

Ocena przydatności testu połączonego – metody optoelektronicznej i testu molekularnego w wykrywaniu śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy

Assessment of optoelectronic method and molecular test usefulness for cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer detection

Pruski Dominik^{1,2}, Kędzia Witold^{1,2}, Przybylski Marcin¹,
Józefiak Agata², Purol Maciej¹, Spaczyński Marek¹

¹ Klinika Onkologii Ginekologicznej Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Pracownia Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno-Położniczego Szpitala w Poznaniu

Streszczenie:

Wstęp: Biofizyka i biologia molekularna są dziedzinami, które bardzo dynamicznie wkraczają w profilaktykę raka szyjki macicy. Zastosowanie testu połączonego, który obejmuje diagnostykę optoelektroniczną i diagnostykę molekularną może w znaczący sposób przyczynić się do spadku zachorowalności i umieralności z powodu raka szyjki macicy.

Cel pracy: Celem pracy była ocena przydatności testu połączonego – metody optoelektronicznej i testu molekularnego na obecność onkogennych typów wirusa HPV w wykrywaniu śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy.

Materiał i metoda: Od sierpnia 2006 do października 2008 roku badaniem objęto 250 pacjentek Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu. U pacjentek wykonano następujące badania diagnostyczne: badanie optoelektroniczne, test PCR na obecność DNA HPV HR, badanie kolposkopowe i badanie histopatologiczne materiału biopsyjnego.

Wyniki: Czulość testu połączonego dla zmian śród nabłonkowych niskiego stopnia w obrębie nabłonka płaskiego (CIN 1) wyniosła 81%, natomiast dla zmian wysokiego stopnia (CIN 2, CIN 3) oraz raka płaskonabłonkowego i gruczolowego szyjki macicy wyniosła 100%.

Wnioski: Diagnostyka optoelektroniczna i molekularna jest przydatna w wykrywaniu zmian neoplastycznych szyjki macicy. Obie metody mogą stać się kluczowym narzędziem diagnostycznym etapu podstawowego i pogłębionego badań przesiewowych raka szyjki macicy. Przewaga badania optoelektronicznego połączonego z diagnostyką molekularną nad profilaktyką opartą o cytodiagnostykę i kolposkopię wynika z możliwości automatyzacji i standaryzacji badania.

Słowa kluczowe: **śród nabłonkowa neoplazja szyjki macicy /
metoda optoelektroniczna / test molekularny /**

Adres do korespondencji:

Dominik Pruski
Klinika Onkologii Ginekologicznej Katedra Ginekologii, Położnictwa i Onkologii Ginekologicznej
UM im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
60-535 Poznań, ul. Polna 33
tel. 61 84-19-271; fax. 61 84-19-465
e-mail: onko@gpsk.am.poznan.pl

Otrzymano: 15.02.2010
Zaakceptowano do druku: 30.05.2010

Summary

Introduction: *Biophysics and molecular biology are disciplines dynamically entering the area of cervical cancer prevention. The combined test, comprising optoelectronic and molecular diagnostics, may play a significant role in the decrease of cervical cancer incidence and mortality.*

Objective: *Assessment of the combined test usefulness – optoelectronic method and HPV test for the presence of oncogenic HPV types, in the detection of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer.*

Material and method: *From August 2006 to October 2008 the study included 250 patients from the Laboratory of Pathophysiology of Uterine Cervix in Gynecology and Obstetrics Clinical Hospital of Karol Marcinkowski University of Medical Sciences. The patients underwent the following diagnostic tests: optoelectronic method, PCR test for the presence of DNA HPV HR, colposcopic examination and histopathologic biopsy.*

Results: *Sensitivity of the combined test for low-grade intraepithelial changes in the area of squamous epithelium (CIN 1) was 81%, while for high-grade changes (CIN 2, CIN 3) and carcinoma planoepitheliale together with adenocarcinoma was 100%.*

Conclusions: *Optoelectronic and molecular diagnostics methods are useful in detecting neoplastic cervical changes. Both methods may become a key diagnostic tool of basic and advanced level of cervical screening. The advantage of the combined optoelectronic method and molecular diagnostics method over prevention based on cytodiagnosics and colposcopy has its source in the possibility of test automation and standardization.*

