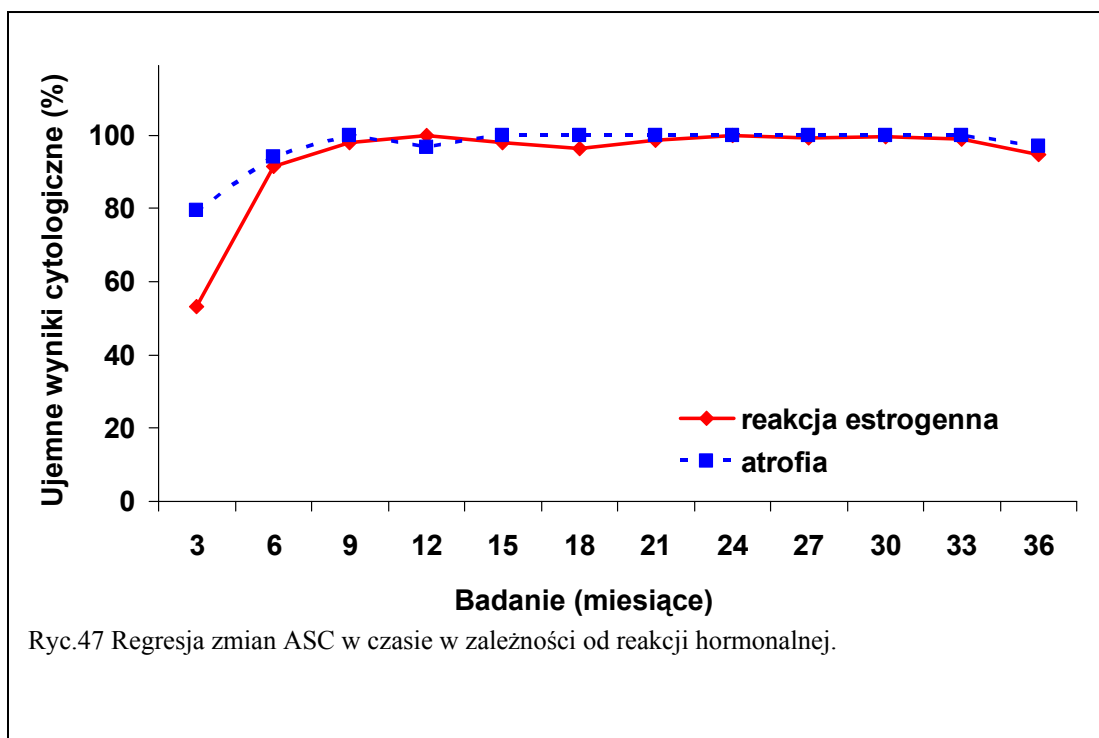
K-badanie kontrolne w 3 miesięcznych odstępach czasowych

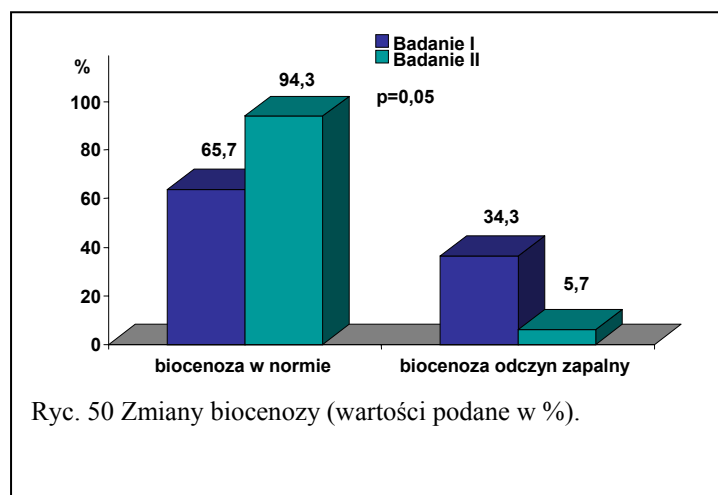
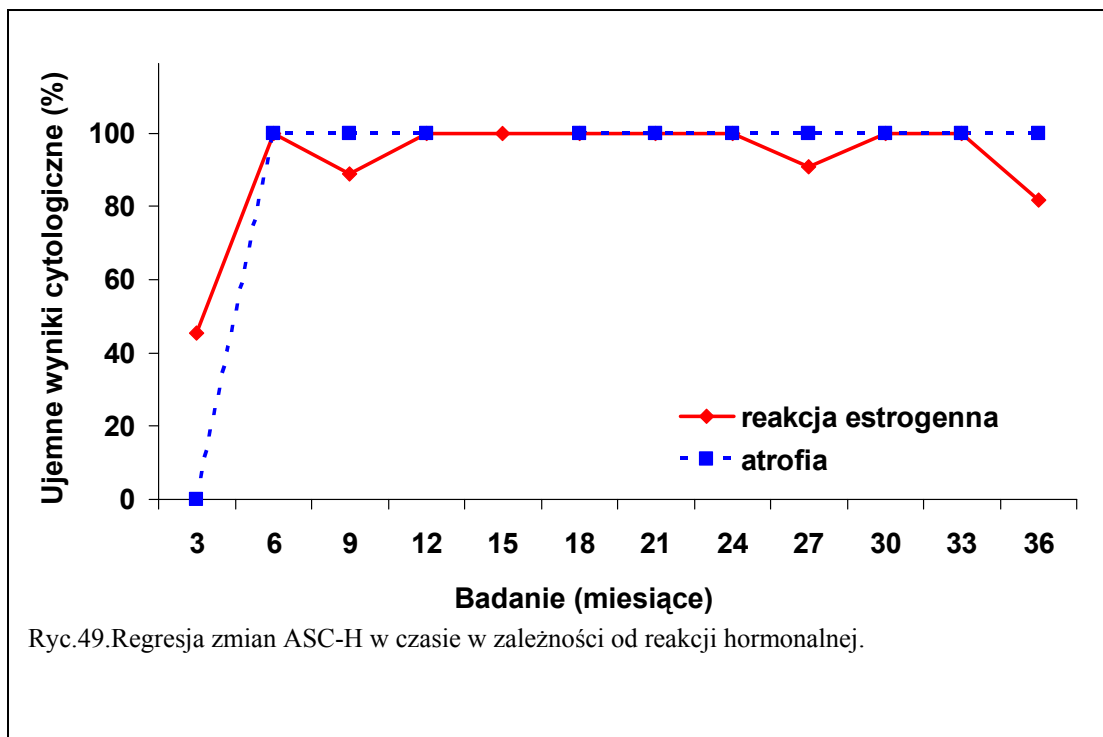
n-wynik prawidłowy badania cytologicznego

N-grupa wszystkich kobiet z daną reakcją hormonalną

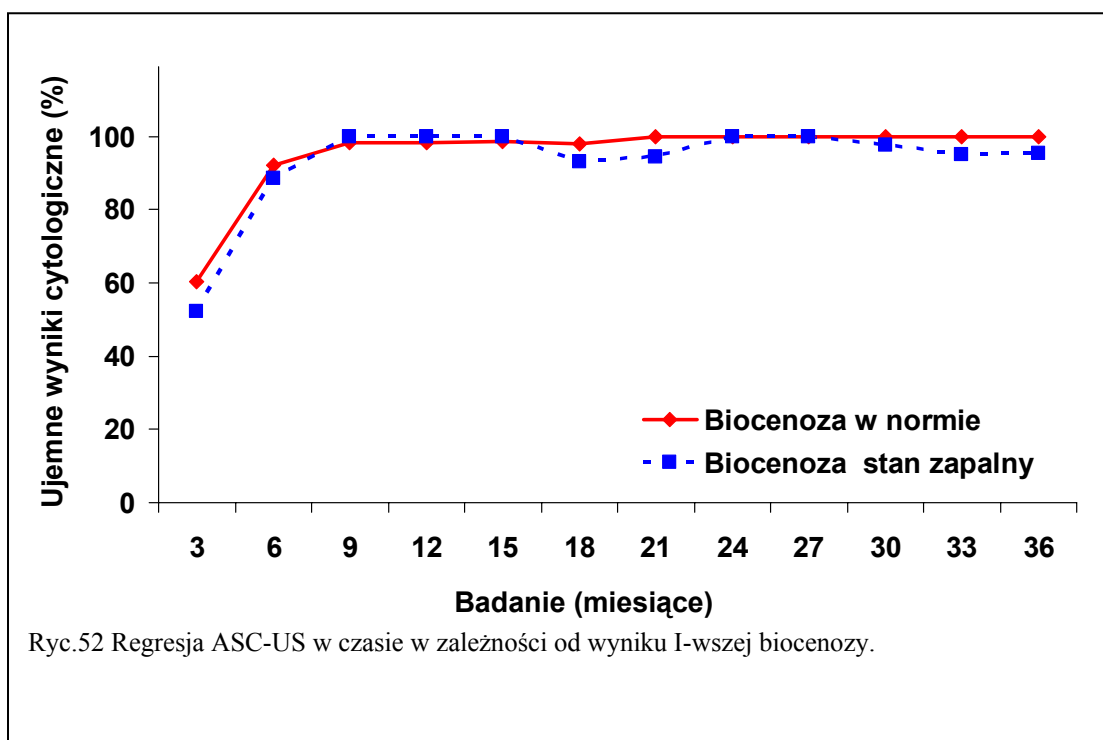
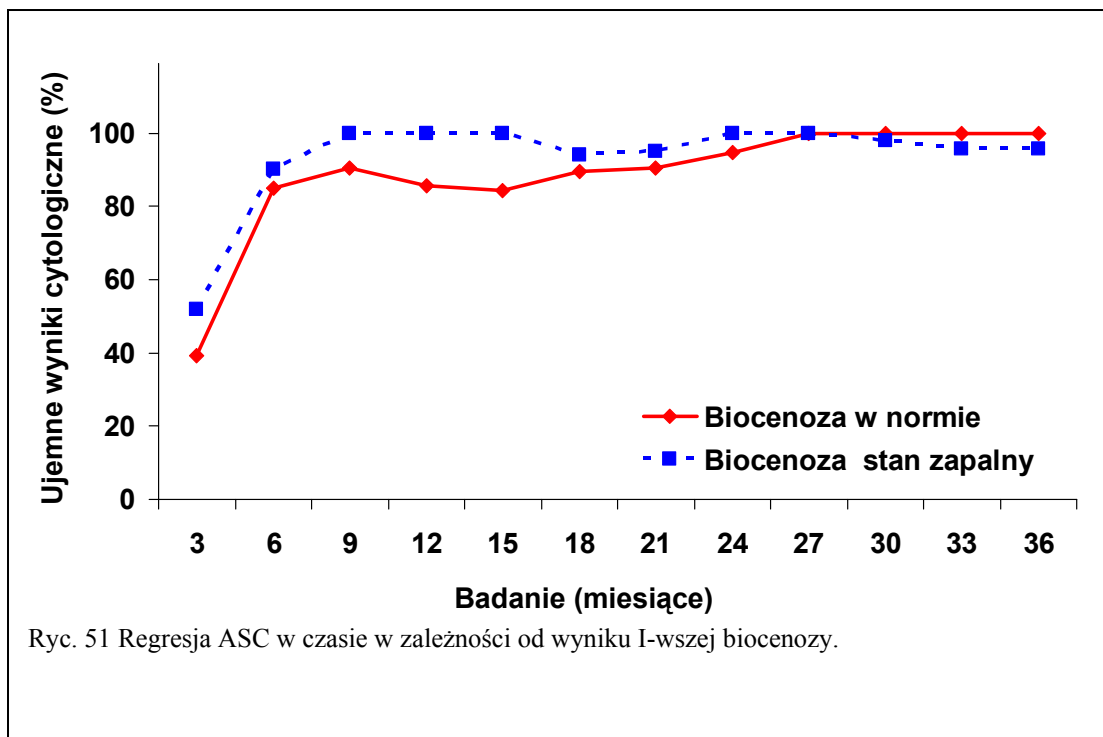
NS-nieistotne statystycznie

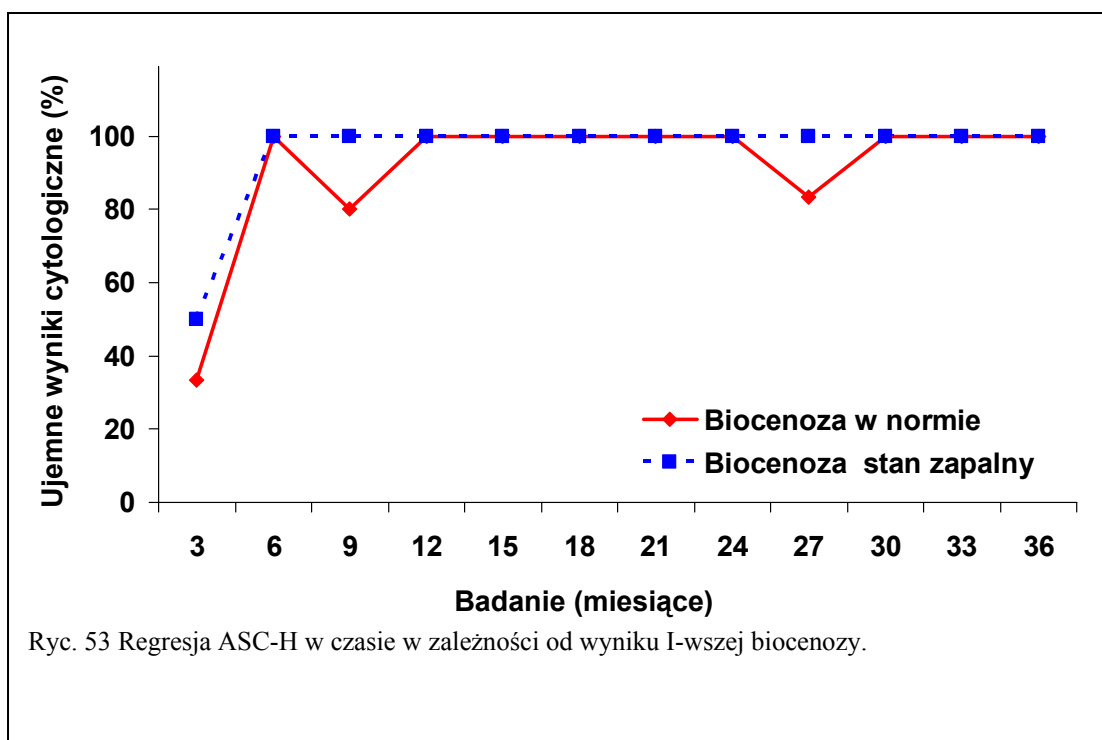
Regresję ASC w czasie 36 miesięcznej obserwacji w zależności od reakcji hormonalnej przedstawiono na Ryc. 47. Ryc. 48 i 49 przedstawiają zachowanie się poszczególnych podgrup tzn. ASC-US i ASC-H w czasie.





