

4. Wstęp do diagnostyki cytologicznej

4.1. Czym jest diagnostyka cytologiczna?

Diagnostyka cytologiczna (określana również jako cytopatologiczna lub krócej cytodiagnostyka) jest metodą badania komórek (pochodzących z tkanek lub z płynów ustrojowych organizmu) przy użyciu mikroskopu. Celem badania jest z reguły identyfikacja zmian patologicznych w komórkach, które mogą wskazywać na choroby nowotworowe lub stan zapalny. W przypadku wykrycia zmiany nowotworowej, lekarz może zalecić dalsze badania w celu postawienia dokładnej diagnozy i zaplanowania odpowiedniego leczenia.

Diagnostyka cytologiczna jest metodą szybką i tanią (w porównaniu z innymi metodami). Należy do kategorii badań przesiewowych (screeningowych), czyli profilaktycznych badań dla osób zdrowych, jednak znajdujących się w podwyższonej grupie ryzyka konkretnej choroby nowotworowej. Celem tego typu badań jest wykrycie choroby nowotworowej (lub innych zmian) przed wystąpieniem objawów oraz kontrola stanu zdrowia populacji. W trakcie leczenia może być stosowana również jako metoda monitorowania postępów leczenia lub wczesnego wykrywania nawrotów choroby. Warto podkreślić, że wynik badania cytologicznego nie stanowi rozpoznania, jest jednak podstawą dla dalszej diagnostyki [11].

Cytopatologia (inne określenie diagnostyki cytologicznej) jest działem patomorfologii, wobec czego pobrany do badań materiał jest oceniany przez odpowiednio wykwalifikowanych patomorfologów (czasem osoby przeprowadzające analizę nazywane są również cytologami). Cytologia zakłada, że wygląd, charakterystyka komórek odzwierciedla biologiczną specyfikę (kondycję) badanego narządu lub niekiedy całego ciała (zależnie od zakresu badania). Ocena mikroskopowa zawiera analizę elementów takich jak: [11]

- skład komórkowy próbek,
- znaki szczególne pojedynczych komórek,
- sposób zgrupowania komórek (wzór),
- obecność innych elementów np. ciał obcych, bakterii

Najważniejsze zalety wykorzystania diagnostyki cytologicznej to: [1]

- Bezpieczeństwo - procedury, które są stosowane w celu uzyskania próbek cytologicznych są niezwykle bezpieczne. Powikłania zdarzają się bardzo rzadko, a jeśli już wystąpią, to są stosunkowo łagodne.
- Prostota - uzyskanie większości próbek cytologicznych jest proste w porównaniu z innymi metodami. Obecnie większość instytucji przeprowadzających badania bardzo dobrze zna technologię pracy diagnostycznej.

- Szybkość - wyniki mogą być udzielone niemal natychmiast (w czasie procedury), lub w ciągu kilku godzin
- Niski koszt - w porównaniu z biopsją chirurgiczną koszt wykonania badania cytologicznego jest znacznie niższy.

Wady: [26]

- Niska czułość - niektóre badania cytologiczne mają niską czułość, co oznacza, że mogą pomijać niektóre przypadki choroby.
- Wysoka liczba fałszywie ujemnych wyników - w niektórych przypadkach badanie cytologiczne może dać wynik fałszywie ujemny, co oznacza, że wynik jest negatywny, ale choroba występuje.
- Konieczność powtórzenia badania - w przypadku niejednoznacznych lub negatywnych wyników konieczne może być powtórzenie badania, co zwiększa koszty i opóźnia diagnozę.
- Skomplikowane wyniki - wyniki mogą być trudne do interpretacji, co może prowadzić do błędów i opóźnień w leczeniu.

4.2. Historia

Historia diagnostyki cytologicznej rozpoczęła się w XVIII i XIX wieku, kiedy podejmowane były pierwsze próby obserwacji i identyfikacji komórek pod mikroskopem. Ważnym wydarzeniem w rozwoju cytologii było wydanie w 1928 roku pierwszej pracy na temat cytologicznej diagnostyki raka szyjki macicy przez greckiego patologa George Papanicolaou. Jednak pomysł spotkał się ze sceptycyzmem i oporem ze strony innych naukowców oraz środowiska lekarskiego. Kolejną pracą była wydana w 1943 roku przez Papanicolaou wraz z Herbertem Trautem monografia "Diagnosis of Uterine Cancer by the Vaginal Smear", która stała się podstawą nowoczesnej cytopatologii. W książce omówione zostało m.in. przygotowanie wymazów do badania (szyjki macicy i pochwy), opisane zostały zmiany obserwowane w przypadku obecności raka, czy ogólne zmiany cytologiczne w trakcie cyklu miesięczkowego [1, 22, 25].

Co więcej bardzo szczegółowo opisali sposób barwienia i utrwalania preparatów cytologicznych i podali szereg kryteriów rozpoznawczych dla wykrywania komórek nowotworowych. Cała procedura postępowania i identyfikacji opisana w publikacji została nazwana testem Papanicolaou (krócej testem Pap), który obecnie jest powszechnie znany jako badanie cytologiczne, które jest stosowane do wykrywania i zapobiegania rakowi szyjki macicy i innym chorobom cytologicznym żeńskiego układu rozrodczego. Bardzo istotną uwagą przekazaną przez autorów było zastrzeżenie, że cytodiagnostyka nie stanowi metody ostatecznie ustalającej rozpoznanie raka szyjki macicy. Jednak metoda powinna być stosowana jako badanie wstępne i sortujące, które może zasygnalizować występowanie niepożądanych zmian, którą muszą być następnie potwierdzone badaniem mikroskopowym tkanki. Jest to bardzo ważna idea, która jest wciąż aktualna [25]. Wykorzystanie testu Pap w diagnostyce cytologicznej w USA pozwoliło w latach 1950 - 1970 obniżyć zachorowalność nawet o około 50%, a wskaźnik zgonów spowodowanych tego rodzaju nowotworem o około 70%. Pomimo wielu ulepszeń na przestrzeni

lat i niejasności dotyczących faktycznego odkrywcy metody procedura wciąż nazywana jest jako „Pap test” [25].