Key words: **cervical intraepithelial neoplasia / optoelectronic method /
/ molecular diagnostic testing /**

Wstęp

Inwazyjny rak szyjki macicy jest chorobą, której stosunkowo łatwo można zapobiegać. Poprzedzając go długi okres rozwoju postaci przedinwazyjnych stwarza możliwość realizowania przesiewowych programów badań cytologicznych. Pomimo to w roku 2007 w Polsce rozpoznanie raka szyjki macicy postawiono u 3431 kobiet, a 1907 kobiet zmarło z powodu tego nowotworu. Standaryzowany współczynnik zachorowalności na raka szyjki macicy wynosi 11,8, a umieralności 5,9 [1].

Wśród licznych czynników ryzyka zachorowania wymienia się m.in.: młody wiek w chwili inicjacji seksualnej (<16 lat), licznych aktywnych płciowo partnerów seksualnych, palenie tytoniu, dużą liczbę porodów i niski status ekonomiczny. Jednak główną przyczyną etiologiczną rozwoju raka szyjki macicy jest przetrwałe zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego. Szczególnie groźna jest infekcja typami o wysokim charakterze onkogennym np. HPV 16, 18. Typ 16 jest związany z patogenezą raka płaskonabłonkowego, a typ 18 z powstaniem raka gruczolowego.

Stanem przedrakowym szyjki macicy jest śród nabłonkowa neoplazja szyjki macicy – CIN (*cervical intraepithelial neoplasia*). Do zmian śród nabłonkowych niskiego stopnia – LGSIL, zaliczamy CIN 1, a do zmian śród nabłonkowych wysokiego stopnia – HGSIL, rozpoznania histopatologiczne CIN 2 i CIN 3.

Proces ewolucji stanu przedrakowego szyjki macicy trwa wiele lat. Pojawienie się śród nabłonkowej neoplazji wyprzedza rozwój raka szyjki macicy o około 3 do 10 lat, co stanowi dość duży margines diagnostyczny. CIN 1 bardzo często jest konsekwencją incydentalnego, przejściowego zakażenia wirusem brodawczaka ludzkiego, które u 80% kobiet ulega samoistnej regresji w czasie 9-15 miesięcy [2]. Przetrwałe zakażenie typami onkogennymi HPV może 300-krotnie zwiększać ryzyko rozwoju zmian wysokiego stopnia, jest także odpowiedzialne za rozwój i utrzymanie CIN 3 [3].

W roku 1928 powstała pierwsza klasyfikacja oceny wymazów cytologicznych – według Papanicolaou [4]. Od 1950 roku badania przesiewowe oparte o wymazy cytologiczne przyniosły obniżenie wskaźnika zachorowalności na raka szyjki macicy

o 79% oraz wskaźnika śmiertelności do 70% [5]. W 1988 roku opracowano nowy system klasyfikacji rozmazów cytologicznych – *The Bethesda System* (TBS), który dzięki swojemu opisowemu charakterowi pozwolił między innymi zmniejszyć liczbę wyników fałszywie negatywnych i pozytywnych. Pomimo wprowadzenia klasyfikacji TBS wraz z ostatnimi modyfikacjami wymazu cytologicznego użytego do wykrywania śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy, czułość i swoistość metody szacuje się na 60% i 70% [6]. Zastosowanie metod molekularnych do identyfikacji onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego ułatwiło kwalifikację kobiet do grupy wysokiego ryzyka rozwoju śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy. Jedyną metodą rozpoznawczą niezmiennie pozostaje ocena histopatologiczna materiału pobranego z miejsc podejrzanych pod kontrolą kolposkopii.

Dziedziną, która bardzo dynamicznie wkracza w profilaktykę i diagnostykę śród nabłonkowej neoplazji szyjki macicy jest biofizyka oraz biologia molekularna.