Zależność pomiędzy stopniem czystości pochwy a regresją ASC w czasie przedstawiono na Ryc. 51, 52, 53.





5. OMÓWIENIE WYNIKÓW. DYSKUSJA.

Jednym z największych osiągnięć medycyny XX wieku pozostaje bezsprzecznie wprowadzenie cytodiagnostyki pochwowo-szyjkowej. Jej twórca George Nicolaous Papanicolaou nie tylko zwrócił uwagę na możliwość wykorzystania oceny złuszczonego nabłonka szyjki macicy i pochwy w diagnostyce raka szyjki macicy. Stworzył również czytelny, pięciostopniowy system klasyfikacji rozmazów. Wraz z upływem czasu klasyfikacja ta budziła coraz więcej zastrzeżeń. Nie tylko dlatego, iż nie uwzględniała aktualnej wiedzy na temat procesów karcynogenezy w obrębie szyjki macicy oraz nieprawidłowości nabłonka gruczołowego szyjki macicy. Najbardziej problematyczna i budząca najwięcej zarzutów okazała się grupa II w klasyfikacji Papanicolaou. Zaliczono do niej m.in. różnorodne zmiany związane z procesami odczynowymi i naprawczymi będące wynikiem działania czynników zapalnych, ale także szerokie spektrum zmian związanych z infekcją brodawczaka ludzkiego (20,21). Włączenie tych nieprawidłowości do grupy II, która jest uznawana za prawidłową, a więc obejmuje fizjologiczne procesy zachodzące w obrębie szyjki macicy okazało się błędem (33,49,53,54,100,101,129,135,136). Chęć wyeliminowania niedoskonałości klasyfikacji Papanicolaou doprowadziła do podjęcia prób jej modyfikacji. Jedną z nich był opracowany przez Niemieckie Towarzystwo Cytologiczne system Monachijski. Zasadniczą zmianą było przeniesienie w nieprawidłowości do grupy III. Obejmowała ona niejasne obrazy komórkowe, będące najprawdopodobniej wynikiem ciężkich zmian zapalnych i zwyrodnieniowych, lub poważnych zmian wstecznych mogących być wynikiem istniejącego już stanu przedrakowego lub raka (44,106). Wydzielono w niej również podgrupę IIID, którą stanowiły komórki z cechami dysplazji małego i średniego stopnia. Zakwalifikowanie tych niejasnych obrazów komórkowych do grupy trzeciej, oraz opracowanie standardów postępowania u kobiet z takimi komórkami w rozmazie polegających na intensywnej kontroli cytologicznej, a w razie powtarzania się nieprawidłowości wykonania kolposkopii i badania

histologicznego wskazywały na lepsze zrozumienie ich znaczenia i ewentualnego udziału w tworzeniu poszczególnych stopni karcynogenezy szyjki macicy. Wieloletnie badania nad procesem nowotworzenia w obrębie dolnego odcinka żeńskiego narządu płciowego wykazały, iż zasadnicze znaczenie w tym procesie ma przetrwałe zakażenie wirusami brodawczaka ludzkiego o wysokim potencjale onkogennym. W ostatnich latach stwierdzono również wzrost postaci gruczołowej raka szyjki macicy (7). Stąd kolejnym krokiem w udoskonaleniu systemów oceny rozmazów cytologicznych było stworzenie nowej klasyfikacji, którą nazwano systemem Bethesda. Uwzględnił on w swojej terminologii nie tylko zmiany morfologiczne związane z infekcją HPV. Wprowadził również dwie nowe grupy rozpoznania: atypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu (ASCUS – *atypical squamous cells of undetermined significance*) oraz atypowe komórki gruczołowe o nieokreślonym znaczeniu (AGUS – *atypical glandular cells of undetermined significance*). W skład tych nieprawidłowości wchodziły wszystkie te zmiany dotyczące komórek płaskonabłonkowych i gruczołowych, w których nasilenie nieprawidłowości nie było wystarczające by rozpoznać zmiany płaskonabłonkowe śródnabłonkowe (SIL) czy raka gruczołowego. Wprowadzony w 1989 roku system Bethesda, którego celem było zastąpienie przestarzałego systemu oceny rozmazów cytologicznych według Papanicolaou początkowo cechował się dużą zmiennością i dowolnością interpretacyjną rozmazów wśród cytodiagnostów, a także wysokim odsetkiem nieprawidłowości o charakterze ASCUS. Rozpoznanie to przez wielu traktowane było jak „śmieć diagnostyczny” (81,82), i często stawiane w sytuacji, kiedy niedoświadczony cytolog nie potrafił prawidłowo zinterpretować niejasnego obrazu cytologicznego. Odsetek tak stawianych rozpoznania stanowił w niektórych regionach nawet do 20% wszystkich rozpoznania cytologicznych (20,21).

Wprowadzenie dwóch nowych grup rozpoznania nie spotkało się ze zrozumieniem i akceptacją. Obejmowały one bowiem nieprawidłowości o niejasnym już z samej nazwy znaczeniu i

niewiadomej prognostyce. Początkowo zarówno ASCUS jak i AGUS nie spotkały się nawet z większym zainteresowaniem klinicystów, którzy traktowali te zmiany jako nieprawidłowości o łagodnym przebiegu, związane ze zmianami odczynowymi, uznając, iż jest to cytologiczny odpowiednik grupy II wg klasyfikacji Papanicolaou. Rozpowszechnienie systemu Bethesda, głównie w Stanach Zjednoczonych oraz badania i obserwacje zachowania się poszczególnych kategorii rozpoznań i lepsze zrozumienie ich znaczenia doprowadziły do kolejnych modyfikacji. Przede wszystkim wyeliminowano w terminologii określenie „o nieokreślonym znaczeniu” jako wprowadzające w błąd i sugerującą możliwe łagodne podłoże nieprawidłowości. Nadal jednak nie udało się ustalić rzeczywistego znaczenia zmian typu ASC czy AGC oraz metod weryfikacji tych nieprawidłowości. Od wielu lat uznane i powszechnie akceptowane są metody kolposkopowej i histologicznej weryfikacji i leczenia nieprawidłowości ocenianych cytologicznie jako zmiany śródnabłonkowe płaskonabłonkowe dużego stopnia (HSIL), oraz postępowanie bardziej zachowawcze w przypadku zmian śródnabłonkowych płaskonabłonkowych małego stopnia (LSIL). Ogólnie przyjętym faktem jest, iż zmiany o charakterze LSIL w wysokim odsetku przypadków (ok. 60%) ulegają samoistnej regresji, a także to, iż zmiany o charakterze dysplazji małego stopnia są morfologicznie trudne do odróżnienia od zmian charakterystycznych dla subklinicznej infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego (5,6,10,20,21,104,134). Jakie jest jednak znaczenie zmian, które wg systemu Bethesda w skali nasilenia nieprawidłowości dotyczących zmian nabłonka szyjki macicy umieszczane są zdecydowanie poniżej zmian śródnabłonkowych płaskonabłonkowych (LSIL i HSIL) i gruczołowych (AIS), a jednocześnie w trakcie dalszej, często krótko-terminowej obserwacji tych zmian, które określane są nietypowymi komórkami płaskonabłonkowymi (ASC) a szczególnie nietypowymi komórkami gruczołowymi (AGC), wykrywa się zmiany nawet o charakterze nowotworowym?

W naszym materiale w objętej programem skriningowym pięciostysięcznej niewyselekcjonowanej populacji kobiet z regionu Małopolski AGC stwierdzono w 0,7% przypadków. Jest to najrzadziej występująca kategoria rozpoznań cytologicznych (129). W badanej populacji ASC stwierdzono w 4,96% przypadkach, jest to więc najczęściej występująca nieprawidłowość w rozmazach pochwowo-szyjkowych.

Uzyskany odsetek AGC w naszym materiale nie przekracza wartości 1% wszystkich rozpoznań. Jest zgodny z tym podawanym w wytycznych przez zespół ekspertów National Cancer Institute dla laboratoriów cytodiagnostycznych stosujących system klasyfikacji Bethesda 2001 (129). Jest również zgodny z wartościami podawanymi w większości opracowań z tego zakresu (3,13,15,16,17,20,31,32,40,59,65,73,74,83,96,100,108,109,114,124,138). Podawana w literaturze częstość występowania AGC w rozmazach pochwowo-szyjkowych wynosi od 0,08 do 2,1% ze średnią wartością 0,5% (11,12,15,16,17,27,31,32,38,40,59,65,73,74,83,96,100,108,109,110,114,138,147,153).

Ze względu na zmiany nazewnictwa, definicji a także na fakt bardzo dowolnego podejścia interpretacyjnego w pracach sprzed 2001 roku trudno jest przeprowadzić porównanie dotyczące częstości występowania ASC. W analizowanym przez nas materiale częstość występowania tej grupy rozpoznań była podobna jak w największym do tej pory przeprowadzonym prospektywnym badaniu „ASCUS/LSIL Triage Study” (ALTS) sponsorowanym przez National Cancer Institute (116,122,123,124,129,130,132). Odsetek rozpoznań cytologicznych jakie stanowiły w naszym badaniu ASC mieści się również w zakresie dopuszczalnych wartości ustanowionych przez twórców systemu Bethesda 2001 dla laboratoriów cytologicznych, wskazuje więc na prawidłowo przeprowadzoną w naszym badaniu kwalifikację rozpoznań (129).

W naszym badaniu w grupie AGC dominowały te wywodzące się z nabłonka gruczołowego endocerywikalnego stanowiąc $\frac{3}{4}$ wszystkich AGC, podczas gdy podtyp

endometrialny występował istotnie statystycznie rzadziej (Diag.4). Podobnie częstsze występowanie AGC pochodzenia endocerykalnego stwierdził także Chieng (15,16), Hemelt (42) i Chin (18) a u Parellady (100) wszystkie AGC pochodziły z nabłonka endocerykalnego. Odwrotnie natomiast Tam (138) częściej stwierdzała AGC wywodzące się z endometrium niż z nabłonka gruczołowego szyjki macicy.

W grupie kobiet z ASC poddanych dalszej analizie u 94,2% stwierdzono nietypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu (ASC-US), natomiast w 5,8% nietypowe komórki płaskonabłonkowe nie można wykluczyć HSIL (ASC-H) (Diag.3). Rozkład odsetkowy (uwzględniający nazewnictwo systemu Bethesda 2001) był podobny jak w badaniu ALTS sponsorowanym przez National Cancer Institute (116,121,122,123,129,130, 132). Również w większości prac opublikowanych przed wprowadzeniem modyfikacji systemu Bethesda 2001 największy odsetek rozpoznań stanowiły nietypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu klasyfikowane jako zmiany odczynowe, reaktywne bądź inaczej niesklasyfikowane (ASCUS FR, ASCUS NOS 77-95%). Natomiast zmiany klasyfikowane jako nietypowe komórki płaskonabłonkowe o nieokreślonym znaczeniu prawdopodobnie zmiany nowotworowe (ASCUS FN) a więc te, które w obecnej klasyfikacji można by umieścić w podgrupie ASC-H stanowiły od 5-23% (1,2,24,46,51,64, 72,75,84,103,111,120,127,133,144). Wydaje się, iż różnice w częstości występowania tej podgrupy cytologicznej w pracach różnych autorów wynikają z stosowania różnych kryteriów cytologicznych m.in. w związku z modyfikacjami systemu Bethesda oraz różnic w populacjach kobiet objętych skriningiem (60).

W analizowanym przez nas materiale kobiety, u których stwierdzono AGC należały do istotnie statystycznie starszej grupy wiekowej, niż te z ASC (Ryc.5). Wszystkie kobiety z nietypowymi komórkami gruczołowymi w naszym badaniu były po czterdziestym roku życia. Nie stwierdziliśmy natomiast by wiek był czynnikiem wpływającym na częstość

występowania poszczególnych podtypów AGC (Ryc.6). W pracach innych autorów nie wykazano tak silnie zaznaczonego wpływu wieku na pojawienie się AGC w rozmazach pochwowo-szyjkowych, AGC stwierdzano bowiem również u kobiet młodszych nawet przed 35 rokiem życia (15,16,18,100). W naszym materiale w grupie kobiet z ASC te, u których rozpoznano podtyp ASC-US były zdecydowanie młodsze (średnia wieku 42,2) od tych, u których stwierdzono ASC-H (średnia wieku 54,2), a różnica ta była istotna statystycznie. (Ryc.6). Podobną zależność pomiędzy wiekiem a podtypem ASC wykazali również inni autorzy (127,130).