W latach 50. XX wieku cytologia zaczęła być szeroko stosowana, a w kolejnych latach metodykę zaczęto stosować, także w diagnostyce raka piersi i tarczycy. W 1958 roku wprowadzono do diagnostyki cytologicznej badanie płynów ustrojowych, takich jak mocz czy płyn mózgowo-rdzeniowy, a w latach 60. i 70. cytologię narządów wewnętrznych, takich jak płuca, trzustka czy wątroba. W kolejnych dziesięcioleciach rozwój diagnostyki cytologicznej był znaczny. Wprowadzono nowe techniki badawcze, takie jak cytometria przepływowa czy analiza obrazu cyfrowego. Dzięki temu możliwe stało się szybkie i dokładne rozpoznawanie chorób onkologicznych, a także innych chorób, takich jak choroby zakaźne czy autoimmunologiczne.

Dopiero w 1989 roku cytopatologia przeszła proces standaryzacji i w tym roku powstała również oficjalna instytucja przyznająca uprawnienia w dziedzinie cytologii (American Board of Examination Cytopathology). Obecnie diagnostyka cytologiczna jest nieodłączną częścią diagnostyki laboratoryjnej, a jej znaczenie w medycynie jest nieocenione [1].

4.3. Metody pobierania materiału cytologicznego

Materiałem cytologicznym nazywa się pobrane od pacjenta (lub ze zwłok) płyny z jam ciała, tkanki, komórki czy wydzieliny. Materiał przygotowywany jest przez lekarza klinicystę, radiologa lub patomorfologa. Istnieje wiele różnych metod pobierania materiałów cytologicznych, w zależności od rodzaju wykonywanego badania oraz narządu, który poddawany jest badaniu. Poniżej przedstawiono najczęściej stosowane metody: [1, 5]

- Rozmaz (lub wymaz) - metoda polegająca na pobraniu komórek za pomocą wacika, pęsety lub szczotki, a następnie rozmazaniu ich na szkiełku mikroskopowym. Rozmaz jest najczęściej stosowany w badaniach ginekologicznych, takich jak cytologia szyjki macicy.
- Aspiracja cienkoigłowa - metoda polegająca na pobraniu próbki tkanek lub płynu za pomocą cienkiej igły i strzykawki. Aspiracja cienkoigłowa jest stosowana w badaniach takich jak biopsja tarczycy, biopsja piersi, czy pobranie płynu z opłucnej.
- Pobranie wydzieliny - metoda polegająca na pobraniu wydzieliny z narządu, takiej jak np. płwocina, czy wydzielina z szyjki macicy. Pobranie wydzieliny umożliwia analizę komórek w płynach i wydzielinach występujących w narządach.

Wybór odpowiedniej metody pobrania materiału cytologicznego zależy od rodzaju badania oraz narządu, który jest badany. Ważne jest, aby pobranie materiału było bezpieczne i minimalnie inwazyjne dla pacjenta.

Preparat cytologiczny jest to materiał cytologiczny (próbka komórek lub tkanek pobrana w celu diagnostyki cytologicznej) umieszczony na szkiełku podstawowym (czyli prostokątnej szklanej płytce przygotowanej do obserwacji pod mikroskopem), utrwalony i zabarwiony. W celu ułatwienia identyfikacji pacjentów na początku badania preparat oznacza się trwale numerem, dzięki któremu łatwo zidentyfikować osobę, od której próbka pochodzi [5].

Do wykonania badania potrzebna jest nieduża próbka, która występuje w dwóch postaciach: [16]

- rozmazu cytologicznego - materiał cytologiczny rozprowadzony i utrwalony na szkiełku
- cytobloku - materiał cytologiczny utrwalony, a następnie zatopiony w bloczku parafinowym (używane np. w diagnostyce nowotworów płuc)

Aby przeprowadzić analizę mikroskopową pobranych komórek lub tkanek konieczne jest odpowiednie przygotowanie preparatu cytologicznego, które zazwyczaj obejmuje następujące kroki: [5, 16]

- Pobranie próbki - pobranie próbki może odbyć się różnymi metodami, takimi jak rozmaz, biopsja cienkoigłowa czy wycinek. Metoda pobrania zależy od rodzaju badania oraz narządu, który jest badany. Bardzo ważne jest aby pobranie próbki odbywało się w sterylnych warunkach w celu uniknięcia zakażenia.
- Przygotowanie rozmazu (lub cytobloku) - w przypadku rozmazu, pobrane komórki lub tkanki są rozmazywane na szkiełku podstawowym.
- Utrwalenie preparatu - w celu zabezpieczenia materiału przed zniszczeniem należy utrwalić próbkę z wykorzystaniem środków takich jak np. alkohol, formalina
- Barwienie preparatu - aby zwiększyć widoczność oraz kontrast komórek korzysta się z środków barwiących. Konieczne jest także wysuszenie preparatu. Na szkiełku z preparatem często umieszcza się też szkiełko, które służy jako nakrywka, która chroni próbkę i zapobiega wyblaknięciu zabarwienia.
- Analiza mikroskopowa - przygotowany preparat jest badany pod mikroskopem przez patologa w celu zidentyfikowania i zdiagnozowania wszelkich nieprawidłowości

Warto odnotować, że konkretne kroki i techniki stosowane podczas przygotowywania preparatu cytologicznego mogą się różnić w zależności od rodzaju próbki i celu badania.

W zależności od sposobu pozyskiwania materiału do badania cytologię dzieli się na cytologię złuszczeniową i aspiracyjną.

Cytologia złuszczeniowa, polega na pobraniu i ocenie mikroskopowej próbek komórek z powierzchni narządów (lub tkanek), które uległy samoistnemu złuszczeniu (nazywane złuszczeniem spontanicznym). Obejmuje materiał cytologiczny pobrany z: [1, 16]

- wydzielin i wydalin,
- płynów z jam ciała,
- popłuczyn i wymazów szczoteczkowych

Jako przykład spontanicznego złuszczenia można podać pobieranie komórek jamy opłucnej, które są usuwane przez organizm w postaci płynu opłucnowego. Płyn ten można zebrać różnymi metodami np. strzykawką z igłą [21].

Uzyskanie materiału jest możliwe także w sposób ręczny - poprzez zeszkrobanie (lub zeszcotkowanie) komórek z powierzchni tkanek (nazywane złuszczeniem mechanicznym) Przykładem tego rodzaju badania jest opisywane wcześniej badanie Papanikolaou, które stosuje się do badania komórek szyjki macicy u kobiet. W tym badaniu, lekarz zeszkrobuje próbkę

komórek z szyjki macicy za pomocą za pomocą szczoteczki lub łopatki. Cytologia złuszczeniowa jest stosowana głównie do wykonywania cytologii: szyjki macicy, układu moczowego, płynów z jam ciała czy układu oddechowego [16].