Jedną z najbardziej obiecujących koncepcji biofizycznego programu profilaktyki ostatnich lat jest metoda optoelektroniczna. Analiza budowy błony śluzowej szyjki macicy za pomocą tej metody polega na pomiarze powracającej, odbitej, rozproszonej wiązki światła oraz odpowiedzi elektrycznej, czyli powracającego impulsu elektrycznego, zmodyfikowanego przez tkankę prawidłową lub zmienioną patologicznie [7, 8]. Etapem końcowym tej metody jest komputerowe porównanie danych pacjentki ze wzorcem, stworzonym na podstawie grupy kontrolnej 3000 kobiet różnego pochodzenia, rasy, wieku, rodności itd. Dla każdej z tych wzorcowych kobiet opracowano swoisty optoelektroniczny „podpis tkankowy” potwierdzony analizą kolposkopową, cytologiczną i histologiczną. Urządzenie identyfikuje 16 różnych typów patologii nabłonka wielowarstwowego płaskiego i gruczolowego. Ocena optoelektroniczna nabłonka szyjki macicy jest obiektywna poprzez swoją automatyzację i pozwala uniknąć błędów ludzkiego tak charakterystycznego dla cytodiagnostyki.

Zastosowanie testu składającego się z metody optoelektronicznej oraz diagnostyki molekularnej może w znaczący sposób przyczynić się do spadku zachorowalności i umieralności z powodu raka szyjki macicy.

Cel pracy

Celem pracy była ocena przydatności testu połączonego – metody optoelektronicznej i testu molekularnego na obecność onkogennych typów wirusa HPV w wykrywaniu śródnamłonkowej neoplazji szyjki macicy oraz raka szyjki macicy. Cel zrealizowano poprzez ocenę czułości testu połączonego (metody optoelektronicznej i testu HPV DNA HR) w wykrywaniu śródnamłonkowej neoplazji szyjki macicy.

Materiał i metoda

Od sierpnia 2006 do października 2008 roku badaniem objęto 250 pacjentek. Badania prowadzono w Pracowni Patofizjologii Szyjki Macicy Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego w Poznaniu. Algorytm badań przeprowadzonych u wszystkich pacjentek obejmował: badanie metodą optoelektroniczną, test PCR na obecność DNA HPV HR, badanie kolposkopowe i badanie histopatologiczne materiału biopsyjnego. Na wszystkie procedury uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu, a każda pacjentka po uzyskaniu wyczerpujących informacji podpisywała świadomą zgodę na udział w badaniu. Przeprowadzone badania były prospektywne i zaślepienie.

Metoda optoelektroniczna

Technika wykonania badania nie jest zbyt skomplikowana i czasochłonna. Upraszczając, polega na zbliżeniu końcówki sondy do szyjki macicy, w celu skanowania całej grubości nabłonka. Badanie jest bezbolesne i trwa od 1 do 2 minut. W badaniu wykorzystano urządzenie Truscreen firmy Polartech. (Rycina 1).

Metoda optoelektroniczna wykorzystuje następujące zjawiska fizyczne:

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

W skład systemu diagnostycznego wchodzi:

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

Składowa elektryczna metody optoelektronicznej wykorzystuje wielofunkcyjne elektrody, które stymulują tkankę impulsami elektrycznymi o napięciu 0,8V i czasie trwania 350µs. Krzywa przepływu ładunku zależy od typu tkanki stymulowanej, czyli od jej impedancji [8].

Składowa optyczna wykorzystuje trzy różne długości światła (podczerwień od 780nm do 1mm, światło czerwone oraz zielone). Źródłem światła są diody typu LED o mocy od 7 do 130µW.

Badania wirusologiczne

Materiał na obecność onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego pobierano szczoteczką typu Cervex Brush z tarczy, kanału szyjki macicy oraz ze sklepień pochwy. Otrzymany materiał był następnie podawany obróbce molekularnej z zastosowaniem metody PCR (Amplicor-Roche Diagnostics), która

jest jakościowym testem służącym do identyfikacji DNA wirusów HPV wysokiego ryzyka o genotypach 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 i 68 *in vitro*.