W przeprowadzonym badaniu nie stwierdziliśmy by atrofia nabłonków pochwy miała wpływ na częstsze występowanie AGC lub ASC w rozmazach pochwowo-szyjkowych. Wprawdzie opracowane wytyczne National Cancer Institute u pacjentek z AGC stwierdzanymi po okresie reprodukcyjnym zalecają przed wdrożeniem inwazyjnych procedur diagnostycznych zastosowanie 7 dniowej dopochwowej kuracji estrogenowej, jednak w naszym badaniu nie wykazano by miało to jakikolwiek wpływ na częstość stwierdzanych w rzeczywistości nieprawidłowości. Część autorów (15,16) podaje, iż takie postępowanie może przynieść korzyści w przypadku kobiet, u których AGC są w rzeczywistości odzwierciedleniem zmian płaskonabłonkowych, a w przypadku ASC wyeliminować te przypadki które wynikają z zaburzenia różnicowania związanego z niedoborem estrogenów. Nasze badanie nie potwierdziło jednak celowości takiego postępowania, gdyż atrofia rozmazu nie miała wpływu na częstość stwierdzanych nieprawidłowości o charakterze ASC i AGC (Tab.21, Tab.33). Powyższe wnioski dotyczą również poszczególnych podtypów zarówno AGC jak i ASC.

W przeprowadzonej przez nas analizie, wykazaliśmy, iż AGC częściej występowały u kobiet po menopauzie, natomiast ASC u będących w okresie prokreacyjnym (Ryc.7). W przypadku grupy AGC dotyczyło to zarówno podtypu endocerykalnego jak i

endometrialnego. W grupie ASC natomiast, wykazano, iż ASC-US częściej występowały u kobiet przed menopauzą (73,8%), natomiast ASC-H u kobiet po menopauzie (58,3%) (ryc.8.).

Nie stwierdzono również by jakikolwiek patogen pochwy miał wpływ na częstsze występowanie AGC w rozmazach szyjkowych. Wykazano więc w naszym badaniu, iż modyfikacja podgrupy AGUS z usunięciem podtypu będącego wynikiem zmian odczynowych związanych z zapaleniem była celowa. Nie stwierdzono w analizowanym przez nas materiale by pojawienie się AGC było wynikiem zmian odczynowych czy reparacyjnych związanych z działaniem czynnika infekcyjnego. Uzyskane wyniki badań są zgodne z pracami innych autorów (15,20,1114,129). Po przeanalizowaniu wyników biocenozy pochwy w grupie ASC stwierdzono, iż w podgrupie ASC-US dominowała prawidłowa flora bakteryjna pochwy, natomiast w grupie ASC-H w równym odsetku przypadków występowała fizjologiczna i patologiczna flora pochwy (Tabl.4). Obserwacja ta potwierdza słuszność twierdzenia, iż obecność tych nieprawidłowości nie jest reakcją na działanie czynnika zakaźnego.

Znaczenie zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego u kobiet, u których występują AGC nie zostało dotychczas wyjaśnione, natomiast w podgrupie ASC przypuszczano, iż pojawienie się tych nieprawidłowości w rozmazie jest wynikiem przemijającego zakażenia HPV (129,141). W naszym materiale na początku obserwacji infekcję HPV stwierdzono u 42,9% kobiet z grupy AGC oraz u 42,5% z grupy ASC. Zdecydowanie częściej w obu podgrupach stwierdzano materiał genetyczny wysokoonkogennych wirusów brodawczaka ludzkiego. Istotnie statystycznie częściej u kobiet z AGC podtyp endometrialny występowało zakażenie wirusami o wysokim potencjale onkogennym w porównaniu do podtypu endocervikalnego (Ryc.35). Również istotnie statystycznie częściej zakażenie wirusami wysokoonkogennymi stwierdzono w grupie kobiet z ASC-H, natomiast zakażenie wirusami brodawczaka ludzkiego o niskim potencjale onkogennym w podgrupie ASC-US (Tab.10). W

analizowanym materiale w grupie ASC stwierdzono, iż zakażenie wysokoonkogennymi podtypami wirusa występuje istotnie statystycznie częściej u młodszych kobiet, natomiast w starszej grupie wiekowej dominowało zakażenie HPV o niskim potencjale onkogennym. Nie zaobserwowaliśmy podobnej korelacji pomiędzy wiekiem kobiet a typem HPV w podgrupach AGC. Badanie nasze wykazało, podobnie jak największe do tej pory prospektywne badanie dotyczące nietypowych komórek płaskonabłonkowych (ASCUS/LSIL Triage Study), iż prawie połowa tych nieprawidłowości ma związek z zakażeniem HPV (121,123,129,130). Kobiety zarażone wirusami o wysokim potencjale onkogennym były statystycznie istotnie młodsze, jednak średnia wieku w tej grupie była >30r.ż. (34,8 lat). Nie stwierdzono natomiast by w podgrupie ASC-US różnica wieku pomiędzy kobietami z infekcją wysokoonkogennymi a niskoonkogennymi podtypami wirusa była znamienna statystycznie (Ryc.38.). Podobny rozkład infekcji przedstawiają prace innych autorów (21,23,48,56,57,61,84,112). Również w badaniu ASCUS/LSIL Triage Study odsetek dodatnich badań wirusologicznych był podobny jak w naszym materiale (115,116,123,124,130).

W trakcie trzech lat obserwacji kobiet z AGC stwierdzono, iż w ponad połowie przypadków obecność tych komórek w rozmazach pochwowo-szyjkowych jest zjawiskiem przemijającym i nie wiąże się z wystąpieniem patologii w dalszej obserwacji. W 48,6% przypadków natomiast jest ona w rzeczywistości obrazem istniejących już, lub rozwijających się nieprawidłowości (Tab.14). Dalsza diagnostyka przeprowadzona zgodnie z protokołem badania wykazała, że aż 41,2% przypadków wszystkich nieprawidłowości w badanej grupie AGC stanowiły zmiany dotyczące nabłonka wielowarstwowego płaskiego pod postacią śródnabłonkowej neoplazji szyjki macicy, natomiast w 58,8% punktem wyjścia patologii był nabłonek gruczołowy, w tym w 29,4% były to zmiany istotne klinicznie. Obserwacja ta jest bardzo istotna, gdyż wskazuje na konieczność zastosowania u kobiet z AGC w rozmazach pochwowo-szyjkowych diagnostyki nie tylko w kierunku nieprawidłowości nabłonka

gruczołowego, ale również nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Pojawienie się niejednoznacznych zmian komórkowych pochodzenia gruczołowego w rozmazach pochwowo-szyjkowych stanowi istotny problem diagnostyczno-terapeutyczny, gdyż pomimo faktu, iż AGC są najrzadziej stawianym rozpoznaniem cytologicznym, to mogą być prekursorem rozwoju lub objawem już istniejących nieprawidłowości, które wymagają zastosowania leczenia chirurgicznego. W naszym materiale u kobiet a nietypowymi komórkami gruczołowymi zmiany o charakterze \geq CIN2 (w przypadku zmian nabłonka płaskiego) oraz raka gruczołowego endometrium i rozrostu atypowego błony śluzowej (w przypadku nabłonka gruczołowego) stwierdzono u 25,7% kobiet i stanowiły one 52,9% wszystkich nieprawidłowości.

Modyfikacja systemu Bethesda z 2001 roku zalecała określenie źródła AGC, a więc wskazania czy pochodzą one z nabłonka gruczołowego szyjki macicy czy z endometrium, oraz określenia stopnia nasilenia zmiany poprzez ocenę zagrożenia wykrycia zmiany nowotworowej (favor neoplasia – FN vs. not otherwise specified - NOS). W naszych obserwacji wynika, iż istotne znaczenie ma uwzględnienie źródła komórek gruczołowych, pozwalające na włączenie właściwego postępowania diagnostycznego, odpowiednio skierowanego na wykrycie zmiany dotyczącej nabłonka gruczołowego i tej która w rzeczywistości jest związana z patologią nabłonka wielowarstwowego płaskiego. Określenie natomiast nasilenia nieprawidłowości, w tym czy jest to w rzeczywistości nieprawidłowość mająca charakter zmiany nowotworowej w przypadku jednowarstwowego nabłonka gruczołowego wydaje się nie mieć takiej wartości. Również inni autorzy (40,100,108, 110,114,140,153) nie wykazują istotnie statystycznego znaczenia podziału AGC na podgrupy AGC NOS i AGC FN. W naszym materiale stwierdzono, iż wykrycie AGC podtypu endometrialnego, jest rzadsze, lecz związane z większym ryzykiem wykrycia zmian istotnych klinicznie. W przeprowadzonym przez nas badaniu odsetek raka stwierdzanego w grupie

kobiet z AGC wynosił 11,4% i w 100% przypadków był to rak endometrium. We wszystkich przypadkach był on stwierdzany w grupie AGC podtyp endometrialny. Również wszystkie przypadki zmian \geq CIN2 wykryto w tej grupie nietypowych komórek gruczołowych. W przeciwieństwie do innych autorów nie stwierdzono natomiast żadnego przypadku raka gruczołowego wewnątrzszyczkowego, ani współistnienia raka gruczołowego z płaskonabłonkowym. Odsetek nowotworów stwierdzanych w grupie AGC był nieznacznie wyższy niż u innych autorów (31,153).

Odsetek nieprawidłowości określanych w literaturze angielskojęzycznej jako istotne klinicznie w naszym materiale był podobny jak u Kooningsa (65), Ronnett (114) i Chhienga (15), lecz niższy niż u innych autorów, u których wynosił nawet do prawie 60% (17,18,31, 32,38,60,83,95,100).

Jednocześnie w naszym materiale, stwierdzono, iż wiek jest czynnikiem istotnie wpływającym na rozkład nieprawidłowości wykrywanych u kobiet z AGC w trakcie następnym procedur diagnostyczno-terapeutycznych. W grupie kobiet starszych zmiany istotne klinicznie dotyczyły głównie nabłonka gruczołowego wywodzącego się z endometrium natomiast zmiany dotyczące nabłonka gruczołowego endocerywikalnego miały mniejsze klinicznie znaczenie ($p < 0,001$). Podobne obserwacje opisał Doss (27) wykazując, iż w populacji kobiet w wieku pomenopauzalnym zdecydowanie częściej występują zmiany o istotnym klinicznie znaczeniu oraz, iż w przeważającym odsetku przypadków są to patologie dotyczące nabłonka gruczołowego endometrialnego (14,15). Stwierdziliśmy również, iż w grupie kobiet starszych istnieje większe ryzyko wykrycia raka endometrium, natomiast u młodszych zmian o charakterze CIN. Podobne wyniki uzyskał Koonings (65).

Nie stwierdziliśmy w naszym badaniu istotnego statystycznie wpływu reakcji hormonalnej na przemiany AGC w trakcie trzechletniej obserwacji, ani na typ i częstość stwierdzanych nieprawidłowości w kolejnych badaniach (Tab.21, Ryc. 40,41,42). Podobnie

nie wykazano, by którykolwiek z patogenów pochwy z analizowanych wyników badań mikrobiologicznych wpływał na częstość regresji, progresji i utrzymywania się nietypowych komórek gruczołowych oraz ich poszczególnych podtypów (Ryc. 43,44,45).

Istotnie klinicznie częściej w naszym materiale podobnie jak u innych autorów stwierdzono zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego u tych kobiet, u których w dalszym badaniu wykryto zmiany istotne klinicznie i to zarówno o charakterze CIN jak i raka gruczołowego (38). Również częściej (83,3%) w tej grupie kobiet stwierdzono zakażenie wirusami o wysokim potencjale onkogennym, które częściej stanowią przyczynę infekcji przetrwałej. Uzyskane z analizowanego przez nas materiału obserwacje wskazują, iż zastosowanie testu HPV pozwoli na identyfikację tych kobiet z AGC u podłoża których leżą nieprawidłowości dużego stopnia, głównie pochodzenia płaskonabłonkowego i w połączeniu z oceną cech cytopatologicznych AGC umożliwi wyodrębnienie grupy kobiet o zwiększonym ryzyku wykrycia HSIL a więc wymagającej dalszej diagnostyki kolposkopowej i histologicznej (114). Nie potwierdzono jednak skuteczności zastosowania testu Hybrid Capture 2 wykrywającego materiał genetyczny wirusa brodawczaka ludzkiego w różnicowaniu AGC pod względem zagrożenia wykrycia zmian płaskonabłonkowych od tych dotyczących błony śluzowej macicy (Tab.18,19,20). Stwierdzono bowiem, iż w 85,7% wszystkich nieprawidłowości o charakterze CIN1, CIN2 i CIN3 stwierdzono wysokoonkogenny podtyp wirusa, ale również w 100% przypadków zmian dotyczących błony śluzowej trzonu macicy wynik badania wirusologicznego był dodatni (80% HPV podtyp wysokoonkogenny, 20% oba podtypy wirusa).

