

## ASCUS V ATROFII

Dušková J.<sup>1,2,3</sup>, Drozenová, J.<sup>1</sup>, Hajná R.<sup>1</sup><sup>1</sup>Ústav patologie 1. LF UK a VFN,<sup>2</sup>Katedra patologie IPVZ a<sup>3</sup>Vysoká škola zdravotní, Praha

Práce byla prezentována na Cytologickém dni 22. 9.2006 v Jindřichově Hradci

## Souhrn

**Cíl studie:** Vrchol výskytu karcinomu děložního hrdla předchází atrofií dlaždicového epitelu nastávající po menopauze. Část pozitivních nálezů však spadá i do tohoto období. Atrofie, zejména neúplně vyjádřená, vykazuje některé morfologické cytodiagnostické znaky blízké těm, jež jsou užívány v rozpoznání SIL, a to zejména tehdy, kdy v obraze navíc interferují v tomto období časté zánětlivé změny. Proliferační test jako obecně přijatý nástroj k objasnění nejasných nálezů znamená opakované vyšetření; studie je zaměřena na možnosti redukce jeho použití zařazením testu proliferace na sporných buněčných formacích.

**Materiál:** Retrospektivní studie – rutinně hodnocené cytologické nátěry 22 pacientek. Jedenadvacet z nich bylo perimenopauzálních a menopauzálních; jejich nálezy byly 16krát nejisté (ASCUS, popř. ASC-US, ASC-H v některé z obou verzí Bethesda klasifikace, tj. ASCUS různého typu v atrofii), 4krát SIL v atrofii s následnou histologií a 1krát atrofie s negativním cytologickým nálezem. Jedenkrát se jednalo o H SIL u mladší pacientky bez atrofie. Celkově bylo revidováno 60 cytologických vyšetření, protože řada pacientek byla s dg. ASCUS vyšetřena cytologicky opakovaně.

**Metoda:** V archivačním systému obrazové analýzy LUCIA Net (Laboratory Imaging, Praha) byly uloženy minimálně tři obrázky s diagnosticky významnými záběry. Následně byly preparáty rozmontovány, odbarveny a podrobeny imunocytochemickému průkazu proliferace s protilátkou Ki-67, klon MIB 1 (v textu dále MIB 1). Výsledky byly opět archivovány v systému LUCIA Net.

Vyhodnocení pozitivit bylo provedeno ve čtyřstupeňové škále:

1. zcela negativní formace – neg.; 2. ojedinělé pozitivitivy – x; 3. řídké disperzní pozitivitivy (méně než 1/3 buněk) – xx; 4. hustě disperzní pozitivitivy (více než 1/3 buněk) – xxx.

**Výsledky:** Postup poskytl většinou hodnotitelný výsledek. Archivace před a po imunocytochemickém došetření umožnila porovnání polychromaticky barvených preparátů a MIB I. Pacientky s prokázanou SIL vykazovaly přítomnost MIB 1 pozitivních buněk ve skupinách stupňů 2. až 4. (4/5). Pozitivitivy řídké disperzní (skupina 3) byly nejčastěji (6krát) zjištěny u kompaktních shluků vzhledu nezralé metaplasie. U těchto pacientek jsme zaznamenali následně ústup cytologického nálezu. U pacientek, které měly pouze ojedinělé MIB 1 pozitivitivy (skupina 2), docházelo častěji (4/7) k ústupu nálezu. Nicméně tento stupeň pozitivitivy vykazovaly i dva nálezy s histologicky ověřenou CIN. Variabilitu průkazu MIB 1 jsme zaznamenali i v histologické úrovni. Cytologická přehlednost suspektních buněčných trsů v terénu zánětlivých změn MOP III se v průkazu MIB 1 po odbarvení zřetelně zlepšila. Vytvořili jsme algoritmus zařazení testu proliferace na nejistých atrofických obrazech. Soudíme, že se jej vyplatí zařadit u nálezů ASC-H v atrofii. Pokud bude pozitivita suspektních buněčných skupin silná, je to důvodem k biopsickému došetření. Slabé a střední pozitivitivy jsou kandidáty pro E-test a kontrolu po půl roce.

**Klíčová slova:** cervikální cytologie – atrofie – ASCUS – ASC-H v atrofii – estrogenní test – proliferace – Ki-67 MIB1 pozitivita

## Summary

## ASCUS in Atrophy

**Aim:** The peak of incidence in cervical carcinoma precedes epithelial atrophy following menopause. Nevertheless, some carcinomas develop in the postmenopausal period.