Procedura badania molekularnego składa się z czterech etapów: przygotowania próbki, amplifikacji docelowego materiału DNA, hybrydyzacji i detekcji produktów amplifikacji.

Badanie kolposkopowe

W badaniach wykorzystano kolposkop stereoskopowy (Olympus OCS-500). Do diagnostyki kolposkopowej wykorzystano próbę z 3-5% kwasem octowym i test Schillera. Obrazy kolposkopowe zostały ocenione przy użyciu ośmiopunktowej skali Reida, opisującej brzeg i zbieżenie zmiany po kwasie octowym, jodonegatywność oraz charakter naczyń. Zastosowanie większych powiększeń umożliwiało szczegółową ocenę podnamłonkowego łożyska naczyniowego.

Za wynik nieprawidłowy uznano obrazy ocenione w skali Reida na 3 i więcej punktów. Brak wizualizacji całej strefy przekształceń kwalifikował obraz do kategorii kolpogramów niesatysfakcjonujących.

Badanie histopatologiczne

U wszystkich pacjentek pod kontrolą kolposkopu pobrano celowane wycinki z miejsc podejrzanych oraz wyłyczkowano kanał szyjki macicy. Wskazaniem do weryfikacji histopatologicznej był pierwotnie nieprawidłowy wynik badania cytologicznego.

Wszystkie preparaty histopatologiczne zostały poddane podwójnej, niezależnej, zaślepieniu ocenie histopatologicznej w Pracowni Patomorfologicznej GPSK UM w Poznaniu.

Wyniki

Odsetek wyników nieprawidłowych w grupie badanej 73/250 wyniósł 29%. (Rycina 2).

Przebadaną populację podzielono w zależności od rozpoznania histopatologicznego na następujące grupy:

- 29 pacjentek z rozpoznaniem zmian typu LGSIL (CIN 1),
- 41 pacjentek rozpoznaniem zmian typu HGSIL (CIN 2, CIN 3) oraz raka płaskonabłonkowego,
- 3 pacjentki z rozpoznaniem raka gruczołowego,
- 177 pacjentek z rozpoznaniem pozbawionym cech procesu neoplazji.

Czułość metody optoelektronicznej użytej do wykrycia zmian śródnamłonkowych niskiego stopnia w obrębie nabłonka płaskiego – LGSIL została oszacowana na 62,0%, a dla zmian wysokiego stopnia – HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego 87,8%. (Tabela I).

Metoda optoelektroniczna nie wykryła ani jednego przypadku raka gruczołowego. Swoistość metody optoelektronicznej użytej do wykrycia patologii szyjki macicy wyniosła 80,2%.

Czułość metody molekularnej PCR użytej do wykrycia zmian śródnamłonkowych niskiego stopnia w obrębie nabłonka płaskiego – LGSIL została wyliczona na 69,0%, a dla zmian wysokiego stopnia - HGSIL oraz raka płaskonabłonkowego 92,7%. (Tabela I).

Test na obecność onkogennych typów wirusa brodawczaka ludzkiego – PCR umożliwił wykrycie wszystkich, trzech przypadków raka gruczołowego w obrębie błony śluzowej szyjki macicy.

Tabela 1. Czulość metody optoelektronicznej, testu molekularnego PCR oraz testu połączonego użytego do wykrywania zmian typu LGSIL, HGSIL wraz z rakiem płaskonabłonkowym, oraz raka gruczołowego.

	LGSIL	HGSIL + RAK PŁASKONABŁONKOWY	RAK GRUCZOŁOWY
CZUŁOŚĆ METODY OPTOELEKTRONICZNEJ	62,0%	87,8%	0%
CZUŁOŚĆ METODY MOLEKULARNEJ PCR	69,0%	92,7%	100%
CZUŁOŚĆ POŁĄCZONA OBU TESTÓW DIAGNOSTYCZNYCH	83,0%	100%	100%

Swoistość metody molekularnej PCR identyfikującej obecność trzynastu typów onkogennych wirusa brodawczaka ludzkiego użytej do wykrycia patologii szyjki macicy wyniosła 63,3%.