Niewielu autorów zajmowało się w swych pracach analizą nasilenia nieprawidłowości komórki w rozmazie a rodzajem stwierdzanych nieprawidłowości w dalszym postępowaniu diagnostycznym (109,110,114). Opracowana przez nas analiza poszczególnych cech morfologicznych i zastosowanie ich jako predyktorów wystąpienia znaczących

nieprawidłowości zarówno w przypadku AGC jak i ASC jest oryginalna i niezwykle istotna. W przeprowadzonym badaniu analiza cech cytopatologicznych AGC pozwoliła na stwierdzenie, iż obecność komórek o silnie zabarwionych jądrach, nieprawidłowym kształcie jądra i gęstej cytoplazmie oraz poligonalnym kształcie komórek jest charakterystyczna dla tych AGC u których w dalszym postępowaniu stwierdzono CIN1, CIN2 i CIN3 (Tab.5). Natomiast obecność komórek w układzie grupowym o piankowatej cytoplazmie z położonym pośrodku komórki jądrze z regularnie rozmieszczoną chromatyną i o układzie „plastra miodu” pozwala na zakwalifikowanie pacjentek do tej grupy u których wystąpi regresja bądź nie wystąpią istotne klinicznie nieprawidłowości w dalszym postępowaniu diagnostycznym. Nakładanie się jąder komórkowych i komórek oraz peryferyjne przemieszczenie jądra komórkowego znamienne częściej występowało w przypadku zmian o większym znaczeniu klinicznym. W przeciwieństwie do Ronnette (114) nie wykazano w naszej obserwacji by układ grupowy AGC był bardziej charakterystyczny dla tych kobiet u których w kolejnych badaniach stwierdzono patologię nabłonka płaskiego. Ustalono również, iż istotnym wskaźnikiem stwierdzenia istotnych klinicznie nieprawidłowości dotyczących nabłonka gruczołowego jest peryferyjny układ jąder oraz ich wzajemne nakładanie się (Tab.5). Jednocześnie należy zdawać sobie sprawę z faktu, iż AGC są rozpoznaniem o najniższym stopniu powtarzalności zarówno w przypadku pojedynczego cytodiagnosty, jak i pomiędzy dwoma czy trzema cytologami oceniającymi ten sam preparat i jest ona tym większa im bardziej doświadczony jest cytolog (73).

Uzyskane przez nas wyniki 36 miesięcznej obserwacji wskazuje na konieczność bardzo dokładnej, systematycznej i intensywnej diagnostyki kobiet z AGC w rozmazach szyjkowych.

W trakcie 3-letniej obserwacji klinicznej próbowano ustalić standardy postępowania w grupie kobiet z AGC. Wysoki odsetek stwierdzanych w dalszym postępowaniu

nieprawidłowości wskazuje, iż wykonanie kontrolnego badania cytologicznego jest postępowaniem niewystarczającym. Ze względu na wysoki odsetek nieprawidłowości dotyczących nabłonka wielowarstwowego płaskiego, u kobiet z AGC szczególnie w przypadku komórek klasyfikowanych jako endometrialne, zalecamy każdorazowo wykonanie badania kolposkopowego. W przypadku omawianej podgrupy stwierdzono również wysoki odsetek patologii dotyczących błony śluzowej macicy o istotnym klinicznie znaczeniu. Stąd w każdym przypadku AGC podtypu endometrialnego zalecamy wyłyżeczkowanie kanału szyjki i jamy macicy. Ze względu na małą liczebność grupy AGC nie można było jednak ocenić istotności statystycznej stosowanych metod diagnostycznych. Niewystarczające wydaje się w tej grupie kobiet wykonanie zgodnie z zaleceniem ASCCP (*American Society for Colposcopy and Cervical Pathology*) wyłącznie biopsji endometrium ze względu na wysoki odsetek nieprawidłowości o charakterze CIN.

Wyniki naszych obserwacji w grupie kobiet z AGC podtyp endocerykalny są zgodne z zaleceniami ASCCP – u wszystkich kobiet z tej grupy należy wykonać badanie kolposkopowe. Porównywalną wartość diagnostyczną w tej grupie kobiet ma również badanie wirusologiczne, które jak wykazały nasze obserwacje pozwoliło na wyłonienie grupy kobiet z nieprawidłowościami o charakterze CIN. Jednak ze względu na wysoki koszt badania i niewielką dostępność w warunkach polskich ma ono ograniczone zastosowanie.

ASCCP zaleca by postępowanie u kobiet z AGC w rozmazach pochwowo-szyjkowych uzależnić od wieku. Problemатyczne wydaje się postawienie takiej granicy wieku, od którego pacjentka wymaga szczególnie intensywnej diagnostyki w kierunku patologii błony śluzowej trzonu macicy, jeśli w rozmazie stwierdzone zostaną AGC. Część badaczy stawia tą linię bardzo nisko, zalecając wykonanie biopsji endometrium u kobiet > 35 roku życia (153). Inni zalecają ocenę histologiczną endometrium po 45 roku życia (65). Jeszcze inni uważają, że u kobiet poniżej 40 r.ż wszystkie nieprawidłowości występujące w grupie z AGC dotyczą

szyjki macicy, natomiast u kobiet powyżej 40 roku życia w równym stopniu szyjki macicy i błony śluzowej trzonu macicy (100). Wszystkie kobiety z AGC w naszym badaniu miały ponad 40 lat, nie możemy więc na podstawie własnych obserwacji wyciągnąć wniosków co do granicy wieku powyżej którego należy poszerzyć diagnostykę o endometrium.

Zastosowany przez nas podział AGC na podtyp endocerykalny i endometrialny oraz uzyskane w naszym badaniu wyniki wskazują na konieczność wykonania frakcjonowanego wyłyżeczkowania kanału szyjki i jamy macicy u wszystkich kobiet, u których dwukrotnie w badaniach cytologicznych stwierdzono obecność AGC podtyp endometrialny. U tych, u których występuje AGC podtyp endocerykalny wystarczającym wydaje się wykonanie kolposkopii z ew. badaniem histologicznym wycinków celowanych i wyłyżeczkowaniem kanału szyjki.

Uzyskane wyniki obserwacji kobiet z ASC wskazują w przeważającym odsetku przypadków (76,3%), iż obecność tych komórek w rozmazach pochwowo-szyjkowych jest zjawiskiem przemijającym i nie wiąże się z wystąpieniem patologii w dalszej obserwacji.

W analizowanej przez nas grupie kobiet z ASC regresja cytologiczna w trakcie pierwszego badania kontrolnego w grupie ASC wynosiła 57,5%, a w poszczególnych podtypach 58,5% dla ASC-US i 41,7% dla ASC-H. Podobny rozkład odsetkowy przedstawiono w pracach innych autorów (2,39,89,90,115,116,123,124). Szczególnie wysoki odsetek progresji dotyczył natomiast kobiet z ASC-H w tym aż u 50% kobiet z tej grupy w ciągu całego okresu obserwacji w wyniku zastosowanych metod diagnostycznych stwierdzono nieprawidłowości \geq CIN2 w porównaniu do 5,6% z grupy ASC-US (Tab.26). Podobne zróżnicowanie rozkładu odsetkowego nieprawidłowości wymagających leczenia inwazyjnego w poszczególnych podgrupach ASC wykazały prace innych autorów (39,89,115,116,123,124). W żadnym przypadku kobiet z grupy ASC nie stwierdzono nieprawidłowości dotyczących nabłonka gruczołowego. Zmiany o charakterze CIN1 statystycznie częściej

stwierdzane były w grupie kobiet z ASC-US a CIN o wyższym stopniu zaawansowania i raka w grupie ASC-H (Ryc.46). W ciągu 3-letniego okresu obserwacji 8,2% kobiet u których we wstępnym badaniu cytologicznym rozpoznano ASC wymagało zastosowania leczenia chirurgicznego w tym zaledwie u 5,6% kobiet z ASC-US a u 50% z ASC-H. Istotnie statystycznie częściej więc zmiany \geq CIN2 wymagające zastosowania terapii inwazyjnej stwierdziliśmy w grupie ASC-H, w porównaniu do ASC-US. Obserwacja ta jest bardzo istotna, gdyż uzasadnia wydzielenie tych podgrup w grupie nietypowych komórek płaskonabłonkowych. Wskazuje również na konieczność ścisłego monitorowania kobiet, u których w badaniu cytologicznym stwierdzono ASC, a szczególnie ASC-H, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów (36,120,121,129).

Nie stwierdzono by nieprawidłowy wynik badania mikrobiologicznego miał wpływ na zachowanie się ASC w trakcie trzech lat obserwacji (Ryc.51). Nie stwierdzono również istotnego statystycznie wpływu reakcji hormonalnej na zachowanie się ASC w trakcie 3-letniego okresu obserwacji (Tabl. 33). Dowodzi to, że na zachowanie się zmian ASC mają wpływ inne czynniki. Nie potwierdzono, iż szczególnie trudna jest diagnostyka i ustalenie najlepszego sposobu postępowania u kobiet z ASC z towarzyszącym zapaleniem oraz atrofią. Zalecane przez ASCCP postępowanie obejmuje 7 dniową dopochwową kurację estrogenową oraz w przypadku stanu zapalnego dopochwową terapię metronidazolem wydaje się godnym polecenia, gdyż obniży koszt procedury diagnostycznej w przypadku nasilenia zmian uniemożliwiających zakwalifikowanie rozmazu jako nadającego się do oceny Nie wykazano jednak by atrofia lub nieprawidłowa flora pochwy miały wpływ na odsetek fałszywie dodatnich rozpoznań, czy zachowanie się nieprawidłowości w czasie.

Od momentu wprowadzenia technik biologii molekularnej jasne stały się dowody wskazujące na znaczenie przetrwałej infekcji wirusem brodawczaka ludzkiego w rozwoju wewnątrznałonkowej neoplazji i raka szyjki macicy. Stąd w grupie kobiet z

niejednoznacznymi nieprawidłowościami cytologicznymi o charakterze ASC i AGC próbowano zastosować diagnostykę w kierunku infekcji HPV metodą Hybrid Capture 2 (20,21,149,150). Jednocześnie we wszystkich przeprowadzonych dotychczas badaniach określano tylko obecność wirusów HPV o wysokim potencjale onkogennym. Pomijano natomiast diagnostykę w kierunku zakażenia podtypami niskoonkogennymi HPV, które być może mają znaczenie w występowaniu formy przemijającej HSIL?(112)

W badanym materiale stwierdzono, iż wykonanie badania wirusologicznego w kierunku zakażenia HPV umożliwia wyodrębnienie z grupy kobiet z ASC tych, u których w dalszym badaniu stwierdza się nieprawidłowości wymagające dalszego postępowania diagnostyczno - terapeutycznego. Bowiem u 100% kobiet u których wykryto nieprawidłowości \geq CIN2 obecny był materiał genetyczny HPV w tym w 76,5% była to infekcja wysokoonkogennymi typami HPV, w 17,6% oboma typami wirusa, a u 5,9% typami niskoonkogennymi (Tab.21).

Jednocześnie jednak w 27,8% przypadków ASC, w których nie stwierdzono patologii w dalszym postępowaniu diagnostycznym wynik badania wirusologicznego był dodatni. Wydaje się jednak iż wyniki naszych badań wskazujące iż 100 % wszystkich ASC-H i 88,9% wszystkich ASC-US u których w dalszym badaniu stwierdzono CIN miało dodatnie badanie wirusologiczne uzasadniają stosowanie testu Hybrid Capture 2 jako jednej z metod w strategii postępowania z kobietami z ASC w rozmazach pochwowo-szyjkowych. Towarzysząca infekcja HPV zwłaszcza o wysokim potencjale onkogennym u kobiet z ASC-H dowodzi znaczenia tych wirusów w procesie morfogenezy raka szyjki macicy. Natomiast także wyższy odsetek HPV o wysokim potencjale onkogennym (Σ infekcji wysokoonkogennej i mieszanej) w ASC-US u których wystąpiła regresja, wskazuje na to, iż sama obecność zakażenia HPV nie wystarcza do zainicjowania procesu karcynogenezy.

Należy się jednak zgodzić, że w warunkach Polski, gdzie badanie wirusologiczne jest badaniem drogim i mało dostępnym postępowaniem z wyboru w przypadku zmian o

charakterze nietypowych komórek płaskonabłonkowych należy zastosować inną strategię postępowania (104). Piver zdecydowanie potępia wykonanie powtórnych badań cytologicznych u tych pacjentek opierając się na badaniach w których od 25-50% kobiet z ASCUS miało w trakcie weryfikacji histopatologicznej stwierdzoną śródnabłonkową neoplazję szyjki macicy, w tym ponad połowa dużego stopnia, a 1-3% raka inwazyjnego (104).

Podobne wyniki do Pivera (104) uzyskała Anton (2) porównując wyniki kolejnego badania cytologicznego i histologicznego uzyskanego z biopsji celowanej u pacjentek z ASC.

Wykorzystując cytologię jako badanie weryfikujące wstępne rozpoznanie stwierdziła brak istotnych klinicznie nieprawidłowości w 91,4%, oraz zmiany o charakterze SIL w 8,6%. W tej samej grupie pacjentek wykonane badanie histologiczne metodą biopsyjną wykazało obecność CIN w 63,7% przypadków kobiet z ASC, a zaledwie 36,3% nie wykazało żadnych nieprawidłowości lub zmiany bez istotnego klinicznie znaczenia (2). W przeprowadzonym trzyletnim okresie obserwacji wykazano, że opisywane jako ASC, nieprawidłowości w 23,7% były w rzeczywistości już istniejącymi zmianami nabłonka wielowarstwowego płaskiego o większym nasileniu, w tym w zaledwie 8,2% miały one charakter \geq CIN2. W grupie ASC-US nieprawidłowości \geq CIN2 stanowiły 5,6% przypadków, natomiast w grupie ASC-H aż 50%. Dlatego też biorąc pod uwagę długi czas trwania procesu karcynogenezy w obrębie szyjki macicy oraz fakt, iż w kolejnych badaniach cytologicznych kobiet z ASC stwierdzano zmiany o większym nasileniu (LSIL i HSIL) w przypadku kobiet z ASC-US dobrym standardem postępowania wydaje się wykonanie badania cytologicznego w odstępie 3-6 miesięcy, natomiast u kobiet z ASC-H ze względu na wysoki odsetek nieprawidłowości lepszym postępowaniem wydaje się być kolposkopia.