Cytologia aspiracyjna polega na pobraniu próbki komórek lub tkanek za pomocą cienkiej igły. Do wykonania nakłucia wybiera się miejsca podejrzane o zmiany chorobowe. W tym rodzaju badania patolog ingeruje w ciało w celu pobrania próbki materiału komórkowego (w odróżnieniu do cytologii złuszczeniowej) [16].

Metoda określana jest bardziej szczegółowo jako biopsja aspiracyjna cienkoigłowa (FNAC - fine-needle aspiration cytology). Wyróżnia się następujące rodzaje biopsji cienkoigłowej: [16]

- z aspiracją - do nałucia wykorzystuje się igłę iniekcyjną (jałową) z podłączoną strzykawką, którą wykorzystuje się do pobrania materiału komórkowego w celu zwiększenia wydajności
- bez aspiracji - wykonuje się kilkukrotne nakłucie zmiany igłą iniekcyjną (jałową)

Uzyskany z biopsji materiał rozprowadza się na szkiełku podstawowym, a następnie utrwalany w postaci rozmazu cytologicznego lub cytobloku. Wykorzystanie materiału z biopsji (zwłaszcza w postaci cytobloku), pozwala na wykonanie także dodatkowych badań (np. immunohistochemicznych, czy z zakresu biologii molekularnej). Ważną zaletą opisywanego podejścia jest możliwość ostatecznego rozpoznania bez konieczności stosowania bardziej inwazyjnych metod diagnostycznych [16].

FNAC może być wykonywany pod kontrolą palpacyjną (lekarz może wyczuć miejsce niebezpiecznej zmiany poprzez dotyk) w obszarach, takich jak szyja, tarczycza lub piersi. FNAC często wspomagany jest także poprzez USG lub tomografię komputerową w celu pobrania próbek ze zmian występujących głęboko w ciele, które nie mogą być zlokalizowane przez palpację. Metoda jest szeroko stosowana, ale powodzenie badania zależy w dużej mierze od umiejętności lekarza [21].

Przykładem zastosowania biopsji cienkoigłowej jest badanie tarczycy, w którym lekarz pobiera próbkę komórek tarczycy za pomocą cienkiej igły wprowadzonej bezpośrednio do gruczołu.

4.4. Diagnostyka raka szyjki macicy

4.4.1. Wstęp

Nowotwór szyjki macicy jest jednym z najczęstszych rodzajów nowotworów, które występują u kobiet. Szacuje się, że każdego roku rak szyjki macicy rozpoznawany jest u ponad 500 tysięcy kobiet, natomiast nawet 300 tysięcy umiera z powodu efektów działania nowotworu w organizmie. Główną przyczyną występowania jest zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (HPV), które przyczynia się do rozwoju nieprawidłowych komórek w szyjce macicy. Bardzo ważnym elementem zapobiegania oraz leczenia tego rodzaju nowotworu jest wykonywanie przesiewowego (skriningowego) badania - cytologii szyjki macicy (nazywane również testem/rozmazem Pap - od nazwiska twórcy George'a Papanicolau). Badanie to polega na pobraniu komórek z powierzchni szyjki macicy, a następnie zbadaniu ich pod mikroskopem

w celu wykrycia wszelkich nieprawidłowości [10]. Badanie cytologiczne szyjki macicy opiera się na założeniu, że komórki nowotworowe tracą właściwości kohezyjne (w porównaniu z normalnymi komórkami), dzięki czemu łatwiej ulegają przemieszczeniu podczas pobierania wymazu z szyjki macicy. Efektem tej wiedzy jest możliwość wykrycia nawet najmniejszych zmian nowotworowych w łatwy sposób [18].

Co ważne wynik badania cytologicznego nie jest ostatecznym rozpoznaniem, lecz jest podstawą dla dalszej diagnostyki przy wykorzystaniu technik takich jak kolposkopia, biopsja czy analiza histopatologiczna (lub molekularna). Średnia czułość cytologii (czyli zdolność do prawidłowego wykrywania choroby) wynosi około 60–70%, a swoistość (wskaźnik identyfikacji osób zdrowych) nawet do 94%. Fałszywie ujemne wyniki zazwyczaj wynikają z niewielkiej liczby nieprawidłowych komórek, obecności krwi lub komórek zapalnych [11].

Według najnowszych standardów Amerykańskiego Stowarzyszenia do Walki z Rakiem (The American Cancer Society) wykonywanie badań cytologicznych zaleca się z różną częstotliwością w podziale na kilka grup wiekowych: [8, 15]

- Kobiety do 21 roku życia - nie wykonuje się badań, również w przypadku, gdy pacjentka jest aktywna seksualnie przed 21 rokiem życia
- Kobiety w wieku od 21 do 29 - pierwszy test Pap powinien być w wieku 21 lat, a następnie kontrolnie co 3 lata
- Kobiety w wieku od 30 do 65 - powinny wykonywać zarówno test Pap, jak i test HPV co pięć lat (lub tylko test HPV również co 5 lat) albo tylko test Pap co 3 lata
- Kobiety w wieku powyżej 65 lat - jeśli przechodziły regularne badania przesiewowe z prawidłowymi wynikami, nie powinny być badane pod kątem raka szyjki macicy

Kobiety, które w przeszłości chorowały na raka szyjki macicy lub doświadczyły pewnych problemów zdrowotnych, powinny kontynuować badania zgodnie z zaleceniami lekarza.

Istotny dla skuteczności badania jest odpowiedni moment wykonania badania w ciągu cyklu miesięczkowego. Badanie najlepiej przeprowadzić w środku cyklu, jednak nie wcześniej niż 4 dni po ostatnim dniu miesiączki i nie później niż 4 dni przed rozpoczęciem miesiączki (badania nie wykonuje się w trakcie krwawienia miesięczkowego) [11].

Uzyskiwaniem materiału do cytologii szyjki macicy zajmują się lekarz ginekolog. Pobranie rozmazu przeprowadza się na fotelu ginekologicznym z użyciem wziernika (co zapewnia łatwy dostęp do szyjki macicy). Poprzez wziernik wprowadzana jest specjalna szczoteczka cytologiczna, przy użyciu której pobiera się nabłonek z powierzchni szyjki macicy (pobieranie należy wykonywać delikatnie, ruchem obrotowym). Uzyskiwanie materiału jest praktycznie bezbolesne i jednym skutkiem ubocznym może być krwawienie (plamienie) z szyjki macicy, które wynika ze złuszczenia nabłonka [8, 15].