Czulość testu połączonego (metody optoelektronicznej oraz molekularnej) dla wykrywania zmian LGSIL została oszacowana na 83,0%, a dla zmian HGSIL wraz z rakiem płaskonabłonkowym 100% (95% CI; 0,93 – 1,0).

Zastosowanie testu połączonego umożliwiło wykrycie wszystkich trzech przypadków raka gruczołowego, zlokalizowanych w obrębie kanału szyjki macicy. (Tabela I).

Dyskusja

Nadrzędnym celem wdrażania nowych metod wykrywających patologię szyjki macicy jest precyzyjniejsza identyfikacja pacjerek ze śródnabłonkową neoplazją szyjki macicy oraz rakiem szyjki macicy. Zastosowanie testów połączonych w diagnostyce w znaczący sposób wpływa na wzrost czulości metod wykrywających. Główną zaletą diagnostyki optoelektronicznej jest możliwość uzyskania wyniku w czasie rzeczywistym, co pozwala na redukcję liczby wizyt oraz przyspieszenie postawienia ostatecznej diagnozy.

Zastosowana w powyższej pracy, zarówno diagnostyka optoelektroniczna jak i molekularna PCR, umożliwia minimalizację błędów ludzkiego poprzez proces automatyzacji i analizy komputerowej.

W pracy Copplesona i wsp. z 1994 roku wykorzystano prototypowe urządzenie optoelektroniczne (Polarprobe). Czulość diagnostyki optoelektronicznej użytej dla wykrycia zmian typu CIN 1 wyniosła 85%, dla zmian typu CIN 2 i CIN 3 oszacowana na 90%, a dla raka inwazyjnego szyjki macicy na 99% [9].

W publikacji z 2003 roku czulość metody optoelektronicznej zastosowanej do wykrywania zmian niskiego stopnia w obrębie nabłonka wielowarstwowego płaskiego wynosiła 67%, a dla zmian wysokiego stopnia 70% [10].

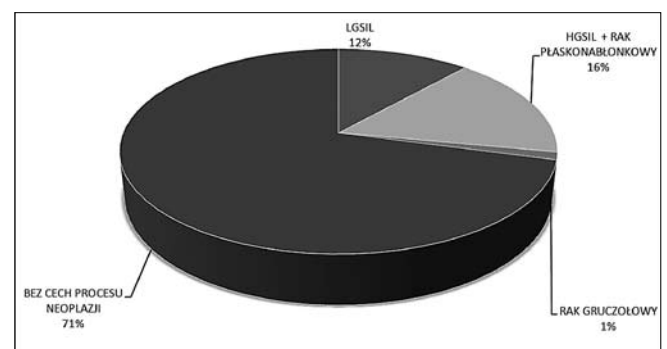
W pracy Francesco z 2008 roku czulość testu molekularnego PCR na obecność DNA trzynastu onkogennych typów wirusa HPV dla zmian typu CIN 1 wynosiła 59%, dla zmian typu CIN 2 i CIN 3 odpowiednio 92% i 90%. Swoistość wynosiła 41% [11].

Czulość testów połączonych z zastosowaniem diagnostyki optoelektronicznej oraz molekularnej po raz pierwszy oszacowano w 2008 roku, wynosiła ona 86% dla zmian niskiego stopnia oraz 100% dla zmian wysokiego stopnia wraz z rakiem płaskonabłonkowym i gruczołowym szyjki macicy [12].

W badanej na potrzeby niniejszej pracy populacji czulość testu połączonego dla wykrywania zmian LGSIL została oszacowana na 83,0%, a dla zmian HGSIL wraz z rakiem płaskonabłonkowym 100% (95% CI; 0,93 – 1,0).

Zastosowanie testu połączonego umożliwiło wykrycie wszystkich trzech przypadków raka gruczołowego, zlokalizowanych w obrębie kanału szyjki macicy. Analizę czulości przeprowadzono na dwa razy większej populacji w porównaniu do publikacji z 2008 roku. Otrzymane przez nasz zespół wyniki potwierdzają przydatność metody optoelektronicznej stosowanej w połączeniu z metodą molekularną PCR identyfikującą trzynaście onkogennych typów wirusa HPV, w wykrywaniu patologii szyjki macicy.