W przeprowadzonej analizie zmian cytopatologicznych jakie wystąpiły w trakcie 36 miesięcznej obserwacji w grupie ASC zaobserwowano, iż najlepszym predyktorem wykrycia

zmian o charakterze CIN 2 i wyższym stopniu zaawansowania w dalszym postępowaniu jest stwierdzenie nieregularności błony jądrowej, nasilonej hyperchromazji i niejednorodnego rozmieszczenia chromatyny jądrowej, skąpej ilości cytoplazmy, owalnego kształtu komórki oraz występowania pojedynczo nieprawidłowych komórek (Tab. 6). Podawane przez większość autorów (129) kryterium zwiększenia stosunku jądro/cytoplazmatycznego w omawianym materiale zaobserwowano w prawie 100% przypadków wszystkich podgrup ASC. Jednak obecność tej cechy nie pozwalała na wyodrębnienie tych kobiet u których w ciągu dalszej diagnostyki stwierdzano zmiany o charakterze CIN1, CIN2 i wyższym stopniu zaawansowania, była bowiem również obecna w 100% przypadków kobiet z prawidłowym wynikiem dodatkowych badań diagnostycznych. W grupie kobiet z ASC, u których w dalszym badaniu stwierdzono CIN1 charakterystycznymi cechami cytopatologicznymi było: wystąpienia prawidłowej ilości cytoplazmy, oraz poligonalnego kształtu komórki. Również istotnie statystycznie częściej w tej grupie pacjentek cytoplazma barwiła się oranżochłannie. (Tab. 6,7,8). Obserwacje te wydają się szczególnie cenne gdyż jak do tej pory jedynie w badaniu ASCUS/LSIL Triage Study (ALTS) wykazano iż w przeważającym odsetku przypadków ASC-H obserwowano przynajmniej ogniskowe karbowanie i nieregularność jądra, a im większe było nasilenie tych zmian w tym większym odsetku przypadków było to związane ze stwierdzeniem w dalszym badaniu zmian o charakterze CIN2/3 (121). Uzyskane przez nas wyniki obserwacji dotyczących cech morfologicznych ASC dowodzą, iż badanie cytologiczne może stanowić ważny czynnik prognostyczny co do dalszych losów ASC-US i ASC-H.

Od momentu wprowadzenia przez System Bethesda dwóch nowych kategorii diagnostycznych tj. ASCUS i AGUS, które następnie modyfikowano i zmieniono na ASC i AGC, poprzez ponad dziesięć lat ich rozpowszechniania i coraz szerszego stosowania oraz

przeprowadzenia badań na temat częstości ich występowania i znaczenia klinicznego, nadal część klinicystów podważa celowość stawiania tego typu rozpoznań.

W trakcie trzecich warsztatów w Bethesda w 2001 r, organizowanych przez NCI opublikowano rekomendacje dotyczące zasad postępowania z kobietami, u których stwierdzono nieprawidłowe wyniki badania cytologicznego (129). Rekomendacje te, podobnie jak standardy postępowania opracowane przez ASCCP oparto na wynikach badań ASCUS/LSIL Triage Study.

Opracowane przez nas standardy są zgodne z wytycznymi opracowanymi przez Amerykańskie Towarzystwo Kolposkopii i Patologii Szyjki Macicy (*American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* – ASCCP). U pacjentek z ASC-US podano trzy opcje postępowania, których zadaniem ma być wykrycie jak najwyższego odsetka CIN2 i CIN3 leżących u podstawy wstępnego rozpoznania cytologicznego. Podane trzy równorzędne pod względem bezpieczeństwa i efektywności metody postępowania to: 1. powtórzenie badania cytologicznego w odstępie od 4-6 miesięcy, 2. skierowanie do badania kolposkopowego, 3. wykonanie testu na obecność wysokoonkogennych podtypów wirusa brodawczaka ludzkiego. W przypadku stwierdzenia ASC-H zalecane postępowanie polega na wykonaniu natychmiastowego badania kolposkopowego ze względu na wyższe ryzyko obecności CIN2 i CIN3 (36).

Z przeprowadzonego przez nas 36 miesięcznego okresu obserwacji wynika, iż w grupie kobiet z ASC najlepszą strategią postępowania jest wykonanie powtórnego badania cytologicznego z dokładną oceną morfologiczną cech cytopatologicznych lub wykonanie badania kolposkopowego. Wykazaliśmy również, iż odstęp trzymiesięczny pomiędzy stwierdzeniem ASC-US w rozmazie a kontrolą cytologiczną jest bezpieczny i może być wydłużony maksymalnie do 6 miesięcy (Tab.24.27).

Kolposkopia powinna zostać uznana za „złoty standard” postępowania w tej grupie kobiet, również ze względu na stosunkowo niski koszt badania w warunkach polskich w porównaniu do badania wirusologicznego i to zarówno w grupie ASC-H jak i ASC-US.

Jakkolwiek kolposkopia w grupie kobiet z ASC powinna być metodą z wyboru, to badanie wirusologiczne może służyć jako badanie pomocnicze w przypadku utrzymywania się zmian w ponownym badaniu cytologicznym, umożliwiające wyodrębnienie tej grupy kobiet, u których należy wykonać kolposkopię. Może również ułatwić wyłonienie grupy kobiet z ASC-US, u których może nastąpić progresja zmiany. Również badanie w kierunku zakażenia HPV o wysokim potencjale onkogennym może ułatwić podjęcie decyzji o rozległości zabiegu operacyjnego. Natomiast w grupie ASC-H wyniki naszych obserwacji wskazują na możliwość wykorzystania badania wirusologicznego jako metody pozwalającej na wyselekcjonowanie kobiet, u których istnieje duże prawdopodobieństwo obecności CIN. (Tab.32)

6. WNIOSKI:

1. Nietypowe komórki płaskonabłonkowe (ASC) stanowią najczęstszą nieprawidłowość w rozmazach pochwowo-szyjkowych i w jednej czwartej przypadków wiążą się z obecnością istotnych klinicznie zmian w dalszym postępowaniu diagnostycznym. Natomiast nietypowe komórki gruczołowe (AGC) są rzadkim rozpoznaniem cytologicznym, w którym w dalszym postępowaniu diagnostycznym w około połowie przypadków wykrywa się istotne klinicznie nieprawidłowości.
2. Częstość występowania tych zmian (ASC i AGC) nie zależy od typu reakcji cytohormonalnej ani też stanu flory bakteryjnej pochwy.
3. Celowym jest wyodrębnienie w grupie zmian o charakterze nietypowych komórek płaskonabłonkowych (ASC) podgrupy nietypowych komórek płaskonabłonkowych, w których nie można wykluczyć zmian śródnabłonkowych dużego stopnia (ASC-H) oraz w grupie zmian o charakterze nietypowych komórek gruczołowych (AGC) podgrupy endometrialnej gdyż obserwowane w tych podgrupach zmiany wymagają diagnostyki inwazyjnej a w większości przypadków także leczenia chirurgicznego.
4. Badanie cytologiczne pozwala na określenie cech cytopatologicznych w przypadkach nietypowych komórek płaskonabłonkowych (ASC) i nietypowych komórek gruczołowych (AGC) wiążących się z wyższym ryzykiem wykrycia w dalszym postępowaniu diagnostycznym istotnych nieprawidłowości klinicznych.
5. Zastosowanie diagnostyki na obecność DNA HPV o wysokim potencjale onkogennym pozwala na wyselekcjonowanie przypadków ASC i AGC wymagających dalszego postępowania diagnostycznego. Bowiem w grupie ASC i AGC z towarzyszącą infekcją HPV o wysokim potencjale onkogennym częściej wykrywa się istotne klinicznie nieprawidłowości wymagające leczenia chirurgicznego.

6. Określenie obecności pewnych cech cytopatologicznych oraz infekcji HPV o wysokim potencjale onkogennym, przy których częściej spotyka się w dalszej obserwacji występowanie CIN pozwala na wyróżnienie zmian nietypowych komórek płaskonabłonkowych (ASC) i nietypowych komórek gruczołowych (AGC) nieistotnych klinicznie od tych, które wymagają szybkiego dalszego postępowania diagnostyczno-terapeutycznego.

7. W przypadkach kobiet z nietypowymi komórkami płaskonabłonkowymi (ASC) w dalszym postępowaniu diagnostycznym należy uwzględnić badanie kolposkopowe z ewentualnym pobraniem wycinków do badania histologicznego, natomiast w przypadkach nietypowych komórek gruczołowych (AGC) szczególnie podtypu endometrialnego dodatkowo wykonać wyłyżeczkowanie kanału szyjki i jamy macicy.

7. STRESZCZENIE.

Wprowadzony nowy system oceny rozmazów cytologicznych zwany systemem Bethesda uwzględnia aktualne dane na temat morfogenezy raka szyjki macicy. Poprzez wprowadzenie jednolitej terminologii miał on na celu także ułatwić porozumienie pomiędzy cytologiem i klinicystą. W nowym systemie klasyfikacyjnym uwzględniono opisywane już wcześniej w innych podziałach rozmazów cytologicznych zmiany komórkowe określane jako niejednoznaczne, tj. nieprawidłowości o niejasnym znaczeniu i trudnej do przewidzenia prognoście i nazwano je atypowymi komórkami płaskonabłonkowymi o nieokreślonym znaczeniu (ASCUS – atypical squamous cells of undetermined significance) i atypowymi komórkami gruczołowymi o nieokreślonym znaczeniu (AGUS – atypical glandular cells of undetermined significance). Te dwie nowe kategorie nie spotkały się z powszechną akceptacją. Wprawdzie od momentu ich rozpowszechnienia pojawiało się coraz więcej doniesień naukowych na temat ich rzeczywistego znaczenia klinicznego, lecz w związku z dowolnością interpretacyjną i brakiem jednoznacznych kryteriów diagnostycznych zarówno w ASCUS jak i AGUS wyniki tych badań różniły się w szerokim zakresie. W 2001 roku wprowadzono modyfikacje terminologii poprzez usunięcie frazy „o nieokreślonym znaczeniu”. Dwie nowe kategorie diagnostyczne ostatecznie nazwano atypowymi komórkami płaskonabłonkowymi (ASC) i atypowymi komórkami gruczołowymi (AGC). Zmiana terminologii nie wyeliminowała jednak wątpliwości co do celowości stawiania tych rozpoznań. Stąd celem naszej pracy było określenie częstości występowania tego typu nieprawidłowości, ich znaczenia klinicznego oraz opracowanie standardów postępowania w przypadkach kobiet, u których stwierdzono obecność ASC lub AGC. Materiał badawczy stanowiło 5000 kobiet w wieku od 25-65 lat objętych programem badań przesiewowych raka szyjki macicy w Klinice Ginekologii, Położnictwa i Onkologii CM UJ w 2001 roku. W grupie tej stwierdzono u 207 (4,96%) kobiet ASC a u 35 (0,7%) AGC. Ta grupa kobiet stanowiła

materiał kliniczny do dalszej obserwacji. Zgodnie z kryteriami systemu Bethesda 2001 w obrębie ASC wydzielono podgrupy ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) i ASC-H (atypical squamous cells cannot exclude HSIL), a w obrębie AGC podgrupy AGC endocerykalne i AGC endometrialne. We wszystkich przypadkach co 3 miesiące wykonywano kontrolne badania cytologiczne przez okres 3 lat. Określono wpływ czynników hormonalnych na występowanie i zachowanie się ASC i AGC w okresie obserwacji, a poprzez ocenę flory pochwy znaczenie czynników infekcyjnych w tych procesach. U wszystkich pacjentek wykonano badanie wirusologiczne testem Hybrid Capture 2 w celu zdiagnozowania zakażenia HPV, z uwzględnieniem podtypu onkogenego wirusów. U kobiet, u których stwierdzono utrzymywanie się zmian typu ASC i AGC przez dwa kolejne badania, lub gdy stwierdzano progresję zmiany wykonywano badanie kolposkopowe. W przypadkach nieprawidłowego badania kolposkopowego pobierano wycinki celowane połączone z wyłyżeczkowaniem kanału szyjki, a u wszystkich kobiet z AGC wykonywano wyłyżeczkowanie frakcjonowane. Na podstawie uzyskanych wyników badań włączano odpowiednie postępowanie terapeutyczne. W przypadkach regresji zmian kobiety nadal podlegały kontroli cytologicznej co 3 miesiące.

Określono odsetek regresji, progresji oraz utrzymywanie się zmian o charakterze ASC i AGC oraz w poszczególnych podgrupach. Określono także cechy cytopatologiczne ASC i AGC u tych kobiet, u których w dalszych badaniach stwierdzono obecność zmian przednowotworowych i raka w grupach badanych. Po zakończeniu badania u wszystkich kobiet wykonano badanie wirusologiczne i mikrobiologiczne. Na podstawie obserwacji zachowania się zmian typu ASC i AGC w czasie, oraz wyników badań kolposkopowych, wirusologicznych, mikrobiologicznych i histologicznych określono strategię postępowania diagnostyczno-terapeutycznego w tych stanach. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie.