**Atrophy,** namely the partially developed, shares some cytomorphology features with SIL, especially if inflammatory changes, common in this period, interfere. Proliferation test is recognized and accepted as a tool to clear uncertain findings. However, it means a repetitive investigation. The study is focused on the possibility to reduce the proliferation test employment with the help of proliferation activity investigation on questionable cell groups.

**Material** of the retrospective study comprised routine pap smears from 22 patients. Twenty-one of them were perimenopausal and menopausal patients who had 16 inconclusive results (ASCUS or ASC-US, ASC-H in one of both versions of Bethesda classifications, i.e. ASCUS in atrophy of any type), 4 SIL in atrophy followed by histology, and 1 atrophy with negative cytology finding. In addition, there was one case of H SIL in a younger patient without atrophy. Altogether, 60 cytology findings were reviewed as many of the patients had repetitive cytologies.

**Method:** As a minimum, three images with diagnostically important cell groups were archived in the LUCIA Net image archiving system (Laboratory Imaging, Prague). Subsequently, the smears were dismounted, destained and used for immunocytochemical reaction to test proliferation activity with the Ki-67 (MIB 1) antibody. The results were archived in the LUCIA Net system again. The evaluation of findings was done on a four-grade scale:

1) negative; 2) isolated positivities; 3) scattered positivities (less than 1/3 of cells in a cluster); 4) heavy disperse positivities (more than 1/3 of cells in a cluster).

**Results:** The procedure provided mostly a readable result. Archiving prior and following the immunocytochemistry procedure provided possibility of comparison of the polychrome stained smears and the MIB I tested. Patients with proven SIL exhibited the positivities in groups 2) to 4) (4/5). Rare scattered positivities /group 3/ were mostly (6x) found in compact groups with the

appearance of immature metaplasia. The cytopathology findings eventually normalized in these patients. In patients with isolated MIB 1 positivities /group 2/ frequently (4/7) eventually normalized as well. Nevertheless, such minimal positivities were found also in two patients with a subsequently proven CIN. The MIB 1 positivities were variable even in the histopathology sections. The cytology features of the suspicious cell groups in slides obscured by inflammation were better visible following destaining for immunocytochemistry.

Based on the results of our study we have developed an algorithm for employment of the proliferation activity test in the doubtful atrophy smears. We believe that it can be useful in the ASC-H in atrophy finding. Provided the positivities found are strong, a biopsy will be indicated. Medium and weak positivities represent candidates for E-test and a 6 months control.

**Key words:** cervical cytology – PAP test – atrophy – ASCUS – ASC-H in atrophy – estrogen test – proliferation activity – Ki-67 MIB1 positivity

*Čes.-slov. Patol., 44, 2008, No. 1, p. 9–14*

Detekce přednádorových stavů skvamózních intraepiteliálních lézí – SIL (viz seznam zkratk na konci článku) v dlaždicovém epitelu děložního hrdla představuje významný prvek v úsilí o snížení výskytu rozvinutých forem karcinomů této lokalizace. I když vrchol výskytu karcinomu děložního hrdla předchází atrofii dlaždicového epitelu nastávající po menopauze, část pozitivních nálezů spadá právě do tohoto období (14, 18, 24). Rozvíjející se atrofie – po delší či kratší dobu v perimenopauzálním období neúplně vyjádřená – přitom vykazuje některé morfologické cyto-diagnostické znaky blízké těm, jež jsou užívány v rozpoznání SIL, a to zejména tehdy, kdy v obraze navíc interferují zánětlivé změny, které jsou v tomto období časté (1, 2). Hodnocení gynekologických stěrů pacientek s částečnou atrofií je vnímáno jako obtížné (21) a zatížené falešně pozitivními nálezy, jež odrážejí obavu z podhodnocení nejasného obrazu.