4.4.2. Metody badań

Cytologia szyjki macicy może być wykonywana przy użyciu różnych technik. Zazwyczaj wyróżnia się dwie metody: [6, 11, 24]

- cytologię konwencjonalną - materiał cytologiczny zebrany przy pomocy szczoteczki lub szpatułki przenoszony jest na szkiełko mikroskopowe tworząc cienką warstwę
- cytologię na podłożu płynnym (z ang. Liquid-based cytology w skrócie LBC) - inaczej określana również jako cytologia płynna lub cienkowarstwowa. W tym przypadku pobranie również odbywa się przy wykorzystaniu szczoteczki lub szpatułki, jednak materiał nie jest od razu przenoszony na szkiełko, tylko najpierw umieszczany jest w pojemniku ze specjalnym płynem, który zapobiega uszkodzeniu komórek. W kolejnym kroku preparat cytologiczny poddawany jest procesowi cytowirowania, filtracji lub sedymentacji, ponieważ komórki są zawieszone w płynie. Efektem jest pozyskanie preparatu zawierającego jedną warstwę komórek pochodzących z osadu rozdzielonego od fazy płynnej, a także oczyszczonego z niepożądanych elementów np. ze śluzu, krwinek czerwonych czy bakterii. Po tym procesie materiał jest gotowy do przeniesienia na szkiełko, procesu barwienia i wreszcie wykonania obserwacji pod mikroskopem. Historia LBC sięga lat 90. XX wieku i została opracowana w celu poprawy efektywności metody konwencjonalnej. Rysunek 4.1 przedstawia proces uzyskiwania preparatu cytologicznego dla metody LBC

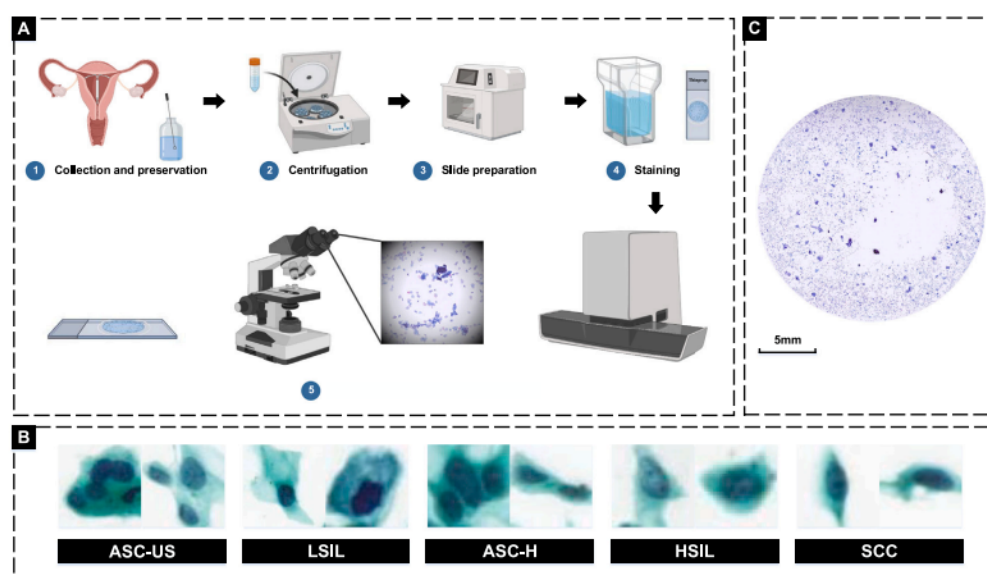


Fig. 1. Illustration of clinical cytology screening. (A) The procedure of cytology specimen preparation (taking the cervix as an example). (B) Cytology images in different categories. (C) Whole slides for digital processing and analysis.

Figure 4.1: Przebieg typowego badania - diagnostyki cytologicznej

W ramach LBC rozróżnia się odmienne podejścia do zbierania i obróbki próbek cytologicznych, różniące się m.in. preparatem utrwalającym, narzędziem pobierania czy wielkością próbki na szkiełku. Dwoma najbardziej popularnymi metodami są SurePath i ThinPrep, które zostały zatwierdzone do użytku w USA przez Food and Drug Administration (FDA) i są obecnie najczęściej stosowanymi metodami na świecie. Obydwa systemy są w pełni zautomatyzowane. Porównanie obu metod zostało przedstawione w tabeli 4.1 [24].

Table 4.1: Porównanie metod ThinPrep i SurePath [9]

Cechy	ThinPrep	SurePath
Mechanizm działania	Filtr	Cytowierowanie
Utrwalacz	Metanol	Etanol
Obszar próbki	okrąg o średnicy 20 mm	okrąg o średnicy 13 mm
Metoda osadzania	kontrolowane ciśnienie	sedymetacja
Cytowierowanie	potrzebne	konieczne
Trwałość preparatu	2 lata	3 lata
Narzędzie pobierania	szczoteczka, szpatułka	szczoteczka
Technika dyspersji	wirowanie	wirowanie oraz przepłukiwanie

Table 4.2: Porównanie metod LBC i metody konwencjonalnej [9]

Cechy	LBC	metoda konwencjonalna
Tło próbki: ilość niepożądanych elementów kolor	bardzo niska czyste tło	znaczna ilość nieprzejryste tło
Rozmieszczenie komórek	równomierne	nierównomierne (gęste obszary)
Wielkość komórek	mniejsza	większa
Materiał pozakomórkowy	zredukowany	zachowany
Ilość warstw	pojedyncza	wiele nachodzących na siebie warstw
Transport preparatu	bezpieczny, stabilny	duże ryzyko uszkodzenia materiału
test HPV	możliwe	brak możliwości

Obie metody (metoda LBC i konwencjonalna) są nadal szeroko stosowane w medycynie, porównanie cech obu metod przedstawiono w tabeli 4.2.