W badanej populacji kobiet z regionu Małopolski ASC było najczęściej a AGC najrzadziej stwierdzaną nieprawidłowością w rozmazach pochwowo-szyjkowych. W grupie 207 kobiet z ASC dominowały zmiany o charakterze ASC-US (94,2%), natomiast ASC-H stwierdzono zaledwie w 5,8% przypadków. W grupie 35 kobiet z AGC częściej stwierdzano zmiany AGC wywodzące się z nabłonka endocerywikalnego - 74,3%, natomiast AGC pochodzące z endometrium stanowiły 25,7%. Nie stwierdzono by flora bakteryjna pochwy, czy reakcja cytohormonalna miały wpływ na częstość występowania ASC i AGC oraz poszczególnych podgrup rozpoznań w rozmazach pochwowo-szyjkowych. Istotnie statystycznie częściej AGC występowały w starszej grupie wiekowej w stosunku do ASC, a grupa kobiet z ASC-US była istotnie statystycznie młodsza od tych z ASC-H. Nie stwierdzono natomiast wpływu wieku na częstość występowania poszczególnych podtypów AGC.

W obu grupach badanych w blisko połowie przypadków (ASC-42,5%, AGC-42,5%) stwierdzono zakażenie HPV. Zdecydowanie częściej w obu grupach występowała infekcja wysokoonkogennymi podtypami wirusa, w tym istotnie statystycznie częściej wynik badania wirusologicznego w kierunku zakażenia wysokoonkogennymi HPV był dodatni w grupie ASC-H i AGC podtyp endometrialny, a więc w tych grupach, w których znamienne statystycznie częściej stwierdzono istotne klinicznie nieprawidłowości.

Analiza zachowania obserwowanych nieprawidłowości w czasie wykazała, iż w grupie ASC w 76,3% przypadków, a w grupie AGC w 51,4% przypadków obecność tych nieprawidłowości w rozmazie była zjawiskiem przemijającym i nie wiązała się z wystąpieniem klinicznie istotnych nieprawidłowości w ciągu 3-letniego okresu obserwacji. Wykazano, iż szczególnie istotne jest wydzielenie podgrup ASC-H w grupie ASC i podtypu endometrialnego w grupie AGC ze względu na stwierdzany w tych grupach wysoki odsetek zmian wymagających leczenia chirurgicznego. U kobiet z ASC-H odsetek zmian o charakterze \geq CIN 2 wynosił 50%. W grupie AGC podtyp endometrialny we wszystkich

przypadkach były to zmiany o istotnym klinicznie znaczeniu w tym w 44,4% były to zmiany płaskonabłonkowe o charakterze \geq CIN 2, w 44,4% przypadków rak endometrium a w 11,2% złożony atypowy rozrost endometrium. Oryginalną obserwacją stwierdzoną na podstawie uzyskanych wyników badań jest fakt możliwości wykorzystania pewnych cech cytopatologicznych komórek ASC i AGC w prognozowaniu wykrycia zmian o istotnym znaczeniu klinicznym w dalszym postępowaniu diagnostyczno-terapeutycznym, oraz możliwość połączenia ww obserwacji z wykonaniem badania wirusologicznego w kierunku zakażenia wysokoonkogennymi HPV. Taka strategia postępowania umożliwi wyodrębnienie tej grupy kobiet, u których istnieje wysokie ryzyko wykrycia zmian istotnych klinicznie i które wymagają szybkiego włączenia leczenia chirurgicznego.

W podsumowaniu należy stwierdzić, iż na podstawie naszych obserwacji wydaje się, iż w grupie kobiet z ASC najlepszą strategią postępowania będzie wykonanie powtórnego badania cytologicznego z dokładną oceną cech cytopatologicznych i/lub badanie kolposkopowe. W grupie kobiet z AGC (szczególnie podtyp endometrialny) ze względu na wysoki odsetek istotnych klinicznie nieprawidłowości wykonanie kontrolnego badania cytologicznego jest postępowaniem niewystarczającym. Dlatego w tej grupie kobiet zalecamy wykonanie badania kolposkopowego, a ze względu na wysoki odsetek raków endometrium stwierdzanych w podgrupie AGC endometrialne każdorazowo dodatkowo wyłyżeczkowania kanału szyjki i jamy macicy. Jako badanie równoważne zarówno w grupie ASC jak i AGC można zastosować badanie wirusologiczne w kierunku obecności DNA wysokoonkogennych podtypów HPV. Na podstawie uzyskanych wyników i ich analizy wysunięto następujące wnioski:

1. Nietypowe komórki płaskonabłonkowe (ASC) stanowią najczęstszą nieprawidłowość w rozmazach pochwowo-szyjkowych i w jednej czwartej przypadków wiążą się z obecnością istotnych klinicznie zmian w dalszym postępowaniu diagnostycznym. Natomiast

nietypowe komórki gruczołowe (AGC) są rzadkim rozpoznaniem cytologicznym, w którym w dalszym postępowaniu diagnostycznym w około połowie przypadków wykrywa się istotne klinicznie nieprawidłowości.

2. Częstość występowania tych zmian (ASC i AGC) nie zależy od typu reakcji cytohormonalnej ani też stanu flory bakteryjnej pochwy.
3. Celowym jest wyodrębnienie w grupie zmian o charakterze nietypowych komórek płaskonabłonkowych (ASC) podgrupy nietypowych komórek płaskonabłonkowych, w których nie można wykluczyć zmian śródnabłonkowych dużego stopnia (ASC-H) oraz w grupie zmian o charakterze nietypowych komórek gruczołowych (AGC) podgrupy endometrialnej gdyż obserwowane w tych podgrupach zmiany wymagają diagnostyki inwazyjnej a w większości przypadków także leczenia chirurgicznego.
4. Badanie cytologiczne pozwala na określenie cech cytopatologicznych w przypadkach nietypowych komórek płaskonabłonkowych (ASC) i nietypowych komórek gruczołowych (AGC) wiążących się z wyższym ryzykiem wykrycia w dalszym postępowaniu diagnostycznym istotnych nieprawidłowości klinicznych.
5. Zastosowanie diagnostyki na obecność DNA HPV o wysokim potencjale onkogennym pozwala na wyselekcjonowanie przypadków ASC i AGC wymagających dalszego postępowania diagnostycznego. Bowiem w grupie ASC i AGC z towarzyszącą infekcją HPV o wysokim potencjale onkogennym częściej wykrywa się istotne klinicznie nieprawidłowości wymagające leczenia chirurgicznego.
6. Określenie obecności pewnych cech cytopatologicznych oraz infekcji HPV o wysokim potencjale onkogennym, przy których częściej spotyka się w dalszej obserwacji występowanie CIN pozwala na wyróżnienie zmian nietypowych komórek płaskonabłonkowych (ASC) i nietypowych komórek gruczołowych (AGC) nieistotnych

klinicznie od tych, które wymagają szybkiego dalszego postępowania diagnostyczno-terapeutycznego.

7. W przypadkach kobiet z nietypowymi komórkami płaskonabłonkowymi (ASC) w dalszym postępowaniu diagnostycznym należy uwzględnić badanie kolposkopowe z ewentualnym pobraniem wycinków do badania histologicznego, natomiast w przypadkach nietypowych komórek gruczołowych (AGC) szczególnie podtypu endometrialnego dodatkowo wykonać wyłżeczowanie kanału szyjki i jamy macicy.

8. SUMMARY.

The new introduced system of classification of smears named the Bethesda system, complies current knowledge of cervical cancer morphogenesis. The main objective of the Bethesda system is the facilitation of communication between cytologists and clinicians by introducing an uniform terminology. In the new classification system, the abnormalities defined earlier in others reporting system of cervical smears as unclear cervical changes that is abnormalities of unclear significance and difficult prognostics to anticipate were taken into consideration. There were named the atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) and atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS). These two new categories did not meet with universal acceptance. Although since their propagation, more and more papers appeared on the subject of their real clinical significance, but in relation with free interpretative attitude and lack of unambiguous diagnostic criteria in ASCUS and AGUS, the results of these researches were different in wide extent. In 2001 the modification of this terminology was introduced and the designation „of undetermined significance” was removed. Two new diagnostic categories – atypical squamous cells (ASC) and atypical glandular cells (AGC) were created. Despite terminology change there are still doubts concerning necessity to separate those categories. Hence the aim of our research was determination of those abnormalities frequency and their clinical significance. We also defined management strategies in women with atypical squamous cells and atypical glandular cells in cervical smears.

The study material consisted of 5000 women at the age of 25-65 years who participated in cervical cancer screening program in Chair of Obstetrics and Gynecology of the Jagiellonian University in 2001. In this group ASC in 207 (4,96%) women and AGC in 35 (0,7%) were stated. Those two groups were the object of further clinical observation. In accordance with criteria of the Bethesda 2001 system, in ASC two subgroups were divided:

atypical squamous cells of undetermined significance (ASC-US) and atypical squamous cells cannot exclude high grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H). Similarly in AGC two subgroups were isolated : atypical endocervical cells, and atypical endometrial cells. In all those women the control cervical cytological examination was performed every 3 months for 3 years follow up. The influence of hormonal factors on incidence and retention of ASC and AGC during observation was evaluated, and through assessment of vaginal flora the significance of infectious factors was characterized. In all women Hybrid Capture 2 test for detection 13 high-risk and 5 low-risk human papilloma viruses was carried out. All women diagnosed with ASC and AGC in two consecutive cervical cytology, or when progression was observed were referred for colposcopy. When colposcopic examination was abnormal we took cervical biopsies with endocervical curettage, and in all women with AGC we performed excochleation of the cervical canal and the endometrial strip sampling. Appropriate therapeutic management was applied based on obtained results. All women with regression of lesion were still subject to cytological control every 3 months. The percentage of regression, progression and stationary state of ASC and AGC and their subgroups were compared. We defined cytopathologic features of ASC and AGC, in those women who had precancerous lesions or cancer in the study groups. After 3 years of observation all women had performed HPV tests and evaluation of vaginal biocenosis. On the basis of ASC and AGC transformation during observation time and results of colposcopic, viral, microbiological and histological examinations we defined strategy of diagnostic and therapeutic management in those conditions. The obtained results were evolved statistically.

In our material from Malopolska region ASC was the most often and AGC most uncommon detected abnormalities in cervical smears. ASC-US (94,2%) predominated in group of 207 women with ASC, however ASC-H was only affirmed in 5,8% cases. In group of 35 women with atypical glandular cell, atypical endocervical cells were stated more often –

in 74,3%, however AGC of endometrial origin were diagnosed in 25,7% cases. In our study vaginal flora and cytohormonal reaction (especially atrophy) had no influence on incidence of ASC or AGC and their subgroups of diagnoses in cervical smears. AGC occurred statistically significantly more often in older women than ASC, and the group of women with ASC-US was significantly statistically younger than those with ASC-H. However we did not observe the influence of age on incidence of particular subtypes of AGC. In both groups in almost half of the cases (ASC-42,5%, AGC-42,5%) HPV infection was detected. Decisively more often in both groups high-risk HPV infection occurred, and statistically significantly more often high-risk HPV tests were positive in women with ASC-H and AGC of endometrial origin, well in those groups the clinically important abnormalities incidence was statistically significantly greater. The analysis of observed abnormalities maintenance during observation time showed that in ASC group in 76,3% and in AGC group in 51,4% the presence of these abnormalities was a transient phenomenon and it was not associated with occurrence of clinically significant anomaly. We demonstrated that dividing subgroups ASC-H and AGC of endometrial origin is especially essential, because of high percentage of lesions in these groups requiring surgery. At women with ASC-H the percentage of lesions \geq CIN2 was 50%. In AGC group of endometrial origin there were clinically significant lesions in all cases (in 44,4% there were squamous lesions \geq CIN2, in 44,4% endometrial adenocarcinoma and in 11,2% atypical endometrial hyperplasia). The original observation prepared on the basis of results from our research is the possibility of using certain cytopathologic traits of ASC or AGC in prognostication of detection of clinically significant lesions in further diagnostic and therapeutic procedure, and the possibility of combination of above-mentioned observation with high-risk HPV tests performing. Such a strategy of management enables isolating those groups of women who have high risk of clinically significant lesions detection and who require fast surgical treatment. We think, based on our observation that in ASC group the

second control cytology with precise evaluation of cytopathologic traits and/or colposcopy will be the best strategy of management. In women with AGC (especially of endometrial origin) in view of high percentage of clinically significant lesions, performing of second cytological examination is an insufficient management. For that reason in this group of women we recommend colposcopy, and in view of high percentage of adenocarcinoma of endometrium detected in subgroup of AGC of endometrial origin we recommend every time excochleation of the cervical canal and the uterus. As the examination of the same value in both groups (ASC and AGC) Hybrid Capture 2 test for detection of high-risk HPV can be used. Judging by obtained results and their analysis we concluded:

1. Atypical squamous cells are the most common abnormalities that are observed in cervical smears, and in $\frac{1}{4}$ of cases are connected with occurrence of clinically significant lesions in further diagnostic proceeding. However atypical glandular cells are uncommon recognized cytological diagnosis, but in further diagnostic proceeding in a half of cases clinically significant abnormalities are detected.
2. There is no relation between type of cytohormonal reaction or vaginal flora and incidence rate of ASC and AGC.
3. The isolation in group of atypical squamous cells (ASC) the ASC-H subgroup, and in group of atypical glandular cells (AGC) the endometrial subgroup is legitimate in view of observed in these subgroups lesions that require invasive diagnostics and also in most cases surgical treatment.
4. Cytological examination permits to define in cases of atypical squamous cells (ASC) and atypical glandular cells (AGC) such cytopathologic traits associated with higher risk of detection of clinically significant lesions in further diagnostic proceeding.
5. The application of diagnostic test for detection of high-risk HPV allows selecting those cases of ASC and AGC that require further diagnostic proceeding. As in ASC and AGC

groups with accompanied high-risk HPV infection, the clinically significant lesions that require surgical treatment are more often detected.