V cytopatologické literatuře se tato problematika objevuje intermitentně. Publikované soubory zdůrazňují vyšší podíl ASCUS nálezů zejména v neúplných atrofiích (14). V obou verzích Bethesda klasifikace (TBS 1991, TBS 2001), se část atrofických stěrů ocitá v kategorii méně závažných typů ASCUS. V TBS 1991 ASCUS vs. reaktivní, ASCUS možná L SIL představují typy změn, jež byly v TBS 2001 početně redukovány. Nicméně projevy nejasných změn s poruchou maturace vlivem nedostatku estrogenů charakteru dříve ASCUS-H a nyní ASC-H jsou změnou klasifikace dotčeny minimálně. Všechny současné učebnice (6, 10, 17, 26) se shodují v užitečnosti vyzrávacího testu – krátkodobé lokální aplikace estrogenů k ozřejnění nejasných cytologických nálezů (13, 15). I tato relativně nenáročná procedura znamená ovšem opakovaně vyšetření pacientky staršího věku, které je do jisté míry obtěžující, má určité ekonomické náklady a konečně i vlastní metodické limity. Ze všech těchto důvodů se pozornost zaměřuje na možnosti získat více informace z materiálu pořízeného již prvním odběrem. Pomocnou metodou použitelnou již v první době je určení proliferativní aktivity atypických hyperchromních trsů, jež jsou častým cytomorfolo-gickým nálezem pro dg. ASC-H. Postup lze bez problémů použít na LBC materiálu. Z ekonomických důvodů však tato metoda není ve většině zemí včetně ČR dostupná v širokém populačním měřítku. Pozornost jsme proto zaměřili na možnost využití základního získaného klasického stěru. Proliferativní aktivitu v histopatologickém materiálu hodnotíme rutinně v široké řadě zejména onkologických diagnostických situací; používaná protilátka MIB 1 (DAKO) s vizualizací značenou streptavidin-biotinovou koncovkou (LSAB) s vyvoláním DAB poskytuje v našich laboratořích konstantně dobré výsledky. V souladu s publikovanými zprávami o obdobných průkazech ze skandinávských pracovišť (8, 11) jsme se rozhodli ověřit si použitelnost tohoto postupu. V případě předpokládaného přínosu potom definovat užitečnost vřazení testu proliferativní aktivity do diagnostického a sledovacího algoritmu.

## MATERIÁL A METODA

Materiál retrospektivní studie představovaly rutinně hodnocené cytologické nátěry 22 pacientek. Jedenadvacet z nich bylo perimenopauzálních a menopauzálních; jejich nálezy byly 16krát nejisté (ASCUS, popř. ASC-US, ASC-H v některé z obou verzí Bethesda klasifikace, tj. ASCUS různého typu v atrofii), 4krát SIL v atrofii s následnou histologií a 1krát atrofie s negativním cytologickým nálezem. Jedenkrát se jednalo H SIL u mladší pacientky bez atrofie. Celkově bylo revidováno 60 cytologických vyšetření, protože řada pacientek byla s dg. ASCUS vyšetřena cytologicky opakovaně. Po doporučeném vyzrávacím testu (ne vždy na následném vyšetření uvedeném) byly další nálezy v kategorii benigních buněčných změn (NILM). Preparáty byly v souladu s přijatými standardy EFCS/QUATE základně barveny polychromem a montovány krycím sklem.

Vzhledem k okolnosti, že standard gynekologického cytologického vyšetření převzatý oběma zainteresovanými odbornými společnostmi (Společností českých patologů ČLS JEP a Společností klinické cytologie ČLS JEP) ze standardů evropských (UICC) ukládá archivaci tohoto unikátního materiálu (EFCS/QUATE), pořídili jsme v archivačním systému obrazové analýzy LUCIA Net (Laboratory Imaging, Praha) minimálně tři obrázky s diagnosticky významnými záběry dále zpracovávaných nátěrů. Následně byly dokumentované preparáty rozmontovány, odbarveny a podrobeny imunocytochemickému průkazu proliferativní aktivity s protilátkou Ki-67, klon MIB 1 firmy DAKO. Primární protilátka byla použita v ředění 1 : 50, inkubace 70 minut při pokojové teplotě. Detekce provedena systémem DAKO Cytomation LSAB™ + HRP. Vizualizace diamminbenzidinem (DAB – 5 minut). Jádra dobarvena Harrisovým hematoxylinem – 30 sekund. Výsledky byly opět archivovány v systému LUCIA Net.

Vyhodnocení pozitivit jsme prováděli ve čtyřstupňové škále: zcela negativní formace – neg.

ojedinelé pozitivita – x

řídce disperzní pozitivita (méně než 1/3 buněk) – xx

hustě disperzní pozitivita (více než 1/3 buněk) – xxx

## VÝSLEDKY

Jak při archivaci obrazů z preparátů barevných polychromem, tak následně při hodnocení a dokumentaci proliferativní aktivity jsme se soustředili na diagnostické buněčné formace, které byly podkladem pro dg. ASCUS. V naprosté většině se jednalo o kompaktní buněčné formace s vyšším nukleoplazmovým poměrem, hyperchromazií či anizokaryózou. Méně často se jednalo o izolované atypické buňky se zvětšenými jádry, popř. vzhledu dyskeratocytů. Přehled pacientek dle věku, vstupní cytologické diagnózy a semikvantitativního zhodnocení pozitivit MIB 1 podává tabulka 1; biopsické došetření je k dispozici pouze u 7 z nich.