Z tabeli wynika, że metoda LBC zapewnia większą przejrzystość, czytelność próbki (czystsze tło - łatwiej zinterpretować zmiany na próbce). Co więcej próbkę pokrywa pojedyncza warstwa rozproszonych komórek skupionych na jednej powierzchni, czego efektem jest znacznie szybsze rozpoznanie niż w przypadku tradycyjnego rozmazu. Równocześnie metoda LBC jest o wiele bardziej stabilna w transporcie i trwała oraz pozwala na wykonywanie na preparacie także innych badań np. testu HPV. Poza własnościami wyszczególnionymi w tabeli 4.2 LBC zapewnia także inne zalety: [24]

- Preparaty są utrwalane natychmiastowo, dzięki czemu szczegóły budowy jąder komórkowych i cytoplazmy są lepiej uwydatnione
- Z pobranego materiału można sporządzić wiele preparatów
- Znaczna większość preparatów nadaje się do oceny cytologicznej, a każdy do oceny mikroskopowej
- Łatwo zastosować automatyczny skrining

Jednak metoda LBC posiada również wady takie jak: [24]

- Rodzaje rozmazów są odmienne z powodu randomizacji komórek
- Komórki nieprawidłowe są rozproszone na całej powierzchni próbki
- Rozmazy LBC z małą ilością komórek są trudne do wykonania skriningu i interpretacji
- Elementy niepożądane takie jak: krew, śluz, komórki zapalne, brudne tło (specyficzne dla nowotworu złośliwego) są dalej obecne, jednak mają inny charakter
- Komórki nabłonkowe występują mniej licznie (lub pojedynczo) oraz są nieco mniejsze niż w zwykłych preparatach cytologicznych
- Pozyskanie preparatu metodą LBC jest droższe niż tradycyjne preparaty cytologiczne

W porównaniu z LBC cytologia konwencjonalna jest metodą tanią i znacznie łatwiejszą do wykonania, . Dlatego może być stosowana także przez laboratoria o ograniczonych zasobach i zdolnościach. Jednak metoda może być trudniejsza do interpretacji przez patomorfologów ze względu na mniej czytelne obrazy komórek. Cytologia konwencjonalna ma nieco niższą czułość i specyficzność w porównaniu do LBC. Obecnie metoda LBC staje się coraz bardziej popularna, ponieważ jest dużo bardziej wydajna od cytologii konwencjonalnej, pozwala na wykonanie innych testów (przede wszystkim testy na obecność HPV lub testy molekularne) oraz zapewnia lepszą jakość próbek [9, 24].

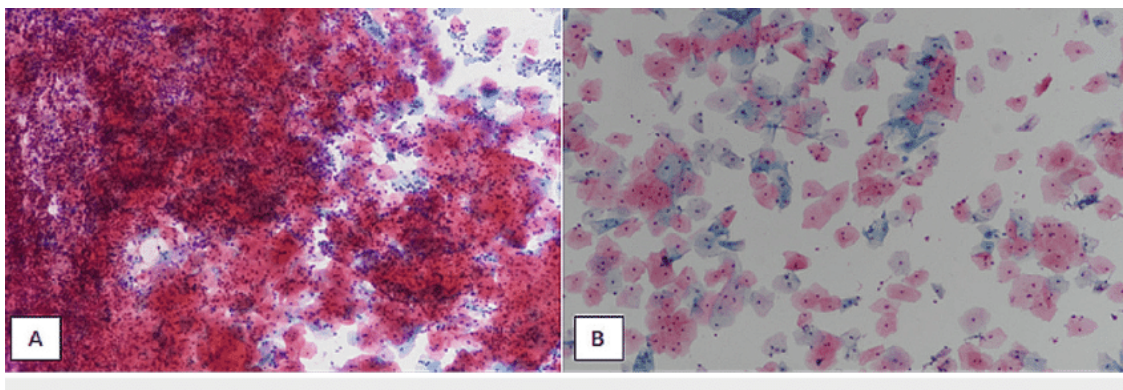


Figure 4.2: conventional vs LBC [7]

4.4.3. Systemy klasyfikacji

Pierwsza próba klasyfikacji komórek występujących w rozmazie została stworzona przez George'a Papanicolaou (jako elementu całej procedury - testu Papanicolaou). Podział polegał na wyszczególnieniu 5 grup, od obrazów komórek prawidłowych (jako grupy I) do komórek nowotworowych raka szyjki macicy (grupa V). Podczas badania cytologicznego ocenie podlegała grupa, w której znajdują się komórki obecne na rozmazie. Ogromną wadą tej klasyfikacji była informacja jedynie o wyglądzie komórek, nie zawierając żadnych innych przydatnych informacji. Klasyfikacje wg Papanicolaou przedstawiono w tabeli 4.3 [25].

Table 4.3: Klasyfikacja mikroskopowa obrazów cytologicznych wg. propozycji Papanicolaou: [11, 25]

Grupa	Opis
I	zawiera tylko prawidłowe komórki
II	zawiera prawidłowe komórki oraz komórki zapalne
III	nieprawidłowy rozmaz: podtyp A - nasilony stan zapalny, podtyp B - komórki nabłonka o budowie dysplastycznej wskazujące na CIN (śródnabłonkową neoplazję)
IV	nieprawidłowy rozmaz z nieprawidłowymi komórkami (atypowe), które mogą wskazywać na wczesne stadium nowotworu (bez nacieków na sąsiadujące tkanki)
V	nieprawidłowy rozmaz - liczne atypowe komórki charakterystyczne dla zaawansowanego stadium raka

Obecnie powszechnie stosowaną klasyfikacją, która wyparła klasyfikację Papanicolaou jest stworzony w 1988 roku opisowy system Bethesda (The Bethesda System) opracowany przez amerykański Narodowy Instytut Zdrowia (National Institutes of Health) w 1988 roku. Motywacją wprowadzenia tego systemu była chęć ulepszenia systemu klasyfikacji Papanicolaou, który okazał się niewystarczająco dokładny wobec postępu badań w zakresie występowania zmian nienowotworowych szyjki macicy. Podstawową niedoskonałość poprzedniego systemu był brak zawarcia zmian nabłonka szyjki macicy powstających pod wpływem infekcji wirusowych (takich jak HPV) oraz zmian w obrębie nabłonka gruczołowego obecnego w kanale szyjki. System Bethesda jest rekomendowany przez Polskie Towarzystwo Ginekologów i Położników dla wykonywania cytologii szyjki macicy już od 2001 roku i jest obecnie najczęściej stosowany w Polsce. Pomimo stosowania klasyfikacji Bethesda badania cytologiczne z szyjki macicy nadal nazywa się testem Pap [11, 20, 23, 25].