6. The determination of certain cytopathologic traits and high-risk HPV infection at which incidence of CIN is more often seen permits to separate clinically insignificant atypical squamous cells and atypical glandular cells from these required fast further diagnostic and therapeutic management.

7. We recommend colposcopy with eventual biopsy for histological examination as further diagnostic proceeding in women with atypical squamous cells, however in cases of atypical glandular cells especially of endometrial origin we recommend the excochleation of cervical canal and uterine cavity.

9. PIŚMIENNICTWO:

1. Alanen K, Elit L, Molinaro P et al. Assessment of cytologic follow-up as the recommended management of atypical squamous cells of undetermined significance or low grade squamous intraepithelial lesions. *Cancer Cytopathol* 1998;4:5-10.
2. Anton RC, Ramzy I, Schwartz MR et al.. Should the cytologic diagnosis of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance be qualified? *Cancer Cytopathol* 2001;93(2):93-99.
3. Apgar BS, Brotzman G. Management of cervical cytologic abnormalities. *Am Family Physic* 2004;70(10):1905-1915.
4. Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M et al. Virologic versus cytologic trage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high grade intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer Inst* 2004;96:280-293.
5. Basta A. Znaczenie infekcji wirusowej (HPV) oraz obniżonego poziomu witaminy A w surowicy krwi jak i niektórych czynników osobniczych i środowiskowych w morfogenezie raka szyjki macicy. *Rozprawa Habilitacyjna*. Kraków 1990.
6. Basta A. Rola infekcji wirusowych w etiopatogenezie raka szyjki macicy. *Rak szyjki macicy*. Red. J. Markowskiej. PZWL 1999;89-111.
7. Basta A., Basta P. Trachelektomia w leczeniu wczesnych postaci raka szyjki macicy. *Onkologia Ginekologiczna* red. J. Markowska 2006 – w druku
8. Berek JS. Simplification of the new Bethesda 2001 Classification System. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:1-5
9. Blanc BJ-L, Boubli L. *Ginekologia*. Zakład Narodowy im. Ossolińskich 1995.
10. Bosch FX, De Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer – burden and assessment of causality. *J Nat Cancer Inst* 2003;31:3-13.

11. Bristow RE, Montz FJ. Workup of the abnormal pap test. *Off Gynecol* 2001;3(1):12-24.
12. Bulten J, de Wilde PCM, Boonstra H. et al. Proliferation in atypical atrophic Pap smears. *Gynecol Oncol* 2000;79:225-229.
13. Burnett A. Atypical glandular cells of undetermined significance Pap smears: appropriate evaluation and management. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2000;12:33-37.
14. Castle PE, Schiffman M, Bratti MC et al. A Population Based Study of Vaginal Human Papillomavirus Infection in Hysterectomized Women. *J Infect Diseases* 2004;190:458-67.
15. Chhieng DC, Elgert P, Cangiarella JF et al. Variation in the Incidence of AGUS between Different Patient Populations. *Acta Cytol* 2001;45:287-293.
16. Chhieng DC, Elgert P, Cangiarella JC, Cohen JM. Clinical significance of atypical glandular cells of undetermined significance – a follow-up study from academic medical center. *Acta Cytol* 2000;44:557-566.
17. Chhieng DC, Cohen JM, Cangiarella JF. Clinical significance of Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance in Postmenopausal Women. *Cancer* 2001;93(1):1-7
18. Chin AB, Bristow RE, Korst LM et al. The significance of atypical glandular cells on routine cervical cytologic testing in a community-based population *Am J Obstet Gynecol* 2000;182(6):1278-1282.
19. Connor JP, Elam G, Goldberg JM. Empiric vaginal metronidazol in the management of the ASCUS papanicolaou smear: a randomized controlled Trial. *Elsev Science* 2002; 99:183-187
20. Cox J. ASCCP Practice Guidelines: management of glandular abnormalities in the cervical smears. *J Low Genit Tract Dis* 1997;1:41-45.

21. Cox JT Management of atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesion by human papillomavirus testing. *Best Prac Resarch Clin Obstet Gynecol.* 2001;15(5):715-741.
22. Cuzick J, Sasieni P, Davies P. et al. A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technol Assess* 1999;3(14):1-196.
23. Dalstein V, Riethmuller D, Sautiere JL et al. Detection of cervical precancer and cancer in hospital population: benefits of testing for human papillomavirus. *Eur J Cancer* 2004;40:1225-1232.
24. Davey DD, Woodhouse S, Styer P et al. Atypical Epithelial Cells and Specimen Adequacy. Current laboratory Practices of participants in the College of American Pathologies Interlaboratory Comparison Program in Cervicovaginal Cytology. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124: 203-211.
25. DeMay RM. Cytopathology of false negatives preceding cervical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1996;175(4) 1110-1113.
26. DiSaia PJ, Creasman WT. *Ginekologia onkologiczna.* Lublin. Wydawnictwo Czelej; 1999.
27. Doss BJ, Masian AM, Montag AG et al. Atypical glandular cells of undetermined significance in postmenopausal women. *Mod Pathol* 2000;12:33A
28. Duggan MA., McGregor, Benoit JL et al. The human papillomavirus status of invasive cervical adenocarcinoma: a clinicopathological and outcome analysis. *Hum Pathol* 1995;26:319-325
29. Duggan MA, Benoit JL, McGregor et al. Adenocarcinoma in situ of the endocervix: human papillomavirus determination by dot blot hybridization and polymerase chain reaction amplification. *Int J Gynecol Pathol* 1994;13:143-9

30. Duggan MA, Benoit JL, McGregor et al. The human papillomavirus status of 114 endocervical adenocarcinoma cases by dot blot hybridization *Hum Pathol* 1993;24:121-5.
31. Eddy GL, Strumpf KB, Wojtowicz M. et al. Biopsy findings in five hundred thirty-one patients with atypical glandular cells of uncertain significance as defined by the Bethesda system. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(5) 1188-1195.
32. Eltabbakh GH, Lipman JN, Mount SL et al. Significance of Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance on Thin Prep papanicolaou Smears. *Gyn Oncol* 2000:245-250.
33. Fahey MT, Irwing L, Macaskil P. Metaanalysis of Pap test accuracy. *Am.J Epidemiol* 1955;141:680-9.
34. Falkner CA, Walker JL. Management of Atypical and Low-Grade Cervical Cytology. *Cancer J* 2003;9(5):377-381.
35. Ferguson AW, Swoboda-Newman SM, Frank TS. Analysis of human papillomavirus infection and molecular alterations in adenocarcinoma of the cervix. *Mod Pathol* 1998;11:11-18
36. Ferris DG, Cox JT, O'Connor DM et al. *Modern Colposcopy. Textbook and Atlas.* Iowa: ASCCP Kendall/Hunt Publishing Company 2004.
37. Franco EL. Are we ready for a paradigm change in cervical cancer screening? *Lancet* 2003;362:1866-1867
38. Geier CS. Clinical Evaluation of Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance. *Am J Obstet Gynecol* 2001;184: 64-69.
39. Gerber S, De Grandi P, Petignat P et al. Colposcopic evaluation after a repeat atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) smear. *Int J Gynecol Obstet* 2001;75:251-255.

40. Goff BA, Atanasoff CT, Brown E et al. Endocervical glandular atypia in Papanicolaou smears. *Obstet Gynecol* 1992;79:101-104.
41. Gupta D, Balsara G. Extrauterine malignancies: role of pap smears in diagnosis and management. *Acta Cytol* 1999;43:806-813
42. Hemelt BA, Begnaud WP, Finan MA. Is colposcopy always necessary with atypical glandular cells of undetermined significance on Papanicolaou smears. *Prim Care Update Ob/Gyn* 2001;8:18-21
43. Herbert A, Singh N, Smith J.A.E. Adenocarcinoma of the uterine cervix compared with squamous cell carcinoma: a 12 year study in Southampton and South-west Hampshire. *Cytopatol* 2001;12:26-36
44. Herting W, Hanrath C. *Gynäkologische Zytologie. Vagina. Zervix. Endometrium.* Mülheim. H.U.F.-Verlag; 1994.
45. Ho GY, Bierman R, Beardsley L et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-428.
46. Holcomb K, Abulafia O, Matthews RP et al. The significance of ASCUS in HIN-positive women. *Gynecol Oncol* 1999;75:118-121.
47. Holowaty P, Miller AB, Rohan T et al. Natural History of Dysplasia of the uterine cervix. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91:252-8.
48. Howard M Sellors JW., Lytwyn A. et al. Combining Human Papillomavirus Testing or Cervicography With Cytology to Detect Cervical Neoplasia. *Arch Pathol Labor Med* 2004;128(11):1257-1262
49. Hulka BS. Cytologic and histologic outcome following an atypical cervical smear. *Am J Obstet Gynecol* 1968;15:90-99

50. Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M et al. Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. *Cancer* 1996;77:2275-2279
51. Jones HW.III. Clinical Treatment of Women With Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance or Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance Cervical Cytology. *Clin Obstet Gynecol* 2000;43(2):381-393.
52. Jones HW.III. Discrepancy in the Interpretation of Cervical Histology by Gynecologic Pathologists. *Obstet Gynecol Surv* 2003;58(3) 174-176.
53. Kaminski PF, Sorosky JI, Wheelock JB. Squamous atypia on cytology: the influence of age. *J Reprod Med* 1989;34:617-620
54. Kaminski PF, Sorosky JI, Wheelock JB et al. The significance of atypical cervical cytology in an older population. *Obstet Gynecol* 1989;73:13-15
55. Kaufmann RH, Adam E, Incenogle J et al. Human papillomavirus testing as triage for atypical squamous cells of undetermined significance and low-grade squamous intraepithelial lesions: sensitivity, specificity, and cost-effectiveness. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177(4)930-936.
56. Kaufmann RH, Adam E. Does typing of human papillomavirus assist in the triage of women with repeated low grade cervical cytologic abnormalities. *Gynecol Oncol* 1998;70:317-318.
57. Kaufmann RH, Adam E. Is human papillomavirus testing of value in clinical practice. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:1049-1053.
58. Kavita N, McCrory DC, Myers ER et al. Accuracy of the papanicolaou test in Screening for and Follow-up of cervical Cytologic Abnormalities: A Systematic Review. *Ann Int Medic* 2000;132:810-819.

59. Kennedy AW, Salmieri SS, Wirth SL et al. Results of the Clinical Evaluation of Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance Detected on cervical Cytology Screening. *Gynecol Oncol* 1996;63:14-18.
60. Kim TJ, Kim HS, Park CT, Park IS et al. Clinical evaluation of Follow – up Methods and Results of Atypical Glandular Cells of Undetermined Significance (AGUS) Detected on Cervicovaginal Pap Smears *Gynecologic Oncology* 1999;73:292-298
61. Kirby TO, Huh WK. HPV triage of patients with ASCUS cervical Pap smears. *Sex Reprod Menop* 2004;2(3):146-153.
62. Kishi Y, Inui S, Sakamoto Y et al. Colposcopy for postmenopausal women. *Gynecol Oncol* 1985;20:62-70.
63. Klimek R. Rak- przyczyna, uwarunkownia, samoobrona. PZWN Warszawa 1985.
64. Kline M, Davey D. Atypical squamous cells of undetermined significance qualified: a follow-up study. *Diagn Cytopathol* 1996;14:380-384.
65. Koonings PP, Price JH. Evaluation of atypical glandular cells of undetermined significance: Is age important? *Am J Obstet Gynecol* 2001 184(7):1457-1461.
66. Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med* 1992;327:1272-78
67. Krajowy Rejestr Nowotworów <http://148.81.190.231/KRN/>
68. Krupiński L. Własna modyfikacja metody Papanicolaou.” *Przegl.Metod Akademia Medyczna Kraków* 1967.
69. Krupiński L. Cytodiagnostyka ginekologiczna. *Ginekologia* red. R Klimek. PZWL, Warszawa 1982.
70. Kurman RJ, Henson DE, Herbst AL, et al. Interim Guidelines for Management of Abnormal Cervical Cytology. *JAMA* 1994;271(23):1866-1869.

71. Lacey JV, Brinton LA, Abbas FM et al. Oral contraceptives as Risk Factors for Cervical Adenocarcinomas and Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Epidemiol*;8:1079-85.
72. Lambert B, Boivin Y, Lepage Y. Atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS): clinical-cytological significance. *Int J Gynecol Cancer* 1999;329-332.
73. Lee KR, Darragh TM, Joste NE et al. Atypical Glandular Cells of Undetermined significance (AGUS). Intraobserver Reproducibility in Cervical Smears and Corresponding Thin-Layer Preparations. *Am J Clin Pathol* 2002;117:96-102
74. Levine L, Lucci J, Dinh TV. Atypical glandular cells: New Bethesda Terminology and Management Guidelines. *Obstet Gynecol Surv* 2003;58(6)399-406.
75. Lin CT, Tseng CJ, Lai CH et al. High-risk HPV detection by Hybrid Capture II. An adjunctive test for mildly abnormal cytologic smears in women \geq 50 years of age. *J Reprod Med* 2000;45:345-350.
76. Lindheim S, Smith-Nguyen G. Aggressive evaluation of atypical squamous cells in Papanicolaou smears. *J Reprod Med* 1990;35:971-973.
77. Lonky NM, Sadeghi M, Tsodik GW et al. The clinical significance of the poor correlation of cervical dysplasia and cervical malignancy with referral cytologic results. *Am J Obstet Gynecol* 1999;181(3):560-566.
78. Lytwyn A, Sellors JW, Mahony JB et al. Comparison of human papillomavirus DNA testing and repeat papanicolaou test in women with low-grade cervical cytologic abnormalities: a randomized trial. *Can Med Assoc J* 2000;163(6):701-707.
79. Madej J. Kolposkopia. PZWL Warszawa 1982.
80. Madeleine M.M, Dailing JR, Schwartz SM et al. Human papillomavirus and Long-term Oral Contraceptive Use Increase the Risk of Adenocarcinoma in Situ of the cervix. *Cancer Epidemiol* 2001;10:171-7.