Na podstawie przeprowadzonych badań należy jednak stwierdzić, że badanie metodą optoelektroniczną jest nieprzydatne w ciąży i połogu, w okresie 3 miesięcy po zabiegach na szyjce, po radio i fototerapii oraz w przypadku niemożności uwidocznienia całej powierzchni tarczy szyjki macicy, stwierdzenia zmian krwawiących lub torbieli Nabotha.

**Rycina 1.** Urządzenie Truscreen – konsola z sondą.**Rycina 2.** Udział procentowy poszczególnych rozpoznań histopatologicznych w całej populacji badanej.

W sytuacji gdy proces karcinogenezy zlokalizowany jest w *endocervix*, badanie optoelektroniczne podlega tym samym ograniczeniom co cytodiagnostyka i kolposkopia. Stąd wniosek, że test optoelektroniczny powinien być wykonywany łącznie z testem molekularnym na obecność DNA HPV HR.

Wnioski

Diagnostyka optoelektroniczna i molekularna jest przydatna w wykrywaniu zmian neoplastycznych szyjki macicy.

Czułość testu połączonego dla wykrywania zmian LGSIL została oszacowana na 83,0%, a dla zmian HGSIL wraz z rakiem płaskonabłonkowym oraz gruczolowym na 100%

Obie metody stosowane równolegle mają szansę stać się znaczącym narzędziem diagnostycznym etapu podstawowego i pogłębionego badań przesiewowych raka szyjki macicy. Przewaga optoelektroniki oraz diagnostyki molekularnej nad profilaktyką opartą o cytodiagnostykę i kolposkopię wynika z możliwości automatyzacji i standaryzacji badania.

Piśmiennictwo

1. Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie. Zakład Epidemiologii i Prewencji Nowotworów. Krajowy Rejestr Nowotworów. 2010-05-16. <http://epid.coi.waw.pl/krn/>
2. Ho G, Bierman R, Beardsley L, [et al.]. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998, 338, 423-428.
3. Nobbenhuis M, Walboomers M, Helmerhorst T, [et al.]. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical cancer screening: a prospective study. *Lancet.* 1999, 354, 20-25.
4. Papanicolaou G. A new procedure for the staining of vaginal smears. *Science.* 1942, 95, 438-439.
5. Ries L, Eisner M, Kosary C, [et al.]. SEER Cancer statistics review, 1975-2002. Bethesda, MD: *National Cancer Institute*, 2004.
6. Cox J, Lorincz A, Schiffman M, [et al.]. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol.* 1995, 172, 946-954.
7. Canfell K, Chow C. Real-time devices for the screening and diagnosis of cervical neoplasia. In: Part 6B Cervical neoplasia: screening. Ed. Jordan J, Singer A, Jones H, [et al.]. Published by Wiley J & Sons. *The Cervix*, 2nd Edition 2006.
8. Abdul S, Brown B, Milnes P, [et al.]. The use of electrical impedance spectroscopy in the detection of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Cancer.* 2006, 16, 1823-1832.
9. Coppleson M, Reid B, Skladnev V, [et al.]. An electronic approach to the detection of pre-cancer and cancer of the uterine cervix: a preliminary evaluation of Polar-probe. *Int J Gynecol Cancer.* 1994, 4, 79-83.
10. Singer A, Coppleson M, Canfell K, [et al.]. A real time optoelectronic device as an adjunct to the Pap smear for cervical screening: a multicenter evaluation. *Int J Gynecol Cancer.* 2003, 13, 804-811.
11. De Francesco M, Gargiulo F, Schreiber C, [et al.]. Comparison of the AMPLICOR human papilloma virus test and the hybrid capture 2 assay for detection of high-risk human papillomavirus in women with abnormal PAP smear. *J Virol Methods.* 2008, 147, 10-17.
12. Pruski D, Kędzia W, Przybylski M, [et al.]. Assessment of real optoelectronic method in the detection of cervical intraepithelial neoplasia. *Ginekol Pol.* 2008, 79, 342-346. Polish.