Klasyfikacja według systemu Bethesda nie jest oparta na grupach tak jak w oryginalnym badaniu Pap. Zamiast grup wprowadzono opis dotyczący ilości pobranego materiału, jego jakości, oceny zawartości mikroorganizmów w zadanym obszarze, a także sugestii oceniającego dotyczącej np. powtórzenia badania. Każdy uzyskany podczas badania wynik oceniający rozmaz jest sprawdzany przez lekarza według opracowanego schematu, który następnie opisuje komórki i proponuje dalsze zalecenia dla pacjenta np. "powtórne badanie za 12 miesięcy". Ważnym założeniem systemu Bethesda jest także brak wyników pomiędzy np. grupa I/II dla klasyfikacji Papanicolaou [25].

System Bethesda zawiera informacje o typie próbki (cytologia cienkowarstwowa lub konwencjonalna), jakości (liczba i rodzaj komórek, rodzaj środków wykorzystanych do utrwalenia i barwienia preparatu) oraz ogólnej charakterystyce. Jeśli materiał nie spełnia kryteriów diagnostycznych, podawany jest powód niewykonania badania [11].

Nowe ustalenia z zakresu miejsc występowania nowotworu doprowadziły także, do pobierania rozmazu cytologicznego z dwóch miejsc w obrębie szyjki macicy: [25]

- z powierzchni tarczy szyjki (ujścia zewnętrznego szyjki macicy), gdzie znajdują się nabłonek wielowarstwowy płaski

- z kanału szyjki, gdzie znajdują się nabłonek gruczołowy

Zmienione komórki mogą pojawić się w każdym z opisanych rodzajów nabłonka lub obu jednocześnie, co uwzględnia wynik zgodnie ze skalą Bethesda. Najczęstszym nowotworem szyjki macicy jest rak płaskonabłonkowy z nabłonka wielowarstwowego płaskiego, znacznie rzadszy nowotwór nabłonka gruczołowego nazywany jest gruczolakorakiem [17].

Pierwszym aspektem podlegającym ocenie jest jakość pobranego materiału. Diagnosta sprawdza, czy zebrano odpowiednią ilość komórek z każdego nabłonka oraz czy preparat został poprawnie utrwalony i wybarwiony. Następnie przeprowadza się oceny komórek. Jeśli nie stwierdza się żadnych zmian przednowotworowych ani nowotworowych, rozmaz opisuje się skrótem NILM (negative for intraepithelial lesion or malignancy - negatywny wynik dla zmian śródnabłonkowych lub raka) lub opisowo jako "brak zmian cytoonkologicznych" [17]. W przeciwnym przypadku korzysta się z zapisu: "nieprawidłowy obraz cytoonkologiczny", w połączeniu z którym stosuje się następujące skróty w opisie wyniku: [11, 17]

- Nieprawidłowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego:
- ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) - nieprawidłowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego o nieokreślonym znaczeniu, co często świadczy o przewlekłym stanie zapalnym
- ASC-H (atypical squamous cells, cannot exclude HSIL) – nieprawidłowe komórki nabłonka wielowarstwowego płaskiego, nie można wykluczyć stanu przedrakowego, czyli HSIL;
- LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion) – zmiana śródnabłonkowa niskiego stopnia zaawansowania, może świadczyć o zakażeniu HPV
- HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion) – zmiana śródnabłonkowa wysokiego stopnia zaawansowania
- CIS (carcinoma in situ) – rak płaskonabłonkowy in situ czyli „w miejscu”, odpowiada rakowi przedinwazyjnemu
- Nieprawidłowe komórki nabłonka gruczołowego:
- AGC (atypical glandular cells) – nieprawidłowe komórki nabłonka gruczołowego
- AIS (adenocarcinoma in situ) – rak gruczołowy in situ czyli „w miejscu”, odpowiada rakowi przedinwazyjnemu
- Gruczolakorak - komórki raka gruczołowego szyjki lub trzonu macicy lub nowotworu pozamacicznego

Zgodnie z zaleceniami The College of American Pathologists and American Society for Colposcopy and Cervical Pathology (ASCCP), zaleca się stosowanie dwufazowej klasyfikacji zmian SIL (Squamous Intraepithelial Lesion). Wyróżnia się dwa stopnie zależne od nasilenia zmian komórkowych i ryzyka progresji nowotworu: LSIL (Low Squamous Intraepithelial

Lesion) oraz HSIL (Squamous Intraepithelial Lesion). Kategorie LSIL od HSIL rozróżnia się na podstawie oceny ilości komórek patologicznych oraz atypii jądra komórkowego. W przypadku gdy ilość nieprawidłowych komórek lub cechy patologiczne są niewystarczające, stosuje się również opisane wcześniej stopnie pośrednie, tj. ASC-US (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) lub ASC-H (Atypical Squamous Cells, Cannot exclude HSIL) [12]. Wygląd oraz opis cech LSIL i HSIL przedstawiono na rysunku 4.3. Do odróżnienia komórek LSIL od HSIL wykorzystuje się relację N:C (nucleus:cytoplasm - jądro:cytoplazma). W LSIL jądra mogą być również znacznie powiększone i pleomorficzne (o bardziej zróżnicowanym kształcie), lecz charakteryzują się niskim stosunkiem N:C, podczas gdy jądra w HSIL są bardziej jednolite i posiadają wysoki stosunek N:C. LSIL ma także tendencję do zajmowania powierzchniowych warstw błony śluzowej, podczas gdy komórki HSIL rozciągają się na co najmniej jedną trzecią grubości błony śluzowej. W niektórych przypadkach nie można określić czy komórki są LSIL lub HSIL. W takim przypadku zmiany charakteryzują się jako SIL o nieokreślonym stopniu zaawansowania [4].