81. Malarewicz A. Cytodiagnostyka patologii szyjki macicy. Blackhorse; 2002
82. Malarewicz A. Ilustrowana cytodiagnostyka ginekologiczna. Polska oficyna wydawnicza „BGW”
83. Manetta A, Keefe K, Fritz L et al. Atypical glandular cells of undetermined significance in cervical cytologic findings. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180(4):883-888.
84. Manos MM, Kinney WK, Hurley LB et al. Identifying Women With Cervical Neoplasia: Using Human Papillomavirus DNA testing for Equivocal Papanicolaou Results. *JAMA* 1999;281(17):1605-1610.
85. Manos MM. HPV testing for clarifying borderline cervical smear results: recent conflicting results highlight the dilemmas of progress. *Br Med. J* 2001;322:878-879
86. Markowska J. Rak szyjki macicy. PZWL Warszawa 1999.
87. Markowska J. Rak błony śluzowej trzonu macicy. Springer PWN Warszawa 1998.
88. Mashburn J. Evolution of the evidence-based Papanicolaou smear. *J Mid Women Health* 2001;46(3):181-189.
89. Massad LS, Collins YC, Meyer PM. Biopsy Correlates of Abnormal Cervical Cytology Classified Using the Bethesda System. *Gynecol Oncol* 2001;82:516-522
90. Massad LS, Behbakht K, Collins YC et al. Histologic findings from the cervix among older women with abnormal cervical cytology. *Gynecol Oncol* 2003;88:340-344.
91. McCluggage WG. Endocervical glandular lesions: Controversial aspects and ancillary techniques. *J Clin Pathol* 2003;56(3) 164-173.
92. Mitchell H, Medley G, Gordon I et al. Cervical cytology reported as negative and risk of adenocarcinoma: no strong evidence of benefit. *Br J Cancer* 1995;71:894-897.
93. Nanda K, McCrory DC, Myers ER et al Accuracy of the Papanicolaou Test in Screening for and Follow-up of Cervical Cytologic Abnormalities: A Systematic Review. *Ann Int Med* 2000;132:810-819

94. Nieminen P, Aho M, Vesterinen E et al. Natural history of HPV infection: preliminary results of a cohort study. *Papillomavirus Workshop* 1991:77.
95. Nieminen P, Kalio M, Hakama M. The effect of mass screening on incidence and mortality of squamous and adenocarcinoma of the cervix uteri. *Obstet Gynecol* 1995;85:1017-1021
96. Obenson K, Abreo F, Grafton WD. Cytohistologic Correlation Between AGUS and Biopsy-Detected lesions in Postmenopausal Women. *Acta Cytol* 2000;44:41-45
97. Papanicolaou GN. The diagnostic value of vaginal smear in carcinoma of the uterus. *Am J Obst Gyn*, 1941,42:193:206.
98. Papanicolaou GN, Traut HF. *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear* New York 1943.
99. Papanicolaou GN. *Atlas of exfoliative cytology*. Cambridge 1954
100. Parellada CI, Schivartche PL, Pereyra EA et al. Atypical glandular cells on cervical smears. *Int J Gynecol Obstetr* 2002;78:227-234.
101. Partridge E. NCCN practice guidelines for cervical cancer screening. *Oncol* 1999;13:550-574.
102. Peters RK, Chow A, Mack TN et al.. Increased frequency of adenocarcinoma of the uterine cervix in young women in Los Angeles county. *J Natl Cancer Inst* 1986;76:423-428.
103. Pirog EC, Erroll M, Hharigopal M et al. Comparison of Human Papillomavirus DNA Prevalence in Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Subcategories as Defined by the Original Bethesda 1991 and the new Bethesda 2001 Systems. *Arch Pathol Lab Med* 2004;128:527-532.
104. Piver MS. *Podręcznik onkologii ginekologicznej*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa 1999.

105. Poulsen H.E, Taylor C.W, Sobin L.H. Hystological typing of female genital tract tumors. International hystological classification of tumors No 13. WHO Geneva 1975
106. Pschyrembel W, Strauss G, Petrie E. Ginekologia praktyczna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa 1994.
107. Raab SS. Human papillomavirus reporting. Impact on Bethesda Cytology Reports. Arch Pathol Lab Med 2003;127;8:969-972.
108. Raab SS, Geisinger KR, Silverman HF et al. Intraobserver variability of Papanicolaou smears diagnosis of atypical glandular cells of undetermined significance. Am J Clin Pathol 1998;110:653-658.
109. Raab SS, Snider TE, Potts SA et al. Atypical glandular cells of undetermined significance: diagnostic accuracy and intraobserver variability using select cytologic criteria. Am J Clin Pathol 1997;107:299-307.
110. Raab SS, Isacson C, Layfield LJ et al. Atypical glandular cells of undetermined significance: cytologic criteria to separate clinically significant from benign lesions. Am J Clin Pathol 1995;104:574-582.
111. Rader AE, Rose PG, Rodriguez M et al. Atypical squamous cells of undetermined significance over 55: comparison with the general population and implications for the management. Acta Cytol 1999;43:357-362.
112. Rebello G, Hallam N, Smart G et al. Human papillomavirus testing and the management of women with mildly abnormal cervical smears: an observational study. Br Med J 2001; 322:893-894.
113. Riethdorf S, Riethdorf L, Milde-Langosch K et al. Differences in HPV 16- and HPV18 E6/E7 oncogene expression between in situ and invasive adenocarcinomas of the cervix uteri. Virchows Arch 2000; 437; 491-500.

114. Ronnet BM, Manos M, Ransley JE et al. Atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS): Cytopathologic Features, Histopathologic Results, and Human Papillomavirus DNA detection. *Hum Pathol.* 1999;30(7):816-25.
115. Schiffman M, Solomon D. Findings to Date From the ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS). *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:946-949.
116. Schiffman M, Bauer HM, Hoover RN et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Nat Cancer Inst* 1993;85:958-964.
117. Schroeder BM. ASC updates guidelines for the early detection of cervical neoplasia and cancer. *Am Fam Physic* 2003;67(9):2011-2014.
118. Scyldberg BM, Murray E, Lambkin H et al. Adenocarcinoma of the uterine cervix in Ireland and Sweden: human papillomavirus infections and biological alternations. *Mod Pathol* 1999;12:675-682.
119. Selvaggi S, Haefner H. Reporting of atypical squamous cells of undetermined significance on cervical smears: is it significant? *Diagn Cytopathol* 1995;13:352-356.
120. Sheils L, Wilbur D. Atypical squamous cells of undetermined significance. Stratification of the risk of association with, or progression to squamous intraepithelial lesions based on morphologic subcategorization. *Acta Cytol* 1997;41:1065-1072.
121. Sherman ME, Salomon D, Schiffman M. Qualifications of ASCUS. A comparison of equivocal LSIL and equivocal HSIL cervical cytology in the ASCUS LSIL Triage Study. *A J Clin Pathol* 2001;116:386-394.
122. Sherman ME, Wang SS, Tarone R et al. Histopatologic Extent of Cervical Intraepithelial neoplasia 3 lesions in the Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study: Implications for Subject Safety and Lead-time Bias. *Can Epid Biom Prev.* 2003;12:372-379.

123. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Effects of Age and Human Papilloma Viral Load on Colposcopy Triage: Data From Randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low Grade Squamous Intraepithelial lesions Triage Study (ALTS). *J Nat Can Inst.* 2002;94;2:102-107.
124. Sherman ME, Schiffman MH, Lorincz AT et al. Toward objective quality assurance in cervical cytopathology: correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high risk human papillomavirus types. *Am J Clin Pathol* 1994;102:182-187.
125. Shmith AE, Sherman ME, Scott DR et al. Review of the Bethesda System Atlas Does Not Improve of Reproducibility or Accuracy in the Classification of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significans Smears. *Can Cytopath.* 2000;90;4:201-206.
126. Slawson DC, Bennett JH, Simon LJ et al. Should all women with cytologic atypia be referred for colposcopy: a HARNET sudy. *J Fam Pract* 1994;38:387-392.
127. Smith A, Sherman ME, Scott DR et al. Review of the Bethesda System Atlas Does Not Improve reproducibility or Accuracy in the Classification of Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Smears. *Cancer Cytopathol* 2000;90(4):201-206.
128. Smith-McCune K, Mancuso V, Contant T et al. Menagement of women with atypical Papanicolaou tests of undetermined significance by board-certified gynecologists: Discrepancies with published guidelines. *Am J Obstet Gynecol.*2001;185:551-556.
129. Solomon D, Nayar R. *The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology. Definitions, Criteria, and Explanatory Notes.* Springer 2004.
130. Solomon D, Schiffman M, Cox JT. ALTS Study group. Comparision of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance: baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001;93:293-299.

131. Spaczyński Marek Onkologia ginekologiczna. Urban&Partner Wrocław 1987.
132. Stoler MH, Schiffman M. Interobserver Reproducibility of Cervical Cytologic and Histologic Interpretations: Realistic Estimates From the ASCUS-LSIL Triage Study. JAMA 2001;285(11):1500-1505.
133. Suh-Burgmann E, Darragh T, Smith-McCune K. Atypical squamous cells of undetermined significance: Management patterns at an academic medical center. Am J Obstet Gynecol. 1998;178:991-995.
134. Syrjänen K, Kataja V, Yliskoski M et al. Natural history of cervical human papillomavirus lesions does not substantiate the biologic relevance of the Bethesda System. Obstet Gynecol 1992;79:675-82.
135. Szalay L. Cytology of the uterine cervix. Wilhelm Maudrich-Medical Publishers;1990.
136. Szamborski J. Diagnostyka szyjki macicy. Histopatologia.Cytologia. Kolposkopia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
137. The ALTS Group: results of a randomized trial on the management of cytology interpretations of atypical squamous cells of undetermined significance. Am J Obstet Gynecol 2003;183:1383-1392.
138. Tam KF, Cheung ANY, Liu KL et al. A retrospective review on atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS) using the Bethesda 2001 classification. Gynecol Oncol 2003;91:603-607.
139. Tarłowska L. Onkologia ginekologiczna. PZWL Warszawa 1983.
140. Taylor R, Guerrieri J, Nash J et al. Atypical cervical cytology colposcopic follow-up using the Bethesda System. J Reprod Med 1993;38:443-447.
141. Tenti P, Romagnoli S, Silini R et al. Human papillomavirus types 16 and 18 infection in infiltrating adenocarcinoma of the cervix. A J Clin Pathol 1998;152:1057-1063.

142. Toplis PJ, Caemore V, Hallam N et al. Evaluation of colposcopy in postmenopausal women. *Br J Obst Gynecol* 1986;93:843-851.
143. Uchiyama M, Iwasaka T, Matsuo N et al. Correlation between human papillomavirus positivity and p53 gene overexpression in primary adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 1997;65: 23-29.
144. Vlahos NP, Dragisic KG, Wallach EE et al. Clinical significance of the qualification of atypical squamous cells of undetermined significance: An analysis on the basis of histologic diagnoses. *Am J Obstet Gynecol.* 2000;182:885-890.
145. Widy-Wirsky F, Szamborski J, Szymańska K. *Rak szyjki macicy*. PZWL;Warszawa 1961.
146. Wied GL, Koss LG, Reagan JW. *Compendium on Diagnostic Cytology. Tutorials Of Cytology, 5th Edition*, 1983.
147. Wilbur DC, Bonfiglio TA, Erozan YS. The cytology of the endocervix, endometrium and upper female genital tract. *Gynecol Cytopathol* 1997;107-156.
148. Williams M, Rimm D, Pedigo M et al. Atypical squamous cells of undetermined significance: correlative histologic follow-up studies from academic medical center. *Diagn Cytopathol* 1997;16:1-7
149. Wright TC, Cox JT, Massad LS et al. 2001 Consensus Guidelines for the Management of Women With cervical Cytological Abnormalities. *JAMA* 2002; 287(10):2120-2129.
150. Wright TC, Schiffman M, Solomon D et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol* 2004;103:304-9.
151. Young NA, Naryshkin S, Atkinson BF et al. Intraobserver variability of cervical smears with squamous cell abnormalities: a Philadelphia study. *Diagn Cytopathol* 1994; 11:352-357.

152. Zahm DM, Nidl I, Greinke C et al. Colposcopic appearance of cervical intraepithelial neoplasia is age dependant. *Am J Obstet Gynecol* 1998;179:1298-1304.
153. Zweizig S, Noller K, Reale F et al. Neoplasia associated with atypical glandular cells of undetermined significance on cervical cytology. *Gynecol Oncol* 1997;65:314-318.