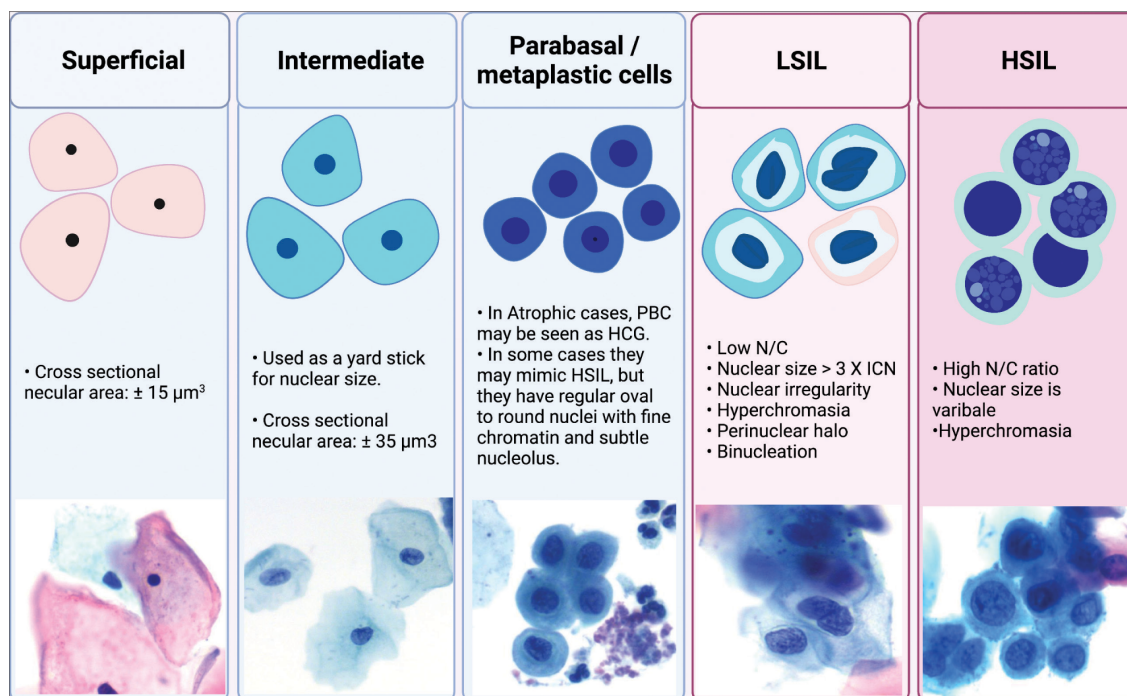


Figure 4.3: LSIL, HSIL [2]

5. Sieci neuronowe, Deep Learning

The examination of cells or cell clusters is a highly professional task, requiring formal training and assessments overseen by international bodies. Currently, there is a trend to standardize cytological diagnosis reporting, allowing reports and implied risk of cancers to be understood by clinicians without ambiguity (Barkan et al., 2016). It also provides well-defined features to be looked for among the cells. Fig. 2 illustrates typical cytological morphologies of commonly encountered specimens. Cytology screening was first applied in cervix cancers almost 100 years ago (Shaw, 2000). Current reporting of cervical cytology is guided by the Bethesda system (Nayar and Wilbur, 2015). Cancerous and precancerous cells are first categorized into squamous cells and glandular cells, then they can be identified and graded by combinations of cytological features such as enlarged nuclei, multinucleation, perinuclear halo, increased nuclear to cytoplasm ratio, wrinkled nuclear membrane, dyskeratosis (abnormal keratin formation), prominent nucleoli, and tumor diathesis. Following the success of the Bethesda system, current reporting of breast aspiration cytology is guided by FNAB (Field et al., 2019). Aspiration of malignant breast lesions is often hypercellular and the cancer cells possess large sometimes irregular nuclei with prominent nucleoli and the lack of myoepithelial cells. Different grades of atypia were also established to estimate the risk of malignancy (Beca and Schmitt, 2019). Similarly, bladder cancer cells from urine often show irregular nuclei with a very high N/C ratio (>0.7), prominent

nucleoli and clumped/coarse chromatin, as outlined in Rosenthal et al. (2016). Thyroid cancer aspirates show distinctive features, including papillary structures, psammoma bodies and optically clear nuclei with nuclear grooves and nuclear inclusions (Cibas and Ali, 2017). Together with examples of lung and oral mucosa shown in Fig. 2, cytological morphology from different organs provides diagnostic information for cancer screening and guides patient management at a minimal cost (Kontzoglou et al., 2005). In cytology screening, scrutinizing individual cells or cell clusters under the microscope (or in gigapixel images) in search of malignancy can be quite time-consuming and tedious for cytologists (Ivanovic, 2014). Researchers have tried to develop accurate and efficient cancer screening systems to handle the ever-increasing caseload. The first successful trial could date back to the 1950s when an automatic system was developed for cervical screening of cytological smears (Tolles, 1955). Afterwards, many cervical screening systems were launched with great success (Koss et al., 1994; Wilbur et al., 2009). These automated screening systems have shown promise in improving efficiency without compromising accuracy. Artificial intelligence (AI) has achieved remarkable progress in the field of medicine over the recent years. Machine learning (ML), a subfield of AI, focuses on learning algorithms to represent the underlying patterns in training data. With the rapid development of ML techniques, medical image interpretation and computer assisted diagnosis have made significant advances in pathology (Lin et al., 2022a; Chen et al., 2016a), radiology (Lassau et al., 2021; Çallı et al., 2021), ophthalmology (Wang et al., 2020), etc. In computational cytology, previous studies have demonstrated the feasibility of various ML approaches in cytology image analysis, such as support vector

machine (SVM), fuzzy c-means (FCM) (Chankong et al., 2014), kmeans (Isa, 2005), and fuzzy clustering (Plissiti et al., 2009). However, there remain challenges in ML-based approaches, such as developing accurate and efficient cytology image analysis models, and establishing human-machine collaborative cytological screening systems. Deep learning (DL), as a branch of the ML family, was developed with multilayer neural networks for leveraging feature representations of input data. The major advantage of DL algorithms is they can reduce the reliance on task-related features designed from expert knowledge and increase the feature representation capability by end-to-end learning. DL solutions in computational cytology are typically designed for accurate and efficient cancer screening, which have been extensively investigated in versatile cancer types, such as cervix (Rahaman et al., 2020), breast (Garud et al., 2017), bladder (Dov et al., 2021), and lung (Teramoto et al., 2017). These solutions typically build DL frameworks to learn the inferable function that maps cytological inputs into desired predictions. Most existing studies in DL-based cytology image analysis focus on network designs and knowledge integration for performance improvements, such as shape prior (Song et al., 2016), attention mechanism (Zhou et al., 2019b), and contour constraints (Song et al., 2018).

6. Conclusions and Future

Zakończenie, podsumowuje najważniejsze wnioski, podaje możliwości dalszego rozwinięcia wykonanych prac i wskazuje obszar potencjalnego zastosowania pracy. Rezultaty pracy mają charakter poznawczy, mogą mieć charakter użytkowy. Należy dokonać analizy uzyskanych wyników. Rezultaty powinny charakteryzować się oryginalnością, a nawet w pewnym stopniu nowatorstwem. Praca zawiera (...). Zostało pokazane (...). Eksperymenty wykazały (...). Tu piszemy wnioski i obserwacje.

Widzimy, że (...). Z tego powodu przyszła praca powinna obejmować (...).

Bibliography

- [1] M. A. Al-Abbadi. Basics of cytology. *Avicenna journal of medicine*, 1(01):18–28, 2011.
- [2] A. Alrajjal, V. Pansare, M. S. R. Choudhury, M. Y. A. Khan, and V. B. Shidham. Squamous intraepithelial lesions (sil: Lsil, hsil, ascus, asc-h, lsil-h) of uterine cervix and bethesda system. *Cytojournal*, 18, 2021.
- [3] P. Babington. *The title of the book*, chapter „The title of the chapter”. Wydawca, Wrocław, 2 edition, (2008).
- [4] basicmedicalkey.com. Cervix, Marzec 2023. <https://basicmedicalkey.com/cervix-2/>.
- [5] dr. hab. n. med. Magdalena Bodnar prof. UMK. Zabezpieczenie. przygotowanie oraz transport materiału cytologicznego do zakładu patomorfologii, placentologii i hematopatologii klinicznej, Marzec 2023. https://biziel.umk.pl/assets/files/cenniki/2022/PR13_PJ10_w3.pdf.
- [6] R. Dunleavy. *Cervical cancer: a guide for nurses*. John Wiley & Sons, 2008.
- [7] A. Hashmi, S. Naz, O. Ahmed, S. Yaqeen, M. Asif, A. kamal, N. Faridi, and M. Irfan. Comparison of liquid-based cytology and conventional papanicolaou smear for cervical cancer screening: An experience from pakistan. *Cureus*, 12, 12 2020.
- [8] N. C. Institute. Cervical cancer screening, Marzec 2023. <https://www.cancer.gov/types/cervical/screening>.
- [9] Y. H. Lee. Liquid-based cytology in gynecologic cytology. *Korean Journal of Pathology*, 43:291–300, 2009.
- [10] A. Manna, R. Kundu, D. Kaplun, A. Sinitca, and R. Sarkar. A fuzzy rank-based ensemble of cnn models for classification of cervical cytology. *Scientific Reports*, 11(1):14538, 2021.
- [11] mp.pl. Cytologia - kiedy robić badanie, co oznaczają wyniki, Marzec 2023. <https://www.mp.pl/pacjent/ginekologia/badania-i-zabiegi/292320, cytologia-badanie-cytologiczne-wszystko-co-musisz-wiedziec>.
- [12] A. Nasierowska-Guttmejer, W. Kędzia, W. Rokita, S. Wojtylak, D. Lange, R. Jach, and M. Wielgoś. Rekomendacje dotyczące diagnostyki i leczenia płaskonabłonkowych zmian śródnabłonkowych szyjki macicy na podstawie wytycznych cap/asccp. *Ginekologia i Perinatologia Praktyczna*, 1(3):130–138, 2016.
- [13] J. Nowak. *The title of the book*. Wydawca, Wrocław, 2 edition, (2008).
- [14] J. Nowak and P. Kowalczyk. The title of the article. *Journal Name*, 12234, (2016).

- [15] T. A. C. of Obstetricians and Gynecologists. *Updated Cervical Cancer Screening Guidelines*, Kwiecień 2021. <https://www.acog.org/clinical/clinical-guidance/practice-advisory/articles/2021/04/updated-cervical-cancer-screening-guidelines>.
- [16] J. R. Opracowanie zbiorowe pod przewodnictwem Renaty Langfort, Andrzeja Marszałka. *Patomorfologia: standardy i przykłady dobrej praktyki oraz elementy diagnostyki różnicowej. Wytyczne dla zakładów/pracowni patomorfologii*. zdrowie.gov.p, Marzec 2023. https://zdrowie.gov.pl/uploads/pub/pages/page_1053/text_images/wytyczne_patomorfologia_1.pdf.
- [17] K. Pawlak. Cytologia wyniki – system bethesda (tbs) i skala papanicolaou (pap), Marzec 2023. <https://wylecz.to/badania-diagnostyczne/cytologia-wyniki-system-bethesda-tbs-i-skala-papanicolaou-pap/>.
- [18] J. H. Smith. Cytology, liquid-based cytology and automation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25(5):585–596, 2011.
- [19] W4n. Nazwa strony, (2017). Last accessed 16 September 2017.
- [20] Wikipedia. Bethesda system, Marzec 2023. https://en.wikipedia.org/wiki/Bethesda_system.
- [21] Wikipedia. Cytopathology, Marzec 2023. <https://en.wikipedia.org/wiki/Cytopathology>.
- [22] Wikipedia. Georgios papanikolaou, Marzec 2023. https://en.wikipedia.org/wiki/Georgios_Papanikolaou.
- [23] Wikipedia. System papanicolaou, Marzec 2023. https://pl.wikipedia.org/wiki/System_Papanicolaou.
- [24] win.eurocytology.eu. Automatyzacja skryningu cytologicznego i cytologia fazy płynnej, Marzec 2023. <https://win.eurocytology.eu/static/eurocytology/POL/cervical/LP1ContentKcontE.html>.
- [25] www.histeroskopia.info. Cytologia, Marzec 2023. <https://www.histeroskopia.info/cytologia-warszawa.html>.
- [26] www.webedcafe.com. Limitations of cytology, Marzec 2023. https://www.webedcafe.com/extern/program_media/amjmed.com/2012/CCS-HPV/printable.php?speaker=monk&figure=14.

List of Figures

3.1	Logo Politechniki Wrocławskiej	5
4.1	Przebieg typowego badania - diagnostyki cytologicznej	15
4.2	conventional vs LBC [7]	17
4.3	LSIL, HSIL [2]	20

List of Tables

3.1	Krótki ale treściwy opis tabeli	5
3.2	Comparison of the compression methods considered for MultiEmo for the sentence level in the mixed domain scenario. The results are averaged on 5 repetitions. The best results are in bold	6
4.1	Porównanie metod ThinPrep i SurePath [9]	16
4.2	Porównanie metod LBC i metody konwencjonalnej [9]	16
4.3	Klasyfikacja mikroskopowa obrazów cytologicznych wg. propozycji Papanicolaou: [11, 25]	18